



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eliana Rita de Almeida Barbosa

ESTUDOS PARA ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE  
SENESCÊNCIA CELULAR  
ADEQUADO A *SCREENING* FARMACOLÓGICO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada  
orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e  
pela Doutora Cátia Moreira de Sousa e apresentada à Faculdade  
de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eliana Rita de Almeida Barbosa

**ESTUDOS PARA ESTABELECIMENTO DE UM  
MODELO DE SENESCÊNCIA CELULAR  
ADEQUADO A *SCREENING* FARMACOLÓGICO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e pela Doutora Cátia Moreira de Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021



***Dedicado ao meu Avô.  
Onde estiver, sei que estará orgulhoso***



# Agradecimentos

Chegar ao fim de mais uma etapa, a mais dura e gratificante etapa acadêmica, mas com um enorme sentimento de dever cumprido.

Agradeço à Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes pela oportunidade que me deu ao acolher-me tão bem no laboratório, por toda a orientação, disponibilidade para me ajudar e compreensão ao longo deste ano.

Agradeço à Doutora Cátia Moreira de Sousa, pela ajuda incansável desde o primeiro dia, pela boa disposição que a caracteriza e nos contagia, pela facilidade em me perceber e dar a mão quando precisei.

Aos meus onde quer que estejam.

À minha Mãe, o meu maior pilar, pela coragem, fibra e resiliência que me transmites. Obrigada por seres mãe e pai e por teres essa força avassaladora, para me proporcionares um futuro melhor. A minha essência é a tua marca mais bem construída.

À minha doce e peculiar Irmã Regina, por estares sempre ao meu lado e nunca me deixares desistir de nada. Juntas sempre a trilhar caminhos. O orgulho que sinto ao ver-te crescer é tanto que não me cabe no peito. Obrigada por estares sempre comigo.

Ao meu querido Avô Antíbio, o meu segundo Pai, o meu exemplo de garra, de dureza e sapiência, mas também de amor pela vida, dando-me também a coragem e a força que sempre me foi faltando durante esta etapa. Nunca me irei esquecer daquilo que me disse quando rumei à Universidade, espero tê-lo deixado orgulhoso.

E agora, será um até qualquer dia meu querido e amado Avô. Esta tese também é sua!

Aos meus Irmãos Cátia e Tiago e aos meus Sobrinhos Ricardo e Salvador que me acompanharam nesta caminhada e darem sempre alento para ser mais e melhor, obrigada!

Aos meus anjos da guarda, Pai, Avó Violante, Avó Alice e Avô Quim a quem devo tudo o que sou hoje e a quem sou profundamente grata, que me mostram que mesmo ausentes fisicamente, estão todos os segundos junto de mim. Foi em vós que arranjei forças para me levantar. Receio não vos ter dito as vezes necessárias o quanto vos amava, deixei de estar convosco muitas vezes para lutar por este sonho, e agora aqui estou, no fim da linha, convosco a aplaudir aí de cima.

Um agradecimento muito especial, à minha querida e super especial amiga Carolina. Obrigada por me ouvires, por estares sempre disponível para me amparar quando estou prestes a cair, por fazeres de mim uma melhor pessoa, e por me ensinares que a amizade também é amor. Desculpa as vezes que te falhei durante este tempo.

Às minhas meninas da TOUS, à Joana, Marta, Diana e Carole, que deixei, para poder dedicar-me inteiramente ao Mestrado e de quem tenho imensas saudades. Cresci cada segundo que convosco partilhei, obrigada! P.S. Espero um dia voltar!!

Ao Fábio, o meu companheiro nesta aventura. Ambos abraçámos a vontade de crescer profissionalmente, e assim embarcámos juntos. Obrigada por seres uma das forças do meu leme, sem ti isto teria sido um bocadinho mais difícil. Não importa onde estejamos, ou com quem estejamos, eu irei estar sempre aqui também para te acompanhar e aplaudir.

Às minhas colegas, e agora amigas de laboratório, Inês, Gabriela e Jéssica. Não me canso de agradecer a vocês por estarem sempre prontas a dar-me a mão. Apoiámo-nos, estivemos umas para as outras e isso não vou esquecer, obrigada!

À Myléne, pelas conversas, pelos risos, e pelos ensinamentos que me transmitiste sempre que te pedi opinião. Cresci naquele apertadinho gabinete, não imaginas quanto!

A todos os que se cruzaram no meu caminho desde o ISEC até à FFUC, e que não referi aqui, o meu carinho, cada um de vós deixou certamente uma marca em mim.

Termino com esta dissertação, o meu percurso académico, com a certeza que dei o melhor de mim e que fui muito feliz. Paulatinamente alcancei a meta que mais desejei, obrigada a todos vós do fundo do coração!!



# Lista de Abreviaturas

## A

- Akt** – Proteína Quinase B
- AMP** – Adenosina Monofosfato
- AMPK** – Proteína Quinase Ativada por AMP
- ANOVA** – Análise de Variância
- AP-I** – Proteína ativadora I (fator de transcrição)
- ATP** – Adenosina Trifosfato

## B

- bFGF** – Fator de Crescimento de Fibroblastos
- BCA** – Ácido Bicinconínico
- BRAF** – Homólogo B do oncogénio viral v-Raf do sarcoma murino
- BSA** – Albumina de soro bovino

## C

- CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono
- CXC** – Motif Chemokine
- CXCL1** – CXC Motif Chemokine Ligand 1

## D

- DDR** – Resposta ao dano no DNA
- DMEM** – Meio de Dulbecco Modificado por Eagle
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DOC** – Desoxicolato de sódio
- DPOC** – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

## E

- EDTA** – Ácido N,N,N',N'-etilenodiaminotetracético
- EGTA** – Ácido etilenoglicol-bis ( $\beta$ -aminoetiléter) - N,N,N',N'-tetracético
- ETC** – Cadeia Transportadora de Eletrões
- ERK** – Cinase regulada por sinais extracelulares

## F

- FBS** – Soro fetal bovino

## **G**

**GH** – Hormona de crescimento

## **H**

**H3K9me3** – Lisina 9 trimetilada na histona H3

**HO•** – Radical hidroxilo

**HGF** – Fator de Crescimento dos Hepatócitos

**HMGB<sub>1</sub>** – High Mobility Group box-1

## **I**

**IGF-I** – Fator de Crescimento semelhante à insulina tipo I

**IL-1 $\alpha$**  – Interleucina – I alfa

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina – I beta

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-8** – Interleucina 8

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-15** – Interleucina 15

## **K**

**Ki-67** – Proteína Ki-67

## **L**

**LV** – Luz Visível

## **M**

**mtDNA** – DNA mitocondrial

**mTOR** – Alvo mecanístico da rapamicina

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio

**MEK** – Cinase da AMPK

**MPM** – Marcador de Peso Molecular

**MMPs** – Metaloproteínases da Matriz

**MMP-1** – Metaloproteinase da matriz 1

**MMP-3** – Metaloproteinase da matriz 3

**MMP-9** – Metaloproteinase da matriz 9

**MMP-13** – Metaloproteinase da matriz 13

## **N**

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**NAD<sup>+</sup>** – Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada

**NF- $\kappa$ B** – Fator de transcrição nuclear *kappa* B

**NT** – Células não tratadas

## O

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Anião superóxido

**OIS** – Senescência Induzida por oncogenes

## P

**p16** – Proteína supressora tumoral 16

**p21** – Proteína supressora tumoral 21

**p38MAPK** – Proteína Cinase Ativada por Mitogénios 38

**p53** – Proteína supressora tumoral 53

**pRb** – Proteína do Retinoblastoma

**PI3K** – Fosfatidilinositol - 3 - Quinase

**PBS** – Tampão Fosfato-Salino

**PVDF** – Difluoreto de Polivinilideno

## R

**Ras** – Rat sarcoma

**Rb** – Retinoblastoma

**RAF** – Rat fibrosarcoma

**RI** – Radiação Infravermelha

**RIPA** – Tampão RIPA

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RNS** – Espécies Reativas de Azoto

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigénio

## S

**SASP** – Fenótipo Secretor Associado à Senescência

**SAHF** – Focos de heterocromatina associados à senescência

**SA- $\beta$ -GAL** –  $\beta$ -galactosidase associada à senescência

**SDS** – Dodecilsulfato de Sódio

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

## T

**TBS-T** – Tampão salino Tris-HCl com Tween

**TEMED** – N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

**TERT** – Transcriptase reversa da telomerase

**TGF- $\alpha$**  – Fator de Crescimento Transformante  $\alpha$

**TGF- $\beta$**  – Fator de Crescimento Transformante  $\beta$

**Tris** – 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

## **U**

**UV** – Radiação Ultravioleta

## **V**

**V** – Veículo (0,1% DMSO)

## **X**

**X-Gal** – 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## Resumo

O envelhecimento representa um declínio das capacidades físicas e mentais, e por consequência, sociais, que culmina na deterioração do organismo. Precisamente pela sua importância, torna-se necessário perceber o seu funcionamento e a sua natureza, e a forma como pode afetar órgãos como é o caso específico da pele.

Torna-se particularmente importante encontrar estratégias que impeçam, ou pelo menos retardem o envelhecimento cutâneo, e que visem reduzir o risco de cancro e outras doenças associadas ao envelhecimento, mantendo as funções fisiológicas de barreira e proteção da pele. Por isso, é importante identificar fármacos capazes de impedir ou retardar o envelhecimento cutâneo, sendo necessário utilizar modelos *in vitro* de senescência em células cutâneas, nomeadamente queratinócitos. Assim, a identificação de condições experimentais que permitam induzir senescência numa linha celular de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados, que sejam aplicáveis ao *screening* de compostos hidrofílicos e lipofílicos para identificação de potencial atividade anti-envelhecimento cutâneo foi o nosso foco de interesse.

Os objetivos deste trabalho centraram-se na avaliação da influência de algumas condições experimentais, nomeadamente da concentração do agente indutor, densidade celular e da percentagem de soro fetal bovino (FBS) no meio de cultura celular na indução de senescência na linha de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados, HaCaT.

Para isso, foi usado o *stress oxidativo*, causado por tratamento das culturas celulares com um agente oxidante, o  $H_2O_2$ , para induzir a senescência celular. Como marcadores de senescência, avaliou-se a proliferação celular, a atividade da  $\beta$ -Galactosidase, a expressão de p53 e de Lamina B1, e a área e circularidade dos núcleos, bem como a eventual presença de focos de heterocromatina associados à senescência (SAHF).

Na fase inicial deste estudo, foi realizada a avaliação do efeito de diferentes concentrações de  $H_2O_2$ , na atividade metabólica celular em função da densidade celular, ao fim de 48 horas, 72 horas ou ao fim de 7 dias. Os resultados desses ensaios levaram-nos a selecionar duas densidades celulares, 0,5 e  $0,25 \times 10^5$  células/mL, cultivadas na presença de 0,5 ou 1% FBS para prosseguir com a avaliação do efeito na indução de senescência celular.

Outra variável testada, foi o efeito de adições múltiplas de  $H_2O_2$  ao longo do período de cultura, isto é, o reforço do efeito do  $H_2O_2$  por adição repetida de uma pequena concentração deste oxidante nos dias seguintes à primeira adição. Adicionalmente e dado que a otimização de um modelo experimental de senescência de queratinócitos tem o objetivo de

possibilita a identificação de fármacos capazes de impedir ou, pelo menos, retardar esse processo, testou-se a influência do tratamento das células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de 0,1% DMSO, o veículo mais frequentemente usado para dissolver fármacos lipofílicos.

Os resultados obtidos não permitiram identificar condições de cultura e tratamento das células HaCaT em que se observasse indução de senescência celular, uma vez que a maioria dos marcadores avaliados não apresentaram alterações significativas nas condições testadas. O marcador de senescência que se observou de forma mais consistente, foi a diminuição da proliferação celular em células tratadas inicialmente com 150 µM ou 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Verificaram-se essencialmente os mesmos resultados independentemente da densidade celular, da concentração de FBS no meio de cultura e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada como reforço da inicial.

Verificou-se um aumento da proteína p53 em células tratadas com 100 µM e reforços de 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não tendo o efeito de outras concentrações, embora se observe uma tendência de aumento com as concentrações menores, até 100 µM. Observou-se ainda um aumento dos níveis de Lamina B1 nas células tratadas inicialmente com 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reforços de 20 µM.

Em nenhuma das condições testadas se observou qualquer alteração da morfologia nuclear, incluindo a área e circularidade dos núcleos, e também não se observou a presença de SAHF. Além disso, nas condições testadas, a morfologia, número e intensidade da coloração das células com marcação decorrente da atividade da SA-β-Gal foram idênticos aos das células não tratadas, o mesmo acontecendo nas células tratadas com veículo (0,1% DMSO), na ausência e na presença das várias concentrações e reforços de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e independentemente da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.

Em suma, a indução de senescência celular *in vitro* ou mimetizar o envelhecimento *in vitro* é de elevada importância, pela diminuta quantidade de modelos estabelecidos até à data e daí a necessidade de estabelecer as condições experimentais que permitem induzir as diferentes características do envelhecimento. Os estudos realizados não permitiram identificar as melhores condições a usar num modelo de senescência celular, mas aproximaram-nos um pouco mais.

**Palavras-chave:** Pele; Envelhecimento Cutâneo; Senescência Celular; Stress Oxidativo; Queratinócitos.

## Abstract

Aging represents a decline in physical and mental capacities, and consequently social, which culminates in the deterioration of the organism. Precisely because of its importance, it is necessary to understand its functioning and nature, and how it can affect organs such as the specific case of the skin.

It is particularly important to find strategies that prevent, or at least delay skin aging, and that aim to reduce the risk of cancer and other diseases associated with aging, maintaining the physiological barrier and protection functions of the skin. Therefore, it is important to identify drugs capable of preventing or delaying skin aging, making it necessary to use in vitro models of senescence in skin cells, namely keratinocytes. Thus, the identification of experimental conditions that allow the induction of senescence in a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line, which are applicable to the screening of hydrophilic and lipophilic compounds to identify potential anti-aging activity, was our focus of interest.

The objectives of this work focused on evaluating the influence of some experimental conditions, namely the concentration of the inducing agent, cell density and the percentage of fetal bovine serum (FBS) in the cell culture medium in the induction of senescence in the spontaneously immortalized human keratinocyte line, HaCaT.

For this, oxidative stress, caused by treatment of cell cultures with an oxidizing agent,  $H_2O_2$ , was used to induce cell senescence. As senescence markers, cell proliferation,  $\beta$ -Galactosidase activity, p53 and Lamin B1 expression, and the area and circularity of nuclei were evaluated, as well as the possible presence of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF).

In the initial phase of this study, the effect of different concentrations of  $H_2O_2$  on cell metabolic activity as a function of cell density was evaluated after 48 hours, 72 hours or after 7 days. The results of these assays led us to select two cell densities, 0.5 and  $0.25 \times 10^5$  cells/mL, cultured in the presence of 0.5 or 1% FBS, to proceed with the evaluation of the effect on cell senescence induction.

Another variable tested was the effect of multiple additions of  $H_2O_2$  throughout the culture period, that is, the reinforcement of the effect of  $H_2O_2$  by repeated addition of a small concentration of this oxidant in the days following the first addition. Additionally, given that the optimization of an experimental model of keratinocyte senescence aims to enable the identification of drugs capable of preventing or at least delaying this process, the influence of

treatment of cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of 0.1% DMSO, the vehicle most frequently used to dissolve lipophilic drugs.

The results obtained did not allow the identification of culture and treatment conditions for HaCaT cells in which cell senescence induction was observed, since most of the evaluated markers did not show significant changes in the conditions tested. The most consistently observed marker of senescence was the decrease in cell proliferation in cells initially treated with 150 μM or 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essentially the same results were verified irrespective of cell density, FBS concentration in the culture medium and the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added as a booster to the initial one.

There was an increase in p53 protein in cells treated with 100 μM and 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> boosters, not having the effect of other concentrations, although a trend of increase was observed with lower concentrations, up to 100 μM. An increase in Lamin B1 levels was also observed in cells initially treated with 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 20 μM boosters.

In none of the conditions tested, any alteration in nuclear morphology was observed, including the area and circularity of the nuclei, and the presence of SAHF was also not observed. Furthermore, under the conditions tested, the morphology, number and intensity of staining of cells with labelling due to SA-β-Gal activity were identical to those of untreated cells, the same happening in cells treated with vehicle (0.1% DMSO), in the absence and presence of the various concentrations and boosts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and independently of cell density and FBS concentration in the culture medium.

In short, the induction of cell senescence in vitro or mimicking in vitro aging is of great importance, due to the small number of models established to date and hence the need to establish experimental conditions that allow inducing the different characteristics of aging. The studies carried out did not allow us to identify the best conditions to use in a cell senescence model, but they brought us a little closer.

**Keywords:** Skin; Skin aging; Cellular Senescence; Oxidative Stress; Keratinocytes.



# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Imagem representativa das camadas da pele e estruturas anexas.....	4
<b>Figura 2</b> - Influência de fatores intrínsecos e extrínsecos no envelhecimento cutâneo. ....	7
<b>Figura 3</b> - Marcadores de senescência celular na pele jovem e na pele envelhecida.....	16
<b>Figura 4</b> - Mecanismos de formação de ROS que potenciam o aparecimento de doenças associadas ao envelhecimento. ....	18
<b>Figura 5</b> - Proliferação e senescência celular causada por indutores de senescência celular em fibroblastos.....	20
<b>Figura 6</b> - Mecanismos de envelhecimento intrínseco e extrínseco com impacto no stress oxidativo. ....	22
<b>Figura 7</b> - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 7 dias no número de células metabolicamente ativas – Influência do reforço com 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura. ....	40
<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 7 dias nos níveis de p53 e Lamina B1 – Influência do reforço com 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.....	43
<b>Figura 9</b> - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na área e circularidade dos núcleos – Influência da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.....	46
<b>Figura 10</b> - Avaliação do efeito do reforço com 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na proliferação celular, em função da concentração inicial de agente oxidante, da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura. ....	48
<b>Figura 11</b> - Avaliação do efeito de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com três reforços de 20 µM nos níveis de p53 e Lamina B1. ....	49
<b>Figura 12</b> - Avaliação do efeito de diferentes concentrações iniciais de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com reforço de 40 µM na proliferação celular, na ausência e na presença de 0,1% DMSO.....	50
<b>Figura 13</b> - Avaliação do efeito de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com três reforços de 40 µM nos níveis de p53 e Lamina B1.....	51
<b>Figura 14</b> - Avaliação do efeito de diferentes concentrações iniciais e reforços de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na actividade da SA-β-Gal. ....	53
<b>Figura 15</b> - Avaliação do efeito da adição de veículo e diferentes concentrações iniciais e reforços de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na actividade da SA-β-Gal em células HaCaT.....	54

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> - Algumas estratégias atualmente disponíveis para prevenção ou retardamento de envelhecimento cutâneo .....	23
---	----

# Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	VII
<b>Resumo</b> .....	XI
<b>Abstract</b> .....	XIII
<b>Índice de Figuras</b> .....	XV
<b>Índice de Tabelas</b> .....	XVI
<b>Capítulo I: Introdução</b> .....	I
I. Introdução Geral .....	3
I.1. Pele.....	4
I.1.1. Funções e Estrutura da pele.....	4
I.2. Envelhecimento Cutâneo .....	7
I.2.1. Envelhecimento Intrínseco.....	8
I.2.2. Envelhecimento Extrínseco .....	8
I.3. Características do Envelhecimento .....	9
I.3.1. Exaustão de Células Estaminais .....	9
I.3.2. Alteração da Comunicação Intercelular .....	10
I.3.3. Erosão dos Telômeros.....	10
I.3.4. Alterações Epigenéticas .....	11
I.3.5. Disfunção Mitocondrial .....	12
I.3.6. Perda de Proteostase.....	13
I.3.7. Alterações da Detecção de Nutrientes.....	13
I.3.8. Instabilidade Genômica.....	14
I.3.9. Senescência Celular .....	15
I.4. <i>Stress</i> Oxidativo.....	20
I.4.1. Papel do <i>Stress</i> Oxidativo no Envelhecimento Cutâneo.....	21
I.5. Estratégias para retardar o envelhecimento cutâneo .....	22
<b>Capítulo 2: Objetivos</b> .....	25
2. Objetivos .....	27
<b>Capítulo 3: Materiais e Métodos</b> .....	29
3.1. Manutenção e Tratamento da Cultura Celular .....	31
3.2. Avaliação da atividade metabólica celular como indicador de proliferação .....	31
3.3. Preparação de Extratos Totais .....	32
3.4. Quantificação de proteína de extratos totais pelo método do ácido bicinonínico (BCA) .....	33
3.5. Western Blot.....	33
3.6. Avaliação da Atividade da $\beta$ -Galactosidase.....	34
3.7. Avaliação da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência.....	35
3.8. Análise Estatística.....	35

<b>Capítulo 4: Resultados</b> .....	37
4.1. Influência da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , da densidade celular e da concentração de FBS na capacidade proliferativa das células HaCaT .....	39
4.2. Influência da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , percentagem de soro e densidade celular nos níveis das proteínas p53 e Lamina B1 .....	41
4.3. Influência da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , percentagem de soro e densidade celular na morfologia nuclear.....	44
4.4. Avaliação do efeito do reforço com 20 ou 40 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na proliferação celular e níveis de p53 e Lamina B1, em função da concentração inicial de agente oxidante.....	47
4.5. Influência da concentração inicial de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e dos reforços na atividade da β-galactosidase associada à senescência.....	52
<b>Capítulo 5: Discussão de Resultados e Conclusões</b> .....	55
<b>Capítulo 6: Referências Bibliográficas</b> .....	59

# **Capítulo I:** **Introdução**



# I. Introdução Geral

O envelhecimento da população mundial é uma questão societal de grande relevância e os cuidados de saúde que permitem atualmente verificar um aumento da esperança média de vida, levantam inúmeras questões relacionadas com a importância de se encontrarem estratégias que possam melhorar a qualidade de vida enquanto se envelhece. Em Portugal, o índice de longevidade, definido como a relação entre a população mais idosa e a população idosa, estima-se ser de 48,7% em 2020, um número muito superior ao verificado em 1961, de 33,6% (*PORDATA - Indicadores de envelhecimento*).

O envelhecimento faz parte de nós, e com o avançar do tempo as marcas deste processo degenerativo e lento são mais visíveis, especialmente ao nível da pele onde se verifica um declínio mais evidente. Esta torna-se cada vez mais seca, vai perdendo firmeza, e o aparecimento de rugas e algumas manchas é uma consequência direta (Zhang e Duan, 2018).

Encontrar soluções que permitam o desenvolvimento de tratamentos associados ao envelhecimento cutâneo são um desafio constante, com várias frentes de investigação que procuram respostas, para a prevenção de doenças associadas à pele, como o cancro de pele. A busca por uma aparência mais jovem, mais cuidada, e mais saudável, que ofereça à população um maior bem-estar, mas fundamentalmente uma maior e melhor qualidade de vida é particularmente importante para a nossa existência individual e na sociedade.

A prevenção ou retardamento do envelhecimento cutâneo começa nos hábitos que adotamos, no uso de proteção solar, na cessação tabágica e de consumo de álcool, mantendo a pele o menos possível sujeita a agressões do exterior (Cao *et al.*, 2020).

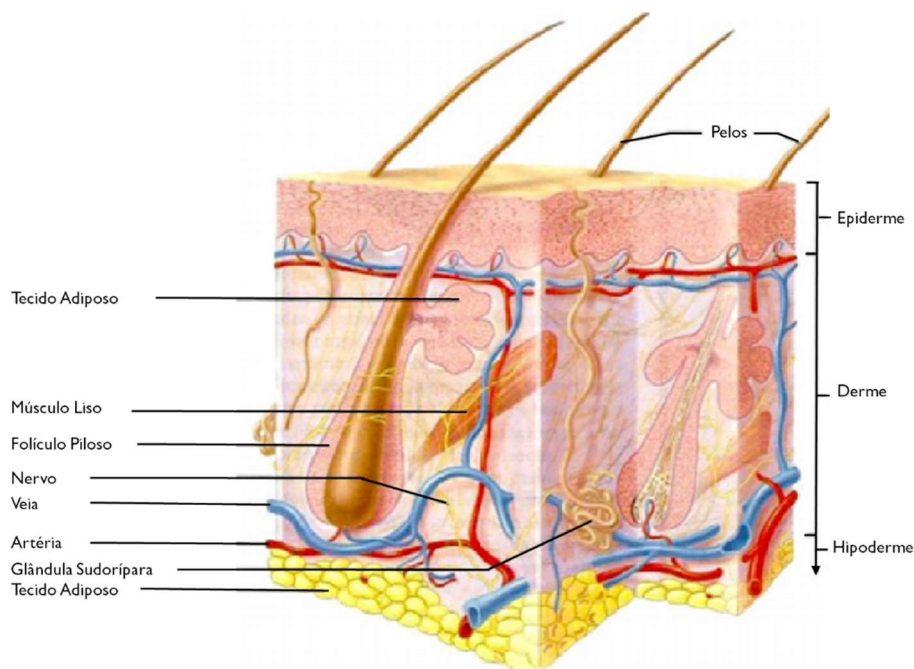
No entanto encontrar estratégias farmacológicas que permitam retardar ou prevenir esse envelhecimento carece de uma pesquisa contínua, de forma a suprimir necessidades terapêuticas e preventivas que ainda não estão resolvidas.

## I.1. Pele

### I.1.1. Funções e Estrutura da pele

A pele é o maior e mais flexível órgão do corpo humano. É complexa, apresenta elasticidade e resistência e encontra-se em contínua renovação pela sua capacidade de autorregeneração, no entanto, esta função pode ficar comprometida quando sujeita a lesões graves. É uma barreira primária impermeável que, no seu todo, confere proteção contra agressões exteriores, sejam estas ambientais, químicas, físicas ou microbiológicas e que apresenta também funções sensoriais, ao nível metabólico, imunitário e também de manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e de síntese de vitamina D (Zouboulis e Makrantonaki, 2011).

A pele encontra-se segmentada por três principais camadas, a epiderme, a derme e a camada subcutânea ou hipoderme, representadas na Figura 1, cada uma com funções específicas.



**Figura 1 – Imagem representativa das camadas da pele e estruturas anexas** (adaptado de Seeley R, Stephens T, 2016).



### **I.I.I.I Epiderme**

A epiderme é uma camada membranosa e semitransparente, mais exterior, não possui vasos ou terminações nervosas e é composta por células epiteliais que são altamente especializadas, os queratinócitos, que representam cerca de 95% da massa celular da epiderme (Johansen, 2017). Resultam da divisão e diferenciação de uma camada basal de células progenitoras que se dividem e se vão diferenciando em queratinócitos que à medida que mais células se vão formando, vão subindo em direção à superfície, sendo a camada mais superficial da epiderme, uma camada constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, com o citoplasma repleto de queratina - a camada córnea. A sua principal função é manter a integridade estrutural da epiderme, criando uma barreira com o exterior (Johansen, 2017; Seeley R, Stephens T, 2016).

A epiderme é constituída por diversas camadas, o estrato córneo, o estrato lúcido, o estrato granuloso, o estrato espinhoso (ou de Malpighi) e o estrato basal, sendo aquele que se encontra mais à superfície, o estrato córneo (Seeley R, Stephens T, 2016).

Além dos queratinócitos como células integrantes da epiderme, que representam 90%-95% das células da pele, existem mais três tipos de células, as Células de Langerhans, cerca de 2%, as Células de Merkel com a menor percentagem de cerca de 0,5% e os Melanócitos cerca de 3% (Tobin, 2017). As células de Langerhans são células dendríticas constituintes do sistema imunitário e apresentadoras de antígenos, capazes de os captar e apresentar aos linfócitos T, ativando-os, encontrando-se maioritariamente na camada espinhosa da epiderme. As células de Merkel, são mais do que um mecanorreceptor, interagindo com terminações nervosas, tendo também um papel neuro-endócrino e que se encontram fixadas entre os queratinócitos que estão dispostos na membrana basal (Bangert, Brunner e Stingl, 2011; Eckhart, Tschachler e Gruber, 2019). Os melanócitos produzem um pigmento escuro, a melanina, que origina a cor da pele, do cabelo e dos olhos do ser humano, e que confere proteção contra a radiação UV (Seeley R, Stephens T, 2016; Steinman, 1991).

Na epiderme também se encontram os apêndices cutâneos, que são estruturas anexas da pele, como os pelos, as unhas e as glândulas sebáceas e sudoríparas (Thomas e Burkemper, 2013).

### **I.1.1.2. Derme**

Depois da epiderme, encontra-se a derme, com cerca de 3-4mm de espessura ricamente vascularizada constituída por tecido conjuntivo que inclui macrófagos, fibras de colagénio, elastina, adipócitos e também fibroblastos que conferem resistência e elasticidade à pele formando uma densa matriz. Para além desta matriz extracelular, a derme é constituída por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, glândulas sudoríparas e folículos pilosebáceos (compostos pelo folículo piloso e por glândulas sebáceas) (Chambers e Vukmanovic-Stejic, 2020; Khavkin e Ellis, 2011; Seeley R, Stephens T, 2016; Tobin, 2017).

A derme encontra-se dividida em duas camadas distintas, a camada papilar, mais à superfície e a camada reticular, mais profunda, sendo esta considerada a principal camada de derme (Seeley R, Stephens T, 2016). A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio e de elastina, formando um tapete de fibras irregulares, resistentes à distensão por muitas direções. Por outro lado, a camada papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma papilas dérmicas, isto é, evaginações que penetram na epiderme (Seeley R, Stephens T, 2016).

A derme é também responsável pela conexão da epiderme à hipoderme, pelo que as fibras de colagénio garantem a resistência e suporte à pele, e as fibras de elastina, garantem a elasticidade que necessitam para sustentar a ligação. O colagénio, como uma das proteínas mais abundantes do corpo humano é o principal componente estrutural da derme, sendo produzido por elementos celulares do tecido conjuntivo, os fibroblastos. À medida que se envelhece, há um aumento das fibras de colagénio que se tornam menos solúveis e desorganizadas, influenciando a síntese de colagénio, que por sua vez, diminui (Tobin, 2017).

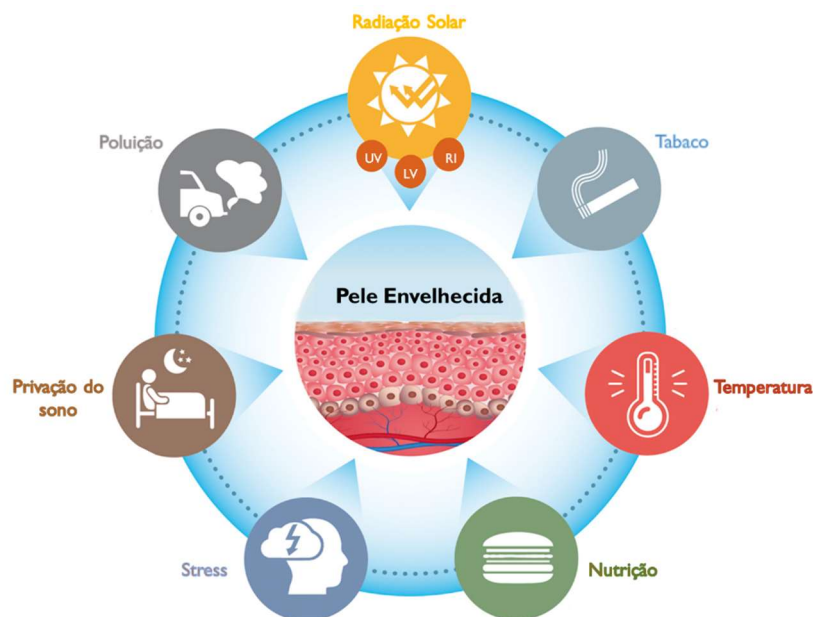
### **I.1.1.3 Hipoderme ou Camada Subcutânea**

A Hipoderme ou Camada Subcutânea confere isolamento térmico, funciona como reserva energética, e é maioritariamente composta por tecido adiposo com fibras de colagénio e elastina, não sendo considerada parte integrante da pele. Funciona como um alicerce de fixação principalmente da derme, ligando-a aos tecidos subjacentes (Baroni *et al.*, 2012; Seeley R, Stephens T, 2016).

## 1.2. Envelhecimento Cutâneo

A pele é um dos órgãos onde o envelhecimento se torna mais evidente. Além de alterações estéticas que contribuem significativamente para a alteração da autoimagem, podendo ter impacto a nível psicológico, o envelhecimento cutâneo está associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cancro cutâneo, dificuldade na cicatrização de feridas e perda da integridade como barreira protetora, além de muitas outras patologias (Chambers e Vukmanovic-Stejic, 2020; Grönniger *et al.*, 2010).

O envelhecimento cutâneo é um processo complexo progressivo e pode assim ser induzido por fatores intrínsecos, influenciados maioritariamente por mecanismos genéticos e hormonais. Também fatores extrínsecos ou ambientais, induzem o envelhecimento cutâneo, nomeadamente radiação solar, tabagismo, entre outros. Estes fatores encontram-se representados na Figura 2 (Tobin, 2017; Zhang e Duan, 2018).



**Figura 2 – Influência de fatores intrínsecos e extrínsecos no envelhecimento cutâneo.** A exposição solar, tabagismo, temperatura ambiental elevada e poluição, são alguns dos fatores extrínsecos, que juntos ou separados de fatores intrínsecos como, maus hábitos alimentares, stress e privação do sono potenciam o envelhecimento cutâneo (*adaptado de Krutmann et al., 2017*).

### **1.2.1. Envelhecimento Intrínseco**

O Envelhecimento Intrínseco varia de pessoa para pessoa, já que está relacionado com fatores genéticos, mas também metabólicos acompanhados de alterações neuroendócrinas, resultantes de um processo fisiológico lento (envelhecimento) (Tobin, 2017). Com o avançar da idade, este processo é impulsionado pelo encurtamento dos telómeros, stress oxidativo, danos no DNA ou inflamação (Tobin, 2017; Zhang e Duan, 2018).

De forma mais notória pode ser observado, numa idade mais avançada, onde a pele se apresenta com rugas de cariz mais profundo, com textura frágil e seca, e alguma palidez. A espessura da junção derme/epiderme sofre uma diminuição acentuada, devido ao facto da epiderme se tornar mais fina, ocorrendo menos trocas de nutrientes e uma menor capacidade de proliferação e renovação de células basais (Tobin, 2017; Zhang e Duan, 2018; Zouboulis et al., 2019).

### **1.2.2. Envelhecimento Extrínseco**

O envelhecimento extrínseco ou envelhecimento acelerado por fatores ambientais, como a designação indica, é um processo resultante de várias condições que interligadas aceleram o envelhecimento cutâneo, como o tabagismo, os maus hábitos alimentares, e principalmente, com maior peso, a exposição prolongada à radiação solar (Baumann, 2007; Tobin, 2017).

As alterações mais visíveis ao nível da pele induzidas pelos fatores extrínsecos encontram-se no rosto, nas mãos e também no pescoço, pois estão maioritariamente mais sujeitos a estas agressões (Makrantonaki e Zouboulis, 2008).

A radiação ultravioleta solar em conjunto com a radiação infravermelha e a radiação visível potenciam o envelhecimento cutâneo, designando-se este processo por fotoenvelhecimento. As radiações solares apresentam espectros alargados, podendo ser divididas em radiações ultravioleta de acordo com o seu comprimento de onda, como a UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (200-280nm) (Gu et al., 2020; Tobin, 2017). As radiações UVC não atingem a crosta terrestre pois são filtradas na estratosfera e são extremamente perigosas apresentando elevada capacidade mutagénica (Gu et al., 2020). As radiações UVB atingem a crosta terrestre e são bastante agressivas pois podem chegar a interagir diretamente com o DNA, atingindo a epiderme de forma intensa, por ser a camada da pele mais superficial, e por consequência a mais direta, encontrando-se estas radiações, na génese de queimaduras solares e da grande maioria dos cancros cutâneos (Gu et al., 2020).

As radiações UVA tal como as UVB atingem a crosta terrestre, possuem uma elevada permeabilidade e podem chegar até à hipoderme quando a exposição a esta radiação é muito prolongada (Gu *et al.*, 2020; Lim, Arellano-Mendoza e Stengel, 2017; Tobin, 2017).

### **1.3. Características do Envelhecimento**

A nível celular e molecular, o envelhecimento caracteriza-se por algumas alterações que se encontram inter-relacionadas, como a exaustão de células estaminais, a alteração da comunicação intercelular, a instabilidade genómica, a diminuição do comprimento dos telómeros e perda de capacidade proliferativa (erosão dos telómeros), as alterações epigenéticas, a perda de proteostase, a desregulação nos processos de deteção de nutrientes, a disfunção mitocondrial e a senescência celular (López-Otín *et al.*, 2013).

#### **1.3.1. Exaustão de Células Estaminais**

As células estaminais são células que se reproduzem e diferenciam em várias outras células que desempenham inúmeras funções no nosso organismo, no entanto à medida que se envelhece a capacidade de se renovarem e transmitirem informação genética, igual à da célula mãe, vai-se perdendo e diminui também a capacidade de regeneração dos tecidos. A perda das funções inerentes e também a diminuição do seu número é caracterizada como um processo de exaustão de células estaminais (Ren *et al.*, 2017). Isto acontece devido a questões de natureza metabólica, por serem mais expostas a danos e lesões, como danos no DNA e alterações epigenéticas, como a perda de metilação da lisina 9 na histona 3, atrito físico de telómeros e mudanças na estrutura da heterocromatina (Ren *et al.*, 2017; Ruzankina e Brown, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

O aumento da expressão de genes supressores tumorais como o p16<sup>INK4A</sup>, um regulador do ciclo celular que inibe a sua progressão, e do gene p53, envolvido também na regulação do ciclo celular, reparação do DNA, apoptose e envelhecimento, é potenciado pelos danos causados nomeadamente ao nível do DNA, que por consequência, pode tornar as células estaminais senescentes, isto é, incapazes de proliferar e portanto de reparar os danos tecidulares e de se auto-renovarem (Ren *et al.*, 2017; Rufini *et al.*, 2013).

A perda de funcionalidade destas células tem impacto no envelhecimento, em particular no envelhecimento cutâneo, nomeadamente na epiderme, diminuindo a capacidade de renovação do epitélio e de cicatrização de feridas (Velarde *et al.*, 2015).

### **1.3.2. Alteração da Comunicação Intercelular**

Como uma das características associadas ao envelhecimento, a alteração da comunicação intercelular envolve mudanças quer de células endócrinas, quer de células neuronais ou até neuroendócrinas, que tende a desregular a sinalização neuro-hormonal, como por exemplo o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o sistema adrenérgico, e o sistema da sinalização insulina/IGFI (López-Otín *et al.*, 2013).

Uma das alterações associadas à comunicação intercelular, que acompanha o envelhecimento, é a inflamação (López-Otín *et al.*, 2013). Este processo pode resultar de diversas causas, como a indução a partir de espécies reativas de oxigénio (ROS) que levam à oxidação dos lípidos que constituem a membrana plasmática das células da epiderme, a ativação do fator de transcrição “Fator Nuclear- $\kappa$ B” (NF- $\kappa$ B), a inibição da capacidade autofágica, ou surgir pelo facto de as células senescentes secretarem citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  ou a IL-6 (Gu *et al.*, 2020; Kumari e Jat, 2021; Zhang e Duan, 2018).

A inflamação está também envolvida no desenvolvimento e progressão de doenças crónicas como, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade, que contribuem e se correlacionam com o envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013; Mendes, Cruz e Gualillo, 2018).

Também na pele a comunicação intercelular desempenha um papel importante, visto que os diversos tipos de células que compreendem este órgão, comunicam entre si, tornando-a mais eficaz (Choi, Kil e Cho, 2020). Descobertas recentes, mostraram que a inflamação associada ao envelhecimento cutâneo inibe a função de células estaminais da epiderme, que deixam de funcionar normalmente, e apresentam incapacidade de tolerar fatores de *stress* (Doles *et al.*, 2012; López-Otín *et al.*, 2013).

### **1.3.3. Erosão dos Telómeros**

Os telómeros são estruturas protetoras presentes nas extremidades dos cromossomas, consistindo em sequências de cadeias duplas de DNA não codificante, com a sequência repetitiva TTAGGG, podendo conter até 15000 pares de bases (Axelrad, Budagov e Atzmon, 2013; Victorelli e Passos, 2017). A sequência TTAGGG é sempre a mesma, no entanto, o número de repetições, varia de individuo para individuo e até entre células do mesmo individuo (Gomez *et al.*, 2012).

Em cada divisão celular, a replicação do DNA resulta na perda de alguns pares de bases dos telómeros que assim, vão ficando mais curtos (Victorelli e Passos, 2017). Quando o tamanho dos telómeros atinge um limiar crítico, a divisão celular cessa e ocorre a morte das

células, que explica a capacidade proliferativa limitada em algumas culturas celulares (López-Otín *et al.*, 2013; Victorelli e Passos, 2017).

A telomerase é uma ribonucleoproteína composta por uma subunidade catalítica, TERT, e também uma sequência de RNA que serve de modelo para a adição de unidades repetidas da sequência de nucleótidos TTAGGG, promovendo a compensação da perda de nucleótidos que ocorre ao longo de ciclos replicativos, mantendo o comprimento dos telômeros constante (Campisi e D'Adda Di Fagagna, 2007; Gomez *et al.*, 2012). Esta enzima encontra-se ativa em células estaminais e também em células tumorais, no entanto a sua expressão em células somáticas diferenciadas é muito baixa (Gorgoulis *et al.*, 2019).

Em consequência da diminuição da expressão e atividade da enzima, os telômeros começam a encurtar de forma progressiva e cumulativa à medida que as células se dividem, e biologicamente este encurtamento tem impacto subsequente no envelhecimento (Axelrad, Budagov e Atzmon, 2013; Vera e Blasco, 2012). No entanto o papel que a telomerase tem no envelhecimento da pele ainda não se encontra bem esclarecido, com algumas evidências a demonstrarem que a sua atividade se encontra aumentada na epiderme após a exposição a radiação ultravioleta ou a inflamação, e que os telômeros encurtam na epiderme com o envelhecimento (Buckingham e Klingelutz, 2011).

Telômeros que apresentam tamanho reduzido em humanos ou que apresentem algum tipo de disfunção estão associados ao desenvolvimento de diversas patologias como a disqueratose congénita, onde a manutenção do seu comprimento é importante para a homeostase da pele, e também a outras doenças como a de Alzheimer, cancro, anemia aplástica, diabetes e doenças cardiovasculares, entre outras que podem em último caso levar à morte (Harley *et al.*, 2011; Vera e Blasco, 2012).

### **1.3.4. Alterações Epigenéticas**

As células e tecidos vão sofrendo diversas alterações ao longo da vida que contribuem para o processo de envelhecimento. Entre essas, destacam-se as alterações epigenéticas que incluem alterações nos padrões de metilação do DNA, modificações pós-tradução nas histonas e a remodelação da cromatina. A metilação do DNA e a modificação de histonas alteram a disponibilidade do DNA para a ligação de proteínas, interferindo no processo de transcrição, visto que a primeira ativa ou silencia os genes e a segunda ocorre devido a modificações pós-tradução, como metilação ou fosforilação (Fuks, 2005; López-Otín *et al.*, 2013; Unnikrishnan *et al.*, 2019).

As células da pele apresentam diversas alterações epigenéticas relacionadas com a idade e com a exposição a diversos fatores ambientais. Vários estudos demonstraram que os níveis de metilação do DNA diminuem com a cultura de fibroblastos *in vitro*, o que sugere que a hipometilação do DNA evidenciada em literatura, possa ser um marcador molecular de envelhecimento, e que alterações nos padrões de metilação do DNA, nomeadamente a diminuição da metilação tem impacto sobre a epiderme (Bormann *et al.*, 2016; Grönniger *et al.*, 2010; López-Otín *et al.*, 2013).

### **1.3.5. Disfunção Mitocondrial**

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos presentes em células eucariotas, onde ocorrem processos de produção de energia necessária às células na forma de adenosina trifosfato (ATP) essenciais para as atividades metabólicas e processos de respiração (Kudryavtseva *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2019; Seeley R, Stephens T, 2016).

A disfunção mitocondrial desempenha um papel importante no envelhecimento, nomeadamente no envelhecimento da pele, que se caracteriza por mitocôndrias danificadas, níveis de ROS elevados, ou perda de DNA mitocondrial (mtDNA) (Sreedhar, Aguilera-Aguirre e Singh, 2020). A perda de mtDNA é uma das causas do surgimento de rugas, e de queda de cabelo, que podem ser revertidas restaurando o conteúdo do mtDNA, como verificado em estudos já realizados (Singh *et al.*, 2018).

A função mitocondrial é comprometida à medida que as células envelhecem, e a respiração celular e a geração de ATP tende a diminuir, resultando em mitocôndrias disfuncionais ou elevada produção de ROS (López-Otín *et al.*, 2013). A produção contínua de ROS acontece como um processo normal de fosforilação oxidativa mitocondrial, no entanto a sua produção exagerada desencadeada quer por estímulos externos (por exemplo, radiação) ou na mitocôndria, onde a sua produção é maior, pode causar danos no DNA mitocondrial (Sreedhar, Aguilera-Aguirre e Singh, 2020).

Alterações na cadeia respiratória por consequência, conduzem à produção de menos energia, sendo que essa energia deixa de ser fornecida às células, que por sua vez leva à rutura e degeneração das mitocôndrias, estando associada à potenciação de cancro e envelhecimento, nomeadamente ao nível da pele onde as mitocôndrias desempenham um importante papel na manutenção da sua homeostase, com impacto na diferenciação da epiderme (Sreedhar, Aguilera-Aguirre e Singh, 2020).

É na mitocôndria que se verifica uma maior suscetibilidade a danos oxidativos, apesar de esta conter defesas antioxidantes que permitem controlar o nível de ROS, alguns eletrões



que fazem parte da cadeia transportadora de elétrons (ETC), podem escapar da cadeia e danificam o DNA da mitocôndria, comprometendo a sua estrutura e atividade (Chapman, Fielder e Passos, 2019).

### **1.3.6. Perda de Proteostase**

O envelhecimento está também relacionado com a perda de proteostase (homeostase de proteínas), que compromete a estabilidade e funções do proteoma (Labbadia e Morimoto, 2015). A proteostase tem por objetivo garantir o funcionamento das células, nomeadamente por permitir a estabilização e enrolamento de proteínas, uma correta degradação de proteínas através do lisossoma ou proteassoma e também a autofagia (Liu-Bryan e Terkeltaub, 2015; López-Otín *et al.*, 2013).

A autofagia caracteriza-se por um processo de autodigestão celular em que proteínas ou organelos não funcionais ou desnecessários ao bom funcionamento das células são eliminados através da formação de autofagossomas que se fundem com o lisossoma, onde o seu conteúdo é degradado (Eckhart, Tschachler e Gruber, 2019; Rubinsztein, Mariño e Kroemer, 2011). A sua disfunção é um dos distúrbios da proteostase que caracteriza o envelhecimento cutâneo, e que de acordo com estudos realizados, pode ser verificada em células da pele como os fibroblastos, queratinócitos ou melanócitos. (Eckhart, Tschachler e Gruber, 2019; Martic *et al.*, 2020). A exposição contínua a radiação UVB em fibroblastos ou melanócitos é também, um dos estímulos que leva à alteração da proteostase (Martic *et al.*, 2020).

A perda ou alteração da proteostase no processo de envelhecimento, influenciada por fatores intrínsecos ou extrínsecos, compromete a estabilidade das proteínas provocando danos no seu estado de agregação ou alterações conformacionais que têm um papel preponderante no desenvolvimento das doenças associadas ao envelhecimento como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (López-Otín *et al.*, 2013; Morimoto e Cuervo, 2014).

### **1.3.7. Alterações da Detecção de Nutrientes**

A desregulação na deteção de nutrientes promove o envelhecimento, seja qual for a célula afetada. Este mecanismo acontece devido a alterações no metabolismo, como é o caso da cascata de sinalização intracelular em resposta ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), que é produzido por diversos tipos de células, em resposta à hormona de crescimento (GH), principalmente por hepatócitos (López-Otín *et al.*, 2013; Zouboulis e Makrantonaki, 2012).

A via de sinalização intracelular do IGF-I apresenta recetores comuns com a via induzida pela insulina, com a função de informar as células da presença de glucose, sendo conhecidas como via de sinalização Insulina/IGF-I (López-Otín *et al.*, 2013).

A via de sinalização Insulina/IGF-I é descrita em alguns estudos, como a via de sinalização mais bem conservada ao longo do processo de envelhecimento, sinaliza a partir da via de sinalização iniciada pela PI3K (Fosfatidilinositol 3-Quinase), que ativa a via Akt (Proteína Quinase B), e esta por sua vez ativa a via mTOR (López-Otín *et al.*, 2013; Papadopoli *et al.*, 2019).

No entanto, esta não é a única via, com importância para os sensores de nutrientes, é possível encontrar mais três vias de sensores de nutrientes que são alvo de estudo no processo de envelhecimento, a deteção de altas concentrações de aminoácidos pela via mTOR, a via AMPK que deteta estados de baixa energia a partir da deteção de elevados níveis de AMP, e a deteção de altos níveis de NAD<sup>+</sup> pelas sirtuínas (López-Otín *et al.*, 2013).

Como as alterações da deteção de nutrientes são um mecanismo impulsionador do envelhecimento, alguns autores defendem que a restrição calórica, ou a prática de exercício físico poderá também prevenir ou retardar o envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

Alterações no envelhecimento cutâneo, também se relacionam com a regulação de nutrientes, por exemplo, estudos realizados demonstraram que, o exercício físico controla a expressão de IL-15, a partir da proteína AMPK ativada pelo músculo-esquelético, que é um regulador central do organismo, e que a eliminação de AMPK muscular causa alterações na estrutura da pele (Crane *et al.*, 2015). A estimulação da produção de IL-15 como regulador da função mitocondrial através de exercício físico, pela via AMPK mostrou ser eficaz para retardar o envelhecimento cutâneo, e benéfica na cicatrização de feridas cutâneas com a estimulação do metabolismo mitocondrial que melhora a resposta face à lesão (Crane *et al.*, 2015).

### **1.3.8. Instabilidade Genómica**

A acumulação de danos sucessivos e lesões moleculares, sejam químicas, físicas ou biológicas promovem a instabilidade do genoma, contribuem para o desenvolvimento de doenças, e também para o aceleração do envelhecimento (Li e Vijg, 2012). Esta instabilidade que advém de fatores endógenos ou exógenos, está muito marcada pelas diversas alterações ao DNA (DNA nuclear ou DNA mitocondrial (mtDNA)), rearranjos nos cromossomas, ganhos e perdas cromossómicas, ou encurtamento dos telómeros (López-Otín *et al.*, 2013; Vijg e Montagna, 2017).

Para combater as lesões provocadas, mecanismos que visam a manutenção e funcionalidade do DNA foram criados, com a finalidade de combater os danos provocados ao DNA nuclear (López-Otín *et al.*, 2013). Estes mecanismos, conhecidos com mecanismos de resposta ao dano no DNA (DDR), dividem-se em diversas vias que se encontram interrelacionadas, e que se expressam pelo tipo de lesão provocada no DNA, com o objetivo de detetar os danos e repará-los (Lord e Ashworth, 2012).

### **1.3.9. Senescência Celular**

A senescência celular é definida como uma interrupção do ciclo celular de forma permanente desencadeada em células normais, impedindo-as de proliferarem, em resposta a estímulos intrínsecos e extrínsecos (Kumari e Jat, 2021; López-Otín *et al.*, 2013).

Foi descrita inicialmente como a linha finita de capacidade replicativa de fibroblastos humanos cultivados que se encontravam em divisão e pararam de proliferar, a qual atualmente se designa de senescência replicativa (Hayflick e Moorhead, 1961).

Quando se observa senescência a probabilidade de se observar envelhecimento é muito grande no entanto, a senescência não ocorre apenas no envelhecimento. Recentemente, foi demonstrado que esta tem um papel importante do desenvolvimento embrionário, na cicatrização de feridas e na reparação de tecidos (Chapman, Fielder e Passos, 2019).

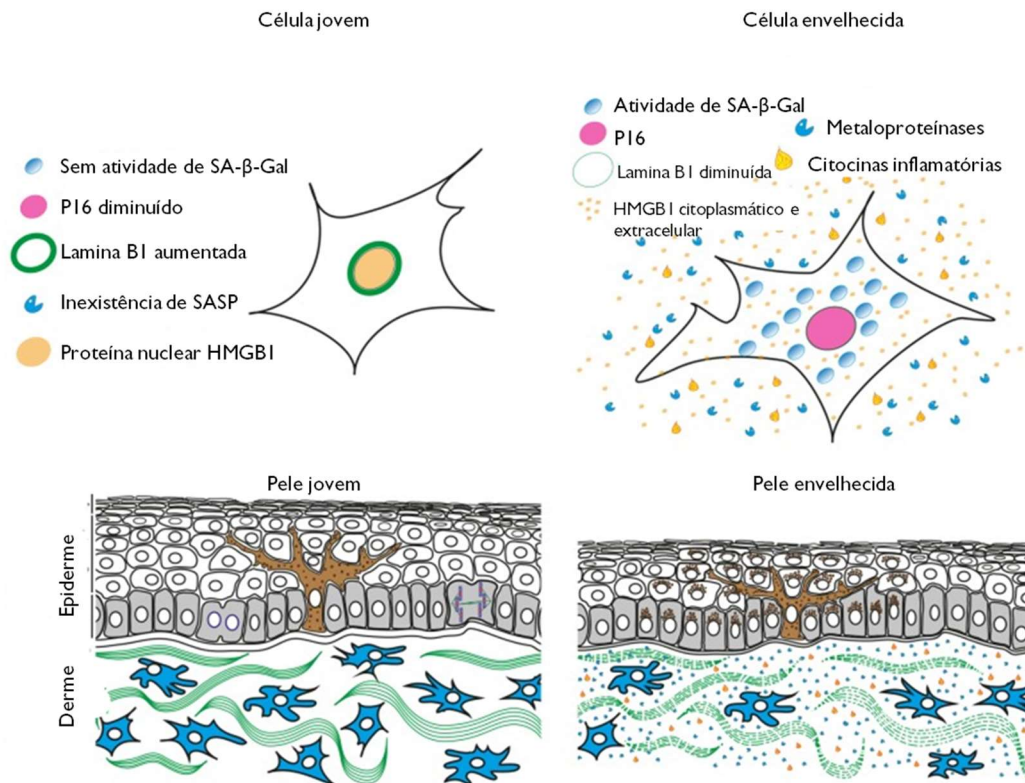
A senescência celular é maioritariamente induzida por fatores que induzem stress oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial, danos no DNA, e ativação inadequada de oncogenes (Fitsiou *et al.*, 2021; Kumari e Jat, 2021). As células senescentes exibem uma capacidade hipersecretora, num processo denominado fenótipo secretor associado à senescência, SASP, que inclui a secreção de várias interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-6), quimiocinas (IL-8 e CXCL1), fatores de crescimento (bFGF e HGF) e proteases (MMP-1,-3 e -13) (He e Sharpless, 2017; Kumari e Jat, 2021). O SASP é particularmente importante pois, desempenha um papel protetor, ativando respostas imunológicas que eliminam células senescentes de tumores e tecidos normais, no entanto, também promove inflamação e disfunção dos tecidos, por exemplo, por ação das proteases e das citocinas (Gorgoulis *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020).

A indução de senescência celular depende de vários fatores, como a ativação de vias supressoras tumorais, como a via p16<sup>INK4a</sup>/proteína de retinoblastoma (Rb) e/ou p53/p21, e a ativação de vias de sinalização com a via p38<sup>AMPK</sup> e NF- $\kappa$ B (He e Sharpless, 2017; Lebrasseur, Tchkonja e Kirkland, 2015). Com a ativação das vias supressoras tumorais, a proliferação celular é inibida, sendo que isto acontece pelo aumento da expressão de p16, Rb, p53 ou p21

que impede a proliferação, pois as células deixam de conseguir dividir-se (He e Sharpless, 2017; Rufini *et al.*, 2013).

Ao acumularem-se na pele, as células senescentes contribuem para diversas alterações cutâneas, entre elas o processo de envelhecimento, impedindo o normal funcionamento de regeneração da pele (Campisi, 1998; Wang e Dreesen, 2018).

Na Figura 3, encontram-se representada a diferença de expressão de alguns marcadores de senescência entre células jovens e envelhecidas.



**Figura 3 – Marcadores de senescência celular na pele jovem e na pele envelhecida.**

Representação de alguns marcadores de senescência celular presentes em células jovens e em células envelhecidas, evidenciando a morfologia celular, o aumento da atividade da β-galactosidase associada à senescência, a expressão positiva de p16, a expressão diminuída de Lamina B1, a translocação de HMGB1 para o citoplasma e espaço extracelular e a secreção de citocinas inflamatórias e metaloproteínas pelo SASP (*adaptado de Wang e Dreesen, 2018*).

A senescência pode ser induzida por fatores intrínsecos desencadeados por um vasto número de divisões das células que originam o encurtamento dos telômeros, definida como senescência replicativa, ou induzida por fatores extrínsecos quando exposta a agentes oxidantes (senescência celular induzida por stress), ativação de oncogenes (senescência celular induzida por oncogenes), danos no DNA (senescência celular induzida por danos no DNA) ou disfunção das mitocôndrias (senescência celular induzida por disfunção mitocondrial).

## **I.3.9.1 Tipos de Senescência Celular**

### **I.3.9.1.1 Senescência Replicativa**

A senescência replicativa inicialmente descrita por Leonard Hayflick e Paul Sidney Moorhead, é caracterizada pela perda irreversível da capacidade de proliferação das células e depende de diversas condicionantes como a idade e o tipo de células (Campisi, 1996; Hayflick e Moorhead, 1961).

À medida que se vão reproduzindo, as células perdem a capacidade de se multiplicarem, à qual está também associada um encurtamento dos telómeros (Sharpless e Sherr, 2015; Vargas *et al.*, 2012). A senescência replicativa pode ser observada em células da pele como queratinócitos e fibroblastos (Despres *et al.*, 2019; Rheinwald *et al.*, 2002).

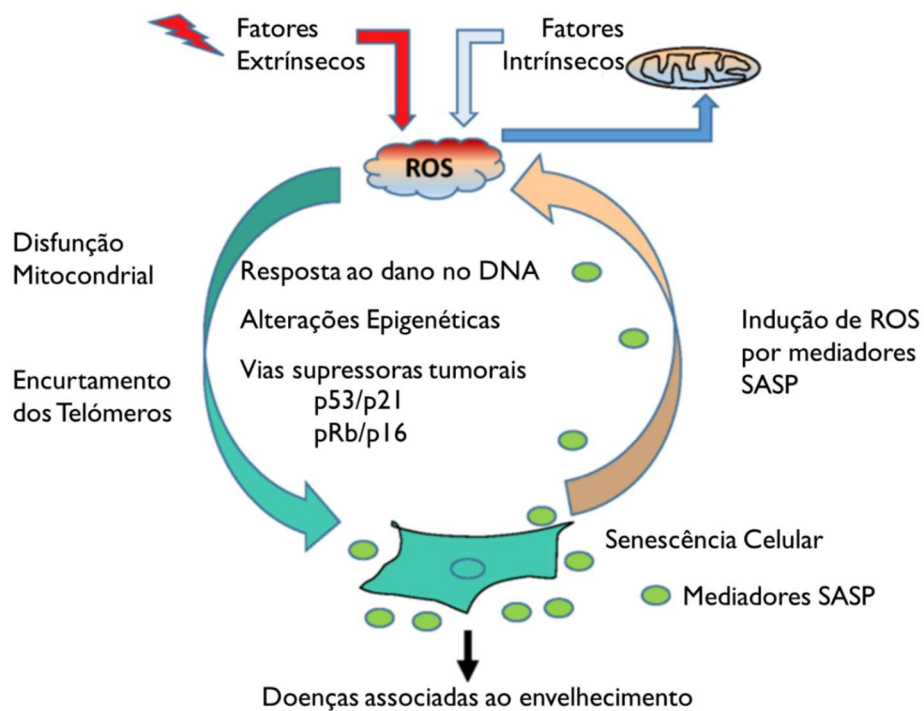
### **I.3.9.1.2 Senescência Celular induzida por Stress**

O mecanismo de *stress* oxidativo, é desencadeado por diversos fatores extrínsecos como a radiação ionizante ou ultravioleta, reações químicas ou por fatores intrínsecos, como, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou a disfunção mitocondrial, que levam à indução de senescência (Hernandez-Segura, Nehme e Demaria, 2018; Kourtis e Tavernarakis, 2011).

A relação entre o *stress* oxidativo e a senescência celular foi estabelecida inicialmente a partir do uso de antioxidantes como forma de tratamento, atrasando ou prevenindo a senescência (Muñoz-Espín e Serrano, 2014).

Se os níveis de ROS aumentarem de forma significativa, a capacidade antioxidante diminui, isto acontece, como consequência dos diferentes tipos de stress, como danos no DNA, ativação de oncogenes ou perda de funções dos telómeros. Este aumento, induzido pela cascata RAS – RAF – MEK – ERK ativa a via p38 AMPK, levando a um aumento da atividade transcricional de p53 e regulação positiva de p21 (Muñoz-Espín e Serrano, 2014).

Mecanismos que potenciam a formação de ROS encontram-se na Figura 4.



**Figura 4 – Mecanismos de formação de ROS que potencializam o aparecimento de doenças associadas ao envelhecimento.** Fatores Intrínsecos ou Extrínsecos desencadeiam a produção de ROS, que por sua vez, induzem a senescência celular como resposta a danos no DNA. A disfunção mitocondrial e o encurtamento dos telômeros são resultado dos fatores que induzem a produção de ROS, e que por consequência aumentam a senescência celular. A senescência celular, desencadeia a expressão de mediadores SASP, que por sua vez induzem a produção de ROS, levando a que este processo se torne um ciclo e leve ao aparecimento de doenças associadas ao envelhecimento (adaptado de Pole, Dimri e P. Dimri, 2016).

### 1.3.9.1.3 Senescência Celular induzida por Oncogenes

A senescência induzida por oncogenes (OIS) é uma resposta celular que limita a replicação, em células que expressam oncogenes (Zhu *et al.*, 2020).

Oncogenes são genes capazes de provocar a transformação neoplásica de células por induzirem a sua proliferação, dando lugar a tumores. São a forma mutada dos proto-oncogenes, cuja passagem a oncogenes, por mutação, translocação cromossômica ou transdução viral, determina com carácter dominante uma desregulação celular de carácter proliferativo (Seeley R, Stephens T, 2016).

A senescência induzida por oncogenes (OIS) envolve a ativação de vias de sinalização como Ras, BRAF, Akt, mTOR, p38MAPK e vias de resposta ao dano, desencadeados pelos genes supressores tumorais p53 e RB (Liu, Ding e Meng, 2018; Yaswen e Campisi, 2007). Estudos realizados, mostraram que os níveis de expressão de oncogenes são importantes para a indução de OIS, com a evidência de que a super-expressão, por exemplo de Ras, induzia a senescência (Liu, Ding e Meng, 2018). Foi também demonstrado que a acumulação de genes

supressores de tumores, p53 e RB, são dois dos principais reguladores intrínsecos de OIS, e que p38AMPK, bem como PI3K/Akt/mTOR mediam as respostas de OIS (Liu, Ding e Meng, 2018).

#### **1.3.9.1.4 Disfunção Mitocondrial associada à senescência**

Recentemente, foi demonstrado que mitocôndrias disfuncionais, podem induzir senescência celular em células que se encontrem em cultura ou *in vivo*, no entanto, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos que levam à indução de senescência (Wiley *et al.*, 2016).

As mitocôndrias oxidam NADH em NAD<sup>+</sup>, mas se estas se encontrarem num estado disfuncional podem diminuir a razão NAD<sup>+</sup>/NADH. Assim, perturbações observadas nas mitocôndrias podem causar um fenótipo de senescência, MiDAS (senescência associada à disfunção mitocondrial), potenciado por uma diminuição de NAD<sup>+</sup>/NADH (Wiley *et al.*, 2016).

Outro exemplo de disfunção mitocondrial que foi demonstrado, foi a ativação da proteína quinase ativada por 5'AMP (AMPK), um importante sensor bioenergético, que por sua vez ativa a expressão de p53 durante a disfunção mitocondrial, e que pode levar à indução de senescência (Gallage e Gil, 2016; Wiley *et al.*, 2016).

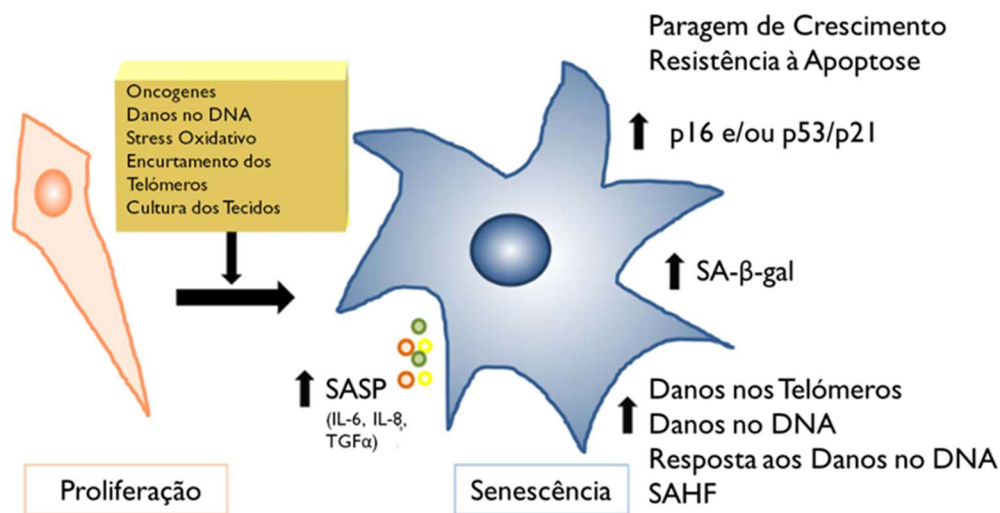
#### **1.3.9.2 Marcadores de Senescência Celular**

Várias características verificadas em células senescentes permitem a sua identificação e são, por isso, usadas como marcadores de senescência, como a diminuição da proteína Ki-67, um marcador de proliferação celular, alterações do níveis de Lamina B1, o aumento da expressão de genes supressores tumorais p53, p16 e p21, observação de alterações na forma e volume do núcleo, a atividade da enzima lisossomal β-galactosidase associada à senescência (SA-β-Gal), a expressão de metaloproteínases da matriz (MMPs), e citocinas pro-inflamatórias como a IL-6, IL-8 e IL-10 (González-Gualda *et al.*, 2021; Hernandez-Segura, Nehme e Demaria, 2018; Soto-Gamez e Demaria, 2017; Wang e Dreesen, 2018).

A β-Galactosidase é uma enzima lisossomal que hidrolisa β-galactosídeos em monossacarídeos e cujo pH ótimo é aproximadamente 4. Em células senescentes, a expressão e atividade desta enzima aumentam significativamente, sendo possível diferenciar células senescentes de células normais através da hidrólise de substratos cromogénicos a pH não ótimo, geralmente em condições de pH=6. A atividade da SA-β-Gal é o biomarcador mais amplamente utilizado na identificação de células senescentes *ex vivo* e *in vitro* (Fuhrmann-Stroissnigg *et al.*, 2019; González-Gualda *et al.*, 2021; Itahana, Itahana e Dimri, 2013). O corante

fluorescente Hoechst 33342 reage com o DNA e permite a contagem do número de células, e a visualização da morfologia nuclear por microscopia.

As respostas aos danos no DNA, stress oxidativo, e outros indutores de senescência celular, são caracterizadas pelo aumento da atividade da SA- $\beta$ -Gal, fatores SASP, como citocinas pró-inflamatórias, pela formação de focos de heterocromatina associadas à senescência (SAHF), a expressão de supressores tumorais p16, p53 ou p21, e outros, que se encontram representados na Figura 5.



**Figura 5 – Proliferação e senescência celular causada por indutores de senescência celular em fibroblastos.** Representação de fibroblastos que se encontram em proliferação e em estado de senescência. Danos no DNA, stress oxidativo, perda ou encurtamento dos telômeros são alguns dos indutores de senescência que potenciam o aumento da atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal), do fenótipo secretor associado à senescência (SASP), de focos de heterocromatina associados à senescência (SAHF), respostas a danos provocados no DNA e supressores tumorais (*adaptado de Noren Hooten e Evans, 2017*).

## 1.4. Stress Oxidativo

O stress oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação excessiva de oxidantes (pró-oxidantes), e a degradação de radicais como espécies reativas de oxigénio (ROS) ou azoto, por antioxidantes (Kristien *et al.*, 2019).

É uma das principais causas de envelhecimento do organismo, com elevado impacto na saúde do ser humano, por alterações da homeostase das células e tecidos, que se perdem quando deixa de haver equilíbrio entre a produção e a degradação de ROS por exemplo (Kristien *et al.*, 2019).



Este mecanismo é um importante indutor do supressor tumoral p53, induzido por espécies reativas de oxigénio (ROS) que incluem radicais livres, como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radicais hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) e moléculas não polares como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e espécies reativas de azoto (RNS), com consequentes danos nas moléculas como nos lípidos, DNA e proteínas. Quando os níveis de oxigénio ativo e de ROS são demasiado altos, a indução de mecanismos de envelhecimento é acelerada, aumentando a susceptibilidade para o surgimento de doenças associadas ao envelhecimento (Chen *et al.*, 2017).

A exposição a agentes de poluição, radiação UV (UVA e UVB), raios X e raios gama, promove a produção de ROS, que ativam fatores de transcrição como a proteína ativadora I (AP-1) e o NF- $\kappa$ B, potenciando o aumento dos níveis de MMPs, nomeadamente MMP1, 3 e 9 em fibroblastos e queratinócitos (Rinnerthaler *et al.*, 2015).

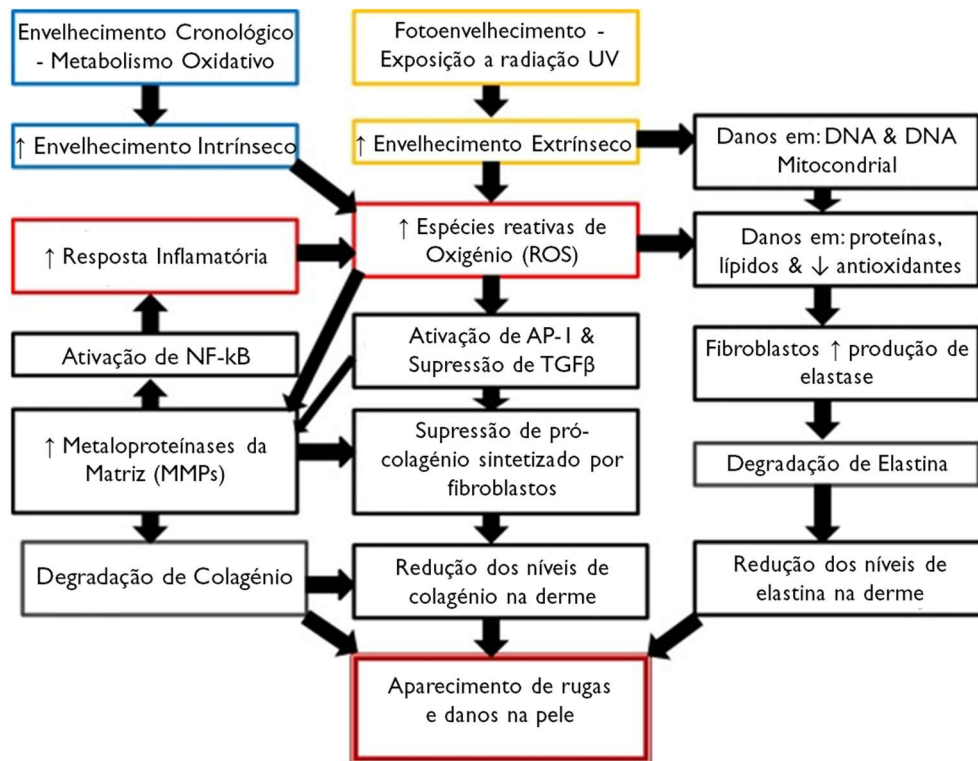
O stress oxidativo está também ligado a diversas doenças, como a diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças renais, DPOC, cancro e outras (Eeden e Sin, 2013; Kristien *et al.*, 2019; Rinnerthaler *et al.*, 2015).

#### **1.4.1. Papel do Stress Oxidativo no Envelhecimento Cutâneo**

O stress oxidativo desempenha um papel importante no envelhecimento cutâneo, associado ao aparecimento de rugas mais expressivas, resultantes das alterações nas funções de genes e proteínas da derme, como o colagénio e elastina, afetando a homeostasia da pele (Lephart, 2016). No entanto, apesar de ser potenciado por fatores externos associados ao envelhecimento extrínseco, também o envelhecimento intrínseco de uma forma inevitável através da produção de ROS via metabolismo oxidativo, acelera o envelhecimento da pele. Quando se encontra exposta a fatores como a exposição à radiação ultravioleta, a produção de ROS aumenta de forma considerável (Kammeyer e Luiten, 2015).

A produção de ROS provoca a ativação de fatores de transcrição como AP-1 que suprime os recetores TGF $\beta$ , e estes por sua vez, bloqueiam a síntese de pró-colagénio que, diminuem os níveis de colagénio na derme (Lephart, 2016). Com a ativação de AP-1, a expressão das MMPs (MMP-1 (colagenase); MMP-3 (estromelesina-1) e MMP-9 (gelatinase B)) é induzida, degradando o colagénio e as fibras de elastina (Lephart, 2016). Ocorre também a ativação do NF- $\kappa$ B que medeia a expressão de citocinas e interleucinas, que, por sua vez, estimulam a produção de mais ROS, num ciclo de *feedback* positivo que conduz ao estabelecimento de um estado de inflamação crónica de baixo grau, característico do envelhecimento e doenças associadas, como se representa esquematicamente na figura 6 (Lephart, 2016).

Com o decorrer destes processos, a matriz extracelular dérmica é degradada, acelerando o aparecimento de rugas e outras marcas de envelhecimento cutâneo (Zhang e Duan, 2018).



**Figura 6 – Mecanismos de envelhecimento intrínseco e extrínseco com impacto no stress oxidativo.** Mecanismos que potenciam o mecanismo de stress oxidativo e que desencadeiam o aparecimento de rugas e pele danificada, com alteração de proteínas estruturais dérmicas como o colágeno e a elastina, a partir de mecanismos de envelhecimento intrínseco e extrínseco. Fatores como NF-kB e a AP-1 são ativados, e TGFβ é suprimido (adaptado de Lephart, 2016).

## 1.5. Estratégias para retardar o envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo e os mecanismos moleculares que lhe estão associados carecem ainda de investigação que possibilite o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas e não farmacológicas que possam retardá-lo (Zouboulis *et al.*, 2019).

Atualmente existem algumas estratégias que podem ser adotadas para prevenir ou retardar o envelhecimento cutâneo, desde as menos invasivas, até às mais invasivas como as cirurgias estéticas. Agentes farmacológicos também têm sido estratégias bastante recorrentes, na composição de cremes anti-envelhecimento, os conhecidos cremes “anti-rugas”, dos quais fazem parte os antioxidantes como vitaminas ou polifenóis, e reguladores celulares como retinóis, e alguns fatores de crescimento (GF) que influenciam a produção de colágeno (Ganceviciene *et al.*, 2012). Também procedimentos invasivos, como as cirurgias estéticas são

das estratégias mais procuradas nos dias de hoje, e têm evoluído constantemente na procura de novas técnicas e aperfeiçoamento de tratamentos anti-envelhecimento (Ganceviciene *et al.*, 2012; Urdiales-Gálvez *et al.*, 2019).

Na Tabela I, encontra-se um conjunto de estratégias que estão disponíveis na prevenção de envelhecimento cutâneo e que podemos facilmente encontrar.

**Tabela I – Algumas estratégias atualmente disponíveis para prevenção ou retardamento de envelhecimento cutâneo** (Ganceviciene *et al.*, 2012; Ramos-e-Silva *et al.*, 2013; Zhang e Duan, 2018; Zouboulis *et al.*, 2019).

<b>Formulações Cosméticas</b>	Fotoproteção associada ao uso de protetores solares	
	Tratamentos por equipamentos não invasivos (laser)	
	Fitocosméticos	
	Cremes Hidratantes	
<b>Agentes Tópicos</b>	Antioxidantes	Vitamina C, E e B3
		Licopeno
		Coenzima Q10
		Retinóides (Vitamina A)
<b>Agentes Sistémicos</b>	Terapias de Substituição Hormonal	
	Terapia com células estaminais	
<b>Medicina Preventiva</b>	Evitar o fumo de tabaco	
	Hábitos Alimentares Saudáveis	
	Uso de plantas como fonte natural de antioxidantes	
	Evitar a exposição a radiação solar	
<b>Cirurgias estéticas</b>	Injeção de Ácido Hialurónico	
	Tratamentos com equipamentos invasivos (laser ablativo e não-ablativo)	
	Correção de rugas	
	Radiofrequência	
	Aumento de pele e contornos	

Apesar de existirem diversas estratégias para retardar o envelhecimento, a sua eficácia é bastante limitada, pelo que continua a existir a necessidade de se continuar a investigar para se compreenderem melhor os mecanismos envolvidos, e se desenvolverem novas estratégias que demonstrem ser mais eficazes.



## **Capítulo 2:** **Objetivos**



## 2. Objetivos

As alterações associadas ao envelhecimento, nomeadamente ao nível da pele, têm sido amplamente estudadas, com a descoberta e pesquisa de mecanismos moleculares que contribuem para estas alterações, no entanto, apesar do que já foi descoberto, ainda há muitas questões por serem esclarecidas, pelo que se torna fundamental continuar a investigá-los (Zhang e Duan, 2018).

O desenvolvimento de novas estratégias capazes de impedir ou pelo menos retardar o envelhecimento cutâneo requer a disponibilidade de modelos *in vitro* e *in vivo* que permitam testar essas estratégias. Assim, o primeiro objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um modelo celular de senescência celular que permita avaliar a eficácia de novos fármacos, tanto hidrofílicos como lipofílicos. Para isso, utilizámos uma linha celular de queratinócitos humanos, a linha HaCaT, e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) como agente oxidante indutor de senescência celular e testámos a influência de diferentes parâmetros (densidade celular, tempo total em cultura, percentagem de soro fetal bovino no meio de cultura, concentração do agente oxidante e frequência de adição desse agente às culturas celulares) na indução desse processo. Como marcadores de senescência celular, avaliámos a proliferação celular, os níveis citoplasmáticos de p53 e Lamina B1, a atividade da SA- $\beta$ -Gal, a área e circularidade dos núcleos, bem como a eventual presença de focos de heterocromatina associados à senescência (SAHF).





## **Capítulo 3:** **Materiais e Métodos**



### **3.1. Manutenção e Tratamento da Cultura Celular**

A linha celular de queratinócitos humanos, HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493), obtidos de pele histologicamente normal e espontaneamente imortalizados, foi cultivada em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - 31600-083, GIBCO), suplementado com Bicarbonato de Sódio (S5761 - Sigma-Aldrich®) e D-(+)-Glucose (S6152 - Sigma-Aldrich®) com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS ; Gibco), inativado a 56°C durante 30 minutos e 1% de antibiótico Penicilina e Estreptomina (GTCO5.0100 - Grisp), mantida a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingirem uma confluência de 70% a 80%, as células foram destacadas com Tripsina 0,05%/EDTA 0,025%, centrifugadas durante 5 minutos a 200G, ressuspensas em meio de cultura fresco e subcultivadas com razões de passagem 1:4, 1:5 ou 1:10.

Cerca de 20 horas após o seu plaqueamento em meio de cultura com 5% FBS e antes da adição do agente oxidante, as células foram sincronizadas por adição de 50% FBS, durante 2 horas. Ao fim desse tempo, o meio de cultura foi substituído por novo meio com 1% ou 0,5% FBS e adicionaram-se as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas nas figuras, tendo-se procedido a adições de reforço (10, 20 ou 40 µM) do 2º ao 4º dias de cultura, mantendo-se nestas condições até ao fim da experiência, num total de 7 dias.

Para avaliação de senescência celular/proliferativa, as células HaCaT foram cultivadas em diferentes densidades, durante 24 horas ou 7 dias e expostas a diferentes concentrações de FBS e de um estímulo oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H1009, Sigma-Aldrich®), numa adição única ou repetida, tal como indicado nas legendas das figuras. Para avaliar a adequação do modelo à avaliação da eficácia de fármacos de natureza lipofílica, as mesmas condições foram também testadas em células tratadas com 0,1% DMSO (v/v) (Sigma-Aldrich®), o veículo mais frequentemente usado para dissolver esse tipo de compostos.

### **3.2. Avaliação da atividade metabólica celular como indicador de proliferação**

Para avaliar o efeito do agente oxidante na capacidade proliferativa das células HaCaT, utilizámos o ensaio de redução da resazurina. Neste ensaio, as células viáveis e metabolicamente ativas incorporam resazurina, um indicador redox permeável, e reduzem este composto a resorufina, de cor rosa intensa e fluorescente. Assim, tanto a absorvância a 570 nm como a fluorescência emitida são diretamente proporcionais ao número de células metabolicamente ativas, sendo por isso, usados tanto como indicadores de viabilidade como de proliferação celular (O'Brien et al., 2000). O significado do resultado depende

essencialmente das condições em que o ensaio é realizado. Assim e para refletir a maior ou menor proliferação das células HaCaT, avaliámos a absorvância do meio de cultura de células cultivadas durante cerca de 24 horas, ou seja, o tempo decorrido entre a colocação das células nas placas de cultura e a adição do agente oxidante ou do veículo. Nestas condições, o resultado obtido reflete o número de células viáveis em cultura imediatamente antes de qualquer tratamento, de modo que qualquer aumento posterior deverá resultar do aumento do número de células e consequentemente refletir proliferação celular, ao passo que qualquer diminuição deverá representar a redução desse número e, portanto, a ocorrência de morte celular.

Para a realização do ensaio, no fim do período de cultura (24 horas após o plaqueamento e 7 dias após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de veículo), o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com meio novo contendo 50 µM resazurina (R7017- Sigma-Aldrich®) a 37°C, em atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>, durante 4 horas.

A absorvância dos sobrenadantes das culturas celulares foi medida em aparelho Biotek Synergy HT plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA), a 570 nm, o comprimento de onda em que a resorufina apresenta absorvância máxima, e a 620 nm (comprimento de onda de referência) (O'Brien *et al.*, 2000; Präbst *et al.*, 2017).

### **3.3. Preparação de Extratos Totais**

No fim do período de incubação, as células foram colocadas em gelo e lavadas com PBS (pH 7,4) duas vezes. Adicionou-se tampão de lise, constituído por tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, (pH 7,5), 5 mM ácido etilenoglicol-bis (β-aminoetiléter) - N,N,N',N'-tetracético (EGTA), 1% Triton X-100, 0,5% desoxicolato de sódio (DOC) e 0,1% dodecilsulfato de sódio (SDS)), suplementado com inibidor de proteases (Complete Mini, Roche Diagnostics, Germany) e inibidor de fosfatases (PhosSTOP, Roche Diagnostics, Germany), durante 30 minutos em gelo. Após esse período, as células foram raspadas e centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. No fim, os sobrenadantes recolhidos foram colocados a -20°C para uso posterior.

### **3.4. Quantificação de proteína de extratos totais pelo método do ácido bicinonínico (BCA)**

A concentração de proteína de cada amostra de extratos totais foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Os sobrenadantes recolhidos na preparação de extratos, foram colocados em gelo, e prepararam-se os padrões de albumina sérica bovina (BSA) (Merck, EMD Milipore Corporation, USA) e o reagente (mistura de sulfato de cobre II a 4% (C2284, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), diluída a 1:50, e ácido bicinonínico (B9643, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)).

Depois de incubar durante 30 minutos a 37°C, a absorvância das amostras foi lida a 570 nm no leitor de placas Biotek Synergy HT plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA). A concentração de proteínas das amostras de extratos totais foi determinada por interpolação na reta de calibração construída com base nas absorvâncias dos padrões de BSA.

### **3.5. Western Blot**

Determinada a concentração de proteína em cada amostra pelo método do BCA descrito anteriormente, utilizaram-se 18 µg de proteína que foram desnaturados numa solução de 20 % Glicerol, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 10% 2-Mercaptoetanol e azul de bromofenol, a 95°C, durante 5 minutos. As proteínas nas amostras foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), durante 60 minutos, a 130 V.

Terminada a electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF, previamente ativadas em metanol, por electrotransferência em sistema húmido, a 350 mA, durante 210 minutos. De seguida, foram colocadas em TBS-Tween 20 (0,1%) com 5% de leite durante duas horas à temperatura ambiente. Após o término do bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal anti - p53 (sc-6243, Santa Cruz) na diluição de 1:500 ou anticorpo policlonal anti - Lamina B1 (ab16048, Abcam) na diluição de 1:1000.

Depois de 6 lavagens com TBS-Tween 20 (0,1%) durante 5 minutos cada, as membranas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário, anticorpo anti-coelho (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:5000. Após incubação com o anticorpo secundário e as subseqüentes lavagens, a deteção dos imunocomplexos foi realizada por reação de quimioluminescência, por aplicação do reagente ECL (#170-5061, Bio-Rad Laboratories, Inc) na superfície da membrana e deteção da luz emitida pelo sistema ImageQuant<sup>™</sup> LAS 500. As membranas foram lavadas novamente com TBS-Tween 20 (0,1%)

e procedeu-se à incubação com o anticorpo monoclonal anti-Actina (Merck, Mab1501) na diluição de 1:20000, durante 1 hora à temperatura ambiente, como controlo de carregamento. Após lavagens com TBS-Tween 20 (0,1%), as membranas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário, anticorpo anti-ratinho (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:5000. A análise das imagens foi realizada com o Software TotalLab TL 120 (Nonlinear Dynamics, Ltd.).

### **3.6. Avaliação da Atividade da $\beta$ -Galactosidase**

Numa placa IBIDI (Ibidi, Martinsried, Germany), de 12 poços, previamente revestida com gelatina 0,1% (Sigma G-2625, Sigma-Aldrich®), após o plaqueamento das células HaCaT, respetivo estímulo e duração do tratamento, conforme as condições indicadas nas legendas das figuras, o meio das células não tratadas e tratadas, foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente. De seguida, as células foram fixadas com Paraformaldeído 4%, durante 3 minutos à temperatura ambiente e lavadas novamente duas vezes com PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente.

De seguida, as células foram expostas a uma solução contendo um substrato da  $\beta$ -Gal, o 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal) que ao ser hidrolisado origina galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol-1. A dimerização deste composto origina um precipitado de cor azul detetável ao microscópio ótico. A realização da reação a um pH superior ao pH ótimo de atuação da enzima permite que a reação enzimática ocorra mais eficientemente nas células senescentes em que a expressão e atividade da enzima estão aumentadas, comparativamente a células normais (González-Gualda *et al.*, 2021). Assim, as células senescentes apresentam o citoplasma corado de azul, podendo a coloração apresentar-se distribuída homogeneamente ou formando aglomerados.

O reagente, preparado imediatamente antes do início do protocolo experimental, é composto por ácido cítrico/tampão de fosfato de sódio (pH 5,8-5,9), ferrocianeto de potássio 5 mM, cloreto de sódio 150 mM, cloreto de magnésio 2 mM e 1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, dissolvido em água.

As células foram incubadas durante a noite numa estufa a 37°C, em atmosfera ambiente, isto é, sem suplementação com CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente, e foi montada uma lamela de vidro com meio de montagem IBIDI (Ibidi, Martinsried, Germany), posteriormente conservada -20°C. As células foram observadas num microscópio morfométrico (Carl Zeiss, Germany) e as imagens

obtidas foram analisadas com recurso ao Software ZEN 3,3 - Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### **3.7. Avaliação da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência**

A morfologia nuclear dos queratinócitos foi analisada por microscopia de fluorescência, pela coloração com Hoechst 33342. Numa placa IBIDI de 12 poços revestida com gelatina 0,1% (Sigma G-2625, Sigma-Aldrich®), após o plaqueamento e respetivo estímulo conforme as condições indicadas nas legendas das figuras, as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) à temperatura ambiente, e fixadas com Paraformaldeído 4% durante 15 minutos, também à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) e coradas com uma solução de Hoechst 33342 (#H3570, Invitrogen) durante 10 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz.

As lâminas foram visualizadas ao microscópio de fluorescência e por cada condição foram capturados vários campos aleatórios até se obterem pelo menos 100 células por condição. As imagens obtidas foram analisadas com o *Software ImageJ*, tendo-se medido a área e a circularidade dos núcleos. Os núcleos foram também observados com o objetivo de identificar a presença de SAHF.

### **3.8. Análise Estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para avaliar a normalidade da distribuição dos resultados, usaram-se os testes de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A significância estatística foi avaliada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Dunnett para comparar várias condições com um controlo e pelo teste t, para comparar dois grupos independentes, às 24 horas e aos 7 dias conforme se encontra nas legendas das figuras.

A análise estatística foi realizada com o Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com valores de  $p < 0.05$ .





## **Capítulo 4:** **Resultados**



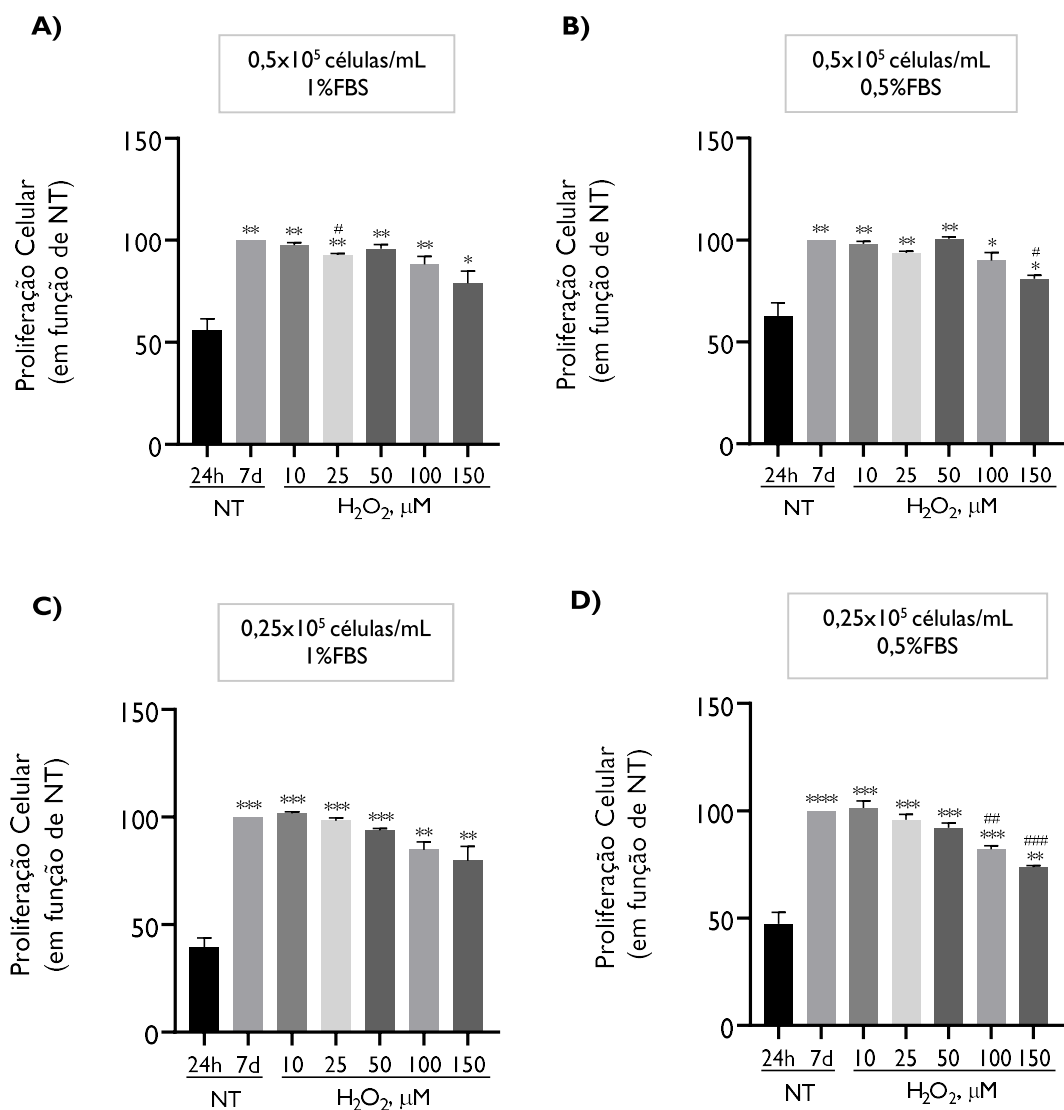
#### **4.1. Influência da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da densidade celular e da concentração de FBS na capacidade proliferativa das células HaCaT**

Na fase inicial deste estudo, foi realizada a avaliação do efeito do tratamento com diferentes concentrações iniciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 48 horas, 72 horas ou 7 dias, na atividade metabólica celular, como descrito na secção de Materiais e Métodos. Avaliou-se também a influência da densidade da cultura celular e da concentração de FBS.

Os resultados desses ensaios levaram-nos a selecionar duas densidades celulares,  $0,5 \times 10^5$  células/mL e  $0,25 \times 10^5$  células/mL, cultivadas na presença de 0,5 ou 1% FBS para prosseguir com a avaliação do efeito na indução de senescência celular de diferentes concentrações iniciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de reforços adicionados repetidamente ao longo do tempo.

Para confirmar se a redução do número de células metabolicamente ativas observada nos ensaios preliminares se devia a inibição da proliferação ou a morte das células, avaliámos a redução da resazurina imediatamente antes da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e no final do tempo total do ensaio, como descrito na secção de Materiais e Métodos.

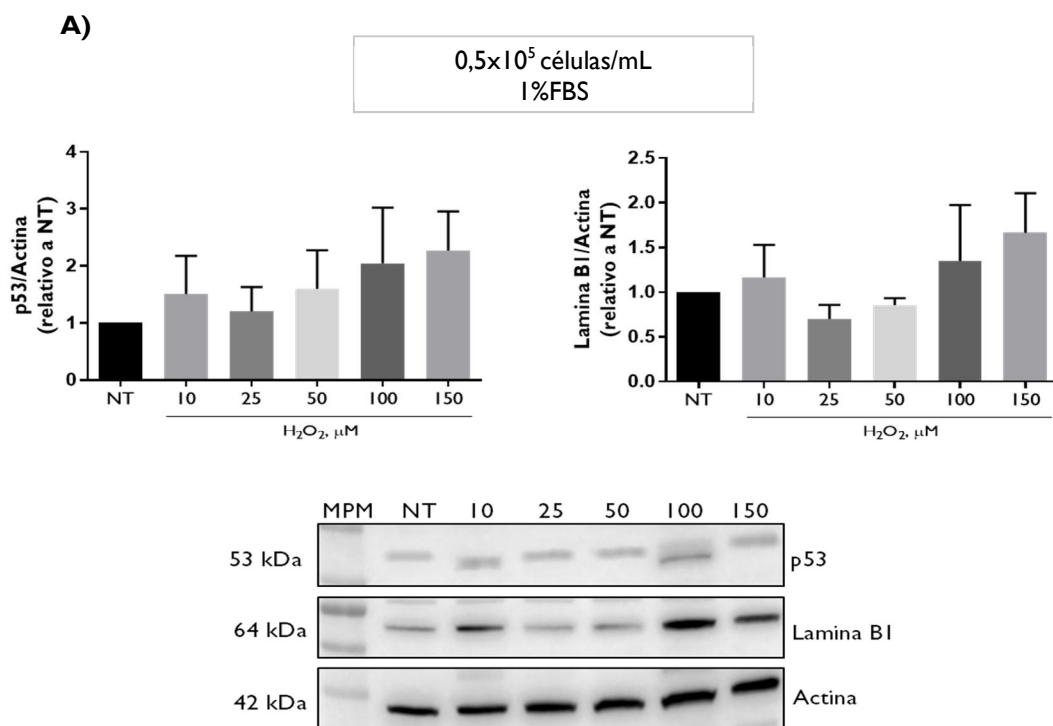
Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que ao fim de 7 dias existiu um aumento significativo na atividade metabólica das células não tratadas indicando que ocorreu proliferação celular. Já nas células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificámos uma pequena redução da atividade metabólica em comparação com as células não tratadas no final da experiência mas, esta atividade metabólica foi muito superior àquela que se observou no início da experiência, imediatamente antes da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostrando por isso que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu a proliferação celular e não induziu a morte (Figura 7). No entanto, a redução da proliferação celular foi em geral pequena.

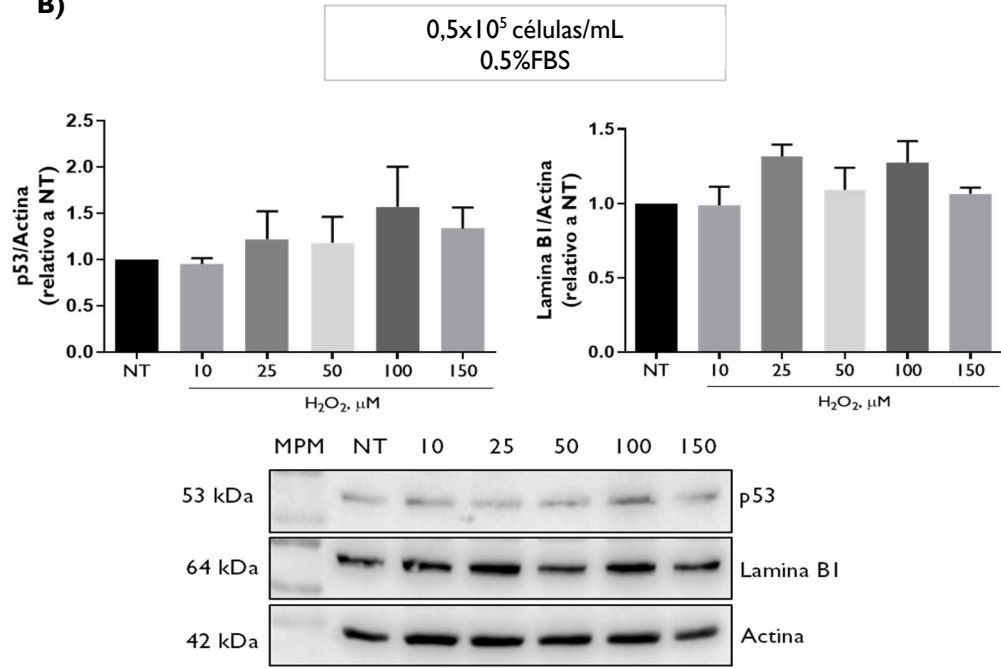
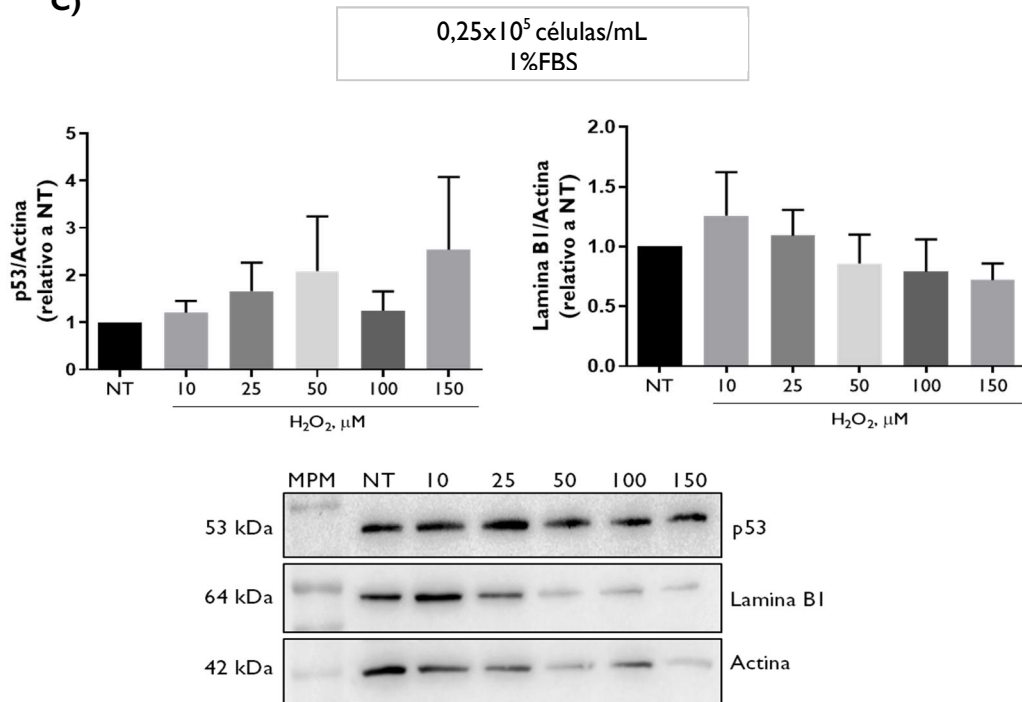


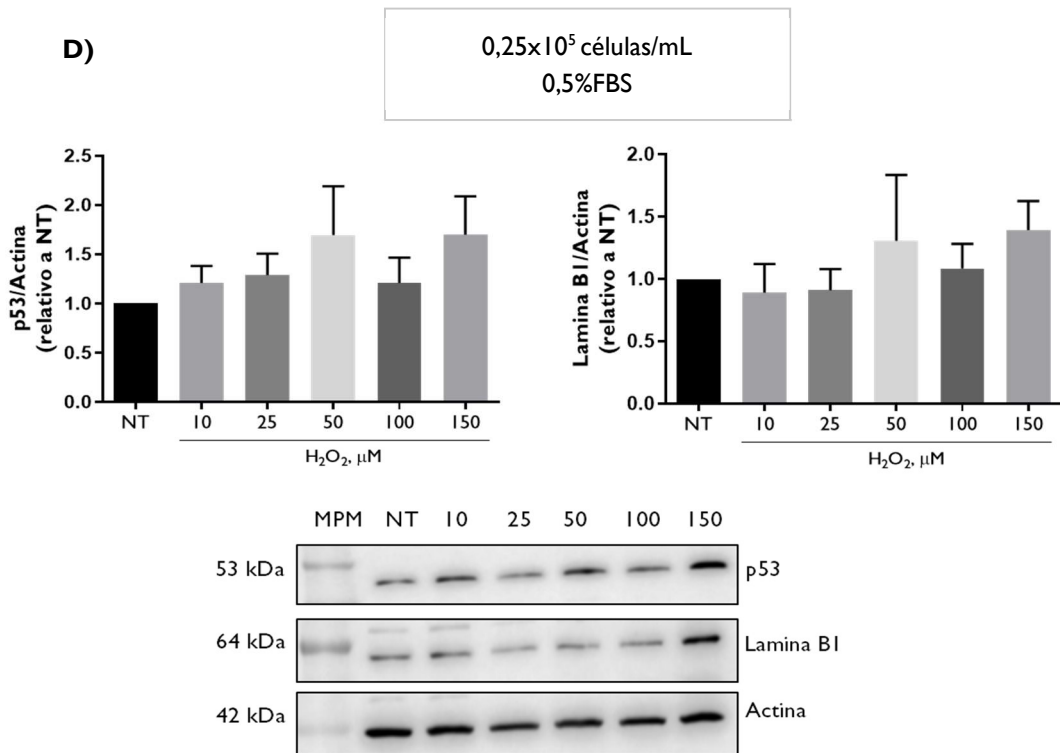
**Figura 7 – Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 7 dias no número de células metabolicamente ativas – Influência do reforço com 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.** O ensaio de redução da resazurina, conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.2), foi realizado imediatamente antes da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isto é, 24 horas após o plaqueamento das células, e 7 dias depois. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas foram adicionadas no dia 0 às culturas celulares com as densidades iniciais e concentrações de FBS indicadas em cada painel. Nos dias 2 a 4 após a adição inicial, foram adicionados mais 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para manter um estado de stress oxidativo prolongado. Os resultados representam a média ± SEM de, pelo menos, três experiências independentes em A), B) e C) e quatro experiências independentes em D). \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001 em relação às células não tratadas às 24horas. # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 relativo às células não tratadas aos 7 dias. NT: células não tratadas.

## 4.2. Influência da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, percentagem de soro e densidade celular nos níveis das proteínas p53 e Lamina B1

É característico das células senescentes o aumento da expressão de p53 e a diminuição de Lamina B1 (Freund *et al.*, 2012; González-Gualda *et al.*, 2021; Mijit *et al.*, 2020). Assim e para confirmar que a redução da proliferação celular observada resultou da indução de senescência celular, avaliámos os níveis destas proteínas por Western Blot em diferentes condições de densidade celular e de concentração de FBS. Os resultados na Figura 8 A, B, C e D mostram uma grande variabilidade nos níveis de ambas as proteínas detetados nas várias condições experimentais indicadas, o que não só impediu a obtenção de resultados estatisticamente significativos como tornou impossível evidenciar qualquer tendência de variação do conteúdo celular nessas proteínas. Isto sugere que nas condições testadas, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não induziu senescência celular.



**B)****C)**



**Figura 8 –Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 7 dias nos níveis de p53 e Lamina B1 – Influência do reforço com 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.** Os níveis de p53, Lamina B1 e Actina (usada como controlo de carregamento) foram determinados por Western Blot, como descrito em Materiais e Métodos (secção 3.5), em extratos totais obtidos de células cultivadas durante 7 dias e não tratadas (NT) ou tratadas no dia 0 com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas e nos dias 2 a 4 após a adição inicial, com 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para manter um estado de *stress* oxidativo prolongado. Nos gráficos, cada coluna representa a média ± SEM dos resultados obtidos em, pelo menos, três experiências independentes em A, B e C e quatro experiências independentes em D. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas. NT: células não tratadas. MPM: Marcadores de Pesos Moleculares.

### **4.3. Influência da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, percentagem de soro e densidade celular na morfologia nuclear**

Diversos estudos mostraram que em células senescentes a circularidade dos núcleos diminui e a área aumenta (Wang *et al.*, 2008; Zhao e Darzynkiewicz, 2013). Além disso, a percentagem de heterocromatina nas células senescentes é maior do que nas não senescentes, formando aglomerados de maior condensação do DNA designados por focos de heterocromatina associados à senescência (SAHF) (Zhang, Chen e Adams, 2007). Assim, utilizámos o corante fluorescente Hoechst 33342 que se liga especificamente ao DNA, para avaliar a área e circularidade dos núcleos, bem como a presença de SAHF, em células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em duas concentrações iniciais diferentes, 25 µM e 100 µM e reforço de 10 µM nos dias 2 a 4 após a adição inicial.

Nestas condições, avaliámos a área e circularidade dos núcleos e a presença de SAHF usando duas densidades celulares, 0,5x10<sup>5</sup> células/mL e 0,25x10<sup>5</sup> células/mL, e duas concentrações de FBS (1% e 0,5%) durante 7 dias de cultura. Observou-se alguma variabilidade na circularidade dos núcleos entre experiências nas mesmas condições, mas em todos os casos a variação em relação às células não tratadas foi muito pequena e não atingiu significado estatístico em nenhuma das condições testadas (Figura 9).

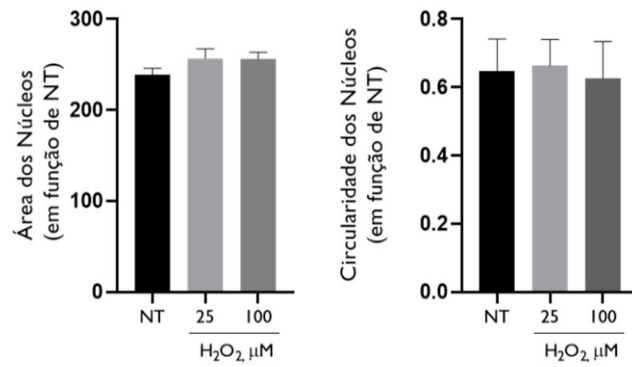
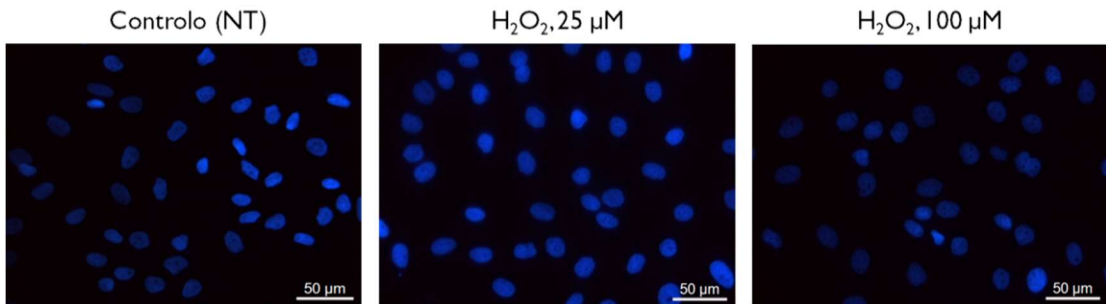
Relativamente à área dos núcleos foi possível verificar um ligeiro aumento em todas as condições (Figura 9) que atingiu significado estatístico nas culturas com a densidade celular inicial de 0,25x10<sup>5</sup> células/mL, cultivadas em meio com 1% FBS e tratadas inicialmente com 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 9 C).

Não se observaram SAHF em qualquer uma das condições testadas, sugerindo a ausência de células senescentes.



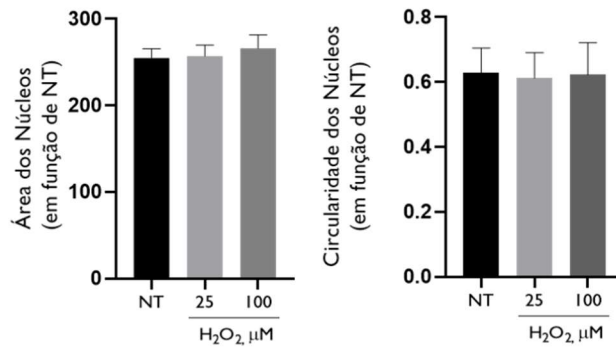
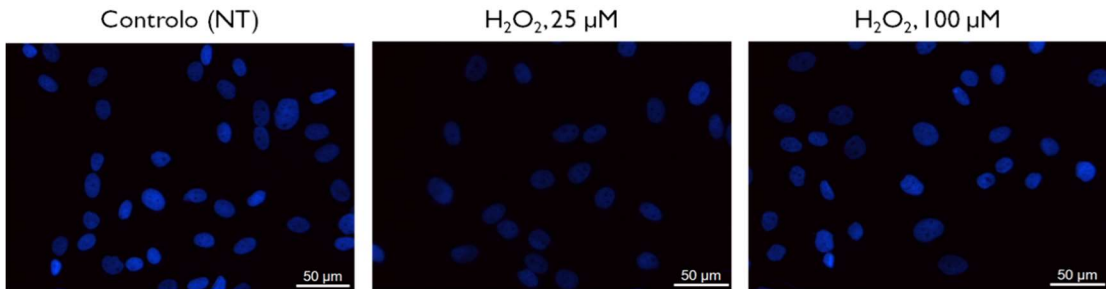
A)

0,5x10<sup>5</sup> células/mL  
1%FBS

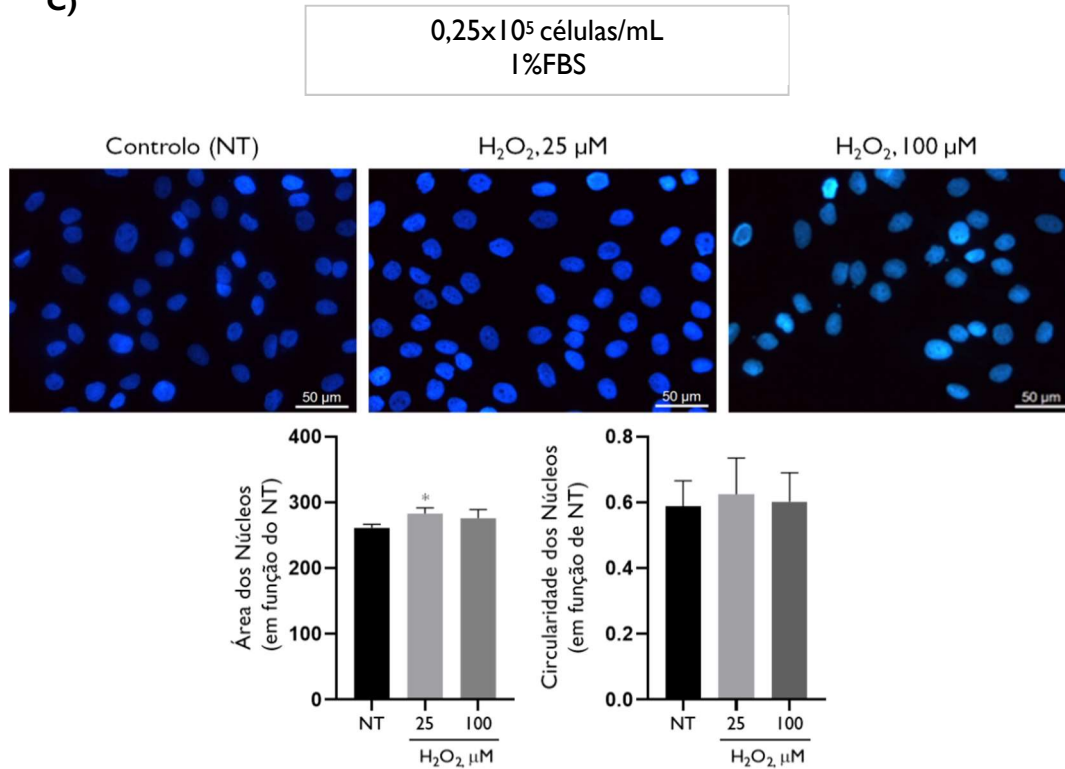


B)

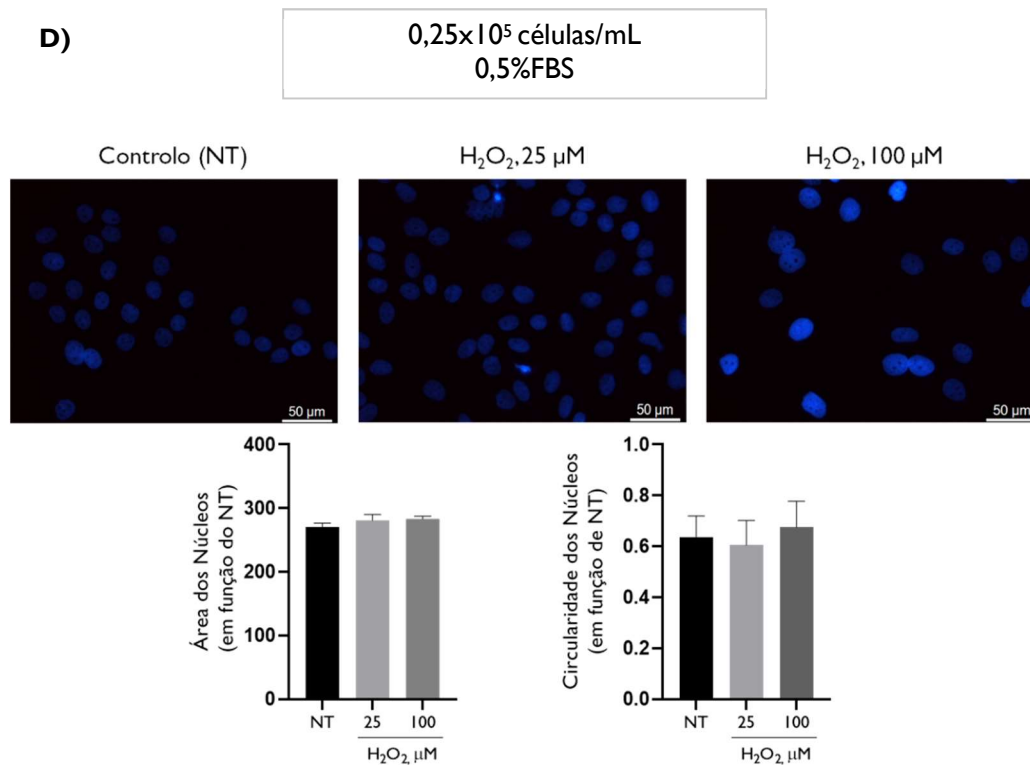
0,5x10<sup>5</sup> células/mL  
0,5%FBS



C)



D)



**Figura 9 – Efeito do tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na área e circularidade dos núcleos – Influência da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.** As células HaCaT nas densidades indicadas foram mantidas em cultura durante 7 dias, sujeitas a tratamento inicial com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas e adição de reforço de 10 μM nos dias 2 a 4. Os núcleos foram corados com corante fluorescente Hoechst 33342 (azul) para

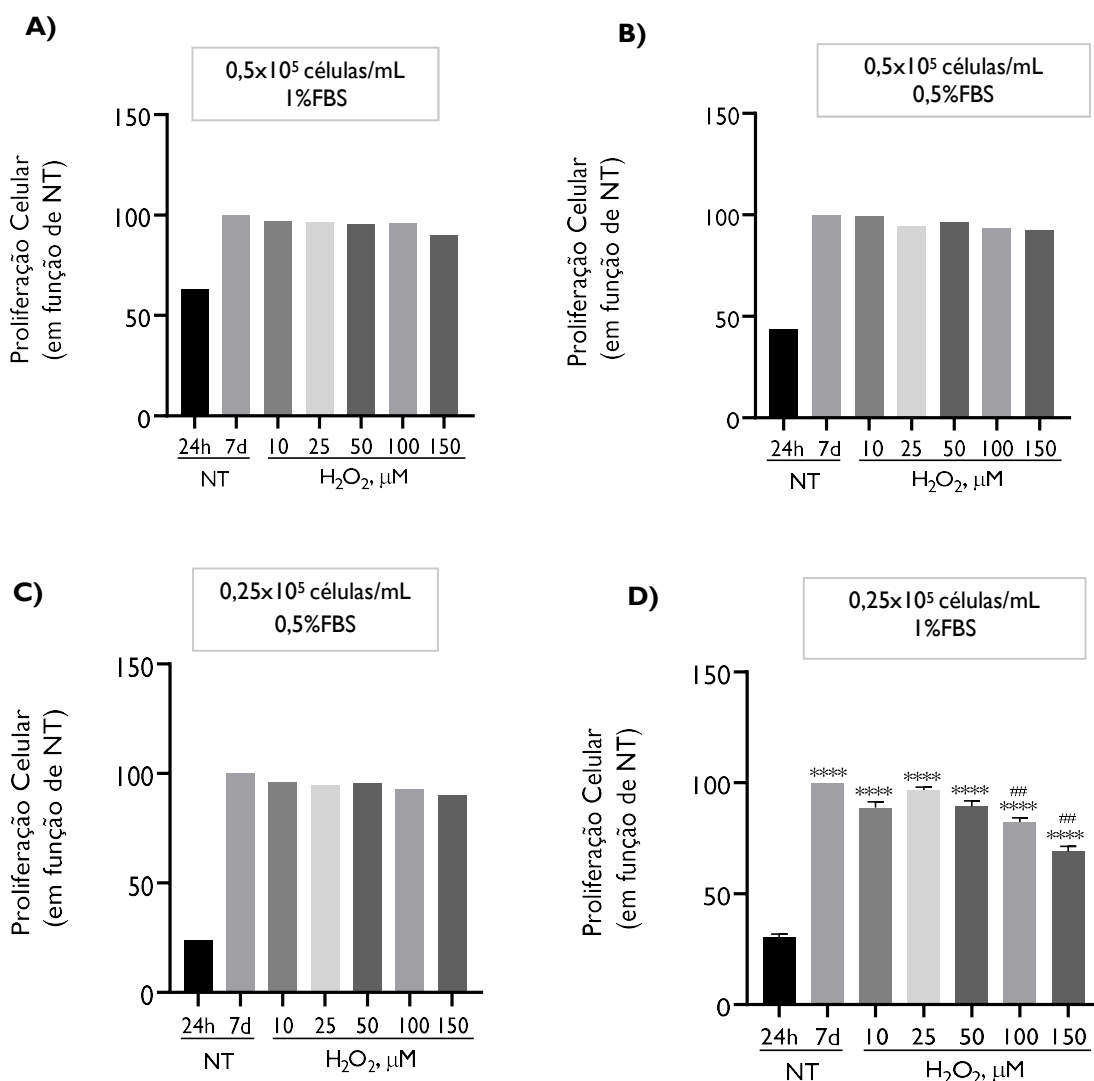
visualização morfológica e a área e circularidade foram avaliadas conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.7). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de quatro experiências diferentes. \* $p < 0.05$  em relação às células não tratadas (NT). As imagens apresentadas são representativas das condições indicadas. Escala, 50  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4. Avaliação do efeito do reforço com 20 ou 40 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ na proliferação celular e níveis de p53 e Lamina B1, em função da concentração inicial de agente oxidante**

Após a realização de ensaios experimentais com três reforços de 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  em dias consecutivos, colocou-se a hipótese de aumentar esses reforços para 20 e 40  $\mu\text{M}$ , pois as diferenças encontradas nos ensaios realizados nas primeiras condições não foram significativas em relação a qualquer um dos marcadores de senescência avaliados. Os reforços com 20 e 40  $\mu\text{M}$ , tal como com 10  $\mu\text{M}$ , foram aplicados do dia 2 ao dia 4 após o tratamento inicial com diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

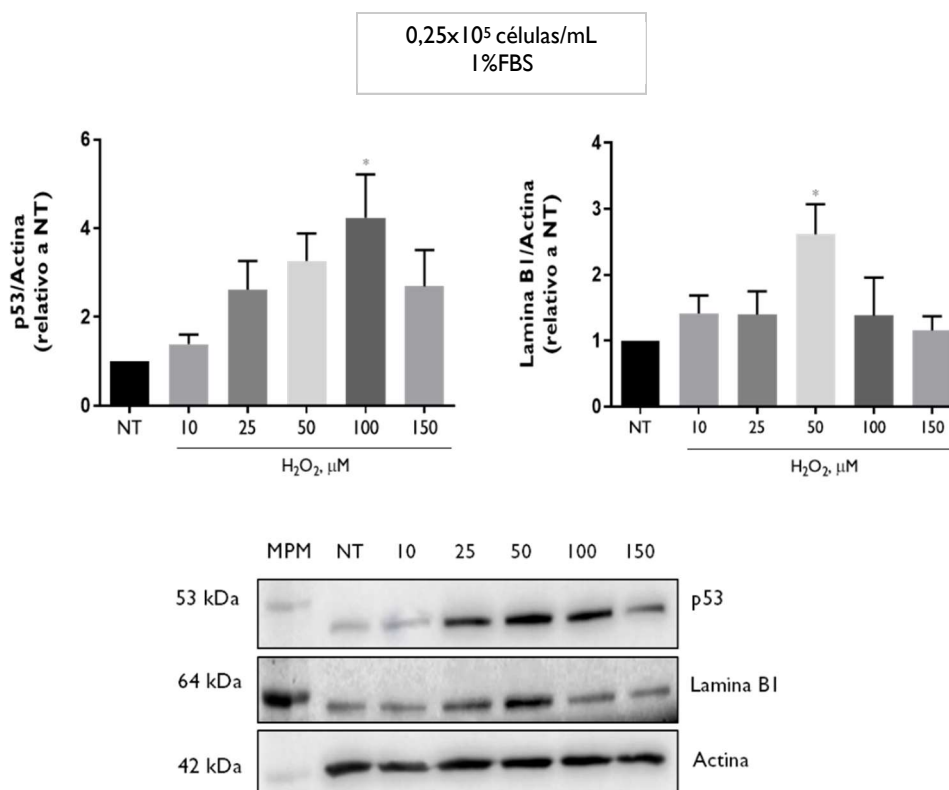
Utilizando as mesmas densidades celulares,  $0,5 \times 10^5$  células/mL e  $0,25 \times 10^5$  células/mL, e as mesmas percentagens de FBS, 1% e 0,5%, avaliou-se a proliferação celular, tal como descrito na secção de Materiais e Métodos e no ponto 4.1 desta secção. Nas culturas com a maior densidade celular e independentemente da concentração de FBS, o tratamento com qualquer uma das concentrações iniciais de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os três reforços de 20  $\mu\text{M}$  não afetou a atividade metabólica comparativamente com as células não tratadas, no final da experiência, mostrando por isso que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não afetou a proliferação nem a viabilidade celular (Figura 10 A e B). Assim, não se repetiu a avaliação destas condições.

Nas culturas com menor densidade celular (Figura 10 C e D), só na presença de 1% de FBS se observaram diferenças significativas entre as células tratadas e não tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nestas condições, verificou-se uma pequena redução de 25,5% e 44,6%, respetivamente do número de células metabolicamente ativas nas culturas tratadas inicialmente com 100 e 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 10 D). Como não se verificaram diferenças significativas na presença de 0,5% de FBS (Figura 10 C), não se repetiu a avaliação desta condição.



**Figura 10 – Avaliação do efeito do reforço com 20 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na proliferação celular, em função da concentração inicial de agente oxidante, da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.** O ensaio de redução da resazurina, conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.2), foi realizado 24 horas após o plaqueamento, isto é, imediatamente antes da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e no final da experiência, 7 dias após a adição inicial das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas nas figuras. Os resultados apresentados nos painéis A, B e C referem-se a uma experiência, enquanto os do painel D representam a média ± SEM de quatro experiências independentes. \*\*\*\*p<0.0001 em relação às células não tratadas (NT) às 24horas. ##p<0.01 relativo às células não tratadas (NT) aos 7 dias.

Uma vez que apenas na densidade de 0,25x10<sup>5</sup> células/mL e na presença de 1% FBS se observou uma redução estatisticamente significativa da proliferação celular, selecionaram-se estas condições para avaliação de outros marcadores de senescência celular, nomeadamente dos níveis de p53 e Lamina B1. Os resultados na Figura 11 mostram que na concentração de 100 μM com reforços de 20 μM, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou significativamente os níveis da proteína p53, o mesmo tendo acontecido com os níveis de Lamina B1, mas apenas na concentração de 50 μM.



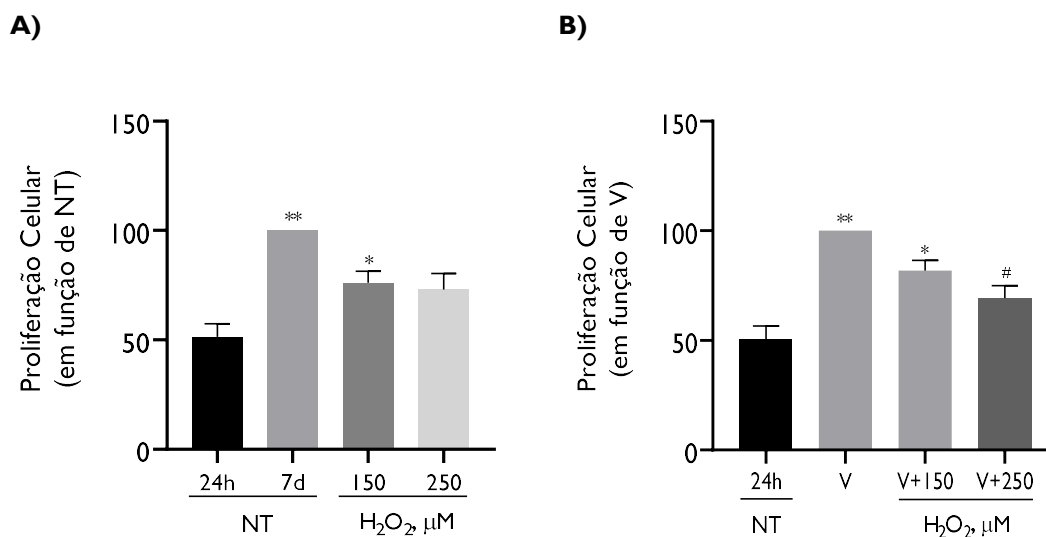
**Figura 11 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com três reforços de 20 μM nos níveis de p53 e Lamina B1.** As culturas celulares com a densidade de 0,25x10<sup>5</sup> células/mL foram mantidas em cultura durante 7 dias, sujeitas a tratamento inicial com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas e reforço de 20 μM nos dias 2 a 4. Os níveis de p53 e Lamina B1 foram avaliados por Western Blot, conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.5). Cada barra representa, a média ± SEM de três experiências independentes, exceto a condição de 150 μM que representa apenas os resultados de 2 experiências. Por isso, não se incluiu esta condição na análise estatística. Abaixo dos gráficos apresentam-se imagens representativas dos resultados obtidos para cada proteína. \*p<0.05 em relação às células não tratadas (NT) ao fim de 7 dias. MPM: Marcadores de Pesos Moleculares.

Uma vez que se observaram diferenças significativas na proliferação celular por tratamento com 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reforços de 20 μM, avaliou-se o efeito de uma concentração inicial (250 μM) e de reforços (40 μM) mais elevados em culturas com 0,25x10<sup>5</sup> células/mL e na presença de 0,5% FBS.

Tal como nos ensaios anteriores, imediatamente antes da adição do agente oxidante (24 horas), foi realizado o ensaio de redução da resazurina para se comparar com o valor obtido ao fim de 7 dias de cultura e assim distinguir entre a eventual ocorrência de morte celular e diminuição da proliferação. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com 150 e 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com reforços de 40 μM reduziu o número de células metabolicamente ativas, embora as diferenças em relação às células não tratadas ao fim de 7 dias não tenham

sido estatisticamente significativas com nenhuma das concentrações iniciais de  $H_2O_2$ , enquanto só na concentração de  $150 \mu M$  não houve diferença significativa em relação ao número inicial de células (células não tratadas ao fim de 24 horas) (Figura 12 A). Este resultado, embora ambíguo, sugere que, na concentração mais elevada e com três reforços de  $40 \mu M$ , ocorreu inibição relevante da proliferação celular que atingiu, em média, cerca de 50%.

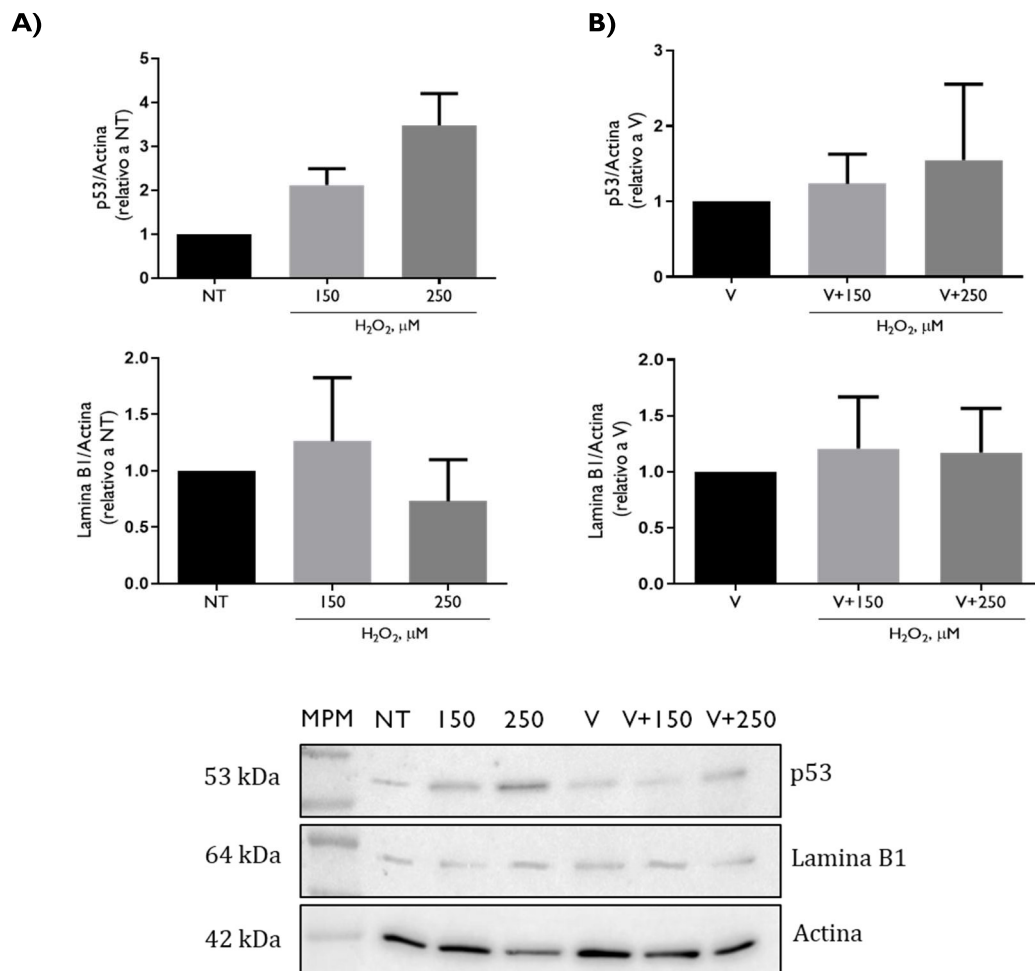
Foi também avaliado o efeito do  $H_2O_2$  na presença do veículo a utilizar para dissolver compostos lipofílicos, isto é, 0,1% DMSO (v/v). Nas mesmas condições indicadas acima, (Figura 12 B), verificou-se uma diminuição da atividade metabólica nas culturas tratadas com  $250 \mu M$  de  $H_2O_2$ , sendo a diferença estatisticamente significativa em relação às culturas tratadas com veículo durante 7 dias, mas não em comparação com o número inicial de células (NT 24 horas). Isto sugere que ocorreu inibição da proliferação celular que atingiu cerca de 60%.



**Figura 12 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações iniciais de  $H_2O_2$  com reforço de  $40 \mu M$  na proliferação celular, na ausência e na presença de 0,1% DMSO.** As culturas celulares com a densidade de  $0,25 \times 10^5$  células/mL na presença de 0,5% FBS foram mantidas em cultura durante 7 dias, sujeitas a tratamento inicial com as concentrações de  $H_2O_2$  indicadas e reforço de  $40 \mu M$  nos dias 2 a 4. O ensaio de redução da resazurina, conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.2), foi realizado às 24 horas, imediatamente antes da adição de  $H_2O_2$  e aos 7 dias. No painel B, a adição do veículo (0,1% DMSO) foi realizada imediatamente antes da adição inicial de  $H_2O_2$ . Os resultados obtidos em três experiências independentes são apresentados como a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  em relação às células não tratadas (NT) às 24 horas. # $p < 0,05$  relativo às células não tratadas (A) ou tratadas com veículo (B) aos 7 dias.

Nas mesmas condições em que foi avaliada a proliferação celular, isto é  $0,25 \times 10^5$  células/mL na presença de 0,5% FBS, avaliaram-se também os níveis das proteínas p53 e Lamina B1 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações iniciais de  $H_2O_2$  e reforços de  $40 \mu M$ , na ausência ou presença de veículo. Os resultados na Figura 13 mostram uma tendência para aumento dos níveis de p53, especialmente na ausência de veículo, mas as diferenças não

foram estatisticamente significativas. Os resultados em relação aos níveis de Lamina B1 mostram diferenças ainda menos acentuadas em relação às células não tratadas ou tratadas apenas com veículo, não sendo de qualquer modo estatisticamente significativas.



**Figura 13 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com três reforços de 40 μM nos níveis de p53 e Lamina B1.** As culturas celulares com a densidade de 0,25×10<sup>5</sup> células/mL foram mantidas durante 7 dias, sujeitas a tratamento inicial com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas e reforço de 40 μM nos dias 2 a 4. Os níveis de p53 e Lamina B1 foram avaliados por Western Blot, conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.5). Cada barra representa a média ± SEM de três experiências independentes. Abaixo dos gráficos apresentam-se imagens representativas dos resultados obtidos para cada proteína. \*p<0.05 em relação às células não tratadas (NT) ao fim de 7 dias. MPM: Marcadores de Pesos Moleculares.

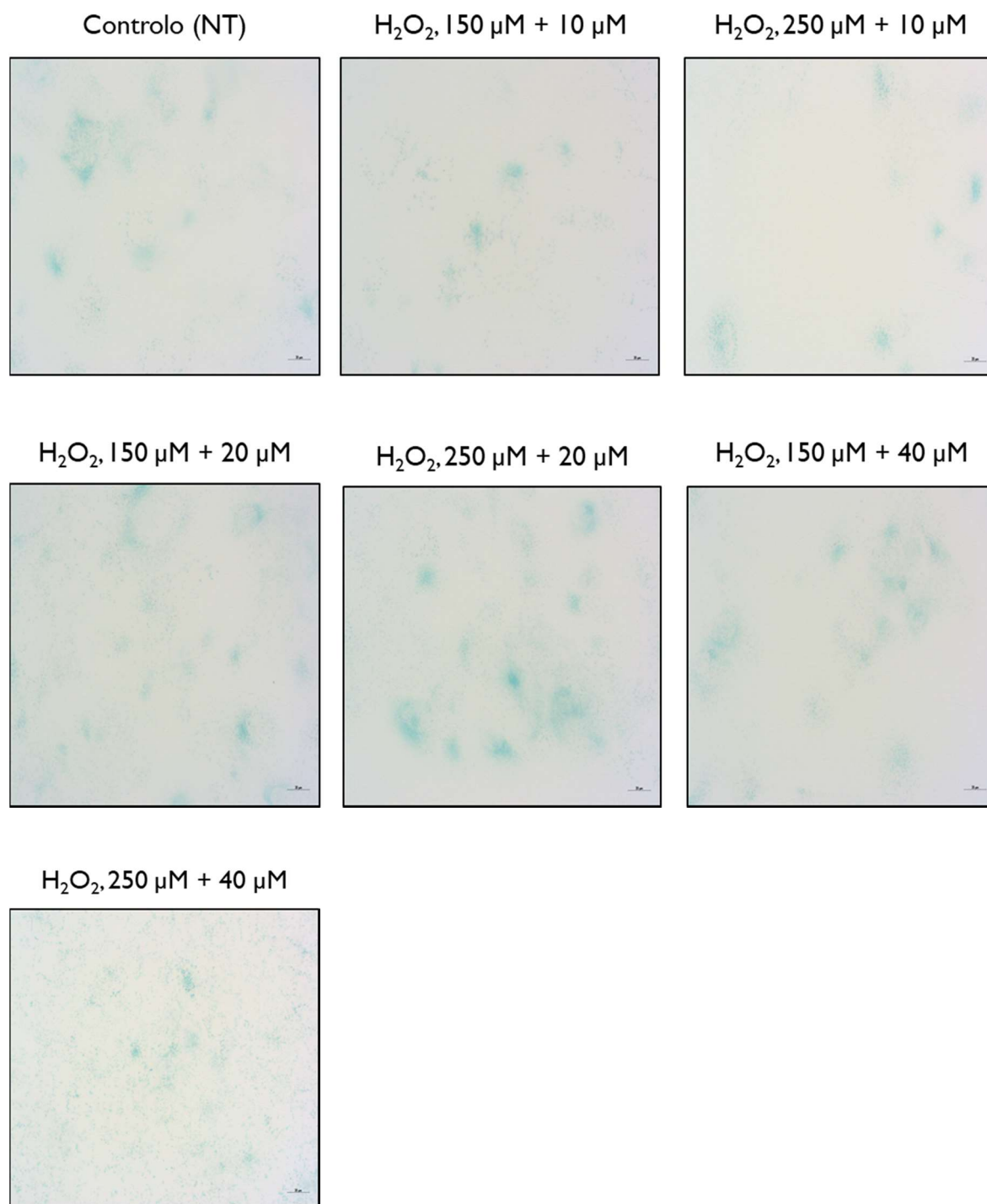
#### **4.5. Influência da concentração inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dos reforços na atividade da β-galactosidase associada à senescência**

A SA-β-Gal é o biomarcador de senescência celular mais utilizado permitindo distinguir células senescentes de não senescentes *in vivo* e *in vitro* (Itahana, Itahana e Dimri, 2013).

A atividade da SA-β-Gal foi avaliada em culturas de células HaCaT, na densidade de 0,25×10<sup>5</sup> células/mL e cultivadas na presença de 0,5% FBS, durante 7 dias, não tratadas (NT) ou tratadas com diferentes concentrações iniciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência (Figura 14) ou na presença (Figura 15) de veículo (0,1% DMSO, V). Foram aplicados reforços de 10 μM, 20 μM ou 40 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do dia 2 ao dia 4 após o estímulo inicial.

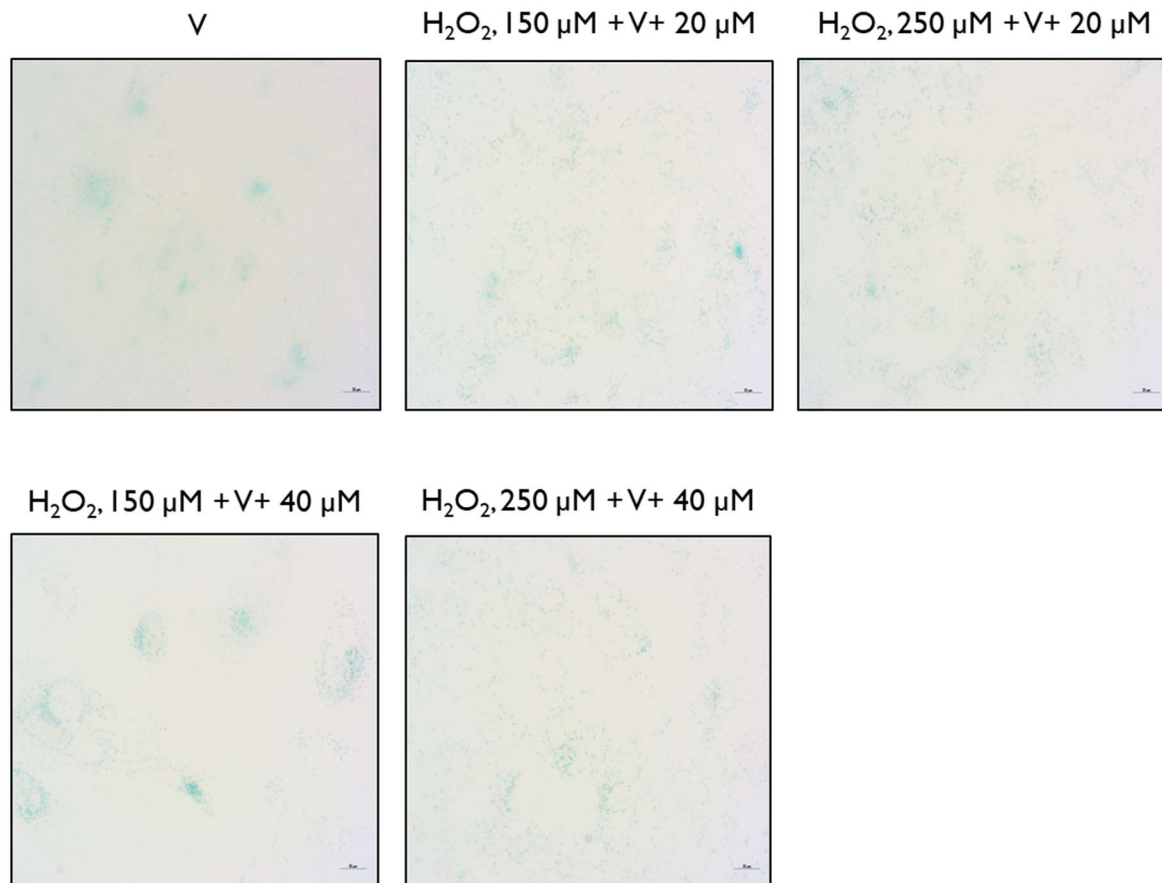
A Figura 14 mostra imagens representativas das células não tratadas e tratadas com diferentes concentrações e reforços de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência de veículo. Na condição de tratamento com, 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reforços de 20 μM (Figura 14), o número de células positivas e a intensidade da coloração parecem ligeiramente maiores que nas outras condições, mas a diferença em relação às células não tratadas é muito ténue, sugerindo que apenas num pequeno número de células poderá ter ocorrido indução de senescência. De qualquer modo, a baixa intensidade da coloração e o reduzido número de células na cultura dificultou significativamente a identificação de células senescentes, tendo sido impossível contar as células positivas.





**Figura 14 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações iniciais e reforços de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na atividade da SA- $\beta$ -Gal.** A atividade da SA- $\beta$ -Gal foi avaliada conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.6), em células HaCaT tratadas ou não durante 7 dias com  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas concentrações iniciais e reforços do dia 2 ao dia 4, indicados. Imagens representativas de três experiências distintas, com as células positivas para SA- $\beta$ -Gal coradas de azul. Escala, 20  $\mu\text{m}$ .

Os resultados obtidos em células tratadas com as mesmas concentrações iniciais e de reforço de  $H_2O_2$  na presença de veículo revelaram uma coloração ainda mais tênue do que na ausência do veículo (Figura 15), sugerindo que a presença de DMSO que tem propriedades antioxidantes, anulou ou pelo menos reduziu o efeito do  $H_2O_2$ .



**Figura 15 – Avaliação do efeito da adição de veículo e diferentes concentrações iniciais e reforços de  $H_2O_2$  na atividade da SA- $\beta$ -Gal em células HaCaT.** A atividade da SA- $\beta$ -Gal foi avaliada conforme descrito em Materiais e Métodos (secção 3.6), em células HaCaT tratadas durante 7 dias com veículo (0,1% DMSO), na ausência (V) ou na presença de  $H_2O_2$  nas concentrações iniciais indicadas e reforços de 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ou 40  $\mu$ M do dia 2 ao dia 4. Imagens representativas de três experiências distintas, com as células positivas para SA- $\beta$ -Gal coradas de azul. Escala, 20  $\mu$ m.

**Capítulo 5:**  
**Discussão de Resultados**  
**e Conclusões**



Numerosos estudos têm contribuído para elucidar o papel do *stress* oxidativo no envelhecimento da pele e as suas consequências nas funções dos queratinócitos, nomeadamente na indução de senescência (Burke, 2018; Liu *et al.*, 2012; Smirnov *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017; Yamaguchi *et al.*, 2018). No entanto, os estudos disponíveis sobre a indução de senescência em queratinócitos humanos são escassos e não recapitulam todas as características das células senescentes. Por exemplo, um estudo comparativo mostrou ausência de aumento de atividade da SA- $\beta$ -Gal em resposta ao *stress* oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto queratinócitos humanos normais como imortalizados, a linha HaCaT, ao passo que a proliferação celular foi mais significativamente afetada na linha celular do que nas células primárias (Liu *et al.*, 2012). Este estudo foi realizado utilizando concentrações relativamente altas e um tempo de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muito curto. Assim, é possível que a ausência de alguns marcadores de senescência signifique que este processo não chegou a ocorrer ou que a sua indução não foi irreversível. Além disso, verifica-se uma grande disparidade entre os protocolos experimentais descritos em diferentes artigos para induzir *stress* oxidativo e senescência celular em queratinócitos, o que dificulta a sua utilização nomeadamente em estudos farmacológicos.

Por isso, o objetivo principal deste estudo consistiu na avaliação do efeito de diversas condições experimentais, como a densidade celular, as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a duração e frequência dos tratamentos e a percentagem de FBS, na indução de senescência na linha celular de queratinócitos humanos HaCaT. Para isso, colocámos como hipótese fundamental que um estado sustentado e prolongado de *stress* oxidativo que não causasse a morte das células, poderia ser necessário para induzir a senescência celular. Por isso, utilizámos um tempo de exposição bastante mais longo e testámos diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguidas da adição em 3 dias consecutivos de concentrações 25 a 6 vezes menores do que as iniciais.

No entanto, os resultados obtidos não permitiram identificar condições de cultura e tratamento das células HaCaT em que se observasse inequivocamente a indução de senescência celular, uma vez que a maioria dos marcadores avaliados não apresentaram alterações significativas em nenhuma das condições testadas. De facto, o marcador de senescência que observámos de forma mais consistente foi a diminuição da proliferação celular em células tratadas inicialmente com 150  $\mu$ M ou 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Verificámos essencialmente os mesmos resultados independentemente da densidade celular, da concentração de FBS no meio de cultura e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada como reforço da inicial.

Verificámos também um aumento significativo da proteína p53 em células tratadas com 100  $\mu$ M e reforços de 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não tendo o efeito de outras concentrações, embora se observe uma tendência de aumento com as concentrações menores, até 100  $\mu$ M. Observámos

ainda um aumento significativo dos níveis de Lamina B1 nas células tratadas inicialmente com 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e reforços de 20  $\mu\text{M}$ , mas não nas tratadas com outras concentrações. O aumento da Lamina B1 não era esperado, uma vez que a redução desta proteína tem sido mais associada à senescência celular, do que o seu aumento, embora também esteja descrito, o que torna o significado destas alterações pouco claro (Barascu *et al.*, 2012; Hernandez-Segura, Nehme e Demaria, 2018).

Em nenhuma das condições testadas observámos qualquer alteração da morfologia nuclear, incluindo a área e circularidade dos núcleos, e também não observámos focos de heterocromatina característicos da senescência celular (SAHF). Além disso, em todas as condições testadas, a morfologia e o número e intensidade da coloração das células com marcação decorrente da actividade da SA- $\beta$ -Gal foram idênticos aos das células não tratadas, o mesmo acontecendo nas células tratadas com veículo (0,1% DMSO), na ausência e na presença das várias concentrações e reforços de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e independentemente da densidade celular e da concentração de FBS no meio de cultura.

Vários fatores podem ter contribuído para o insucesso na indução de senescência celular, nomeadamente o facto de termos sempre cultivado as células na presença de FBS que contém diversos antioxidantes. Por outro lado, avaliámos apenas um pequeno conjunto de marcadores de senescência. A avaliação de outros marcadores como, por exemplo, componentes do SASP (por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-1 e 3, ou a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B) e outras proteínas envolvidas na regulação positiva (por exemplo, Ki-67) e negativa (por exemplo, p16<sup>INK4a</sup>, p21) da proliferação celular, poderia ter permitido uma distinção mais clara dos efeitos das múltiplas variáveis testadas na indução de senescência celular. Muitas outras condições e variáveis, incluindo diferentes agentes indutores de *stress* oxidativo, poderão ser estudadas para definir um protocolo adequado para indução de senescência nas células HaCaT.

Os estudos que realizámos não permitiram identificar as melhores condições a usar num modelo de senescência celular, mas aproximaram-nos um pouco mais e esperamos que contribuam para esse objetivo.

## **Capítulo 6:** **Referências Bibliográficas**





- AXELRAD, Mary Derasmo; BUDAGOV, Temuri; ATZMON, Gil - **Telomere Length and Telomerase Activity; A Yin and Yang of Cell Senescence.** *Journal of Visualized Experiments.* 75 (2013) 1–8. doi: 10.3791/50246.
- BANGERT, Christine; BRUNNER, Patrick M.; STINGL, Georg - **Immune functions of the skin.** *Clinics in Dermatology.* 29:4 (2011) 360–376. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006.
- BARASCU, Aurelia *et al.* - **Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation.** *EMBO Journal.* 31:5 (2012) 1080–1094. doi: 10.1038/emboj.2011.492.
- BARONI, Adone *et al.* - **Structure and function of the epidermis related to barrier properties.** *Clinics in Dermatology.* 30:3 (2012) 257–262. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- BAUMANN, L. - **Skin ageing and its treatment.** *Journal of Pathology.* 211:2 (2007) 241–251. doi: 10.1002/path.2098.
- BORMANN, Felix *et al.* - **Reduced DNA methylation patterning and transcriptional connectivity define human skin aging.** *Aging Cell.* 15:3 (2016) 563–571. doi: 10.1111/ace.12470.
- BUCKINGHAM, Erin M.; KLINGELHUTZ, Aloysius J. - **The role of telomeres in the ageing of human skin.** *Experimental dermatology.* 20:4 (2011) 297. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01242.X.
- BURKE, Karen E. - **Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants.** *Mechanisms of Ageing and Development.* 172:December 2017 (2018) 123–130. doi: 10.1016/j.mad.2017.12.003.
- CAMPISI, J. - **Replicative senescence: An old lives' tale?** *Cell.* 84:4 (1996) 497–500. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81023-5.
- CAMPISI, Judith - **The Role of Cellular Senescence in Skin Aging.** *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 3:(1998) 1–5. doi: 10.1038/jidsymp.1998.2.
- CAMPISI, Judith; D'ADDA DI FAGAGNA, Fabrizio - **Cellular senescence: When bad things happen to good cells.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 8:9 (2007) 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.

CAO, Changwei *et al.* - **Diet and skin aging—from the perspective of food nutrition.** *Nutrients.* 12:3 (2020) 1–25. doi: 10.3390/nu12030870.

CHAMBERS, Emma S.; VUKMANOVIC-STEJIC, Milica - **Skin barrier immunity and ageing.** *Immunology.* 160:2 (2020) 116–125. doi: 10.1111/imm.13152.

CHAPMAN, James; FIELDER, Edward; PASSOS, João F. - **Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship.** *FEBS Letters.* 593:13 (2019) 1566–1579. doi: 10.1002/1873-3468.13498.

CHEN, Feng *et al.* - **Oxidative Stress in Stem Cell Aging.** *Cell Transplantation.* 26:9 (2017) 1483–1495. doi: 10.1177/0963689717735407.

CHOI, Eun Jeong; KIL, In Sup; CHO, Eun Gyung - **Extracellular vesicles derived from senescent fibroblasts attenuate the dermal effect on keratinocyte differentiation.** *International Journal of Molecular Sciences.* 21:3 (2020). doi: 10.3390/ijms21031022.

CRANE, Justin D. *et al.* - **Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging.** *Aging Cell.* 14:4 (2015) 625–634. doi: 10.1111/acel.12341.

DESPRES, Julie *et al.* - **Replicative senescence of human dermal fibroblasts affects structural and functional aspects of the Golgi apparatus.** *Experimental Dermatology.* 28:8 (2019) 922–932. doi: 10.1111/exd.13886.

DOLES, Jason *et al.* - **Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function.** *Genes and Development.* 26:19 (2012) 2144–2153. doi: 10.1101/gad.192294.112.

ECKHART, Leopold; TSCHACHLER, Erwin; GRUBER, Florian - **Autophagic control of skin aging.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 7:JULY (2019) 1–13. doi: 10.3389/fcell.2019.00143.

EEDEN, Stephan F. Van; SIN, Don D. - **Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: A lung and systemic process.** *Canadian Respiratory Journal: Journal of the Canadian Thoracic Society.* 20:1 (2013) 27. doi: 10.1155/2013/509130.

FITSIOU, Eleni *et al.* - **Cellular Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype as Drivers of Skin Photoaging.** *Journal of Investigative Dermatology.* 141:4 (2021) 1119–1126. doi: 10.1016/j.jid.2020.09.031.

FREUND, Adam *et al.* - **Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker.**

- Molecular Biology of the Cell. 23:11 (2012) 2066–2075. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.
- FUHRMANN-STROISSNIGG, Heike *et al.* - **Sa-β-galactosidase-based screening assay for the identification of senotherapeutic drugs.** Journal of Visualized Experiments. 2019:148 (2019) 1–7. doi: 10.3791/58133.
- FUKS, François - **DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes.** Em Current Opinion in Genetics and Development. 15. p. 490–495.
- GALLAGE, Suchira; GIL, Jesús - **Mitochondrial Dysfunction Meets Senescence.** Trends in Biochemical Sciences. 41:3 (2016) 207–209. doi: 10.1016/j.tibs.2016.01.005.
- GANCEVICIENE, Ruta *et al.* - **Skin anti-aging strategies.** 4:3 (2012) 308–319.
- GOMEZ, Daniel E. *et al.* - **Telomere structure and telomerase in health and disease (Review).** International Journal of Oncology. 41:5 (2012) 1561–1569. doi: 10.3892/ijo.2012.1611.
- GONZÁLEZ-GUALDA, Estela *et al.* - **A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo.** FEBS Journal. 288:1 (2021) 56–80. doi: 10.1111/febs.15570.
- GORGOLIS, Vassilis *et al.* - **Cellular Senescence: Defining a Path Forward.** Cell. 179:4 (2019) 813–827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.
- GRÖNNIGER, Elke *et al.* - **Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin.** PLoS Genetics. 6:5 (2010) 6. doi: 10.1371/journal.pgen.1000971.
- GU, Yanpei *et al.* - **Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging.** Ageing Research Reviews. 59:February (2020) 101036. doi: 10.1016/j.arr.2020.101036.
- HARLEY, Calvin B. *et al.* - **A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program.** Rejuvenation Research. 14:1 (2011) 45–56. doi: 10.1089/ rej.2010 . 1085.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. - **The serial cultivation of human diploid cell strains** Experimental Cell Research. 25:3 (1961) 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- HE, Shenghui; SHARPLESS, Norman E. - **Senescence in Health and Disease.** Cell. 169:6 (2017) 1000–1011. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015.
- HERNANDEZ-SEGURA, Alejandra; NEHME, Jamil; DEMARIA, Marco - **Hallmarks of Cellular Senescence.** Trends in Cell Biology. 28:6 (2018) 436–453. doi: 10.1016/

j.tcb.2018. 02.001.

ITAHANA, Koji; ITAHANA, Yoko; DIMRI, Gobarshan P. - **Colorimetric Detection of Senescence-Associated  $\beta$  Galactosidase**. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 965:2013) 143. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1\_8.

JOHANSEN, Claus - **Generation and culturing of primary human keratinocytes from adult skin**. *Journal of Visualized Experiments*. 2017:130 (2017) 1–5. doi: 10.3791/56863.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. - **Oxidation events and skin aging**. *Ageing Research Reviews*. 21:2015) 16–29. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001.

KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David A. F. - **Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology**. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 19:2 (2011) 229–234. doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003.

KOURTIS, Nikos; TAVERNARAKIS, Nektarios - **Cellular stress response pathways and ageing: Intricate molecular relationships**. *EMBO Journal*. 30:13 (2011) 2520–2531. doi: 10.1038/emboj.2011.162.

KRISTIEN, Daenen *et al.* - **Oxidative stress in chronic kidney disease**. *Pediatric nephrology* (Berlin, Germany). 34:6 (2019) 975–991. doi: 10.1007/S00467-018-4005-4.

KRUTMANN, Jean *et al.* - **The skin aging exposome**. *Journal of Dermatological Science*. 85:3 (2017) 152–161. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.015.

KUDRYAVTSEVA, Anna V. *et al.* - **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer**. *Oncotarget*. 7:29 (2016) 44879–44905. doi: 10.18632/oncotarget.9821.

KUMARI, Ruchi; JAT, Parmjit - **Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:March (2021) 1–24. doi: 10.3389/fcell.2021.645593.

LABBADIA, Johnathan; MORIMOTO, Richard I. - **The Biology of Proteostasis in Aging and Disease**. *Annu Rev Biochem*. 84 (2015) 435–464. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033955.

LEBRASSEUR, Nathan K.; TCHKONIA, Tamara; KIRKLAND, James L. - **Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty**. *Nestle Nutr Inst Workshop*. 2015). doi: 10.1159/000382054.

- LEPHART, Edwin D. - **Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms.** Ageing Research Reviews. 31:(2016) 36–54. doi: 10.1016/j.arr.2016.08.001.
- LI, Wenge; VIJG, Jan - **Measuring genome instability in aging - A mini-review.** Gerontology. 58:2 (2012) 129–138. doi: 10.1159/000334368.
- LIM, Henry W.; ARELLANO-MENDOZA, Maria Ivonne; STENGEL, Fernando - **Current challenges in photoprotection.** Journal of the American Academy of Dermatology. 76:3 (2017) S91–S99. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.040.
- LIU-BRYAN, Ru; TERKELTAUB, Robert - **Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis.** Nature reviews. Rheumatology. 11:1 (2015) 35. doi: 10.1038/NRRHEUM.2014.162.
- LIU, L. *et al.* - **Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress.** Clinical and Experimental Dermatology. 37:7 (2012) 772–780. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04315.x.
- LIU, Xue Ling; DING, Jian; MENG, Ling Hua - **Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer.** Acta Pharmacologica Sinica. 39:10 (2018) 1553–1558. doi: 10.1038/aps.2017.198.
- LÓPEZ-OTÍN, Carlos *et al.* - **The Hallmarks of aging.** Cell. 153:6 (2013) 1194. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan - **The DNA damage response and cancer therapy.** Nature. 481:7381 (2012) 287–294. doi: 10.1038/nature10760.
- MAKRANTONAKI, Evgenia; ZOUBOULIS, Christos C. - **Skin alterations and diseases in advanced age.** Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 5:2 (2008) 153–162. doi: 10.1016/j.ddmec.2008.05.008.
- MARTIC, Ines *et al.* - **A new model to investigate UVB-induced cellular senescence and pigmentation in melanocytes.** Mechanisms of ageing and development. 190:(2020) 111322. doi: 10.1016/j.MAD.2020.111322.
- MENDES, Alexandrina Ferreira; CRUZ, Maria Teresa; GUALILLO, Oreste - **Editorial: The Physiology of Inflammation—The Final Common Pathway to Disease.** Frontiers in Physiology. 9:December (2018). doi: 10.3389/fphys.2018.01741.
- MIJIT, Mahmut *et al.* - **Role of p53 in the regulation of cellular senescence.** Biomolecules. 10:3 (2020) 1–16. doi: 10.3390/biom10030420.

MORIMOTO, Richard I.; CUERVO, Ana Maria - **Proteostasis and the Aging Proteome in Health and Disease**. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 69:Suppl 1 (2014) S33. doi: 10.1093/GERONA/GLU049.

MUÑOZ-ESPÍN, Daniel; SERRANO, Manuel - **Cellular senescence: From physiology to pathology**. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 15:7 (2014) 482–496. doi: 10.1038/nrm3823.

NOREN HOOTEN, Nicole; EVANS, Michele K. - **Techniques to induce and quantify cellular senescence**. Journal of Visualized Experiments. 2017:123 (2017) 1–14. doi: 10.3791/55533.

O'BRIEN, John *et al.* - **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. European Journal of Biochemistry. 267:17 (2000) 5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

PAPADOPOLI, David *et al.* - **Mtor as a central regulator of lifespan and aging**. F1000Research. 8:2019) 1–21. doi: 10.12688/f1000research.17196.1.

PENG, Wenxi. *et al.* - **Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis**. <https://home.liebertpub.com/dna>. 38:7 (2019) 597–606. doi: 10.1089/DNA.2018.4552.

POLE, Akshaj; DIMRI, Manjari; P. DIMRI, Goberdhan - **Oxidative stress, cellular senescence and ageing**. AIMS Molecular Science. 3:3 (2016) 300–324. doi: 10.3934/molsci.2016.3.300.

**PORDATA - Indicadores de envelhecimento** - [Consult. 4 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.pordata.pt/Portugal/Indicadores+de+envelhecimento-526-3745>

PRÄBST, Konstantin *et al.* - **Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin**. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 1601:2017) 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-1.

RAMOS-E-SILVA, Marcia *et al.* - **Anti-aging cosmetics: Facts and controversies**. Clinics in Dermatology. 31:6 (2013) 750–758. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.013.

REN, Ruotong *et al.* - **Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics**. Cell Metabolism. 26:3 (2017) 460–474. doi: 10.1016/j.cmet.2017.07.019.

RHEINWALD, James G. *et al.* - **A Two-Stage, p16INK4A- and p53-Dependent Keratinocyte Senescence Mechanism That Limits Replicative Potential Independent of Telomere Status**. Molecular and Cellular Biology. 22:14 (2002) 5157. doi: 10.1128/MCB.22.14.5157-5172.2002.

- RINNERTHALER, Mark *et al.* - **Oxidative stress in aging human skin.** *Biomolecules.* 5:2 (2015) 545–589. doi: 10.3390/biom5020545.
- RUBINSZTEIN, David C.; MARIÑO, Guillermo; KROEMER, Guido - **Autophagy and aging.** *Cell.* 146:5 (2011) 682–695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030.
- RUFINI, A. *et al.* - **Senescence and aging: The critical roles of p53.** *Oncogene.* 32:43 (2013) 5129–5143. doi: 10.1038/onc.2012.640.
- RUZANKINA, Y.; BROWN, E. J. - **Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing.** *British Journal of Cancer.* 97:9 (2007) 1189–1193. doi: 10.1038/sj.bjc.6604029.
- SEELEY R, STEPHENS T, Tate P. - **Anatomia e Fisiologia de Seeley.** 10ª Edição ed. ISBN 978-85-8055-588-2.
- SHARPLESS, Norman E.; SHERR, Charles J. - **Forging a signature of in vivo senescence.** *Nature Reviews Cancer.* 15:7 (2015) 397–408. doi: 10.1038/nrc3960.
- SINGH, Bhupendra *et al.* - **Reversing wrinkled skin and hair loss in mice by restoring mitochondrial function.** *Cell Death and Disease.* 9:7 (2018). doi: 10.1038/s41419-018-0765-9.
- SMIRNOV, Artem *et al.* - **FOXMI regulates proliferation, senescence and oxidative stress in keratinocytes and cancer cells.** *Aging.* 8:7 (2016) 1384–1397. doi: 10.18632/aging.100988.
- SMITH, P. K. *et al.* - **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Analytical Biochemistry.* 150:1 (1985) 76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- SONG, Xiuzu *et al.* - **Autophagy deficient keratinocytes display increased DNA damage, senescence and aberrant lipid composition after oxidative stress in vitro and in vivo.** *Redox Biology.* 11:October 2016 (2017) 219–230. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.015.
- SOTO-GAMEZ, Abel; DEMARIA, Marco - **Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence.** *Drug Discovery Today.* 22:5 (2017) 786–795. doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.004.
- SREEDHAR, Annapoorna; AGUILERA-AGUIRRE, Leopoldo; SINGH, Keshav K. - **Mitochondria in skin health, aging, and disease.** *Cell Death and Disease.* 11:6 (2020). doi: 10.1038/s41419-020-2649-z.

- STEINMAN, Ralph M. - **The Dendritic Cell System**. Annual Review of Immunology. 9:1991) 271–296.
- THOMAS, David R.; BURKEMPER, Nicole M. - **Aging skin and wound healing**. Clinics in Geriatric Medicine. 29:2 (2013). doi: 10.1016/j.cger.2013.02.001.
- TOBIN, Desmond J. - **Introduction to skin aging**. Journal of Tissue Viability. 26:1 (2017) 37–46. doi: 10.1016/j.jtv.2016.03.002.
- UNNIKRISHNAN, Archana *et al.* - **The role of DNA methylation in epigenetics of aging**. HHS Public Access. Pharmacol Ther. 195:2019) 172–185. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.001.
- URDIALES-GÁLVEZ, Fernando *et al.* - **Concomitant Use of Hyaluronic Acid and Laser in Facial Rejuvenation**. Aesthetic plastic surgery. 43:4 (2019) 1061–1070. doi: 10.1007/S00266-019-01393-7.
- VARGAS, Jose *et al.* - **Senescence; an endogenous anticancer mechanism**. Frontiers in Bioscience. 17:2012) 2616–2643.
- VELARDE, Michael C. *et al.* - **Pleiotropic age-dependent effects of mitochondrial dysfunction on epidermal stem cells**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112:33 (2015) 10407. doi: 10.1073/PNAS.1505675112.
- VERA, Elsa; BLASCO, Maria A. - **Beyond average: Potential for measurement of short telomeres**. Aging. 4:6 (2012) 379–392. doi: 10.18632/aging.100462.
- VICTORELLI, Stella; PASSOS, João F. - **Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not**. EBioMedicine. 21:2017) 14–20. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.027.
- VIJG, Jan; MONTAGNA, Cristina - **Genome instability and aging: Cause or effect?** Translational Medicine of Aging. 1:2017) 5–11. doi: 10.1016/j.tma.2017.09.003.
- WANG, Audrey S.; DREESEN, Oliver - **Biomarkers of cellular senescence and skin aging**. Frontiers in Genetics. 9:AUG (2018) 1–14. doi: 10.3389/fgene.2018.00247.
- WANG, Yuexia *et al.* - **Epidermal expression of the truncated prelamin A causing Hutchinson - Gilford progeria syndrome: Effects on keratinocytes, hair and skin**. Human Molecular Genetics. 17:15 (2008) 2357–2369. doi: 10.1093/hmg/ddn136.
- WILEY, Christopher D. *et al.* - **Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype** HHS Public Access. Cell Metab. 23:2 (2016) 303–



314. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.011.

YAMAGUCHI, Masahiro *et al.* - **Oxidative stress-induced interaction between autophagy and cellular senescence in human keratinocytes.** *Journal of Hard Tissue Biology.* 27:3 (2018) 199–208. doi: 10.2485/jhtb.27.199.

YASWEN, Paul; CAMPISI, Judith - **Oncogene-Induced Senescence Pathways Weave an Intricate Tapestry.** *Cell.* 128:2 (2007) 233–234. doi: 10.1016/J.CELL.2007.01.005.

ZHANG, Rugang; CHEN, Wei; ADAMS, Peter D. - **Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci.** *Molecular and Cellular Biology.* 27:6 (2007) 2343–2358. doi: 10.1128/mcb.02019-06.

ZHANG, Shoubing; DUAN, Enkui - **Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside.** *Cell Transplantation.* 27:5 (2018) 729–738. doi: 10.1177/0963689717725755.

ZHANG, Weiqi *et al.* - **A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging.** *HHS Public Access. Science.* 348:6239 (2015) 1160–1163. doi: 10.1126/science.aaa1356.

ZHAO, Hong; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew - **Biomarkers of cell senescence assessed by imaging cytometry.** *Methods in Molecular Biology.* 965:2013) 83–92. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1\_5.

ZHU, Haoran *et al.* - **Oncogene-induced senescence: From biology to therapy.** *Mechanisms of Ageing and Development.* 187:March (2020) 111229. doi: 10.1016/j.mad.2020.111229.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. - **Hormonal therapy of intrinsic aging.** *Rejuvenation Research.* 15:3 (2012) 302–312. doi: 10.1089/rej.2011.1249.

ZOUBOULIS, Christos C. *et al.* - **Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment.** *Clinics in Dermatology.* 37:4 (2019) 365–372. doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.04.002.

ZOUBOULIS, Christos C.; MAKRANTONAKI, Evgenia - **Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging.** *Clinics in Dermatology.* 29:1 (2011) 3–14. doi: 10.1016/j.clindermatol.2010.07.001.