

Soraya de Oliveira da Silva Santos

Padronização da indução de
senescência celular por peróxido
de hidrogênio em fibroblastos
murinos da linhagem L929

Rio de Janeiro
2024

SORAYA DE OLIVEIRA DA SILVA SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR POR
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FIBROBLASTOS MURINOS DA
LINHAGEM L929

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao IFRJ/*campus* Realengo, como parte do
requisito parcial para a obtenção de grau de
bacharel em Farmácia

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Alexandra de Faria
do Amaral (Interno - IFRJ) e Dr. Thadeu
Estevam Moreira Maramaldo Costa (Externo
- Fiocruz)

Rio de Janeiro
2024

SORAYA DE OLIVEIRA DA SILVA SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FIBROBLASTOS MURINOS DA LINHAGEM L929

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao IFRJ/campus Realengo, como parte do requisito parcial para a obtenção de grau de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 19/09/2024.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



THADEU ESTEVAM MOREIRA MARAMALDO COSTA

Data: 25/09/2024 10:41:45-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Thadeu Estevam Moreira Maramaldo Costa
(Orientador Externo - FioCruz)

Documento assinado digitalmente



ALEXANDRA DE FARIA DO AMARAL

Data: 27/09/2024 08:42:12-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr^a. Alexandra de Faria do Amaral
(Orientadora Interna - IFRJ)

Dr^a. Carla Fagundes Félix
(Membro Interno da Banca - IFRJ)

Documento assinado digitalmente



ELISA SUZANA CARNEIRO POÇAS

Data: 24/09/2024 14:29:10-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr^a. Elisa Suzana Carneiro Poças
(Membro Interno da Banca - IFRJ)

Rio de Janeiro
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S237p Santos, Soraya de Oliveira da Silva
Padronização da indução de senescência celular por
peróxido de hidrogênio em fibroblastos murinos da linhagem
L929 / Soraya de Oliveira da Silva Santos - Rio de Janeiro,
2024.

40 f.

Orientação: Alexandra Amaral.

Coorientação: Thadeu Costa.

Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado
em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2024.

1. Senescência celular. 2. Envelhecimento. 3. Inflammaging. 4.
Doenças. I. Amaral, Alexandra, **orient.** II. Costa, Thadeu, **coorient.**
III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio
de Janeiro. IV. Título

CDU 615

Bibliotecária: Karina Barbosa dos Santos – CRB-7/6212

AGRADECIMENTOS

É com o coração repleto de gratidão que inicio meus agradecimentos, e eu não poderia iniciar o mesmo sem reconhecer a grandeza e a primazia de Deus em minha vida. Sua presença constante, Sua bondade, misericórdia e Graça infinita foram meu alicerce. Serei eternamente grata por todas as vezes que me carregou em Seu colo nos momentos difíceis e enviou pessoas para me auxiliar, incentivar e encorajar. Tudo que há de bom em mim advém dEle, e o meu viver é e sempre será para honra e glória do nome dEle.

A minha família é a base de tudo o que sou e conquistei, sou profundamente grata aos meus pais, Lia e Silvio, aos meus irmãos, Sara e Alison e ao meu cunhado Wagner, por todo o amor, apoio e esforço que dedicaram a mim em meio às suas particularidades e dificuldades. Meu carinho e gratidão se estendem a meus sobrinhos Lucas, Jenifer, Daniel e minha sobrinha-neta e afilhada Pérola, bem como aos meus avós Maria e Benedito e meu primo Bruno. Cada um foi fundamental para que este sonho se tornasse realidade. Obrigada por viverem este sonho comigo. Muitas vezes, vocês foram a razão pela qual eu não desisti. Essa jornada foi árdua, e o apoio de vocês foi imprescindível. Meus irmãos, meus Brocksbrow e meu querido Cunha, meus patrocinadores... Eu não sei o que seria de mim sem vocês, obrigada por tudo, nenhuma palavra conseguirá mensurar quão grata sou por ter vocês em minha vida. Eu tive a melhor rede de apoio!

Um agradecimento especial ao meu eterno camarada Uau, que foi fundamental durante esta jornada desde o dia que entrou em minha vida. Sua presença e suporte foram inestimáveis, jamais me esquecerei de todos os atos significativos de quem foi um dos meus maiores incentivadores, como o dia em que mesmo sem entender Físico-química II ficou literalmente ao meu lado, mesmo cansado, até que eu terminasse de estudar porque por mim mesma eu já teria desistido. Meu respeito e admiração por você é infindável. E sua mãe, dona Vera, a quem sou grata por sempre ser tão incentivadora e carinhosa comigo. Agradeço profundamente por todo apoio e por terem feito parte desta importante fase de minha vida. Terão sempre um espaço cativo especial em meu coração.

Às amigas, Erica, Elen, Priscilla e Caroline, agradeço pelo apoio e incentivo desde o início deste sonho, quando ele ainda era apenas uma ideia abstrata em um pedido de oração. Amo vocês, obrigada por tudo!

Às queridas amigas Chayenne e Renata, o trio que deu certo, com quem compartilhei tantos momentos no IFRJ, meu agradecimento especial. Vocês foram presentes divinos em minha vida acadêmica, sempre me apoiando e me incentivando. Me “encontravam” quando eu me retirava para chorar, me dando suporte com muita sensibilidade e uma boa dose de choque de realidade, regado de bom humor (o nosso humor), e também me colocavam, literalmente, na parede quando eu ousava pensar em desistir. Nossa amizade é um presente que valorizo imensamente e ver que essa amizade se estende para além do mundo acadêmico é incrível. O “vocês vão ter me aturar” foi tão real, que agora seguimos para o primeiro casório do trio, e com a honra de ser madrinha. Que alegria é saber que cultivei as amizades certas, sempre sinceras, verdadeiras e que posso contar para toda vida... “A Origem” segue firme, forte e mais unida do que nunca.

Às amigadas que o mundo acadêmico me proporcionou, especialmente à Pâmela, que me introduziu ao universo científico e dedicou tantas horas para me ajudar no desenvolvimento deste trabalho, meu sincero agradecimento. Às demais amigadas do grupo da Fiocruz, Aryella, que tanto auxiliou e colaborou intensamente, durante o desenrolar desse projeto, dias e noites afora, que mesmo cansada estava sempre com brilho nos olhos pela pesquisa e com uma incrível didática para ajudar, Letícia, Thalita e Thamiris, por compartilharem seu conhecimento e experiência, tornando minha jornada acadêmico-científica tão rica e significativa. Obrigada meninas, por toda troca dentro e fora do laboratório, as Oswaldetes estarão sempre em meu coração.

Ao laboratório de Farmacologia Aplicada e ao meu orientador Thadeu, sou grata pela confiança, acolhimento e a oportunidade de aprendizado que me foram proporcionadas. Thadeu, sua orientação foi fundamental para meu desenvolvimento profissional e pessoal, és um pesquisador super competente e comprometido com a pesquisa científica, foi uma honra dividir a bancada com você, obrigada por transmitir seu conhecimento com tanta paciência e empatia.

À minha orientadora interna Alexandra, por sua dedicação incansável e toda positividade, que me impulsionou a concluir este trabalho. Fiz a escolha certa, e tive a honra de partilhar esse momento com a profissional que tanto admiro.

À minha tão sonhada e desejada instituição de ensino, bem como, à coordenação, que, apesar das dificuldades, sempre se destacou pela empatia e dedicação. Sempre digo que o IF é uma mãe, porque esse tratamento respeitoso se

estende, majoritariamente, dos docentes aos discentes. Será uma honra mencionar que fui aluna desta instituição.

Não posso deixar de mencionar o impacto significativo que a ajuda psicoterapêutica teve em minha vida na reta final da graduação. Foi crucial para minha estabilidade e bem-estar, permitindo que eu alcançasse este sonho com mais clareza e intensidade. Um muito obrigada especial, a quem chamo carinhosamente de “tia Ana”.

Às agências de fomento CNPq, PIBIC e Fiocruz.

Por fim, com propriedade posso dizer: ninguém chega a lugar nenhum sozinho e todos vocês foram essenciais para que eu pudesse concluir esse ciclo.

Com todo meu carinho e gratidão.

SANTOS, S.O.S. Padronização da indução de senescência celular por peróxido de hidrogênio em fibroblastos murinos da linhagem L929. 40f. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2024.

RESUMO

A senescência celular é um fenômeno natural associado ao envelhecimento, podendo ser induzida pelo encurtamento dos telômeros (senescência replicativa), após múltiplas divisões celulares ou por diferentes formas de estresse (senescência prematura), como a exposição a espécies reativas de oxigênio (ERO), radiação ultravioleta (UV), quimioterapia, entre outros. O estado senescente é caracterizado pela parada do ciclo celular, expansão do tamanho celular e aumento da atividade da enzima β -galactosidase, além de uma elevada secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-6, o ligante de quimiocina 2 (CCL2, do inglês, *chemokine (C-C motif) ligand 2*) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*). O acúmulo de células senescentes nos tecidos contribui para o estabelecimento de uma inflamação crônica “estétil” (*inflammaging*), associada ao envelhecimento, que manifesta-se devido à secreção ininterrupta de mediadores pró-inflamatórios, metaloproteinasas e outras moléculas sinalizadoras que, coletivamente, são denominadas fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *Senescence-associated secretory phenotype*) e induzem senescência em células vizinhas. A manutenção deste estado inflamatório de forma prolongada pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como a artrite reumatóide, a doença de Alzheimer e o câncer. O melhor entendimento de mecanismos envolvidos no processo de senescência celular é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam mitigar ou eliminar o estabelecimento destas doenças. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi padronizar e estabelecer uma técnica para a determinação de senescência celular prematura induzida por peróxido de hidrogênio em células de linhagem de fibroblastos murinos.

Palavras chaves: Senescência Celular. *Inflammaging*. Envelhecimento. Doenças.

SANTOS, S.O.S. Standardization of cellular senescence induction by hydrogen peroxide in L929 murine fibroblasts. 40p. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2024.

ABSTRACT

Cellular senescence is a natural phenomenon associated with aging and can be induced by telomere shortening (replicative senescence), after multiple cell divisions, or by different forms of stress (premature senescence), such as exposure to reactive oxygen species (ROS), ultraviolet (UV) radiation, chemotherapy, among others. The senescent state is characterized by cell cycle arrest, expansion of cell size, and increased activity of the β -galactosidase enzyme, in addition to increased secretion of chemokines and pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), and vascular endothelial growth factor (VEGF). The accumulation of senescent cells in tissues contributes to the establishment of a chronic "sterile" inflammation (inflammaging), associated with aging, which manifests itself due to the uninterrupted secretion of pro-inflammatory mediators, metalloproteinases and other signaling molecules that, collectively, are called senescence-associated secretory phenotype (SASP) and induce senescence in neighboring cells. The prolonged maintenance of this inflammatory state can contribute to the development of chronic degenerative diseases such as rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease and cancer. A better understanding of the mechanisms involved in the process of cellular senescence is of fundamental importance for the development of therapeutic strategies that can mitigate or eliminate the establishment of these diseases. Thus, the objective of this study was to standardize and establish a technique for the determination of premature cellular senescence induced by hydrogen peroxide in murine fibroblast cells.

Keywords: Cellular Senescence, Inflammaging, Aging, Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - População residente (%) no Brasil por grupos de idade.	14
Figura 2 - Via de sinalização da senescência prematura.....	20
Figura 3 - Alteração morfológica induzida em fibroblastos murinos da linhagem L-929 com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.	29
Figura 4 - Avaliação do efeito do peróxido de hidrogênio sobre a formação de colônias de células da linhagem L929.....	30
Figura 5 - Análise do número de colônias formadas após incubação com peróxido de hidrogênio por 1h.....	31
Figura 6 - Avaliação quantitativa de colônias após indução de senescência por H ₂ O ₂ em células L929.	31
Figura 7 - Efeito do H ₂ O ₂ sobre a expressão do marcador de senescência p21 em células da linhagem, L929.....	32
Figura 8 - Efeito do H ₂ O ₂ sobre a expressão do marcador de senescência p53 em células da linhagem L929.....	33
Figura 9 - Efeito do H ₂ O ₂ sobre a expressão do marcador inflamatório NFκB em células da linhagem L929.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para as marcações de <i>westernblot</i>	28
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ATM	Ataxia telangiectasia mutada, do inglês <i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	Atm referente a rad-3, do inglês <i>atm- and rad3-related</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CCL2	Fator de crescimento, do inglês <i>chemokine (c-c motif) ligand 2</i>
CDK	Proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina, do inglês <i>cyclin-dependent kinases</i>)
DDR	Resposta de dano no DNA, do inglês <i>DNA damage response</i>
DMEM	Meio de cultivo, <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Acido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
GAPDH	Proteína constitutiva, do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IL-1;IL-6; IL-8; IL-10; IL-12	Interleucinas 1, 6, 8, 10 e 12
Kb	Quilobases
L929	Linhagem de fibroblastos murinos
NFκB	Fator de transcrição
OPAS	Organização pan-americana de saúde
P16, p21, p27, P53	Inibidores do ciclo celular
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno, do inglês <i>polyvinylidene fluoride</i>

RIPA	Tampão, do inglês <i>radio immuno precipitation assay</i>
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência (sasp, do inglês <i>senescence-associated secretory phenotype</i>)
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIPS	Senescência prematura induzida por estresse (sips, do inglês <i>stress induced premature senescence</i>)
UV	Luz ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ENVELHECIMENTO	13
1.1.2	Fenômenos biológicos relacionados ao processo de envelhecimento	15
1.2	SENESCÊNCIA CELULAR	15
1.2.1	Fenótipo secretor associado à senescência (SASP)	17
1.2.2	Resposta ao dano no DNA	18
1.3	O ESTRESSE OXIDATIVO E A SENESCÊNCIA	20
1.3.1	Indução de senescência por H ₂ O ₂	21
1.4	OBJETIVOS	22
1.4.1	Objetivo geral	22
1.4.2	Objetivos específicos	22
2	DESENVOLVIMENTO	24
2.1	METODOLOGIA	24
2.1.1	Manutenção e passagem das células L929	24
2.1.2	Indução de senescência celular com H ₂ O ₂ em células L929 e análise morfológica	24
2.1.3	Ensaio de clonogenicidade	25
2.1.4	Extrato de proteínas de lisatos celulares	26
2.1.5	Determinação de proteínas totais em lisatos celulares pelo método de Lowry	26
2.1.6	Identificação de proteínas em lisatos celulares por meio de <i>immunoblotting</i>	27
2.1.7	Análise estatística	28
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.2.1	Análise morfológica após estresse oxidativo com H ₂ O ₂ em células L929	28
2.2.3	Avaliação de expressão das proteínas associadas à senescência	32
2.2.3.1	<i>Expressão da proteína p21 em células L929 após estímulo com H₂O₂</i>	32
2.2.3.2	<i>Expressão da proteína p53 em células L929 após estímulo com H₂O₂</i>	33
3	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

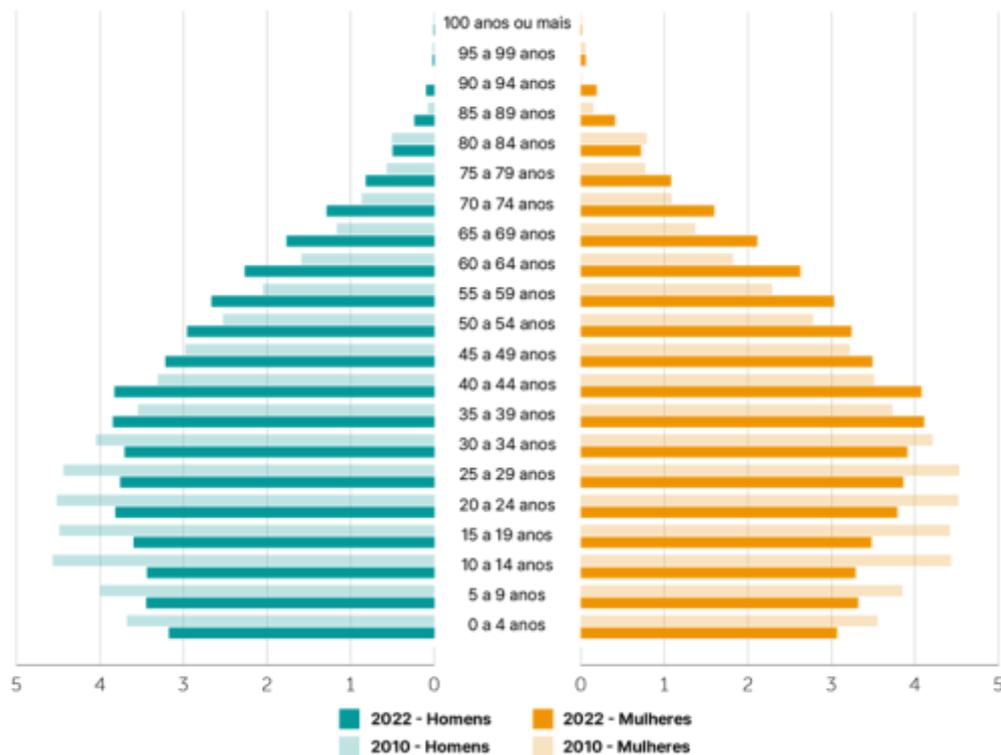
A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) define envelhecimento como um processo sequencial, individual, acumulativo, irreversível, universal, não patológico, de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de maneira que o tempo o torne menos capaz de fazer frente ao estresse do meio-ambiente e, portanto, aumente sua possibilidade de morte. (REISBERG *et al.*, 2011).

Desse modo, o envelhecimento pode ser entendido como um fenômeno fisiológico, que ocorre comumente em vários órgãos e tecidos, culminando em alterações morfológicas e cinéticas dependentes da idade. Estas alterações estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, devido ao declínio funcional gradual nas funções desses órgãos e tecidos, gerando uma redução da qualidade de vida (MACHADO, 2020; SOUZA, SANTOS e REIS, 2021).

O progresso tecnológico, social e da medicina, juntamente com a diminuição da taxa de natalidade e fecundidade, e o declínio na taxa de mortalidade são eventos que proporcionaram o aumento da expectativa de vida, resultando em uma população proporcionalmente mais idosa. Em contrapartida, o crescimento da população com 60 anos ou mais não tem assegurado que essas pessoas alcancem idades mais avançadas mantendo a saúde (CAMARGO; PASINATO, 2010; MACHADO, 2020; SOUZA, SANTOS e REIS, 2021).

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), do ano de 2010 a 2022, a parcela de pessoas com 60 anos ou mais passou de 11,3% (22,3 milhões) para 14,7% (31,2 milhões) da população, crescendo 39,8% no período (Figura 1). Nas próximas décadas, o país deverá vivenciar um processo acentuado e rápido de envelhecimento (IBGE, 2023).

Figura 1 - População residente (%) no Brasil por grupos de idade.



Fonte: Censo Demográfico 2022: População por idade e sexo - Resultados do universo; IBGE- Censo Demográfico 2010.

Uma maior expectativa de vida não se traduz necessariamente em viver de forma mais saudável ou com mais qualidade de vida. Dessa forma, à medida que o aumento da população idosa ocorre em todo o mundo, a necessidade de pesquisar e desenvolver estratégias para um envelhecimento saudável torna-se cada vez mais relevante (MASTELLA, 2018).

Assim, o prolongamento da vida humana tem motivado grupos de pesquisa a procurarem abordagens para esclarecer as respostas biológicas ligadas ao processo de envelhecimento, além de identificar elementos com potencial para retardá-lo (CRUZ, 2014; LOPES, ARAÚJO e NASCIMENTO, 2016).

1.1.2 Fenômenos biológicos relacionados ao processo de envelhecimento

As alterações decorrentes do processo de envelhecimento ocorrem como consequência de eventos intrínsecos que consistem em mudanças geneticamente programadas e eventos extrínsecos que decorrem de um acúmulo de danos ambientais como a exposição à radiação ultravioleta, o sedentarismo, o estresse, entre outras. Nesse contexto, o envelhecimento ocorre como resposta adaptativa às situações ambientais. À medida que ocorre um acúmulo progressivo de lesões celulares, a prevalência de células senescentes persistentes aumentam. Este processo é responsável por desencadear o fenótipo de envelhecimento (KAIM e BACKES, 2019).

Em consonância, alguns estudos sugerem que a senescência é percebida como um estado celular ativado em resposta a danos persistentes ao DNA. Dentre os estímulos responsáveis por esse estado, destaca-se o encurtamento dos telômeros e os danos oxidativos (DEKKER *et al.*, 2011, BIRAN *et al.*, 2017).

1.2 SENESCÊNCIA CELULAR

Em 1961, Hayflick e Moorhead demonstraram em um estudo *in vitro* a alteração da fisiologia e a consequente redução da capacidade proliferativa de fibroblastos primários isolados da pele de galináceos, denominando esse fenômeno como senescência. Posteriormente, compreendeu-se que este limite máximo no número de divisões celulares, está associado ao encurtamento progressivo dos telômeros (BLACKBURN E GALL 1978), sendo conhecido como “limite de Hayflick” (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010).

Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos com sequências curtas de nucleotídeos que se repetem ao longo do DNA, com comprimento variando entre 5 e 15 kb (quilobases = mil nucleotídeos). Eles desempenham um papel crucial para garantir que, a cada novo ciclo celular, os cromossomos tenham seu material genético protegido contra fusão ou degradação (KUMAR, ABBAS e ASTER, 2018; WHITTEMORE *et al.*, 2019).

O encurtamento progressivo dos telômeros ocorre devido a redução da atividade da telomerase, enzima responsável pela adição de sequências específicas e

repetitivas de DNA à extremidade 3' dos cromossomos. Quando o telômero atinge um comprimento crítico ocorre a perda dessa capacidade protetiva e, conseqüentemente, a indução de uma resposta de dano no DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*). Como resultado ocorre a parada do ciclo celular, sendo este o mecanismo da senescência replicativa (RS, do inglês *replicative senescence*) devido a finita capacidade replicativa celular (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; ALLSOPP; HARLEY, 1995; KUILMAN *et al.*, 2010).

Diferentes mecanismos foram sugeridos como responsáveis pelo encurtamento telomérico. Uma variedade de fatores ambientais, como tabagismo, obesidade, etilismo, níveis de estresse e atividade física, alimentação e qualidade do sono, que podem modular o comprimento dos telômeros, juntamente com o envelhecimento cronológico (TURNER, VASU e GRIFFIN, 2019).

A constatação de que o encurtamento telomérico pode aumentar significativamente, chegando até dez vezes, em condições de estresse oxidativo também foi sugerida por Von Zglinicki *et al.* (1995). Essa colocação foi confirmada por meio de um estudo *in vitro*, no qual fibroblastos submetidos a condições de cultura em condições hiperóxicas apresentaram um encurtamento telomérico de até 500 pb (pares de base) por divisão celular. Esse valor é consideravelmente superior ao encurtamento telomérico de aproximadamente 20-50 pb por divisão em condições normóxicas.

A senescência celular também pode ser desencadeada por diferentes tipos de estresses, como o aumento do estresse oxidativo, agentes alquilantes (TIAN *et al.*, 2011), disfunções mitocondriais (WILEY *et al.*, 2016), disfunções metabólicas (LEE *et al.*, 2006, MORGUNOVA *et al.*, 2015), distúrbios epigenéticos (NARITA *et al.*, 2003, COLLADO; SERRANO, 2010; KUILMAN *et al.*, 2010; DI MICCO *et al.*, 2021), radiações ionizantes/ultravioleta e processo de tradução alterado (CHAINIAUX *et al.*, 2002, DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2005, PAYEA *et al.*, 2021).

Os danos intrínsecos e/ou extrínsecos são capazes de provocar uma resposta direta ou indiretamente de danos ao DNA, interrompendo a proliferação celular e tornando as células senescentes. Este tipo de senescência é denominada prematura induzida por estresse (SIPS, do inglês *stress induced premature senescence*) (TOUSSAINT; MEDRANO; VON ZGLINICKI, 2000; DI MICCO *et al.*, 2021).

O fenótipo senescente é caracterizado por um conjunto de marcadores que, juntos, permitem sua identificação, estando entre eles: parada permanente do ciclo

celular, marcadores moleculares e celulares, como alterações morfológicas, rearranjo da cromatina ou modulação da autofagia; reprogramação metabólica; aumento da atividade e expressão da enzima β -galactosidase (β -gal) associada à senescência (SA- β gal), amplamente utilizada como um dos principais marcadores de senescência celular combinada com outros marcadores para aumentar a precisão da identificação de células senescentes; e secreção de citocinas e quimiocinas que compõem o fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *senescence-associated secretory phenotype*). (DUTTA GUPTA; PAN, 2020)

1.2.1 Fenótipo secretor associado à senescência (SASP)

O acúmulo de células senescentes nos tecidos contribui para o estabelecimento de uma inflamação crônica “estérel” (*inflammaging*) associada ao envelhecimento, que se manifesta devido à secreção ininterrupta de mediadores pró-inflamatórios, como metaloproteinases, quimiocinas, citocinas e outras moléculas sinalizadoras que, coletivamente, são denominadas “fenótipo secretor associado a senescência” (SASP). Este fenótipo promove um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 (α e β), IL-6 e IL-8, além de TNF- α e IL-12 e da citocina regulatória IL-10 (normalmente associada à atenuação da resposta pró inflamatória). Além disso, ocorre uma elevada secreção de fatores de crescimento, como a CCL2 (do inglês, *chemokine (C-C motif) ligand 2*) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) (FORSBERG, 2017; HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018; BIRCH; GIL, 2020; DUTTA GUPTA; PAN, 2020; WANG, *et al.*, 2020). O fator de transcrição NF- κ B desempenha um importante papel na regulação do perfil SASP durante a senescência celular. Sua ativação ocorre em resposta a danos ao DNA, estresse oxidativo e outros estímulos senescentes, culminando na secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que alteram o microambiente tumoral, regulando a expressão de genes relacionados à inflamação e resposta imune, impedindo desta forma a proliferação de células danificadas. Contudo, sua ativação prolongada propicia um ambiente inflamatório (MINYOUNG LEE, 2014).

Sendo assim, estado senescente pode ser compreendido por meio da regulação positiva de inibidores do ciclo celular p53, p16 e p21, ou através da

produção de interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), a fim de deter permanentemente células danificadas (YUN; DAVAAPIL; BROCKES, 2015; MCHUGH; GIL, 2018).

As moléculas do perfil SASP contribuem para a degradação da matriz intercelular e induzem senescência em células vizinhas, chamada de senescência parácrina (UNGERLEIDER *et al.*, 2021), intensificando a persistência de células senescentes. O acúmulo de células senescentes é frequentemente observado em cérebros de idosos, corroborando que a senescência celular está inserida na ocorrência ou agravamento de doenças neurodegenerativas e deficiências cognitivas (SI; SUN; WANG, 2021; UNGERLEIDER *et al.*, 2021), devido a fragilidade e maior vulnerabilidade ao desenvolvimento destas injúrias, resultando em uma série de doenças crônicas relacionadas à idade, como câncer, aterosclerose, fibrose hepática, obesidade, Doença de Parkinson, Alzheimer, artrite reumatóide, entre outras (CHEN *et al.* 2022).

Sugere-se, portanto, que a senescência pode representar uma escolha viável para retardar o curso do processo de envelhecimento e tratar ou retardar doenças relacionadas à idade.

1.2.2 Resposta ao dano no DNA

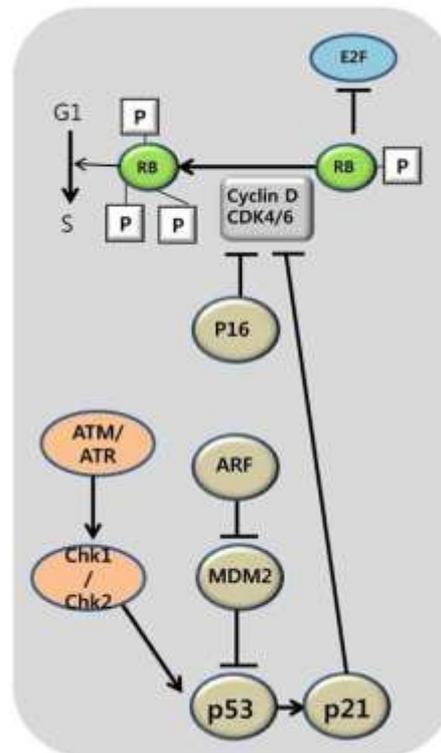
O ciclo celular é composto por duas grandes fases: a interfase e a mitose (divisão da célula). A interfase é composta pelas fases G1 (crescimento pré-sintético), S (síntese de DNA) e G2 (crescimento pré-mitótico). A mitose, conhecida como fase M (mitótica), é composta pela prófase, metáfase, anáfase, telófase. O processo de ciclo celular é regulado por diversos inibidores e ativadores que realizam o controle de qualidade da replicação (*checkpoints*). Dessa forma, para uma próxima etapa do ciclo ocorrer sem erros, é necessário que a etapa anterior seja concluída com a ativação dos fatores correspondentes. Se a replicação do DNA não for realizada adequadamente ou se houver falta de cofatores, a interrupção ocorrerá em diversos pontos de transição (KUMAR, ABBAS e ASTER, 2018).

Os danos ao DNA são detectados através de uma cascata de amplificação de sinal conhecida como resposta a danos no DNA (DDR), que ocorre quando as células respondem à captação do dano ao DNA, interrompendo a progressão do ciclo celular a fim de iniciar a tentativa de reparação. A proliferação não é retomada até que haja

reparação do dano. Quando as lesões no DNA não são reparadas, ou seja, a DDR é prolongada, ocorre a parada permanente da proliferação, culminando em uma senescência celular. Nesta condição, as células se mantêm vivas, contudo, incapazes de proliferar devido à sinalização DDR incessante causada pelo dano persistente ao DNA (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008).

A ativação da DDR é iniciada pela ativação das quinases sensoras de dano ao DNA ataxia telangiectasia mutada (ATM, do inglês *ataxia-telangiectasia mutated*) e pela via ATM referente a Rad-3 (ATR, do inglês *ATM- and Rad3-Related*), ativando a proteína tumoral p53 (TP53, do inglês *tumor protein 53*) e induzindo a parada do ciclo celular. A TP53 regula a ativação de proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinases*), como a p15 (CDKN2B), a p16 (CDKN2A), a p21 (CDKN1A) e a p27 (CDKN1B), responsáveis por sinais de parada do ciclo celular. Uma vez fosforilada (ativada) a p53 induz a ativação da p21, que atua inibindo as ciclinas-dependentes de quinases, impedindo a progressão do ciclo celular. A interrupção da progressão do ciclo celular, também pode ocorrer pela ativação da p16, que inibe as CDK4 e CDK6. Esse processo resulta da repressão contínua dos genes pertencentes à família E2 de fatores de transcrição ligantes ao DNA (E2F, do inglês *promoter binding factor*), essenciais para a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, onde ocorre a replicação (WAAIJER *et al.*, 2012; MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014; VAN DEURSEN, 2014).

Figura 2 - Via de sinalização da senescência prematura



Fonte: A imagem foi retirada do artigo BMB Rep. 2014 Feb; 47(2): 51–59. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163898/>.

As células senescentes não apresentam, necessariamente, todos os marcadores mencionados na literatura. Sendo assim, como mencionado anteriormente, a identificação se dá por um conjunto dessas características correspondentes ao seu fenótipo senescente, bem como proteínas que estejam associadas à progressão do ciclo celular, aumento e atividade da expressão da enzima β -galactosidase, citocinas e mediadores pró inflamatórios (WAAIJER *et al.*, 2012; CAMPISI, 2013).

1.3 O ESTRESSE OXIDATIVO E A SENESCÊNCIA

A senescência celular provocada pelo estresse oxidativo tem sido reconhecida como um modelo *in vitro* valioso para investigar o processo de envelhecimento, haja visto que é um processo altamente prejudicial ao DNA. A teoria do envelhecimento

causado por radicais livres sugere que as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o metabolismo aeróbico normal danificam as biomoléculas, culminando na parada das funções dos tecidos e ao envelhecimento (HARMAN, 2001).

As EROs são metabólitos tóxicos capazes de desencadear diferentes patologias e englobam tanto radicais livres de oxigênio, como o superóxido e a hidroxila, quanto outras espécies reativas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (BECKMAN; AMES, 1998). Estes radicais aparecem devido a instabilidade de seus elétrons desemparelhados, resultando em um alto potencial de reatividade com as moléculas biológicas. Contudo, em baixas concentrações, ou em níveis considerados ótimos/adequados, possuem importante atuação na manutenção do equilíbrio celular. Nesse contexto, existem substâncias, tanto naturais quanto sintéticas, com capacidade antioxidante, as quais têm a função de estabilizar ou neutralizar as EROs antes que estas possam ocasionar dano celular (DA; GOUVEIA; LIMA, 2017).

Existem numerosas evidências que sustentam a teoria das EROs, resultando em uma extensa investigação do papel do estresse oxidativo no processo de envelhecimento (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004; SADIQ, 2021). Diferentes tipos de estresses oxidativos têm sido utilizados para induzir senescência prematura em modelos celulares, como: luz ultravioleta (UV) (TOUSSAINT; HOUBION; REMACLE, 1992), terc-butil hidroperóxido (RODEMANN *et al.*, 1989), hiperóxia (VON ZGLINICKI *et al.*, 1995) e a exposição a peróxido de hidrogênio (CHEN; AMES, 1994), sendo este último o indutor mais frequentemente utilizado.

1.3.1 Indução de senescência por H_2O_2

O uso difundido do peróxido de hidrogênio visa provocar a senescência prematura em um intervalo de tempo reduzido de forma telômero-dependente pela exposição ao estresse oxidativo leve (BEN-PORATH; WEINBERG, 2004; DUAN *et al.*, 2005), por conta das quebras de fita simples nas regiões teloméricas, o que ocasiona o encurtamento acelerado dos telômeros (VON ZGLINICKI; PILGER; SITTE, 2000; VON ZGLINICKI, 2002). As células senescentes resultantes desse processo exibem marcadores semelhantes às células senescentes replicativas, tornando-se assim,

uma ferramenta *in vitro* valiosa para estudos sobre o envelhecimento mediante estresse oxidativo, por se tratar de um potente processo capaz de produzir danos ao DNA (VON ZGLINICKI *et al.*, 1995).

Em 2012, Kiyoshima e colaboradores avaliaram o efeito que o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ gerou em fibroblastos gengivais murinos. Foram investigadas as mudanças no número de células dependentes da idade, assim como as mudanças no comportamento biológico após estímulo com H₂O₂. O estudo demonstrou que o estresse oxidativo gerado, induziu uma diminuição no número de células murinas cultivadas, além do aumento da proporção de células positivas para SA-β-gal (do inglês, *senescence-associated β-galactosidase*), um conhecido marcador de senescência celular, que catalisa a hidrólise de β-galactosídeos em monossacarídeos somente em células senescente, viabilizando o desenvolvimento de estudos *in vitro* voltados para a investigação de potenciais agentes inibidores desse processo.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Estabelecer e padronizar uma técnica para a indução e detecção de senescência celular usando peróxido de hidrogênio na linhagem de fibroblastos murinos L929.

1.4.2 Objetivos específicos

- Induzir a senescência celular com H₂O₂ em fibroblastos murinos da linhagem L929.
- Observar as alterações morfológicas induzidas por H₂O₂ em fibroblastos murinos da linhagem L929.
- Avaliar a proliferação das células L929 após o estímulo com H₂O₂ pelo ensaio de clonogenicidade.

- Analisar a modulação da expressão de marcadores de senescência celular (p21 e p53) e envolvidos no processo inflamatório (fator de transcrição NFκB) e da proteína constitutiva GAPDH (do inglês, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) por *western blot* em fibroblastos murinos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Manutenção e passagem das células L929

As células da linhagem L929 de fibroblastos murinos foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB - *Cultilab*, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (*Gibco/Life Technologies*, EUA) e mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após atingirem subconfluência (aproximadamente 80%) em garrafa de 25 cm² (*T-25*, Corning) as células foram removidas por ação enzimática com solução de tripsina-EDTA [0,25% - 0,02% em tampão salino-fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) (*Sigma-Aldrich*, EUA). As células foram incubadas com 5% de CO₂ por 5 minutos a 37 °C para ação enzimática. Após este período, a reação proteolítica da tripsina foi paralisada pela adição de 5 mL de DMEM suplementado com 10% SFB. As células foram centrifugadas a 127×g, à temperatura ambiente, por 10 minutos para remoção da tripsina. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio ótico de campo claro (*Zeiss*, aumento de 100 ×) pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,4 % para posterior utilização.

2.1.2 Indução de senescência celular com H₂O₂ em células L929 e análise morfológica

A indução de senescência celular foi realizada após plaqueamento das células L929 em placas de 24 poços (1×10⁵/ poço; Corning, EUA) e incubadas por 24h em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂ para adesão. Após período de incubação, as células foram submetidas ao estresse oxidativo com diferentes concentrações (0; 25; 50 e 100 µM) de H₂O₂ por 2 h, exclusivamente neste primeiro experimento. Após este período, a solução de H₂O₂ foi removida e as células L929 foram lavadas três vezes com 500 µL PBS. Em seguida, foram adicionados 500 µL de DMEM suplementado e as células incubadas por 48 h.

Nos demais experimentos, para coleta de proteínas do extrato celular, as células L929 foram semeadas (1×10^6 / poço) em placas de 6 poços (Costar 3516) e submetidas ao estresse oxidativo com diferentes concentrações de H_2O_2 (0; 25; 50 e 100 μ M), por 1 h em estufa a 37 °C e 5 % de CO_2 . Após este período, a solução de H_2O_2 foi removida e as células L929 foram lavadas por três vezes com 2 mL de PBS. Em seguida, foi adicionado 2 mL DMEM suplementado e incubadas por 48 h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados para posterior quantificação de citocinas pró inflamatórias e foi realizado o extrato de proteínas totais para avaliação da expressão de proteínas associadas à senescência por *western blot*. De forma alternativa, as células foram coletadas e contadas pelo método de exclusão por azul de tripan 0,4 % para ensaio de clonogenicidade.

A morfologia das células L929 estimuladas com H_2O_2 foi avaliada em microscópio invertido Nikon Eclipse TS-100 utilizando a câmera Moticam 5.0 (Motic, China) em um aumento de 100x e 400x após 10 dias de plaqueamento e indução de senescência.

2.1.3 Ensaio de clonogenicidade

Após lavagem e contagem, as células foram semeadas (2×10^2 /poço) em placa de 6 poços contendo 2 mL de DMEM suplementado e incubadas por 7 dias em estufa a 37 °C e 5 % de CO_2 para proliferação. Após o término da incubação, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes. Em seguida, as células foram coradas com o kit panótico rápido (Laborclin, Brasil), composto por 3 soluções, sendo elas:

- Solução de triarilmetano 0,1 % (fixador)
- Solução de xantenos 0,1 % (corante acidófilo)
- Solução de tiazinas 0,1 % (corante basófilo)

Cada solução foi adicionada no poço na ordem de 1 a 3 e mantida por 30 segundos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes. Após coloração e secagem das células, foram obtidas imagens e a contagem do número de colônias formadas foi avaliada pelo *software* no ImageJ (NIH, EUA).

2.1.4 Extrato de proteínas de lisatos celulares

Após indução de senescência com H_2O_2 , o sobrenadante das células foi removido e os poços lavados por 3 vezes com 1 mL de PBS. Após lavagens foram adicionados 60 μ L de tampão RIPA (do inglês *Radio Immuno Precipitation Assay*; Tris a 50 mM pH 8,0; NaCl a 150 mM; NP-40 a 1%; SDS a 0,1 %; desoxicolato de sódio a 0,5%; PMSF a 1 mM e inibidores de fosfatase MS-SAFE 1X em cada poço. Com o auxílio de um *scraper*, o fundo do poço foi raspado, o extrato foi coletado e sonificado por 5 min em água com gelo. Em seguida, o lisato celular foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante com as proteínas solúveis coletados e armazenados no ultrafreezer (-80°C) até o momento em que foi feita a dosagem de proteínas e *western blot*.

2.1.5 Determinação de proteínas totais em lisatos celulares pelo método de Lowry

A curva padrão de proteínas foi preparada a partir de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) à 20 mg/mL. O primeiro ponto da curva (2 mg/mL) foi preparado a partir da diluição 1:10 da solução estoque. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada pela diluição 1:3 a partir do primeiro ponto da curva para obtenção dos demais pontos da curva. Para dosagem de proteínas foi utilizado o kit (*DC Protein Assay*) da Bio-Rad. De forma resumida, em uma placa de 96 poços de fundo chato foram colocados 5 μ L de cada concentração da curva padrão e 5 μ L de cada amostra. Em seguida, foram adicionados os reagentes do kit conforme instruções do fabricante (25 μ L da solução de reagente A+S e 200 μ L do reagente B), dos reagentes de Lowry da Bio-Rad. Após 15 minutos de incubação em ambiente protegido da luz, a leitura foi realizada em leitor de microplacas com um comprimento de onda de 750 nm (*SpectraMax 190, Molecular Devices*).

2.1.6 Identificação de proteínas em lisatos celulares por meio de *immunoblotting*

Após a dosagem, foi calculado o volume necessário para que o carregamento de proteínas fosse de 30 µg/raia. Antes de adicionar o conteúdo a cada raia, ao volume de proteínas calculado foram adicionados 20% do tampão de amostra *Laemmli* (Tris-HCl a 50 mM, pH 6,8; SDS a 1%; 2-mercaptoetanol a 5 %; glicerol a 10 % e azul de bromofenol a 0,001%). Depois, as proteínas foram submetidas a um aquecimento a 95°C por 5 minutos para desnaturação. As proteínas foram transferidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*). O gel de separação foi preparado a 10% e o gel de entrada foi preparado a 5%. As condições de corrida foram: 150V e 50 mA por 1 h e 30 min. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*) em sistema semi-seco (*transblot semi-dry*) utilizando tampão de transferência (Tris a 48 mM e Glicina a 39 mM).

A membrana foi corada com a solução de vermelho Ponceau para confirmação da transferência das proteínas do gel para a membrana. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução TBST (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4; NaCl a 150 mM; Tween 20 a 0,1%) contendo 5% Milk (leite em pó desnatado) por 2 h a temperatura ambiente sob agitação. A solução de bloqueio foi desprezada e a membrana foi incubada com o anticorpo contra as proteínas de interesse (p21, p53, NF-kB e GAPDH).

Após período de incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes com TBST por 5 min a cada lavagem, e posteriormente incubadas com o anticorpo (ac) conjugado a HRP anti-IgG (secundário contra camundongo ou coelho dependendo do anticorpo primário) por 1 h. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e duas vezes com TBS. A revelação foi realizada usando o sistema de quimiluminescência ECL e as membranas expostas a filme para contraste *Hyperfilm ECL (GE Healthcare)*. As bandas reveladas foram digitalizadas e os níveis relativos de expressão de proteínas foram quantificados utilizando o programa ImageJ (NIH).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para as marcações de *westernblot*.

	Marcação	Concentração	Fabricante
Ac. Primário	GAPDH	1:2000	Fitzgerald
Ac. Secundário	anti-camundongo	1:10000	Sigma Aldrich
	Marcação	Concentração	Fabricante
Ac. Primário	p21	1:1000	Cell Signaling
Ac. Secundário	anti-coelho	1:5000	Sigma Aldrich
	Marcação	Concentração	Fabricante
Ac. Primário	p53	1:500	Santa Cruz
Ac. Secundário	anti-camundongo	1:10000	Sigma Aldrich

Fonte: A Autora (2024).

2.1.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA/Bonferroni e expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

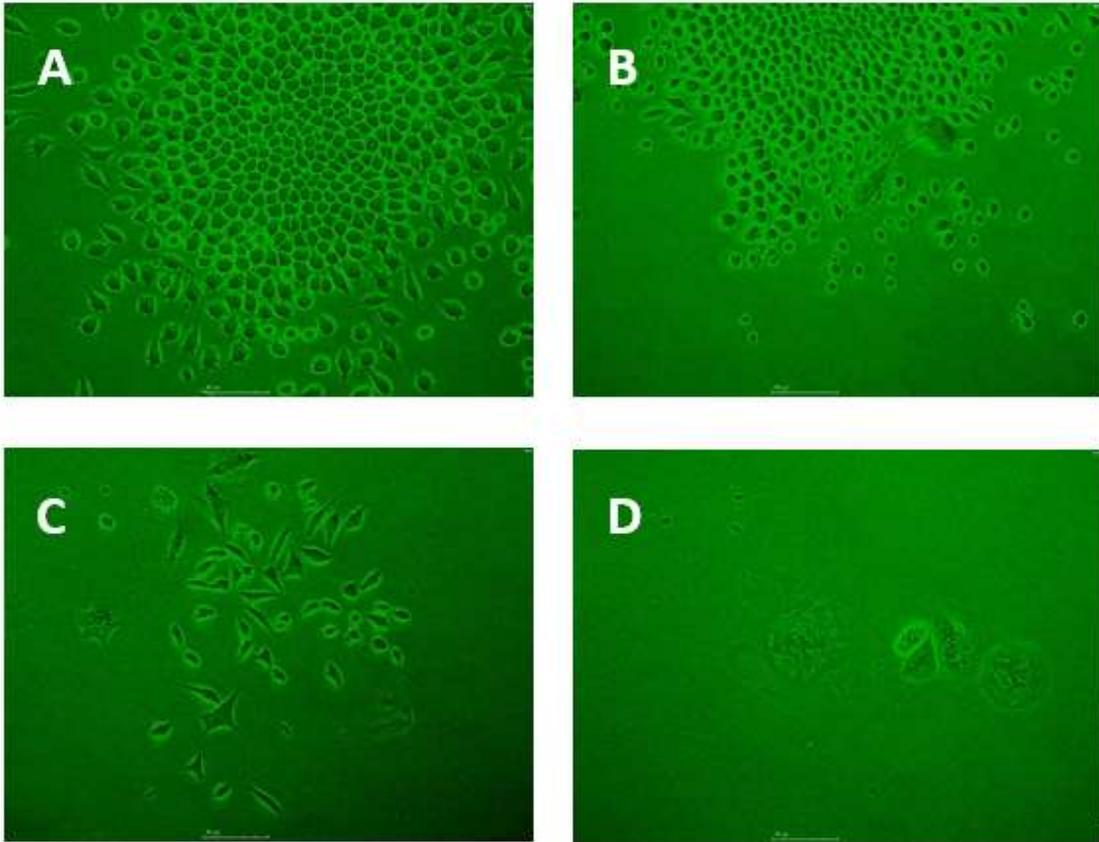
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Análise morfológica após estresse oxidativo com H_2O_2 em células L929

A morfologia das células L929 estimuladas com H_2O_2 foi avaliada em microscópio invertido Nikon Eclipse TS-100 utilizando a câmera Moticam 5.0 (Motic, China) em um aumento de 100x e 400x após 10 dias de plaqueamento e indução de senescência.

Como pode ser observado na Figura 2, as células incubadas com as maiores concentrações de H_2O_2 (50 e 100 μM) apresentaram características fenotípicas de células senescentes (aumento do tamanho das células e do núcleo). Além disso, foi observado um menor número de colônias formadas em relação ao grupo não estimulado (Figura 2C e 2D).

Figura 3 - Alteração morfológica induzida em fibroblastos murinos da linhagem L-929 com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.



Legenda: Fibroblastos da linhagem L929 foram plaqueados (1×10^5 /poço) em placa de 24 poços e tratados por 2 h com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio: (A) 0 μM ; (B) 25 μM ; (C) 50 μM ; (D) 100 μM . As imagens foram adquiridas em microscópio invertido com contraste de fase Nikon Eclipse TS-100 utilizando a câmera Moticam 5.0 (Motic, China) em um aumento de 100x. Barra de escala = 100 μm . Fonte: A Autora (2024).

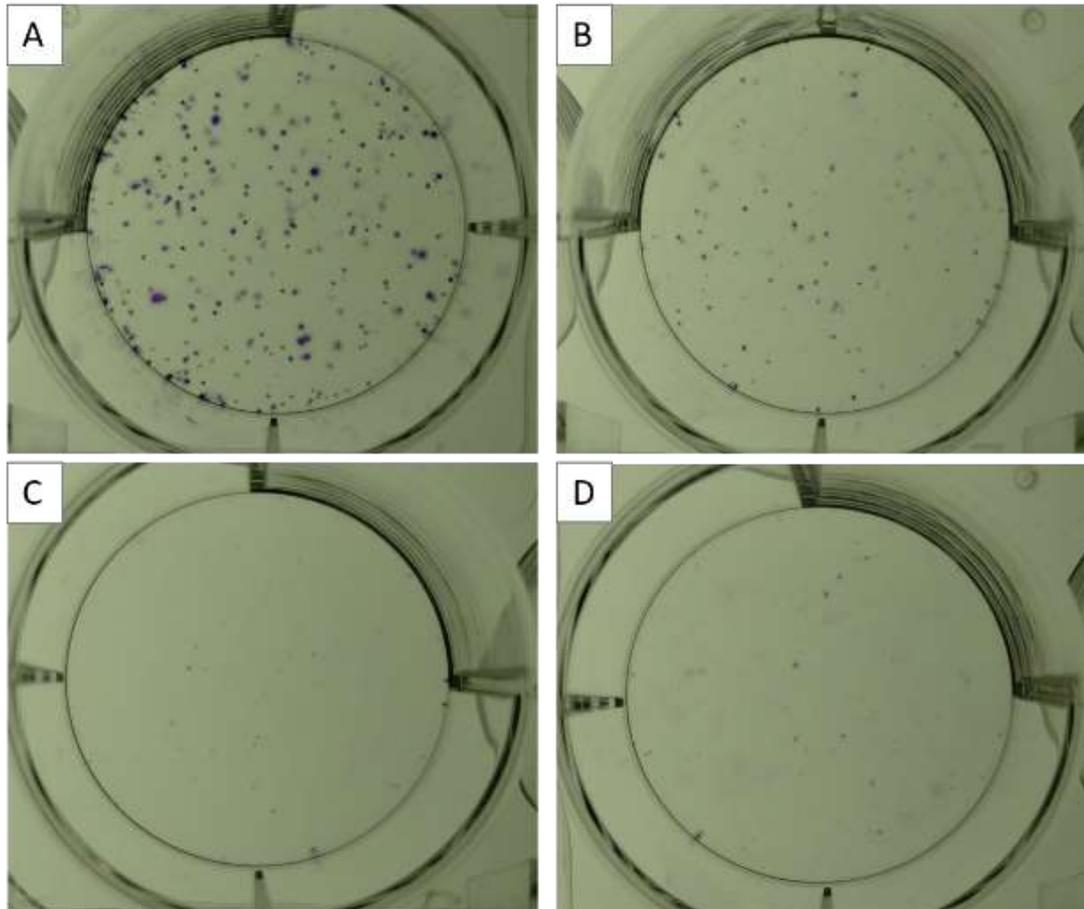
2.2.2 Avaliação quantitativa de colônias após indução de senescência por H_2O_2 em células L929

Considerando que a senescência celular prematura é caracterizada pela interrupção do ciclo celular, foi realizado o ensaio de clonogenicidade após tratamento de 1 h com diferentes concentrações de H_2O_2 (25-100 μM), a partir da quantificação do número de colônias formadas após 7 dias de plaqueamento.

Foi observado que existe uma relação inversamente proporcional entre a formação de colônias e a concentração de H_2O_2 , ou seja, quanto maior a concentração de H_2O_2 , menor é o número de colônias formadas (Figura 3). A quantificação do número de colônias foi realizada pelo programa de análise de

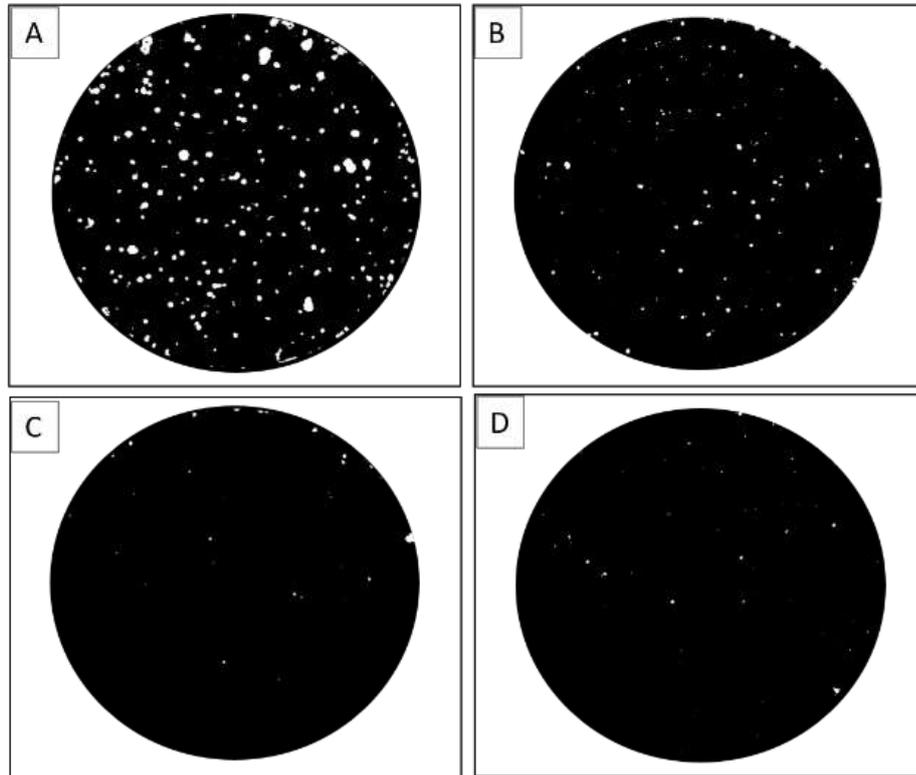
imagens Image J (NIH) (Figura 4) e plotados em gráfico no programa *Prism* versão 5.3 (Figura 5).

Figura 4 - Avaliação do efeito do peróxido de hidrogênio sobre a formação de colônias de células da linhagem L929.



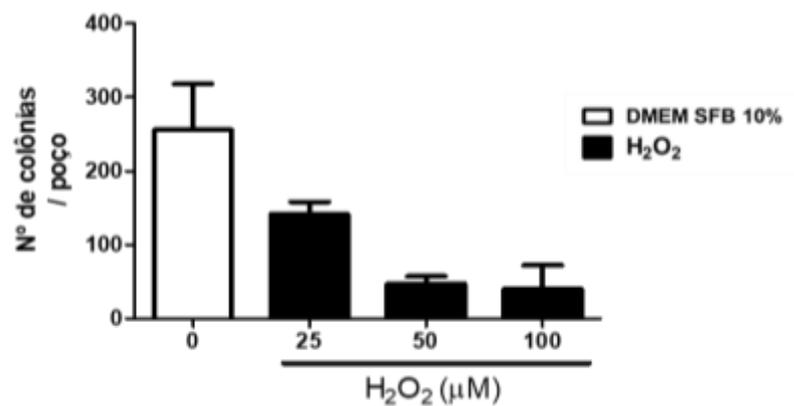
Legenda: Após incubação com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0-100 μM) por 1h, as células foram avaliadas quanto a sua capacidade de formação de colônias. Imagem representativa da formação de colônia das células por células L929 10 dias após o estímulo com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): (A) 0 μM ; (B) 25 μM . (C) 50 μM (D) 100 μM . Fonte: A Autora (2024).

Figura 5 - Análise do número de colônias formadas após incubação com peróxido de hidrogênio por 1h.



Legenda: Imagem da máscara criada pelo software ImageJ (NIH) para a contagem do número de colônias formadas após o estímulo com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): (A) 0 μM ; (B) 25 μM . (C) 50 μM (D) 100 μM . Fonte: A Autora (2024).

Figura 6 - Avaliação quantitativa de colônias após indução de senescência por H_2O_2 em células L929.



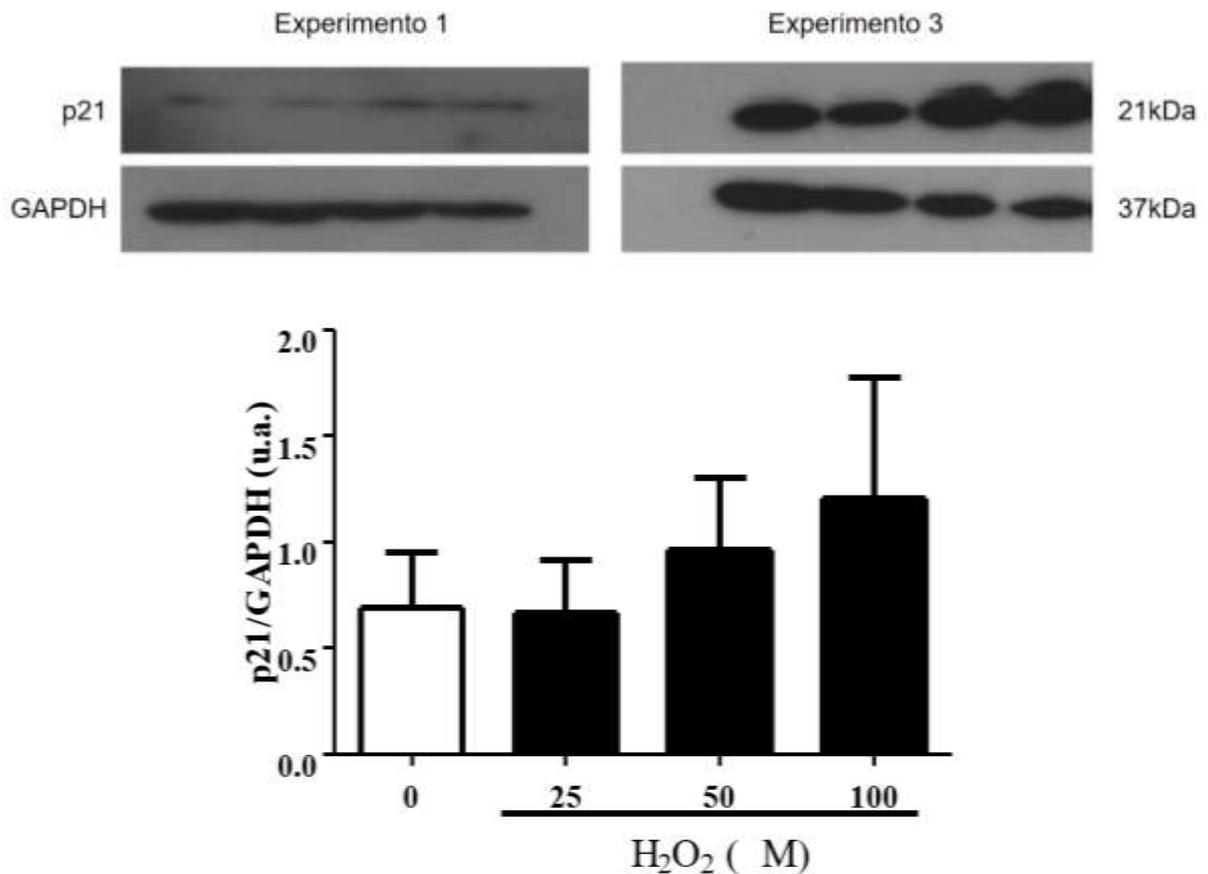
Legenda: Quantificação de colônias de 7 dias após tratamento com H_2O_2 . Os resultados obtidos são representativos de dois experimentos realizados em simplicata. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Fonte: A Autora (2024).

2.2.3 Avaliação de expressão das proteínas associadas à senescência

2.2.3.1 Expressão da proteína p21 em células L929 após estímulo com H_2O_2

A proteína p21 está envolvida na regulação do ciclo celular. O aumento da expressão desta proteína indica uma paralisação da divisão celular e a entrada em estado senescência celular. A incubação com H_2O_2 foi capaz induzir, na maior concentração, um leve aumento na expressão de p21, no entanto não houve diferença estatística entre os grupos estimulados ou não com peróxido de hidrogênio (Figura 6).

Figura 7 - Efeito do H_2O_2 sobre a expressão do marcador de senescência p21 em células da linhagem, L929.

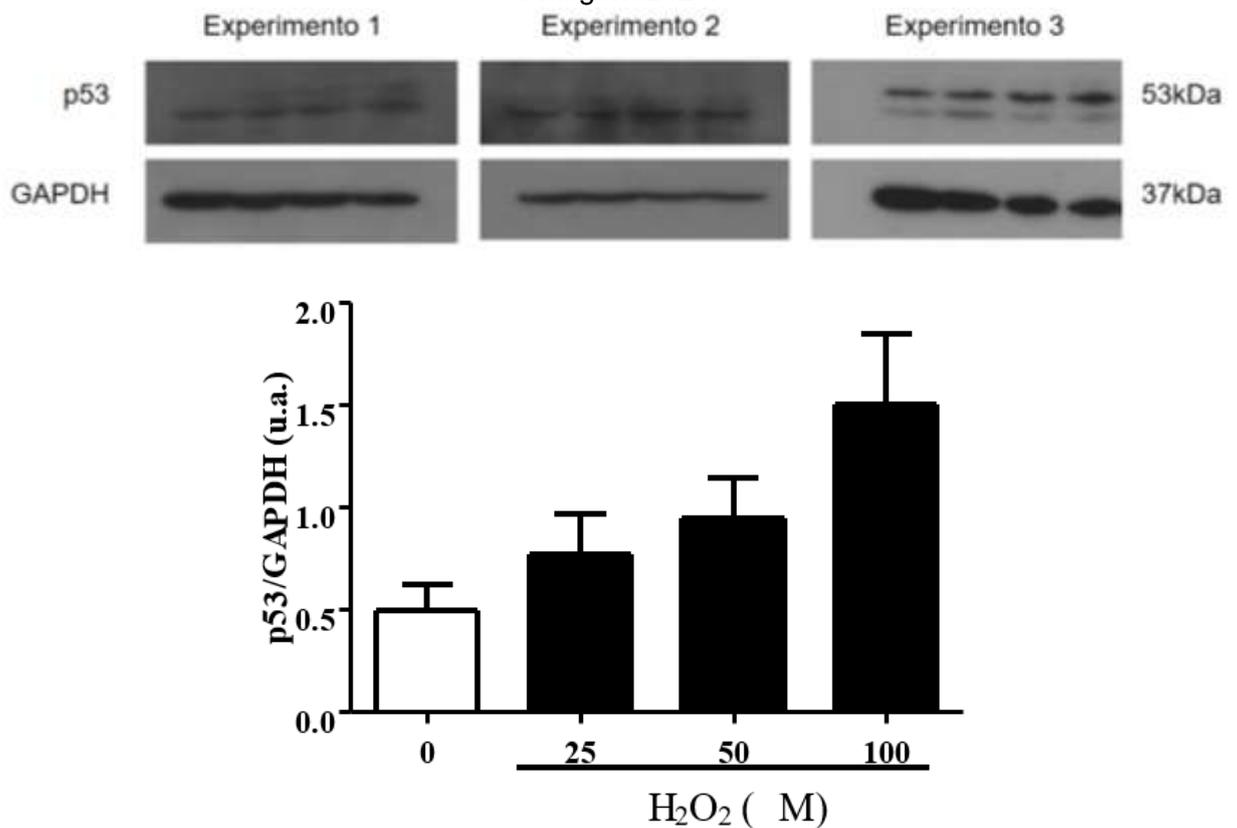


Legenda: A expressão de p21 1 h após tratamento com H_2O_2 . O *immunoblot* é representativo de dois experimentos independentes em simplicata. O gráfico em barra representa os resultados da expressão da p21 expressos como a média \pm o EPM dos dois experimentos. Fonte: A Autora (2024).

2.2.3.2 Expressão da proteína p53 em células L929 após estímulo com H₂O₂

O mesmo padrão de expressão pode ser observado ao ser avaliada a expressão da proteína p53, que também está envolvida na regulação do ciclo celular (Figura 7).

Figura 8 - Efeito do H₂O₂ sobre a expressão do marcador de senescência p53 em células da linhagem L929.



Legenda: A expressão de p53 1 h após tratamento com H₂O₂. O *immunoblot* é representativo de três experimentos independentes em simplicata. O gráfico em barra representa os resultados da expressão da p53 expressos como a média ± o EPM dos três experimentos. Fonte: A Autora (2024).

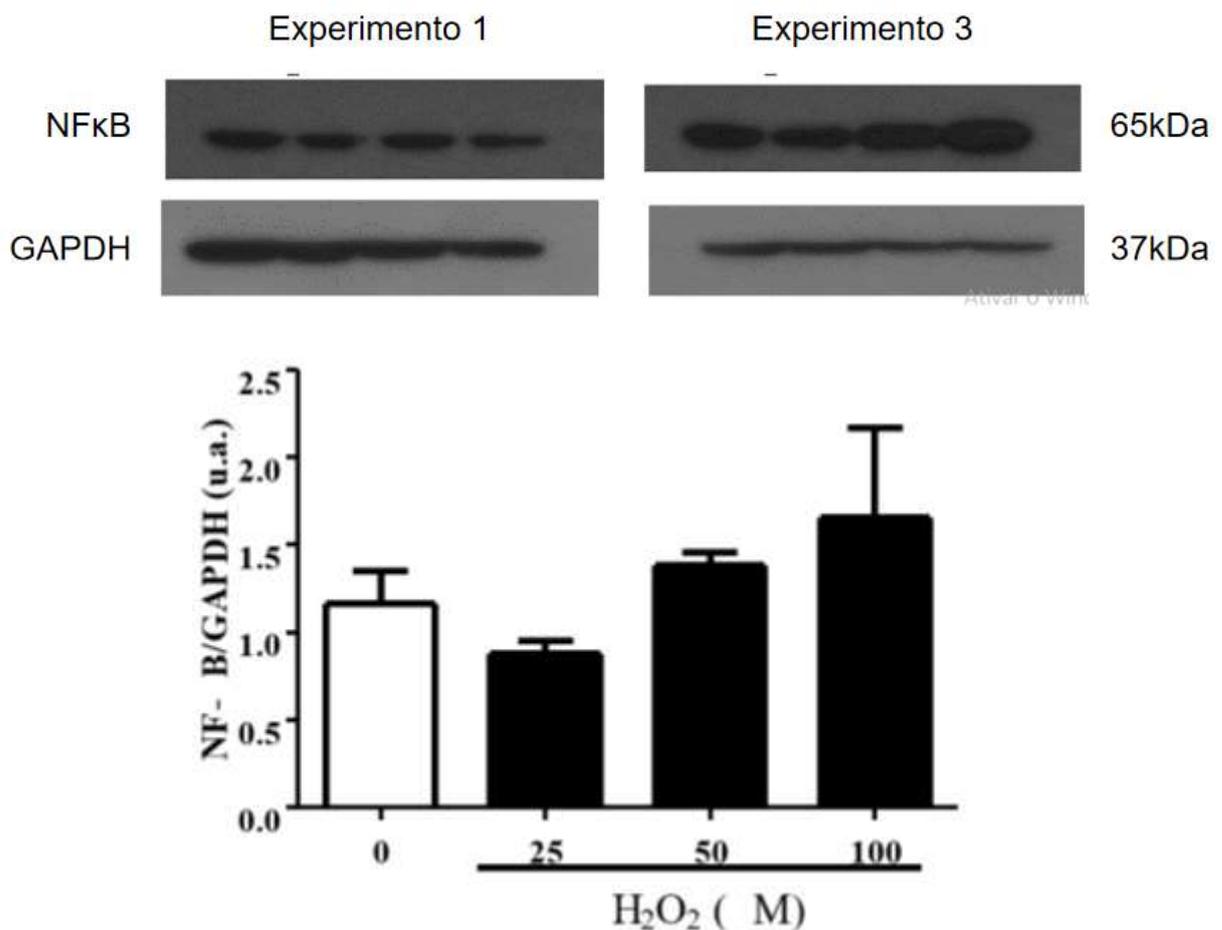
2.2.3.3 Expressão de NFκB em células L929 após tratamento com H₂O₂

O processo de senescência celular induz uma resposta inflamatória estéril, com ativação de fatores de transcrição como o NFκB, envolvido na transcrição de mediadores inflamatórios. Dessa forma, a fim de investigar se o estímulo com

peróxido de hidrogênio também seria capaz de ativar esta via do processo inflamatório, avaliamos a expressão do NFκB em células L929 (Figura 8).

Os dados obtidos sugerem que assim como a p21 e p53, há um indicativo que o tratamento com as maiores concentrações de H₂O₂ (50-100 μM) é capaz de induzir expressão deste marcador da inflamação no extrato celular total.

Figura 9 - Efeito do H₂O₂ sobre a expressão do marcador inflamatório NFκB em células da linhagem L929.



Legenda: Expressão de NFκB em extratos celulares totais 1 h após tratamento com H₂O₂. O *immunoblot* é representativo de dois experimentos independentes em simplicata. O gráfico em barra representa os resultados da expressão da NFκB expressos como a média ± o EPM dos dois experimentos. Fonte: A Autora (2024).

3 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível identificar a presença de importantes marcadores de senescência celular, como o aumento da expressão de p21, p53 e NFκB, além da interrupção da proliferação celular, caracterizando o bloqueio do ciclo celular. Para complementar a análise e confirmar a indução da senescência, serão avaliados outros marcadores, como a atividade da β-galactosidase, e a produção de mediadores inflamatórios, incluindo IL-6, CCL2 e o fator de crescimento VEGF, sob o mesmo protocolo experimental.

Os resultados obtidos até o momento são promissores e sugerem novas oportunidades para futuras investigações no Laboratório de Farmacologia Aplicada, especialmente no uso dessa técnica em ensaios futuros. Ressalta-se que os marcadores p21, p53 e NFκB, amplamente reconhecidos na literatura científica, desempenham papéis cruciais na resposta ao estresse celular e no bloqueio do ciclo celular. A expressão aumentada de p21 e p53, em particular, confirma o papel dessas proteínas no bloqueio do ciclo celular diante de danos ao DNA, enquanto o NFκB regula as respostas inflamatórias ligadas ao fenótipo secretor associado à senescência (SASP).

A análise posterior de outros marcadores, como a β-galactosidase, e de mediadores inflamatórios, como IL-6 e VEGF, será igualmente importante, dado que esses componentes estão intimamente associados ao processo de senescência e à inflamação crônica, comum em doenças relacionadas ao envelhecimento. Estudar esses mecanismos em maior profundidade permitirá o desenvolvimento de intervenções terapêuticas voltadas à mitigação ou ao retardamento da progressão de doenças relacionadas ao envelhecimento, seja por meio da eliminação ou modulação das células senescentes e seus efeitos deletérios.

4 REFERÊNCIAS

- ALLSOPP, R. C.; HARLEY, C. B. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 219, n. 1, 1995.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, 1998.
- BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. **Journal of Clinical Investigation**, 2004.
- BLACKBURN, E. H; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. **Journal of molecular biology**, v 120, n , p. 33-53, 1978.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 10- 11, 2004.
- BURTON, D. G. A.; KRIZHANOVSKY, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2014.
- CAMARGO, A. A; PASINATO, M. T. O envelhecimento populacional na agenda das políticas públicas. Rio de Janeiro: **IPEA**, 2010.
- CAMPISI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annual Review of Physiology**, 2013.
- CHAINIAUX et al. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 11, 2002.
- CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, 1994.
- COHEN-SAIDON et al. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 β . **Blood**, v. 107, n. 4, 2006.
- COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. **Nature Reviews Cancer**, 2010.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature Reviews Cancer**, 2008.
- DA, S.; GOUVEIA, S.; LIMA, A. Relationship Between Reactive Species Of Oxygen And Carcinogenic Promotion. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 3, p. 2317–4404, 2017.
- DAVALOS et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, 2010.

DEBACQ-CHAINIAUX et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 4, 2005.

DI MICCO et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2021.

DUAN et al. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 7, 2005.

DUTTA GUPTA, S.; PAN, C. H. Recent update on discovery and development of Hsp90 inhibitors as senolytic agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

FORSBERG, L. K. The Development of Small Molecules That Modulate Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70. Tese de Doutorado. **University of Kansas**, 2017.

FUHRMANN-STROISSNIGG, Heike et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2017.

FUMAGALLI, M.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. SASPense and DDRama in cancer and ageing. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 8, 2009.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O.; STRANDBERG, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, 2013.

GUPTA, S. D.; PAN, C. H. Recent update on discovery and development of Hsp90 inhibitors as senolytic agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1086-1098, 2020.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, 1990.

HARMAN, D. Aging: Overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2001.

HOTER, A.; EL-SABBAN, M. E.; NAIM, H.Y. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n.9, p. 2560, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Demográfico 2022: número de pessoas com 65 anos ou mais cresceu 57,4% em 12 anos. **Agência IBGE Notícias**, 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Demográfico 2022: População por idade e sexo - Resultados do universo. **Agência IBGE Notícias**, 2023.

KAIM, M.; BACKES, L. T. H. Envelhecimento celular: teorias e mecanismos. **Revista Saúde Integrada**, v. 12, n. 23, p. 178-189, 2019.

KIYOSHIMA et al. Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts.

International Journal of Molecular Medicine, v. 30, n. 5, 2012.

KRIZHANOVSKY et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis.

Cell, v. 134, n. 4, 2008.

KUILMAN et al. The essence of senescence. **Genes and Development**, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K. ASTER, J. C. Robins patologia básica. 10^a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2018.

KUO et al. Involvement of Heat Shock Protein (Hsp)90 β but Not Hsp90 α in Antiapoptotic Effect of CpG-B Oligodeoxynucleotide. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, 2007.

LETTIERI-BARBATO et al. MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs in the Redox Control of Cell Senescence. **Antioxidants**, 2022.

LI, J.; BUCHNER, J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. **Biomedical Journal**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 106-117, mai. 2013.

MACHADO, E. R. As ciências biológicas e a construção de novos paradigmas de conhecimento 2. Paraná: **Atena Editora**, 2020.

MARTÍNEZ-CUÉ, C.; RUEDA, N. Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2020.

Minyoung Lee, Jae-Seon Lee. "Exploiting Tumor Cell Senescence in Anticancer Therapy". **BMB Reports**, 47(2), 51-59, 2014.

MORGUNOVA, G., A. KOLESNIKOV, A. KLEBANOV AND A. KHOKHLOV. Senescence-associated β -galactosidase—A biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction?. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 70, n. 4, p. 165-167, 2015.

NARITA et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. **Cell**, v. 113, n. 6, 2003.

OBERMANN et al. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 4, 1998.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guía Clínica para Atención Primaria a las Personas Mayores**. 3^a ed. Washington: OPAS, 2003.

ÖZGÜR, A.; TUTAR, Y. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Oncology Current Proteomics. **Current Proteomics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 2-6, 2014.

PANARETOU et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. **EMBO Journal**, v. 17, n. 16, 1998.

PAYEA et al. Translational Control during Cellular Senescence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 41, n. 2, 2021.

REISBERG et al. Guía médica de atención integral del adulto mayor. **Ministeria de salud de Panama**, 2011.

RODEMANN et al. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 180, n. 1, 1989.

ROGER, L.; TOMAS, F.; GIRE, V. Mechanisms and regulation of cellular senescence. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

SADIQ, I. Z. Free Radicals and Oxidative Stress: Signaling Mechanisms, Redox Basis for Human Diseases, and Cell Cycle Regulation. **Current Molecular Medicine**, v. 23, n. 1, 2021.

SCHAFER, M. J.; MILLER, J. D.; LEBRASSEUR, N. K. Cellular senescence: Implications for metabolic disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 455, 2017.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v 9, p. 671–675, 2012.

SHIAU et al. Structural Analysis of E. coli hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements. **Cell**, v. 127, n. 2, 2006.

SI, Z.; SUN, L.; WANG, X. Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2021.

SONG et al. O mecanismo regulador da Hsp90 α extracelular no processamento da metaloproteinase-2 da matriz e na angiogênese tumoral. **Revista de Química Biológica**, v. 51, p. 40039-40049, 2010.

SOUZA, F. V. S.; SANTOS, A. S.; REIS, B. A. O. Envelhecimento populacional, políticas públicas voltadas para o idoso e a pandemia da COVID-19: alguns apontamentos possíveis. **Revista Longeviver**, v. 3, n. 12, 2021.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845- 2857, 2010.

TIAN et al. Study on the roles of β -catenin in hydrogen peroxide-induced senescence in human skin fibroblasts. **Experimental Dermatology**, 2011.

TOUSSAINT, O.; HOUBION, A.; REMACLE, J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 65, n. 1, 1992.

TOUSSAINT, O.; MEDRANO, E. E.; VON ZGLINICKI, T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. **Experimental Gerontology**, 2000.

TSUTSUMI et al. A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. **Oncogene**, v. 27, n. 17, 2008.

TURNER, K. J.; VASU, V.; GRIFFIN, D. K. Telomere biology and human phenotype. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 1.19, 2019.

UNGERLEIDER et al. Astrocyte senescence and SASP in neurodegeneration: tau joins the loop. **Cell Cycle**, v. 20, n. 8, 2021.

VAN DEURSEN, J. M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, 2014.

VON ZGLINICKI et al. Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence. **Experimental Cell Research**, v. 220, n. 1, 1995.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, 2002.

VON ZGLINICKI, T.; PILGER, R.; SITTE, N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 1, 2000.

WAAIJER et al. The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, 2012.

WILEY et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 2, 2016.

YUN, M. H.; DAVAAPIL, H.; BROCKES, J. P. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. **eLife**, v. 4, 2015.