

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA**

Moisés Henrique Mastella

**EFEITO MODULATÓRIO DO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron
adstringens* (Mart.) Coville) EM MARCADORES CITOFUNCIONAIS DE
FIBROBLASTOS HUMANOS SENESCENTES: ESTUDO *IN VITRO***

Santa Maria, RS

2018

Moisés Henrique Mastella

**EFEITO MODULATÓRIO DO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
Coville) EM MARCADORES CITOFUNCIONAIS DE FIBROBLASTOS HUMANOS
SENESCENTES: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Gerontologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Gerontologia.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Barbisan
Coorientadora: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, conforme dados fornecidos pelo autor.

Mastella, Moisés Henrique
Efeito modulatório do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) em marcadores citofuncionais de fibroblastos humanos senescentes: estudo in vitro / Moisés Henrique Mastella.- 2018.
83 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Barbisan
Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Educação Física e desportos, Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, RS, 2018

1. Envelhecimento 2. Senescência 3. Pele 4. Estresse Oxidativo 5. Telomerase I. Barbisan, Fernanda II. da Cruz, Ivana Beatrice Mânica III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Moisés Henrique Mastella

EFEITO MODULATÓRIO DO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) EM MARCADORES CITOFUNCIONAIS DE FIBROBLASTOS HUMANOS SENESCENTES: ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Gerontologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Gerontologia.**

Aprovado em 23 de julho de 2018:

Fernanda Barbisan, Dra. (UFSM)
(Orientadora/Presidente)

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)

Izabella Paz Danezi Felin, Dra. (UFSM)

Luiz Fernando Cuzzo Lemos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus nonos, Vitalin Pasquale Perlim (*in memoriam*) e Bromilda Zambra Perlim, essenciais nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus para qual eu agradeço a todas as boas pessoas que torcem por mim e me apoiam e a quem eu sempre recorro pedindo bençãos e proteçãos.

Aos meus pais, David Mastella e Bernadete Perlim Mastella, por sempre acreditarem no meu potencial, me estimularem a ir adiante, pelo amor, aporte emocional e financeiro nessa difícil caminhada.

A minha irmã, Debora Mastella, minha amiga e companheira durante toda minha caminhada acadêmica, com quem dividi alegrias e frustraçãos, podendo compartilhar o melhor de mim e também todos meus defeitos, sempre contando com ela.

Aos meus nonos amados, Vitalin e Bromilda, com quem passei grande parte da minha infância, muito obrigado por todos os ensinamentos, pelos bons momentos, pelas aventuras, por me ensinarem respeito, por serem como pais enquanto os meus lutavam por mim e pela minha irmã.

A minha primeira orientadora e atual coorientadora, Professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, meu eterno agradecimento por ter possibilitado que tudo isso ocorresse e pelo exemplo a ser seguido.

A minha atual orientadora e grande amiga, Professora Fernanda Barbisan, por toda paciência, pelos ensinamentos, dicas, puxões de orelha, pelas conversas e risos, serei sempre grato por tua ajuda.

As minhas amigas e colegas de laboratório: Verônica Azzolin e Cibele Teixeira, muito obrigado por todos os bons momentos, pelas caronas, correrias, risos, por sempre terem tentado me passar tudo o que sabiam sobre o laboratório.

A minha amiga e conterrânea, Louise Moreira, agradeço por sempre se fazer presente, torcer e me estimular a ir adiante.

As minhas amigas e parceiras Janaína Massirer, Carine Barcellos e Maíra Mastella, também ao meu amigo Giancarlo Santos, pelas junçãos, passeios, festas, cafés, e conversas, por me mostrarem como é importante ter bons amigos por perto.

A toda equipe do laboratório Biogenômica, em especial a Neida Pellenz, cujos esforços e dedicação continuando nos levando sempre adiante, mesmo as pequenas coisas no final, juntas, fazem toda diferença.

A Professora Marta Duarte e Professor Paulo Bayard a quem agradeço pelo suporte essencial em grande parte dos experimentos deste trabalho, e também aos alunos de iniciação científica

(ICs) do Laboratório Biogenômica, em especial Danieli Pillar, Beatriz Sadigursky e Bruna Chitolina, pelo auxílio nos testes.

Aos Professores do PG Gerontologia, especialmente Professora Angelita Jaeger e Professora Margrid Beuter, por terem me mostrado o outro lado do envelhecimento humano e despertado meu interesse em outras questões.

Também aos meus colegas do PG Gerontologia, por esse um ano de amizade e companheirismo.

“Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes” – Isaac Newton (1643 – 1727).

RESUMO

EFEITO MODULATÓRIO DO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) EM MARCADORES CITOFUNCIONAIS DE FIBROBLASTOS HUMANOS SENESCENTES: ESTUDO *IN VITRO*

AUTOR: Moisés Henrique Mastella

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Fernanda Barbisan

COORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Introdução: A pele, com o envelhecimento, sofre decréscimo de funções respondendo de forma mais lenta e parcial a processos de manutenção e regeneração. Por ser um fenômeno complexo, muitos quesitos estão envolvidos no desencadeamento e progressão do envelhecimento, no qual se destacam o encurtamento dos telômeros, diminuição na síntese de sirtuínas, níveis não controlados de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem levar ao estresse oxidativo, aumento das taxas de apoptose via super regulação da proteína p53 e também a estados inflamatórios crônicos. Uma vez que as populações humanas estão aumentando bem como sua expectativa de vida, identificar potenciais fatores que desacelerem o envelhecimento da pele pode ser considerado um aspecto de grande relevância. No Brasil existem muitas plantas que possuem ação cicatrizante e que também poderiam ter potencial ação na modulação de fatores associados ao envelhecimento da pele. Este é o caso do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), uma planta nativa dos Biomas Cerrado e Amazônia que possui sua matriz química rica em biomoléculas, como os taninos. **Objetivos:** avaliar *in vitro* o efeito modulatório do extrato aquoso de barbatimão em marcadores citofuncionais de uma linhagem comercial de fibroblastos humanos senescentes. **Metodologia:** a linhagem fibroblastos humanos (HFF-1), foi adquirida da ATCC-EUA via Banco de Células do Rio de Janeiro. No Laboratório de Biogenômica (UFSM), para se obter um fenótipo senescente, a linhagem foi cultivada em condições controladas (37°C e saturação de 5% de CO₂) durante diversas passagens até apresentar diminuição na taxa de proliferação em culturas de 72h e modificações citomorfológicas da monocamada celular. Nos fibroblastos-senescentes inicialmente foi realizada uma curva concentração resposta do extrato de barbatimão (0,49, 0,99, 1,99, 3,92 mg/mL) onde foi averiguado potencial efeito na viabilidade. A partir desta curva foram então escolhidas as concentrações com potencial eficácia e segurança para o prosseguimento das análises. As células novamente cultivadas foram expostas a estas concentrações e após 24 e 72 horas e através de ensaios espectrofotométricos, fluorimétricos, e de modulação de genes por técnica de qRT-PCR, foram conduzidas análises complementares em relação a parâmetros relacionados a viabilidade e proliferação celular, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e queratinócitos (KGF), morfologia, marcadores inflamatórios, como interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon gama (INF- γ), de apoptose celular, como as caspases (Casp 3 e 8) e a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). A expressão dos genes da telomerase, sirtuína e p53 foi usada como marcador de senescência. **Resultados:** a partir da curva inicial foram escolhidas as concentrações de 0,49 mg/mL e 0,99 mg/mL para avaliar o efeito do barbatimão na modulação da senescência dos fibroblastos. A proliferação celular foi aumentada apenas na concentração de 0,99 mg/mL. Entretanto, o aumento significativo nos níveis de FGF e KGF, a redução de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ), aumento da anti-inflamatória (IL-10) e decréscimo das Casp 3 e 8 e 8-OHdG foram dose-dependentes do extrato de barbatimão. Na expressão gênica os genes da telomerase e sirtuína apresentaram super expressão também de modo dose-dependente, enquanto para a p53 se observou *downregulation*. Apesar das limitações metodológicas associadas a protocolos *in vitro*, os resultados observados apontam para a capacidade modulatória do barbatimão quanto à senescência de fibroblastos dérmicos humanos senescentes (HFF1-old). Estes resultados sugerem que o barbatimão poderia ser utilizado em preparações cosméticas e ou dermatológicas que visem desacelerar o processo de envelhecimento da pele.

Palavras-chave: Envelhecimento. Senescência. Pele. Estresse Oxidativo. EROs. Telomerase. Sirtuína. P53. Fatores de Crescimento.

ABSTRACT

MODULATORY EFFECT OF BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) IN CYTOFUNCTIONAL MARKERS OF SENESCENT HUMAN FIBROBLASTS: *IN VITRO* STUDY

AUTHOR: Moisés Henrique Mastella

ADVISOR: Prof^a Dr^a Fernanda Barbisan

CO-ADVISOR: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Manica da Cruz

Introduction: the skin, with aging, undergoes a decrease in functions responding more slowly and partially to maintenance and regeneration processes. Because it is a complex phenomenon, many issues are involved in the onset and progression of aging, in which the shortening of telomeres, decrease in the synthesis of sirtuins, uncontrolled levels of reactive oxygen species (ROS) that may lead to oxidative stress, increased apoptosis rates via super regulation of the p53 protein and also to chronic inflammatory conditions. Since human populations are increasing their life expectancy, identifying potential factors that slow down the aging of the skin can be considered a highly relevant aspect. In Brazil there are many plants that have cicatrizant action and that could also have potential action in the modulation of factors associated with aging of the skin. This is the case of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), a plant native to the Cerrado and Amazonian Biomes that has its chemical matrix rich in biomolecules, such as tannins. **Objectives:** To evaluate *in vitro* the modulatory effect of the aqueous extract of barbatimão on cytofunctional markers of a commercial line of senescent human fibroblasts. **Methodology:** the human fibroblast lineage (HFF-1) was purchased from the ATCC-EUA via Cell Bank of Rio de Janeiro. In the Laboratory of Biogenomics (UFMS), to obtain a senescent phenotype, the lineage was cultured under controlled conditions (37°C and 5% CO₂ saturation) during several passages until it showed a decrease in the proliferation rate in 72h cultures and cyto-morphological modifications of the cell monolayer. A concentration response curve of barbatimão extract (0.49, 0.99, 1.99, 3.92 mg/mL) was initially performed in the senescent fibroblasts, where a potential effect on viability was investigated. From this curve, the concentrations with potential efficacy and safety were chosen for the continuation of the analyzes. The cells cultured again were exposed to these concentrations and after 24 and 72 hours and through spectrophotometric, fluorimetric, and gene modulation tests by qRT-PCR technique, complementary analyzes were conducted in relation to parameters related to cell viability and proliferation, including fibroblast growth factor (FGF) and keratinocytes (KGF), morphology, inflammatory markers such as interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10), tumor necrosis factor (TNF- α) and interferon gamma (INF- γ), cell apoptosis, such as caspases (Casp 3 and 8) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Expression of the telomerase, sirtuin and p53 genes was used as a marker of senescence. **Results:** from the initial curve, concentrations of 0.49 mg/mL and 0.99 mg/mL were chosen to evaluate the effect of barbatimão on the modulation of senescent fibroblasts. Cell proliferation was increased only at the concentration of 0.99 mg/mL. However, the increase in FGF and KGF levels, the reduction of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ), an increase in anti-inflammatory activity (IL-10) and a decrease in Casp 3 and 8 and 8-OHdG were dose-dependent of barbatimão extract. In gene expression, telomerase and sirtuin genes were also super-expressed in a dose-dependent way, whereas p53 was down regulated. Despite the methodological limitations associated with *in vitro* protocols, the observed results point to the modulatory capacity of barbatimão for the senescence of senescent human dermal fibroblasts (HFF1-old). These results suggest that barbatimão could be used in cosmetic and/or dermatological preparations aimed at slowing down the aging process of the skin.

Keywords: Aging. Senescence. Skin. Oxidative stress. EROs. Telomerase. Sirtuin. p53. Growth Factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Envelhecimento da população mundial e projeções.....	16
Figura 2 – Estimativa da população mundial idosa por sexo para o ano de 2020.....	17
Figura 3 – Fecundidade e esperança de vida no Brasil no período de 1950 a 2030.....	18
Figura 4 – População brasileira 2000/2030.....	19
Figura 5 – Ilustração do tecido epitelial.....	21
Figura 6 – Diferenciação de pele jovem normal e pele envelhecida.....	22
Figura 7 – Mecanismos envolvendo a proteína p53.....	27
Figura 8 – Telomerase e telômeros.....	29
Figura 9 – Vias sob influência das sirtuínas.....	31
Figura 10 – Representação da origem de EROs.....	33
Figura 11 – Microscopia de cultivo celular de fibroblasto.....	35
Figura 12 – Ciclo celular e células senescentes.....	36
Figura 13 – Dímeros de timina.....	37
Figura 14 – <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (barbatimão).....	41
Figura 15 – Delineamento geral do manuscrito 1.....	46
Figura 16 – <i>Figure 1</i> do manuscrito.....	55
Figura 17 – <i>Figure 2</i> do manuscrito.....	56
Figura 18 – <i>Figure 3</i> do manuscrito.....	57
Figura 19 – <i>Figure 4</i> do manuscrito.....	58
Figura 20 – Comprovante de submissão Anexo A.....	82
Figura 21 – Comprovante de submissão Anexo B.....	83
Figura 22 – Comprovante de submissão Anexo C.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturação das camadas da pele.....	20
Tabela 2 – Ação do envelhecimento intrínseco e extrínseco na pele.....	23
Tabela 3 – <i>Table</i> 1 do manuscrito 1.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 8-OHdG** – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
A – Nucleotídeo adenina
ANOVA – Análise de Variância
ATCC – *American Cell Line Collection*
ATP – Trifosfato de Adenosina
BAX – Gene envolvido na permeabilidade da membrana mitocondrial
Bcl2 – Gene anti-apoptótico
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
CASP – Caspase
CAT – Catalase
cDNA – DNA complementar
CO₂ – Dióxido de carbono
CN – Controle negativo
CPR – Proteína C-Reativa
DAMPs – do inglês, *Damage-associated molecular patterns* (Padrões Moleculares Associados a Danos)
DMEM 15% - do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DNases – Enzimas que clivam DNA
EGCG – Epigallocatequina-galato
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
FASE S – Estágio do ciclo celular onde predomina a síntese de DNA
FGF – do inglês, *Fibroblast growth factor* (Fator de crescimento de fibroblasto)
G – Nucleotídeo guanina
G1 – Período de crescimento no ciclo celular
GPX – Glutathione Peroxidase
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
HFF-1 – Linhagem celular de fibroblastos humanos
HFF1-old – Linhagem celular de fibroblastos humanos envelhecidas em cultivo
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL – Interleucina
INF- γ – Interferon gama
KGF – do inglês, *Keratynocyte growth factor* (Fator de crescimento de queratinócitos)
MEC – Matriz Extracelular
mg – Miligrama
mL – Mililitro
MMP – Metaloproteinases
MnSOD – Superóxido Dismutase dependente de manganês
MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
nm – Nanômetro
O₂⁻ - Ânion Superóxido
OH[•] - Radical Hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas

p53 – Proteína Supressora de Tumor
RC – Restrição Calórica
RNA – Ácido ribonucleio
RNA_m – RNA mensageiro
SIR – do inglês, *Silent Information Regulator*; Sirtuína
SOD – Superóxido Dismutase
T – Nucleotídeo timina
TE – Tampão Tris-EDTA
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria
 μ L – Microlitro
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS DO ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SEU IMPACTO SOCIAL.....	15
1.2	A PELE E SEU ENVELHECIMENTO.....	19
1.2.1	Camadas da Pele.....	20
1.3	SENESCÊNCIA SOB A ÓTICA BIOLÓGICA.....	24
1.3.1	Reparo do DNA, senescência e apoptose celular: o papel da proteína p53.....	25
1.3.2	Encurtamento telomérico e senescência celular	28
1.3.3	Alterações epigenéticas no envelhecimento: o papel das sirtuínas	29
1.3.4	Estresse oxidativo e senescência celular	31
1.4	ENVELHECIMENTO DOS FIBROBLASTOS: PRINCIPAIS CÉLULAS DA PELE.....	34
1.4.1	Disfunções e morbidades da pele associadas ao envelhecimento	38
1.5	FITOTERÁPICOS NA MODULAÇÃO INDIRETA DA SENESCÊNCIA CUTÂNEA.....	39
1.6	BARBATIMÃO E O POTENCIAL EFEITO NA MODULAÇÃO DO ENVELHECIMENTO DE FIBROBLASTOS	40
2	HIPÓTESES	44
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL.....	46
4.1	DELINEAMENTO GERAL – MANUSCRITO 1:.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	MANUSCRITO	47
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	82
	ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO MANUSCRITO 1, NÃO VINCULADO A DISSERTAÇÃO	83
	ANEXO C: COMPROVANTES DE SUBMISSÃO MANUSCRITO 2 NÃO VINCULADO A DISSERTAÇÃO	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 DETERMINANTES DEMOGRÁFICOS DO ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SEU IMPACTO SOCIAL

O desenvolvimento social e tecnológico de um país é um dos fatores condicionantes para a transição demográfica da população. Através do avanço dessas questões aliadas, por vezes, a questões culturais, observa-se uma queda nas taxas de fecundidade ao mesmo tempo em que se tem redução nas taxas de mortalidade infantil. Como consequência dessas variáveis, a proporção de indivíduos jovens em relação ao de idosos sofre decréscimo, levando a um fenômeno demográfico conhecido como envelhecimento populacional (SCHNEIDER e IRIGARAY, 2008; VANZELLA, 2018).

Segundo Bengtson (2003) a redução nas taxas de mortalidade foi experimentada, primeiramente, por países desenvolvidos, enquanto em países em desenvolvimento, como os da América Latina, esse fenômeno só começou a ser observado em meados do século XX. Comprovadamente, ações de cunho básico, como o acesso a vacinas (especialmente a antivariólica), saneamento básico, habitação e energia elétrica impactaram a longevidade populacional, no entanto a característica mais marcante para o início dessa transição demográfica veio na redução do número médio de filhos por mulher, ou seja, na fecundidade populacional (BENGTSON *et al.*, 2003; NASRI, 2008).

A expectativa de vida ao nascer é mais um dos fatores que implicam na alteração no perfil demográfico de uma população. Muitos países em desenvolvimento experimentam, agora, o que países industrializados já começaram a vivenciar muito antes: taxas de aumento natural de população decorrente da simples equação de nascimentos menos o número de mortes. Esse fator explicaria porque, atualmente, países desenvolvidos possuem as maiores porcentagens de pessoas idosas na população, e o fato de projeções indicarem elevadas taxas de grupos idosos em nações ainda em crescimento (LIMA-COSTA, 2006).

Uma vez associada à fertilidade, a longevidade é um dos fatores responsáveis por alterar a pirâmide etária ao redor do globo, assumindo, posteriormente, um papel de força talvez mais impactante do que representou a fertilidade na dinâmica de populações ao longo do tempo (Figura 1) (BEARD, 2016).

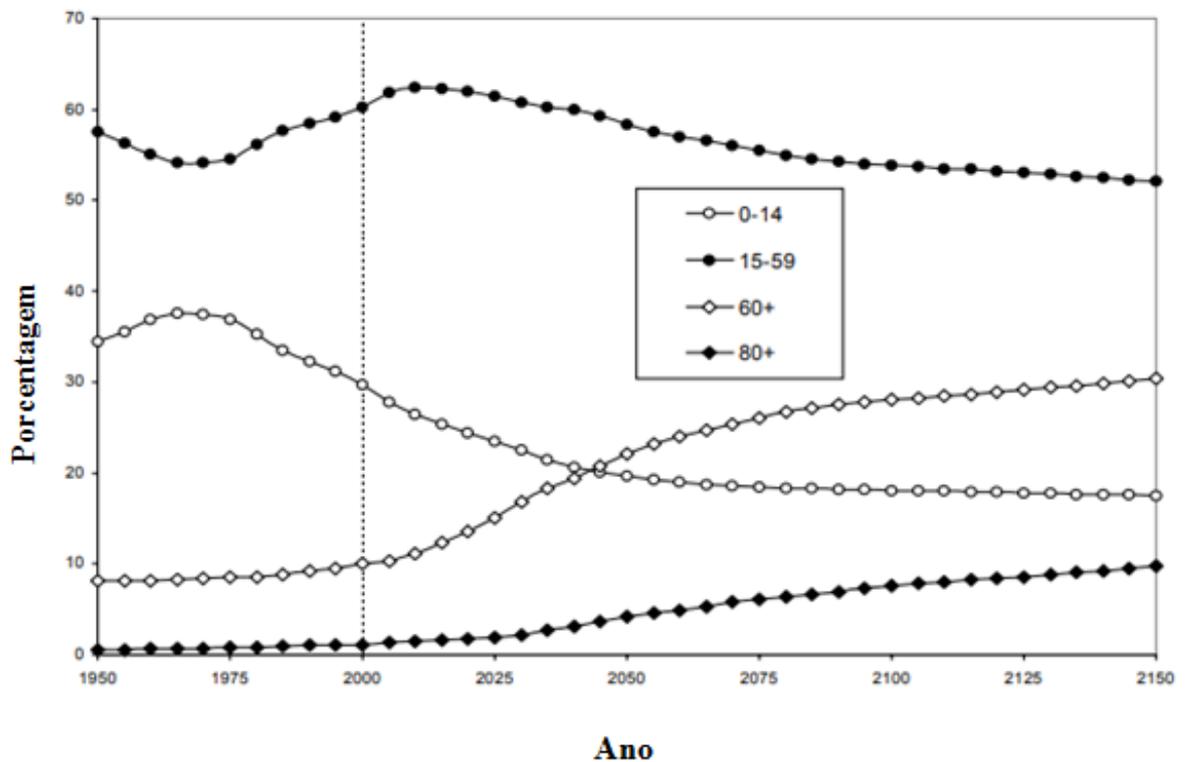


Figura 1: Envelhecimento da população mundial e projeções por faixa etária no período de 1950 a 2150. Fonte: adaptada de MIRKIN e WEINBERGER, 2001.

Um dos pilares da sociedade, a educação, também é um fator crucial na longevidade. Alguns estudos, como o realizado por Abreu *et al.*, (2016), sugerem uma interação entre baixos níveis de escolaridade e risco de acidentes, óbitos e desenvolvimento de doenças crônicas. Aqui é preciso destacar mudanças não apenas nos dados que relacionam analfabetos e alfabetizados ao longo da linha do tempo, mas principalmente a continuidade do estudo, ou seja, os anos estudados por pessoa, bem como o sexo (MACIEL e GUERRA, 2005).

Abordar questões de gênero é preciso, uma vez que a maior parcela do contingente idoso é representada por mulheres, no entanto, esses dados estão associados a fatores mais complexos do que apenas o maior número do sexo feminino na população geral, fenômeno observado em vários países (Figura 2) (FEIO e OLIVEIRA, 2015). Ao pesar velhice e gênero nota-se que os valores, muitas vezes determinantes dos padrões socioculturais no comportamento humano, revelam-se no cotidiano de homens e mulheres que envelhecem, e atuam, influenciando de forma ativa, em eventos e atitudes limitadores ou precursores da conquista do envelhecimento saudável (VARGAS e PORTELLA, 2013).

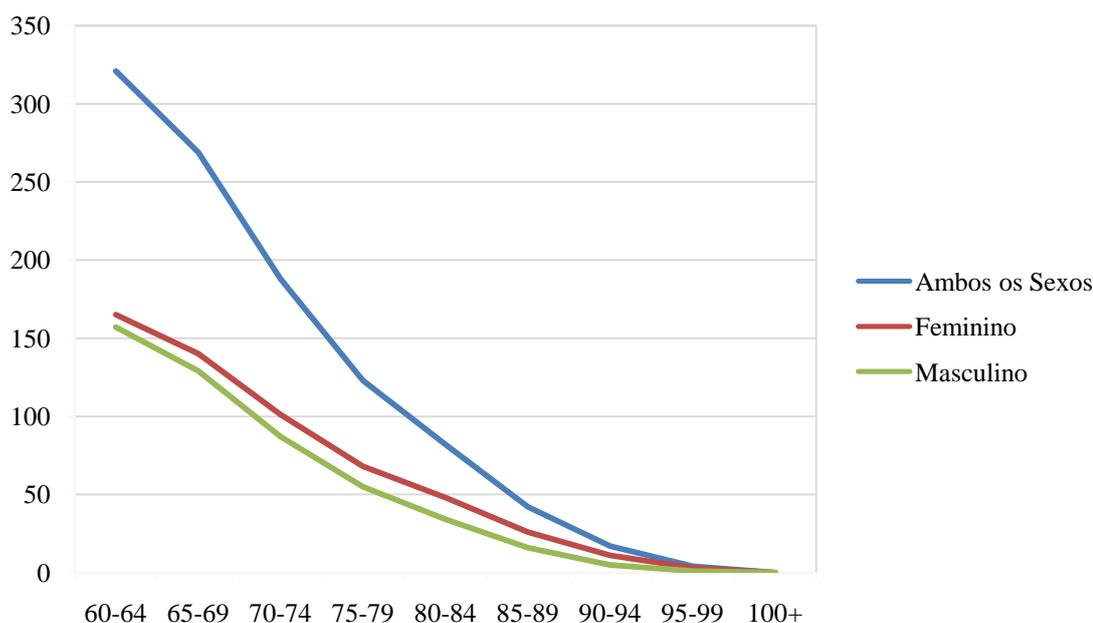


Figura 2: Estimativa da população mundial (em milhões – eixo vertical) por sexo e acima de 60 anos (eixo horizontal) no ano de 2020. Embora os idosos mais velhos sejam um grupo em ascensão, ainda não se equiparam ao contingente mais jovem. A população feminina (linha vermelha) ultrapassa a masculina (linha verde) em todos os pontos de idade.

Fonte: Organização das Nações Unidas – ONU (2018), gráfico organizado pelo autor.

O gênero e a velhice também estão associados à evolução médico-hospitalar ao longo dos anos. No final do século XX, por exemplo, o número de leitos disponível para internação era bem menos significativo do que se apresenta hoje, mesmo com a discrepância entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (NASCIMENTO, 2001; FEIO e OLIVEIRA, 2015). Com a realidade do envelhecimento populacional é imprescindível, não apenas a melhora no sistema e qualidade do atendimento, mas na disponibilidade de recursos, como leitos hospitalares, uma vez que o tempo médio das internações na população idosa tende a aumentar, como mostrado Praia *et al.*, (2018). Este estudo realizado a partir de dados disponíveis no sistema DATASUS Brasil, relatou-se a tendência da população idosa masculina em reduzir o número médio de dias sob cuidado hospitalar, enquanto a feminina mantém certa estabilidade, exceto nas populações mais idosas (acima de 80 anos), quando, a partir de 2013, vieram a permanecer mais tempo internadas (PRAIA *et al.*, 2018).

No Brasil, a longevidade na década de 50, quando a população idosa era cerca de 4%, estava próxima de 50 anos, saltando para cerca de 66 anos quando esse percentual duplicou 40 anos depois (Figura 3) (CAMARANO e PASINATO, 2007; IBGE, 2017).

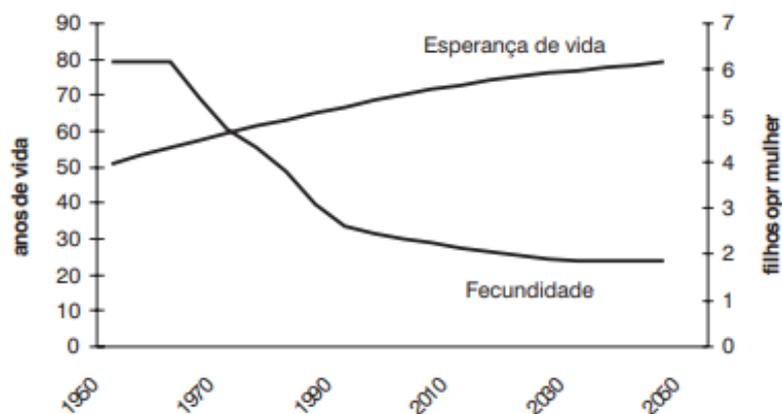


Figura 3: Fecundidade e esperança de vida no Brasil a partir de 1950, com projeção até o ano de 2050. Fonte adaptada de: (SAAD, 2016).

Já adentrando os anos 2000, foi possível observar e projetar a continuidade do processo de envelhecimento populacional brasileiro, como mostra a Figura 4. Nesse período os nascimentos (sem distinção de sexo) estavam próximos a média de 5%. Em contrapartida a população idosa, considerada segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), Política Nacional do Idoso (Lei nº 8.842/1994) e do próprio Estatuto do Idoso (Lei nº 10.741/2003), em países em desenvolvimento como sendo de 60 anos ou mais, representava cerca de 0,7% da população (OMS, 2012; IBGE, 2017).

Ainda na figura 4 é possível observar que, para o ano de 2030, a proporção da taxa de natalidade (0-4 anos), bem como a população jovem/adulta *versus* a parcela populacional acima de 60 anos, onde a primeira abrangerá aproximadamente 2,8% e o montante idoso (\leq 60 anos) cerca de 1,5%, uma redução e aumento de quase 50% quando comparados os mesmos dados ao ano de 2000, respectivamente (IBGE, 2017).

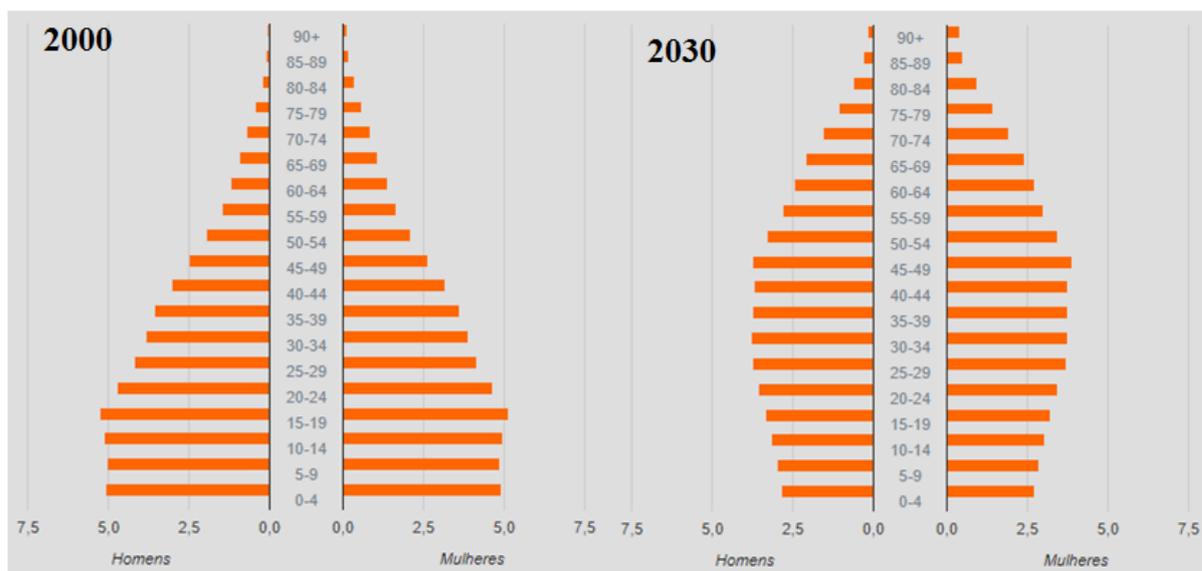


Figura 4: Pirâmide etária brasileira referente ao ano de 2000 à esquerda *versus* projeções para o ano de 2030 à direita. A coluna central das pirâmides representa o intervalo de idades, sendo a base utilizada para apresentar os dados sobre fecundidade e o topo, a partir dos 60 anos de idade, para as projeções da população idosa.
Fonte: IBGE, 2017. Figura organizada pelo autor.

No entanto, o fato de as pessoas estarem vivendo mais tempo, não significa necessariamente que elas estejam vivendo de forma mais saudável e com maior qualidade de vida (ONU, 2015). Uma vez que existe um número considerável de modificações, disfunções e doenças crônicas não transmissíveis que acometem os idosos. Esta condição está diretamente associada ao envelhecimento biológico que representa a última etapa do desenvolvimento que antecede a morte. As disfunções e modificações na pele, com certeza são as mais marcantes ao longo do envelhecimento humano, uma vez que são bastante visíveis.

Mesmo que as modificações da pele associadas ao envelhecimento, não necessariamente representem condições letais, estas podem comprometer a qualidade de vida dos indivíduos, por diminuir a autoestima, muitas vezes expor o idoso a situações constrangedoras, interferindo na qualidade do sono, aumentando o risco de depressão, e isolamento social (BARROS, 2014; SANTOS, M., 2017). Deste modo, estudos voltados à compreensão e ao manejo do envelhecimento da pele são de grande relevância clínica e social.

1.2 A PELE E SEU ENVELHECIMENTO

A pele é considerada o maior órgão do corpo desempenhando funções de vital importância para a sobrevivência já que protege o organismo contra agentes externos

patogênicos e não-patogênicos, ajuda a controlar a homeostasia corporal, em especial temperatura e umidade e apresenta também uma rede de receptores sensoriais que auxiliam o organismo a perceber pressão, frio, calor, dor e outras sensações relevantes (DOUGLAS, 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; SANTOS, 2014). Em termos estruturais a pele é formada pela epiderme e a derme (Tabela 1).

O tecido epitelial, na pele, é dotado de variedade funcional sendo constituído por diferentes tipos de células e por uma matriz extracelular (MEC) escassa, ainda que composta por diversos tipos de moléculas, algumas das quais são altamente organizadas, formando estruturas complexas como as fibrilas de colágeno e as moléculas que compõe a membrana basal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Tabela 1: Estruturação das camadas da pele.

Camada	Posicionamento	Constituição	Principais funções
Epiderme	Superficial	Tecido epitelial	Revestimento corporal
Derme	Abaixo da epiderme	Tecido conjuntivo	Nutrição tecidual
Hipoderme	Basal	Tecido conjuntivo e Adiposo	Regulação da temperatura

Tabela 1: As três camadas constituintes do Tecido Epitelial brevemente caracterizadas quanto a sua posição no tecido, composição celular e desempenho de funções.
Fonte adaptada de: SANTOS, 2014.

1.2.1 Camadas da Pele

Os tecidos corporais formam arranjos de acordo com o tipo de célula e a quantidade de matriz extracelular por elas próprias produzidas. Considerando os epitélios, tem-se a presença de células poliédricas justapostas firmemente aderidas às células vizinhas, o que gera uma quantidade baixa de MEC e permite que as mesmas se organizem em folhetos. A epiderme, por não dispor de vascularização, recebe aporte nutricional da camada mais interna a qual está ancorada: a derme. Localizada entre as superfícies da derme e epiderme, a junção dermo-epidérmica – sintetizada por queratinócitos e fibroblastos dérmicos – atua como mecanismo de adesão entre essas camadas, age como passagem para substâncias e células (durante processos inflamatórios e imunológicos), além de organizar o crescimento e desenvolvimento

da epiderme (Figura 5) (KHAVKIN e ELLIS 2011; DEBEER *et al.*, 2013; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

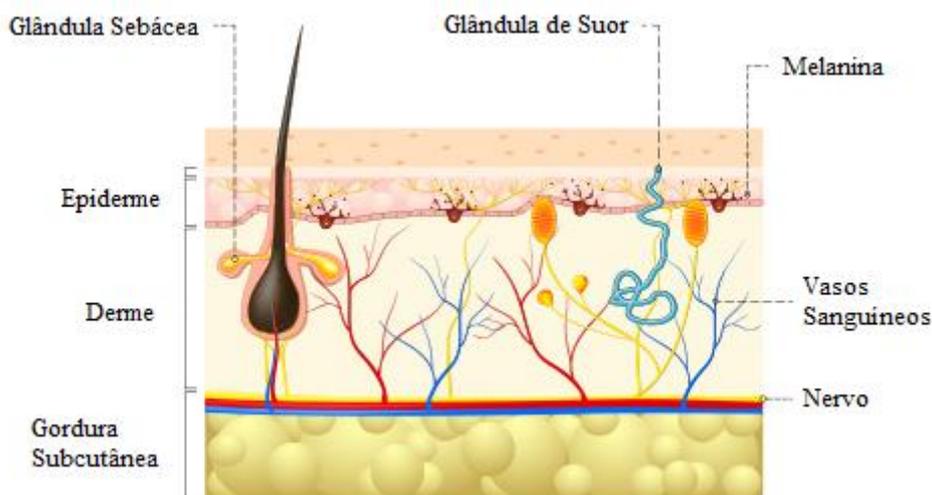


Figura 5: Representação ilustrada da pele abordando suas três camadas, bem como importantes estruturas localizadas neste tecido.

Fonte adaptada de: *Dreamstime*, 2018. Disponível em: <www.dreamstime.com/stock-illustration-human-skin-structure-hair-cross-section-anatomy-diagram-image83813234>

Epiderme: O tecido epitelial, por ser constituído de camadas com diferentes origens, apresenta variados tipos celulares localizados e responsáveis por funções específicas. Superficialmente, o epitélio é formado principalmente por queratinócitos (originados da divisão de células basais) que se diferenciam progressivamente enquanto se movem, formando camadas (estratificação) (MCGRATH *et al.*, 2008).

Derme: Dividida em duas regiões – a derme papilar, em contato com a junção dermo-epidérmica, e a derme reticular, em contato com a hipoderme – tem como principal célula o fibroblasto, responsável por secretar proteínas dérmicas extracelulares como a elastina e o colágeno, sendo este último o mais presente conferindo assim maior resistência. Os vasos linfáticos são tão importantes quanto os vascularizados (responsáveis pela irrigação sanguínea), pois é através deles que ocorre a regulação de fluidos que interferem na pressão e reações imunes. Com o envelhecimento celular, os fibroblastos reduzem sua capacidade biossintética, diminuindo a quantidade de fibras colágenas na pele, causando enrugamento e comprometendo sua integridade (JENKINS, 2002; KHAVKIN e ELLIS, 2011; DEBEER *et al.*, 2013).

Hipoderme: Também pode ser chamada de tecido adiposo subcutâneo. As principais células aqui encontradas são os adipócitos, sendo essa camada quantitativamente variável entre indivíduos devido sua relação com o estado nutricional. Por ser a camada mais profunda

da pele, situa-se abaixo da derme e acima da musculatura adjacente, contribuindo para a proteção a pressões mecânicas. A integridade da pele também é influenciada pela hipoderme, uma vez que alterações nesta camada – ou até mesmo na musculatura – podem resultar no aparecimento de sulcos também conhecidos como rugas (CALOY, 2011; KHAVKIN e ELLIS, 2011).

O envelhecimento cutâneo (Figura 6) pode ser causado por dois fatores: o intrínseco e o extrínseco, onde o primeiro é um processo cronológico inevitável e geneticamente programado que pode ser visto, na pele, através das linhas de expressão, por exemplo, enquanto o segundo pode ser ocasionado via fotoenvelhecimento que é a exposição a raios ultravioleta (UV) (Tabela 2). Em termos histológicos, a integridade da pele pode ser comprometida quando a junção dermo-epidérmica é afetada reduzindo o aporte nutricional, a quantidade de células (mesmo as da camada hipodérmica), o tamanho e a presença de fibras de colágeno, levando a uma cicatrização mais lenta (JENKINS, 2002; KHAVKIN e ELLIS, 2011).

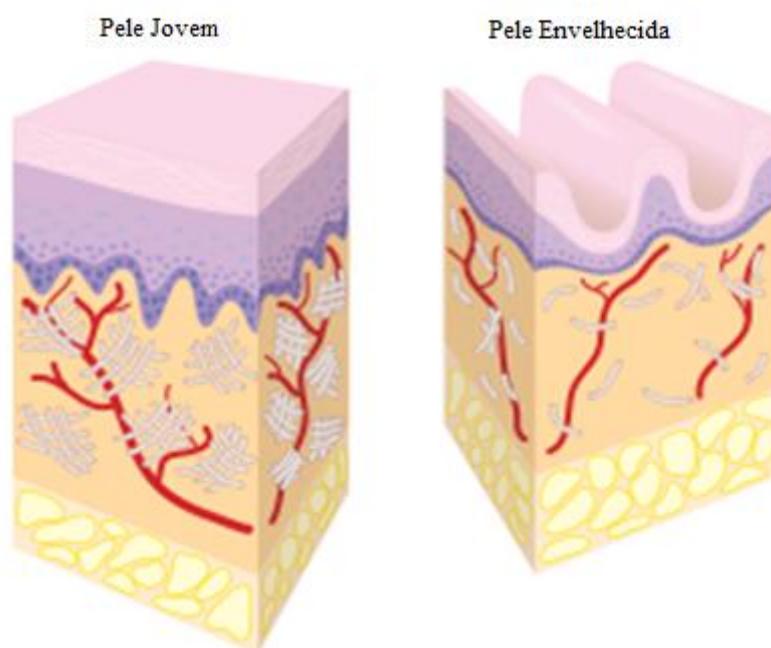


Figura 6: Diferenciação ilustrada da pele jovem normal (com suas estruturas íntegras) versus a pele envelhecida, seja por processos intrínsecos, extrínsecos ou ambos.

Fonte adaptada de: kotolena.com. Disponível em <<http://kotolena.com/bio/>>

Tabela 2: Ação do envelhecimento intrínseco e extrínseco em diferentes áreas corporais.

	Envelhecimento Intrínseco (Cronossenescência)	Envelhecimento Extrínseco (Actinossenescência)
Rugas	Finas	Profundas
Fibras Elásticas	Reorganizadas	Baixa produção Alta degeneração
Fibras de Colágeno	Pequena alteração no tamanho e organização	Grande alteração no tamanho e organização
Folículo Capilar	Baixo número e afinamento	Baixo número e estrutura: perda capilar
Melanócitos	Normal	Baixo número e produção de melanina
Glândulas sebáceas e sudoríparas	Baixo número	Baixo número: pele seca
Junção Dermo-epidérmica	Leve achatamento	Importante achatamento

Tabela 2: Causas dos fatores intrínsecos e extrínsecos no processo de envelhecimento da pele. Fonte adaptada de: MONTAGNER (2009).

A maioria dos autores reconhece que o envelhecimento da pele possui dois processos a cronossenescência ou intrínseco, e a actinossenescência ou extrínseco que são resultantes de fatores ambientais, especialmente radiação UV. As alterações por cronossenescência ocorrem de maneira igual em todas as partes do corpo. Já as mudanças decorrentes da actinossenescência ocorrem principalmente no rosto, pescoço e mãos, locais com maior exposição (PERES *et al.*, 2014).

As principais alterações do envelhecimento da pele incluem: adelgaçamento da membrana basal, responsável pela oxigenação, nutrição e retirada de metabólitos da epiderme. Esse processo torna a epiderme mais fina e mais suscetível a lesões (LeBLANC *et al.*, 2011).

Na derme os vasos sanguíneos tornam-se mais frágeis, aumenta a queratinização da epiderme, o sistema de ancoragem derme-epiderme torna-se menos resistente e a derme chega a perder 20% da espessura total, um dos principais fatores da chamada “pele de seda” (PERES *et al.*, 2014).

A produção de colágeno é fortemente prejudicada e as fibras de colágeno tornam-se escassas, diminuindo a elasticidade e resistência da pele, ainda, a pele torna-se mais

ressecada. A tela subcutânea fica mais fina e menos eficiente (LeBLANC *et al.*, 2011; PERES *et al.*, 2014).

1.3 SENESCÊNCIA SOB A ÓTICA BIOLÓGICA

An unsolved problem in biology, foi o título do ensaio que, em 1960, o zoólogo Peter Medawar, ganhador do Prêmio Nobel, publicou e se tornou uma obra clássica na Biogerontologia. O trabalho em questão trazia à temática do envelhecimento das espécies, contestando o conceito do alemão August Weismann, cuja premissa é a ideia de que a morte seria programada com um propósito evolutivo, a fim de garantir a sobrevivência das espécies. Entretanto, naquela época se tornava bastante difícil explicar como as espécies poderiam ter fixado características relacionadas ao envelhecimento e ao tempo de vida, já que os membros mais velhos de cada espécie geralmente não se reproduziam mais, e assim não conseguiam repassar os potenciais “genes da longevidade” para a próxima geração. Deste modo, Medawar postulou que o envelhecimento poderia ser fortemente modulado por fatores estocásticos ou ambientais. Naturalmente muitos animais estão sujeitos a interações ecológicas que impossibilitam atingir idades avançadas, estando o envelhecimento mais facilmente ao alcance de espécies domesticadas, ou que exercem maior controle sobre a cadeia alimentar e, assim, o meio ambiente (CUNHA, 2011).

Dada a complexidade do envelhecimento biológico e da modulação do tempo de vida nas espécies (longevidade), muitas teorias têm sido propostas, sem que até o presente momento exista uma real “teoria unificadora do envelhecimento” (ARKING, 2008). A tentativa de desvendar ou mesmo definir o envelhecimento biológico guiou muitos pesquisadores após a publicação de Medawar. Strehler, por exemplo, postulou que as mudanças decorrentes do envelhecimento devem necessariamente ser: deletérias, progressivas, intrínsecas e universais (STREHLER, 1979). Contemporaneamente, a grande maioria dos autores reconhece que o envelhecimento biológico é desencadeado pela interação de fatores genético-ambientais (CRUZ e SCHWANKE, 2001; CRUZ, 2014). Neste sentido pode ser aceito que existe uma base constitutiva (genética) relacionada ao envelhecimento de cada espécie, mas este processo pode ser acelerado ou desacelerado, principalmente por fatores ambientais que agem de modo positivo ou negativo.

Autores como Lopez-Otín *et al.*, (2013) e Nicolai *et al.*, (2015) revisaram de modo aprofundado os marcadores moleculares e celulares do envelhecimento a fim de definir o chamado “fenótipo envelhecido”. (1) Marcadores primários do envelhecimento que incluem:

danos no DNA (ácido desoxirribonucleico), encurtamento dos telômeros e alterações epigenéticas; (2) marcadores antagonistas, incluindo as EROs cujos efeitos inicialmente protegem o organismo de dano, mas tornar-se progressivamente negativo; (3) características integrativas, como inflamação ou exaustão no estoque de células-tronco que prejudicam diretamente a homeostase quando o processo que leva ao acúmulo de danos torna-se irreversível.

Em nível celular, o envelhecimento biológico se caracteriza por um acúmulo de alterações em diversos compartimentos celulares nos quais se destacam: (1) alterações em nível nuclear ocorrendo diminuição na taxa de reparo de mutações do DNA incluindo queda nos níveis transcricionais e pós-transcricionais relacionados à síntese de proteínas, alterações epigenética e encurtamento telomérico a cada divisão celular; (2) disfunção mitocondrial, incluindo aumento de mutações no DNA mitocondrial associados ao aumento nos níveis de EROs, o que contribui para o desencadeamento do estresse oxidativo e diminuição na eficiência produção energética (ATP); (3) diminuição na taxa de catalise de resíduos metabólicos pelos lisossomos levando ao acúmulo de moléculas os DAMPs, do inglês, *damage-associated molecular patterns*, que contribuem para o estabelecimento de estados inflamatórios crônicos associados ao envelhecimento (CRUZ, 2014).

No envelhecimento da pele, os processos de dano de DNA, encurtamento telomérico, alterações epigenéticas e disfunção mitocondrial são críticos e por este motivo devem ser abordados de modo mais aprofundado.

1.3.1 Reparo do DNA, senescência e apoptose celular: o papel da proteína p53

Em condições fisiológicas estima-se que por dia ocorram cerca de 4000 mutações diferentes em aproximadamente 500 genes. Estas mutações ocorrem pelas chamadas genotoxinas endógenas ou exógenas. Estes fatores induzem danos genômicos que podem ser ocasionados e mantidos devido a erros na replicação do DNA associados à incorporação incorreta de bases por DNA polimerases. Nesse sentido, as atividades de reparo de DNA são essenciais para manter a estabilidade genômica e a própria vida. O acúmulo de mutações não reparadas, inicialmente leva a instabilidade genômica que é considerada um dos principais desencadeadores do processo de envelhecimento (NICOLAI *et al.*, 2015; PRATES-MORI E SOUZA PINTO, 2018).

Se as lesões de DNA não são adequadamente reparadas e/ou são replicadas, elas são convertidas em mutações permanentes que aumentam significativamente o risco de câncer.

Alternativamente, o dano ao DNA também pode interromper a replicação levando à senescência celular ou morte celular o que contribui para o processo de envelhecimento. Portanto, câncer e envelhecimento, ambos surgindo como consequência de danos irreparáveis ao DNA, podem ser considerados os dois lados da mesma moeda (NICOLAI *et al.*, 2015).

Principalmente no momento em que a célula se prepara para se dividir (fase S) danos no DNA ativam a proteína p53 que é considerada guardiã do genoma. Na realidade, esta proteína e outras moléculas como a p63 e a p73, incluídas na chamada “Família da Proteína p53” detectam os danos no DNA e podem: (1) interromper o ciclo celular para facilitar as ações do reparo do DNA; (2) se estes danos são permanentes estas proteínas podem impedir a replicação da célula e estas tendem a apresentar um fenótipo senescente que inclui aumento do volume celular e aparência achatada. Estas células se tornam refratárias a mitógenos ou fatores de crescimento e modificam dramaticamente a sua expressão gênica e estrutura da cromatina; (3) conforme a intensidade dos danos no DNA a proteína p53 também pode induzir a apoptose por via mitocondrial (intrínseca) ativando a expressão do gene BAX e inibindo a expressão do gene Bcl-2. O aumento nos níveis da BAX induz a ocorrência de poros na membrana mitocondrial, com subsequente liberação do citocromo C para o citoplasma. A presença desta molécula acaba por ativar as rotas das caspases (Casp), incluindo a Casp-8 que é uma molécula iniciadora a Casp-3 que é uma proteína executora do processo apoptótico (NICOLAI *et al.*, 2015; BARBON *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2017; FERRER *et al.*, 2017).

A inativação do gene p53 ou mutação em um dos seus alelos, como ocorre na síndrome de *Li-Fraumeni*, é caracterizada pela formação de grande número de tumores, estreita a relação entre exposição a raios UV, dano no DNA e desenvolvimento de câncer de pele. Esses acontecimentos intranucleares são, na verdade, indutores da síntese de p53 e moléculas acessórias, como p21 e BAX responsáveis pela parada do ciclo antes da sequência replicativa, visto que os níveis proteicos de p53 na célula estão, geralmente, em níveis basais (BENJAMIN e ANANTHASWAMY, 2007).

Outra questão importante diz respeito ao aumento da meia-vida proteica da p53 em células expostas a irradiação. Normalmente o produto do gene p53 tem duração curta dentro da célula, no entanto, considerando que a elevação de suas taxas pode significar a nível celular, a possibilidade de início de carcinomas, a maior estabilização da proteína transcrita para atuar no reparo do DNA se faz necessária (BENJAMIN e ANANTHASWAMY, 2007).

Além disso, o gene p53 possui sequências di-pirimidinas (sequência de duas pirimidinas, ver figura 13C) no loco, o que, pela ação UV, favorece o surgimento de mutações

no próprio gene de reparo como visto em camundongos. Brash *et al.*, (2005) demonstraram que a irradiação UV não apenas induz a mutação do gene, mas impulsiona o ciclo replicativo dessas células alteradas ao induzir apoptose em células normais vizinhas, criando um ambiente onde se faz necessário preenchimento com novas células, contando com a síntese de fatores de crescimento e citocinas, bem como ativação de seus receptores.

É importante ressaltar que, quando suprimida nas células, a p53 não executa a via de interrupção do ciclo e a célula pode sofrer estímulos que a induzam a avançar nas ações de replicação independente do comprimento telomérico. Dada essa condição, pode ser precoce, mas não descartada, a ideia de que a p53 seja mais decisiva na senescência e integridade celular do que a telomerase (MELO, 2015; MACIEJOWSKI e DE LANGE, 2017).

O envelhecimento está associado a uma menor eficiência energética, o que está por sua vez, envolvido com processos mitocondriais. Nesse quesito, a proteína p53 também desempenha papéis no controle bioenergético, ao afetar vias metabólicas dependentes da integridade da mitocôndria (por induzir o citocromo C oxidase) e sensibilidade a hormônios, como a insulina (Figura 7) (RUFINI *et al.*, 2013; CAMPISI, 2016; ZHANG *et al.*, 2011).

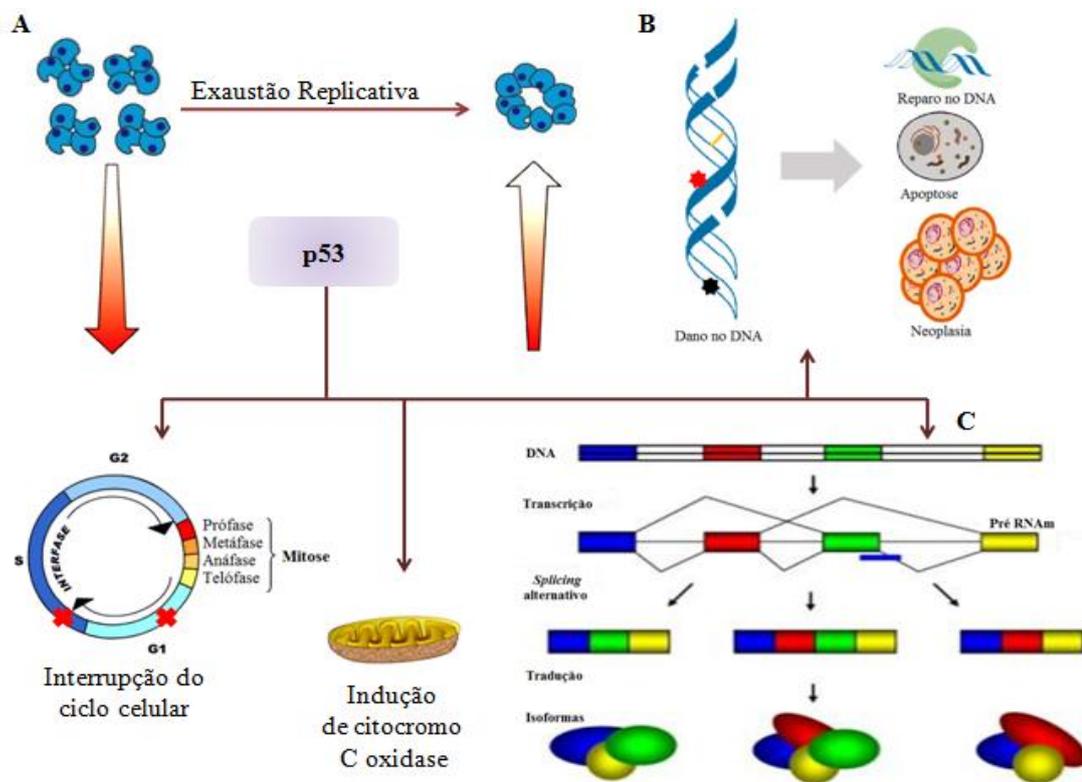


Figura 7: Vias de interesse sob a influência da p53. (A) Síntese diferenciada conforme o estado celular; (B) Importância na parada do ciclo celular para execução de reparos, indução de apoptose e, quando suprimida, surgimento de neoplasias; (C) Exemplificação de *Splicing* alternativo da p53.
Fonte: Imagens obtidas do Google Imagens. Figura organizada pelo autor.

Um fator interessante a ser mencionado sobre a p53 é sua versatilidade de *splicing* alternativos (Figura 7C), ou seja, de uma vez formada a fita de pré-RNAm haver retirada diferenciada de íntrons e éxons que compõe a fita única, permitindo que o mesmo gene dê origem a diferentes proteínas, como a p16, p21 e p44 (Figura 7C). Os processos de senescência podem ser afetados quando ocorre desequilíbrio de p53 e suas variantes, indicando que a modulação dos processos de envelhecimento requerem a presença da p53 (MAIER *et al.*, 2004; PEHAR *et al.*, 2014).

Ainda, estudos demonstraram a capacidade reguladora da Sir1 (Sirtuína) sobre a p53 em células sob senescência ou já envelhecidas, corroborando acerca das diferentes vias influentes nos processos de envelhecimento, não apenas produzirem influências de modo isolado, mas cooperativamente (DESCHÊNES e CHABOT, 2017).

1.3.2 Encurtamento telomérico e senescência celular

O telômero é uma região importante pelo seu desempenho como protetor do cromossomo estando muito além da característica de “relógio biológico”. Isto porque, em certo grau também limita fusões entre diferentes cromossomos. Isso é possível graças às extensas repetições ricas em guaninas nas terminações, que permitem a dobra sobre si mesmo, formando o chamado T-loop (Figura 8A) que, nas extremidades, também impede o acesso da maquinaria proteica de síntese (LEMOS, 2015).

Visto que a síntese de DNA ocorre no sentido 5' – 3', é observada uma perda progressiva de nucleotídeos na extremidade 3' a cada replicação devido a incapacidade replicativa exercida pela DNA polimerase em finalizar a síntese (Figura 8B) (LIBERTINI e FERRARA, 2017). O encurtamento telomérico contínuo decorrente de sucessivas divisões celulares induz a célula a um estado de senescência o que pode, posteriormente, acarretar em morte celular, processo mais comumente observado com o avançar da idade (Figura 8C) (CÁRCANO, 2016; HEIDENREICH e KUMAR, 2017).

A telomerase é uma enzima com atividade catalítica de transcriptase reversa com capacidade de reconhecer telômeros encurtados, em outras palavras, ela permite a criação de um molde na extremidade do telômero onde a síntese não foi concluída, possibilitando que a DNA polimerase siga a sequência substituindo pelos nucleotídeos adequados conforme avança (GAO, 2015; LIU e XING, 2016).

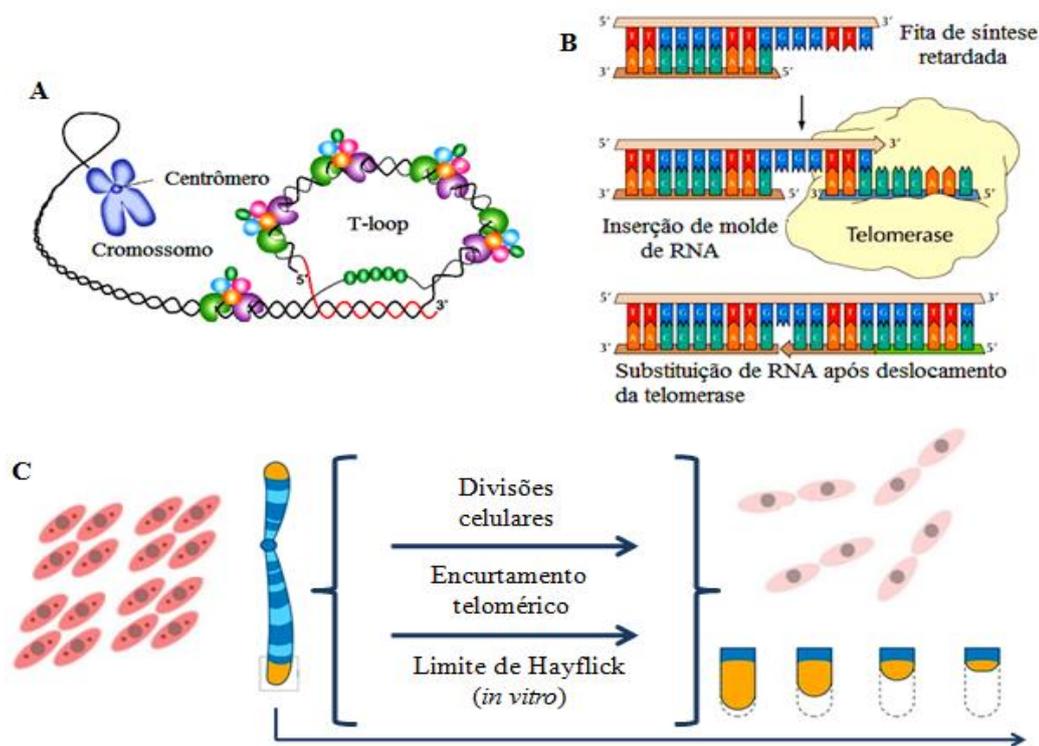


Figura 8: Funcionamento e ações da telomerase nos telômeros. (A) Formação de T-loop na extremidade do cromossomo. (B) Prolongamento telomérico pela ação da telomerase. (C) Senescência decorrente da divisão. Fonte: Imagens obtidas do Google imagens. Figura organizada pelo autor.

Ao apresentar essa questão se evidencia que a telomerase fornece potencial de replicação ilimitado, uma vez que o ônus da redução telomérica seria compensado por sua reconstrução através da ação enzimática. No entanto, é característico de células normais, saudáveis e em diferenciação que a telomerase se apresente em níveis pouco expressivos e, assim, não tenha ou forneça discreta ação (BARBON, 2016; HEIDENREICH e KUMAR, 2017). Fora desse escopo, a expressão e atividade excessiva da telomerase são encontradas em células-tronco embrionárias devido à intensa duplicação para formação tecidual, bem como em células cancerosas ou tumorais onde se instala divisão celular descontrolada, fornecendo, em ambos os casos, capacidade proliferativa indefinida (GAO, 2015; BARBON, 2016).

Com base nestas características o estudo da expressão proteica e gênica da telomerase fornece informações sobre o estado potencial de senescência celular, principalmente queratinócitos e fibroblastos que são as principais células constituintes da pele.

1.3.3 Alterações epigenéticas no envelhecimento: o papel das sirtuínas

As sirtuínas são uma família de proteínas (Sir 1 – 7) cuja principal impacto da descoberta foi à promoção do prolongamento da longevidade em cepas de leveduras e

moscas, além dos mamíferos quando associada à restrição calórica (RC) (ROGINA e HELFAND, 2004; TISSEMBAUM e GUARENTE, 2004). A localização das sete isoformas de sirtuínas varia, assim como sua função, sendo as Sir 6 e 7 exclusivas do núcleo, as Sir 3, 4 e 5 são mitocondriais e mais associadas a processos metabólicos envolvidos na restrição calórica e vias insulínicas e glicogênicas, enquanto as Sir 1 e 2 encontradas na região nuclear e citoplasmática (Figura 9) (MICHISHITA *et al.*, 2005; TENNEN *et al.*, 2010).

Sirtuínas mantidas em regiões nucleares (Sirt 1, 2, 6 e 7) estão intimamente associadas com eventos epigenéticos, como por exemplo proliferação, diferenciação e progressão no ciclo das células, reparo do material genético, apoptose (especialmente associadas a produção de TNF- α – do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*, em português chamado de Fator de Necrose Tumoral Alfa), regulação da atividade da RNA (ácido ribonucleico) polimerase e síntese ribossômica (FORD *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2011; MAO *et al.*, 2012). A inibição, mau funcionamento ou redução dessas proteínas está fortemente associada a mortalidade anterior a fase adulta em modelos experimentais animais, além da maior suscetibilidade no desenvolvimento de tumores, especialmente intestinais (GROB *et al.*, 2009; KANFI *et al.*, 2012).

Assim como a elevada expressão de telomerase ocorre em células cancerosas, também a expressão de sirtuína, especialmente a do tipo 1 no homem, está alterada em quadros neoplásicos. Embora esses processos não sejam completamente entendidos, estudos anteriores apontaram para o potencial da sirtuína em silenciar supressores tumorais. Ou seja, sirtuínas estão diretamente relacionadas com alterações epigenéticas, em especial processos de hipermetilação (LIM 2006; LIU *et al.*, 2009).

Apesar do seu potencial papel nas células neoplásicas, em doenças neurodegenerativas mais incidentes com o avançar da idade, como o Alzheimer, as sirtuínas atuam de modo benéfico sendo capazes de reduzir a expressão da proteína β -amilóide (formadora da placa amilóide), conseqüentemente reduzindo os processos inflamatórios decorrentes de sua presença e, conseqüentemente, diminuindo os processos neurodegenerativos (DONMEZ *et al.*, 2010; MIN *et al.*, 2010).

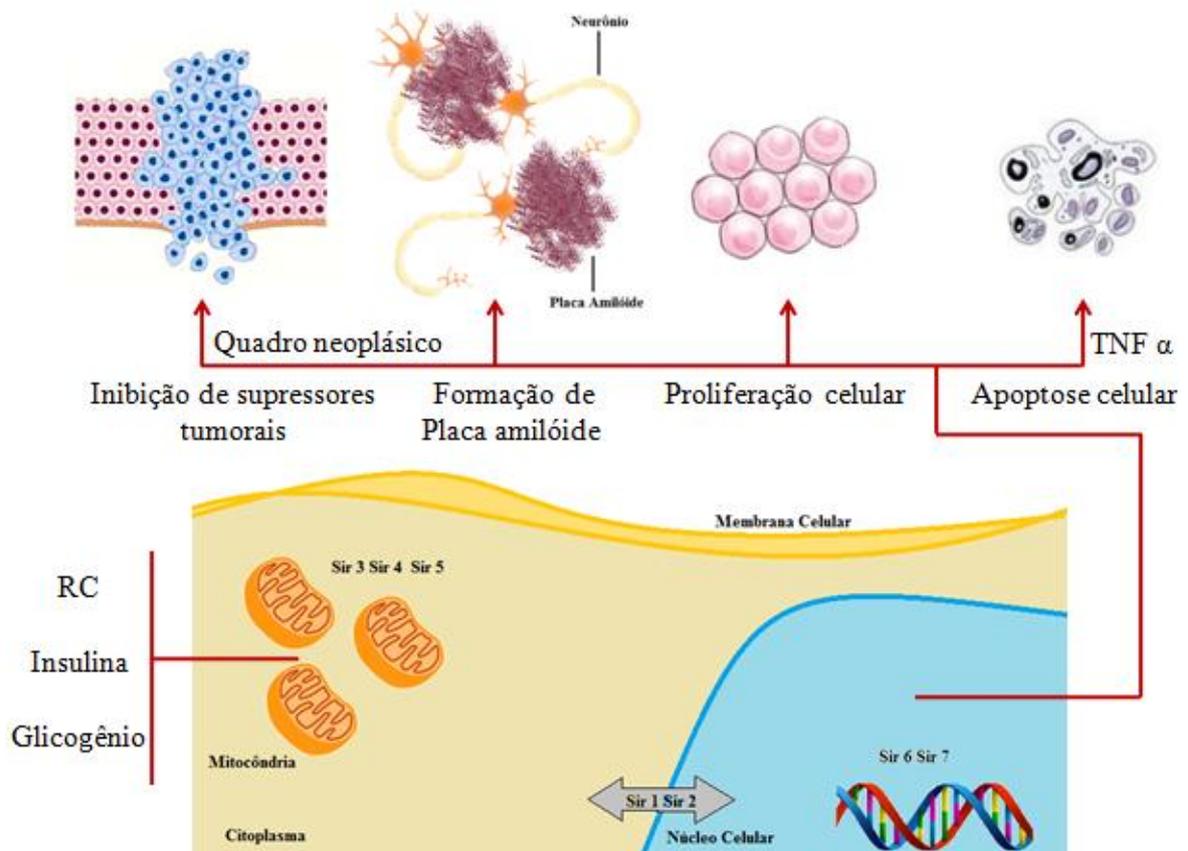


Figura 9: Representação das vias sob influência das sirtuínas. RC: Restrição calórica; Sir: Sirtuína; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa.
Fonte: o autor.

É importante ressaltar que o papel e elucidação dos potenciais das sirtuínas precisam ser melhor estabelecidos, visto que a literatura aponta para atividades danosas e protetoras decorrentes de sua ativação ou hiperativação de acordo com o tipo de tecido onde esta ação é estimulada (DOMNEZ *et al.*, 2012). Neste sentido, a expressão das sirtuínas precisa ser finamente regulada. Não são muitos os fatores que conseguem modular estas proteínas. Entretanto, estudos mostram que alguns compostos bioativos, como é o caso do resveratrol presente no vinho tinto são capazes de modular de modo diferencial e benéfico à expressão das sirtuínas (HOWITZ *et al.*, 2003).

1.3.4 Estresse oxidativo e senescência celular

Uma das teorias mais populares do envelhecimento biológico é a chamada “teoria dos radicais livres” que foi proposta por Harman nos anos 50. Esta teoria considerava que a maior parte dos efeitos deletérios observados nas organelas, células e tecidos era causada por níveis elevados e descontrolados das EROs. Posteriormente esta teoria foi reforçada na

medida em que se evidenciou o papel da disfunção mitocondrial na elevação nos níveis de EROs e estabelecimento de estados de estresse oxidativo (HARRIS, 2009; TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010). No interior dessas organelas, o oxigênio passa pela cadeia transportadora de elétrons gerando ATP (Trifosfato de Adenosina), ou seja, energia metabólica. Isto porque, na respiração aeróbia conduzida na mitocôndria, a redução do oxigênio é incompleta e conduz à geração de diferentes EROs, tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerado o principal contribuinte dos danos oxidativos (VITALE *et al.*, 2013). O H_2O_2 é capaz de originar outras EROs, principalmente o radical hidroxila (OH^{\cdot}), que por ter uma meia vida bastante curta dificilmente é sequestrado *in vivo* (PERL, 2013; BARBISAN *et al.*, 2014).

Por outro lado, evidências posteriores também descreveram que, em níveis baixos e controlados alguns tipos de EROs, como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio atuavam como moléculas sinalizadoras de algumas rotas celulares associadas com a sua proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular (RANG e DALE 2012; MACHADO *et al.*, 2014).

Como mecanismos de controle dos níveis de EROs, organismos aeróbios incluindo os seres humanos possuem dois sistemas principais de defesa antioxidante: o exógeno e o endógeno. O sistema exógeno é adquirido via alimentação através do consumo e absorção de moléculas bioativas com ação redutora de moléculas oxidativas. O sistema endógeno é constituído por um conjunto de enzimas antioxidantes com destaque para: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX) (Figura 10) (MONTAGNER, 2010). Entretanto, cabe também salientar que o organismo também é capaz de produzir moléculas com ação antioxidante que não são enzimas, como é o caso da glutathione.

No sistema antioxidante enzimático, a primeira linha de defesa é constituída pela enzima SOD, que catalisa a reação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Existem três isoformas da enzima SOD, sendo que a isoforma SOD dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) tem papel crucial na sobrevivência celular, uma vez que atua no interior da mitocôndria dismutando $O_2^{\cdot-}$ que é constantemente produzido pela cadeia respiratória em um processo conhecido como vazamento do superóxido (em inglês, *superoxide-leak*). O H_2O_2 produzido pela reação da SOD2 é catalisado por três enzimas, que atuam conforme o compartimento celular: a CAT, a glutathione reduzida e a GPX catalisam a degradação de H_2O_2 em H_2O (água). Assim, essas enzimas são capazes de neutralizar os agentes oxidantes, e mantê-los em níveis adequados no organismo (CARVALHO, 2012; NEVES *et al.*, 2014). No caso, o estresse oxidativo se

instaura quando há uma queda no sistema de defesa enzimático e/ou um aumento na produção de EROs (HALLIWELL, 2007).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está intimamente associado ao processo de envelhecimento e morte celular por apoptose. As EROs têm sido consideradas como pré-requisito para o processo inflamatório e apoptótico, o estresse oxidativo teria assim, um papel central em processos de envelhecimento celular, além de patologias e perda da homeostase do organismo (CHANDRA *et al.*, 2000; SINHA *et al.*, 2014).

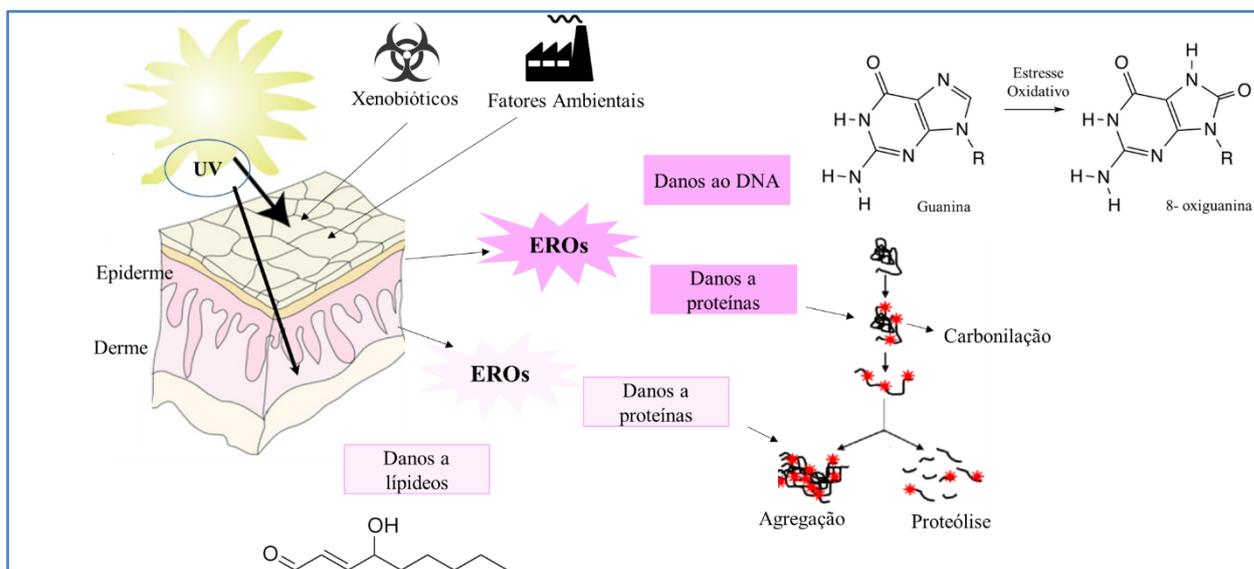


Figura 10: As EROs têm sua formação aumentada pela incidência de radiação UV, exposição a fatores ambientais e xenobióticos. As EROs podem causar danos protéicos do tipo agregador ou lisante e danos lipídicos que podem vir a afetar a membrana celular, tornando-a mais permeável e, assim, interferindo na sua homeostase e desestabilizando o tecido e favorecendo o aparecimento de patologias associadas.

Fonte: Imagens obtidas do Google Imagens. Figura organizada pelo autor.

1.3.5 Inflamação e senescência celular

O termo “*inflammaging*”, cunhado no início dos anos 2000 pelo pesquisador Claudio Franceschi, tem sido usado para definir o sistema estéril (na ausência de infecção) crônico e de baixo grau de estado de inflamação que hoje em dia é considerado um essencial biológico do processo de envelhecimento. De fato, a inflamação é um processo benéfico como uma resposta imune a condições prejudiciais, mas com o envelhecimento há uma redução na capacidade de suportar desencadeantes antigênicos, químicos, físicos e nutricionais, tornando-se crônica e de baixo grau, levando aos tecidos disfunção e degeneração (LEONARDI *et al.*, 2018).

Numerosas evidências têm mostrado que aparentemente diferentes doenças crônicas não transmissíveis, incluindo câncer, morbidades cardiovasculares e diabetes tipo 2 têm em comum um quadro de inflamação crônica de baixo grau. Assim, estudos epidemiológicos têm sugerido relação entre níveis aumentados de inflamação mediados pela interleucina (IL) -6 ou proteína C-reativa (CPR) a múltiplas doenças relacionadas à idade (VASTO *et al.*, 2009; LEONARDI *et al.*, 2018).

A associação de inflamação crônica e senescência celular ocorrem, já que, apesar de células senescentes interromperem sua atividade replicativa, elas ainda assim continuam metabolicamente ativas, principalmente em nível transcricional, interferindo no seu microambiente via ocorrência do chamado “fenótipo senescente”. Com este fenótipo, as células podem alterar a quantidade e qualidade de produção de proteínas e também diminuir a eficiência na catalise de resíduos metabólicos pelos lisossomos. Além disso, o estresse oxidativo também pode gerar uma maior quantidade de resíduos metabólicos que podem permanecer dentro das células ou no meio extracelular. Este grupo de elementos não desejáveis passou a ser denominado DAMPs. Estas moléculas podem atuar como indutoras de respostas inflamatórias, por ativarem células imunes como os macrófagos de modo similar ao que ocorre na presença de patógenos. Na medida em que a produção e o acúmulo de DAMPs não são controlados podem se estabelecer quadros inflamatórios crônicos, via manutenção de níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, TNF- α , e níveis baixos de citocinas antioxidantes como a IL-10. Por este motivo, Huang *et al.*, (2015) propuseram que as DAMPs representariam biomarcadores ideais do envelhecimento celular constituindo um alvo atraente para intervenções no envelhecimento e também nas doenças associadas à idade.

1.4 ENVELHECIMENTO DOS FIBROBLASTOS: PRINCIPAIS CÉLULAS DA PELE

A camada da derme é responsável pela síntese de substâncias formadoras da matriz extracelular, tais como colágeno e elastina (MCGRATH *et al.*, 2008). Entre outras funções, se destaca a capacidade do fibroblasto sintetizar fatores de crescimento para a diferenciação e proliferação celular. Essa variedade de atividades reflete o estado metabólico desse tipo de célula que pode ser chamado de fibrócito quando estiver em estado quiescente (repouso), nesse estado de repouso a célula contém certas organelas celulares em menor quantidade. A divisão celular de fibroblastos em adultos geralmente só ocorre quando necessário, como em uma lesão, por exemplo, onde é essencial na cicatrização (Figura 11) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).



Figura 11: Imagem ao microscópio invertido mostrando cultivo celular de fibroblastos humanos.
Fonte: ATCC (*American Cell Line Collection*).

Está bem evidenciado que células fibroblásticas senescentes se acumulam na pele humana envelhecida, pois estão detidas na fase G1 de desenvolvimento, não sendo estimuladas a entrar na fase S (duplicação do DNA a fim de gerar uma nova célula) devido à repressão de vários genes ligados ao crescimento celular que impulsionariam a célula para as fases seguintes de seu ciclo replicativo (Figura 12). A resistência a apoptose é uma característica de células com parada irreversível de fatores de crescimento, como consequência, tem-se um acúmulo de células com o fenótipo senescente, o que leva ao declínio da funcionalidade tecidual (JENKINS, 2002; RANG e DALE, 2012).

Estudos *in vitro* sugeriram que a senescência celular está sob o controle genético. Nesse contexto, células de doadores idosos, bem como as que apresentam síndrome hereditária de envelhecimento, entram em senescência após menor número de replicações do que as de doadores jovens (DIMRI *et al.*, 1995; PANSANI *et al.*, 2016). Um dos quesitos responsáveis por essa situação inclui a perda dos receptores de ligação do EGF (do inglês *Epidermal Growth Factor*), um fator de crescimento epidérmico o que causa uma resposta reduzida a esse fator de crescimento bastante necessário na cicatrização celular, uma vez que afeta os fibroblastos circundantes do tecido saudável vizinho ao local de injúria (ALIPER *et al.*, 2015).

De fato, outros fatores de crescimento e estruturas que estejam relacionados à proliferação tecidual, como os telômeros nos cromossomos, por exemplo, mostraram-se

dependentes de idade, o que significa uma redução no tempo hábil para reparar um tecido que venha a ser danificado (ALIPER *et al.*, 2015; LUPA *et al.*, 2015).

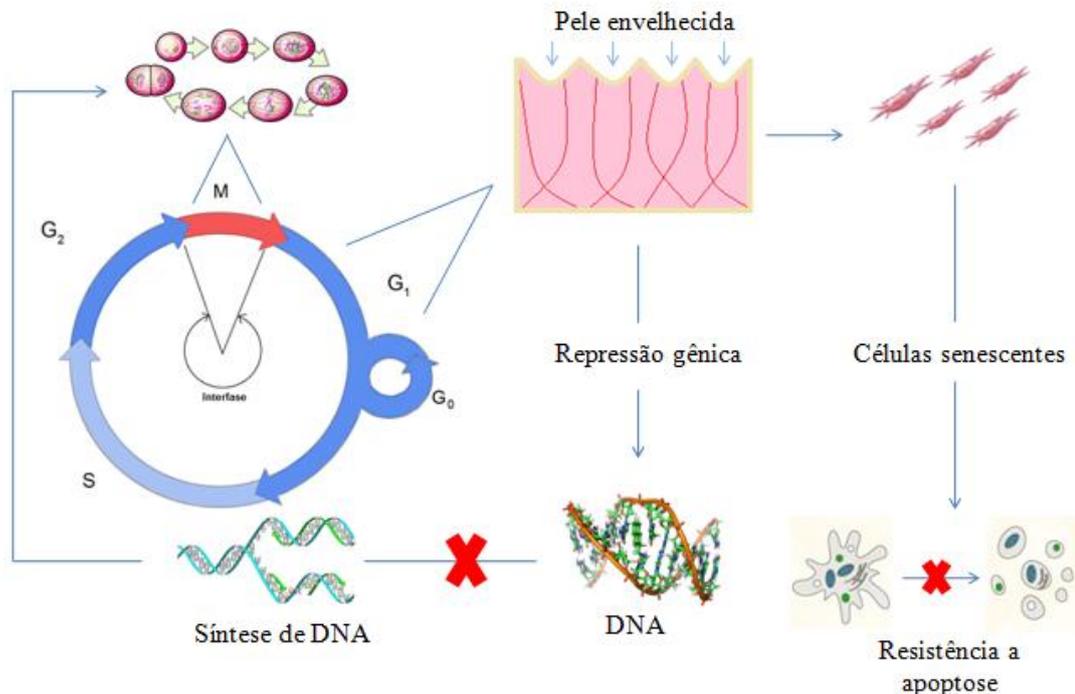


Figura 12: Células com parada do ciclo celular. (G₀) célula fora do ciclo replicativo; (G₁) primeiro estágio do ciclo celular; (S) fase de síntese de DNA; (G₂) duplicação de estruturas celulares; (M) Mitose.
 Fonte: Imagens obtidas do Google imagens, montagem da figura: o autor.

Estudos têm apontado para uma estimativa de encurtamento dos telômeros nos fibroblastos, sendo que a cada divisão celular este vem a perder cerca de 150 pares de bases, outros confirmaram em células humanas cultivadas que a idade está relacionada ao comprimento dos telômeros, uma vez que doadores idosos têm um maior encurtamento quando comparados a adultos jovens. Células da pele com proliferação mínima podem vir a reverter seu fenótipo senescente quando a telomerase é induzida (KOSMADAKI e GILCHREST, 2004). Aqui é importante comentar que, ao contrário dos fibroblastos os queratinócitos são células que praticamente não apresentam senescência replicativa. Deste modo, as características associadas ao envelhecimento da pele, como é o caso do aparecimento de rugas, está diretamente associada ao envelhecimento dos fibroblastos.

Considerando a alta necessidade de reposição celular na pele por esta ser um tecido de revestimento, o encurtamento progressivo dos telômeros é um dos fatores intrínsecos de senescência mais impactante. A exposição solar também afeta grandemente o processo de

envelhecimento cutâneo e causa mais facilmente danos no DNA em regiões conhecidas como dímeros de timina, ou seja, regiões que apresentam na fita a sequência TT (T de timina, um nucleotídeo que compõe a dupla hélice do grupo das pirimidinas). Assim, considerando que os telômeros são compostos de sequências TTAGGG (A de adenina e G de guanina, ambas do grupo das purinas), um terço das alterações poderão ser ocasionadas, na pele, por fotoenvelhecimento (Figura 13) (ELLER et al., 2002).

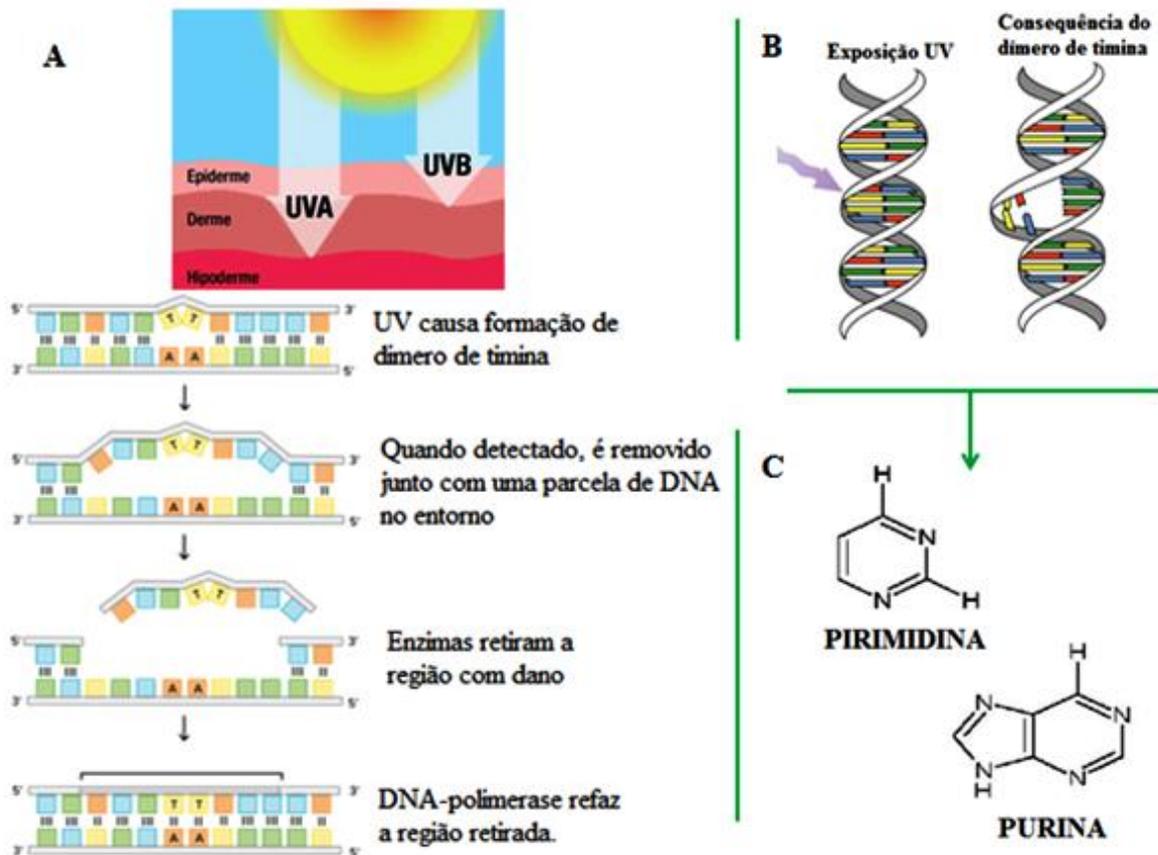


Figura 13: (A) Formação e reparo de dímeros de timina após exposição a UV; (B) Consequência estrutural na dupla-hélice de DNA após formação de dímero; (C) Representação química de pirimidinas e purinas presentes no DNA.

Fonte: Imagens obtidas de Google Imagens. Figura organizada pelo autor.

O rompimento do T-loop no telômero, mesmo que esse ocorra de forma natural (pelo encurtamento excessivo), de forma induzida ou por inferência de estresse *in vitro*, bem como a exposição à irradiação ultravioleta (UV) estão envolvidos na sinalização da indução da p53. (FUNK *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003).

1.4.1 Disfunções e morbidades da pele associadas ao envelhecimento

Doenças crônicas e lesões podem levar à perda da integridade da pele (CLARK et al., 2007). A histologia do tecido envelhecido revela que a maior parte dos danos se localiza na camada da derme, tornando-a fina devido à ação deletéria de colágeno que reduz interações com os fibroblastos (QUAN *et al.*, 2015). A exposição a certos estressores, como à radiação ultravioleta (UV), por exemplo, gera a migração de células de defesa para a derme que podem produzir elastases responsáveis por romper a rede de fibras presente nessa camada, assim, metaloproteinases (MMP) também são recrutadas para clivar as fibras da matriz. Além disso, fibroblastos também secretam fatores de crescimento que interagem com os queratinócitos das camadas mais superficiais, esses por sua vez aumentam a resistência a ondas UV e a apoptose como consequência da senescência. Sem esses fatores, as células sofrem morte celular programada em maior grau enquanto as sobreviventes, que não entram em estado senescente, somam-se a presença de EROs, podendo resultar em carcinomas (RINNERTHALER *et al.*, 2015).

Os mecanismos antioxidantes celulares são mais concentrados na derme do que na epiderme onde a quantidade de EROs é maior, entre elas cabe mencionar a SOD conversora de O_2^- em H_2O_2 que pode ser convertido em vários outros compostos, como água, através da GPX, por exemplo (KAMMEYER; LUITEN, 2015). A proteína supressora de tumor p53 desempenha um papel importante na proteção de genoma, células, tecidos e pele, uma vez que permite a reparação de danos do DNA antes da sua replicação ou induz a morte celular por apoptose quando os danos de DNA são severos (DONADUSSI, 2012; RANG e DALE, 2012).

Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da morte celular programada, como as caspases que sinalizam para a apoptose e clivam os substratos levando à condensação e fragmentação nuclear e externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas que promovem apoptose por: indução de enzimas destrutivas, como DNAses, e destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (RANG e DALE, 2012; JERONIMO, 2016).

A pele não é a única que sofre involução ao longo do tempo, a musculatura também tem acentuadas características de regressão conforme o avançar da idade. As modificações no sistema tegumentar, que torna a pele mais frágil, levam a uma lenta cicatrização de ferimentos

devido ao decréscimo da atividade de importantes componentes desse tecido (SANTOS e BIANCHI, 2014).

A avaliação da integridade cutânea considera critérios fisiológicos como hidratação, secreção sebácea, funcionamento das glândulas sudoríparas, além da permeabilidade. Outros apontamentos são feitos com base na organização desse tecido, levando em conta proteínas estruturais como o colágeno e a elastina, sintetizadas pela principal célula da pele, o fibroblasto (SOUZA e SANTOS, 2007).

Sendo a pele o órgão de revestimento que vai sofrer as ações intrínsecas e extrínsecas precursores do desequilíbrio cutâneo, é de extrema necessidade estudar a otimização de processos chaves envolvidos na fisiologia, biologia e manutenção desse importante componente orgânico.

1.5 FITOTERÁPICOS NA MODULAÇÃO INDIRETA DA SENESCÊNCIA CUTÂNEA

Diversos fatores podem influenciar na modulação, positiva ou negativamente, das células, cabendo destacar, primeiramente, a idade do indivíduo, seu grau de mobilidade (devido à maior probabilidade de abrasão, além de atrito entre os próprios tecidos), seguida de particularidades de vida, como estado nutricional, presença de outras doenças (como diabetes), uso de medicamentos (principalmente imunossupressores), além da localização anatômica e ocorrência de infecções (RAMOS, 2015).

A aplicação de fitoterápicos tem sido amplamente utilizada desde antes do advento da farmacologia com o intuito de obter mais rapidamente a melhora, ou estética ou funcional, de tecidos afetados e que se encontram fora do seu quadro de normalidade. Com o passar do tempo, no entanto, e o avanço na produção de medicamentos, observou-se uma maior tentativa, não apenas em produzir novos fármacos, mas em isolar princípios ativos (RAMOS, 2015; MACEDO *et al.*, 2017).

Em uma revisão publicada por Macedo *et al.*, (2017), foi avaliada a ação de fitoterápicos em lesões associadas à *diabetes mellitus*. Embora esta revisão tenha encontrado praticamente todos os artigos utilizando modelos experimentais animais, apenas um estudo apontou para diferença não significativa entre grupo controle (sem fitoterápico) e grupo tratado (com fitoterápico), levando a conclusão de que mesmo que a planta contenha compostos ativos para a proliferação celular, a concentração necessária e, possivelmente, a interação entre essas substâncias é de essencial importância para a obtenção de resultados significativos.

Outro estudo, este publicado por Li *et al.*, (2011), avaliou uma pomada a base de ervas chinesas em pacientes diabéticos diagnosticados com lesão por pressão. Neste caso, pacientes que receberam o tratamento padrão, sem adição de fitoterápicos tiveram índice de cura 30% menor e em maior tempo do que o grupo submetido ao tratamento. A diabetes é uma condição que influencia no tempo de reparo tecidual de modo geral, e não pontual, no organismo.

Em contrapartida o estudo publicado por Adams *et al.*, (2016) tem seu foco voltado para a ação de 14 substâncias, presentes em diferentes espécies nativas da Austrália, capazes de induzir ou suprimir a síntese de colágeno *in vitro*. Sabe-se que o colágeno é participante da manutenção da integridade cutânea e, neste estudo em especial, foi verificada a capacidade de certas substâncias em atuar aumentando ou reduzindo a síntese de colágeno sem, no entanto, haver concordância com a quantidade de RNAm (RNA mensageiro, que pode ser um denominador da síntese proteica), sugerindo que certos compostos poderiam atuar mediante outra via que não através da expressão gênica.

Independente do estudo a ser analisado na literatura e do fato de que substâncias, como os polifenóis (com frequência usados como objetos medicinais e farmacológicos), a grande maioria dos estudos converge para o fato de que a fitoterapia, embora usada ao extremo desde épocas pré-históricas, carece de pesquisas atuais principalmente no que tange a aplicabilidade de variados compostos presentes em diversas estruturas de plantas (BAJRACHARYA, 2015; MACEDO *et al.*, 2017). A seguir, apresenta-se mais aprofundadamente o barbatimão, fitoterápico que é o foco deste estudo.

1.6 BARBATIMÃO E O POTENCIAL EFEITO NA MODULAÇÃO DO ENVELHECIMENTO DE FIBROBLASTOS

Denominado cientificamente *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, o barbatimão é uma planta medicinal oriunda do Bioma Cerrado Brasileiro, também encontrada no Bioma Amazônia e Bioma Caatinga sendo pertencente à família *Fabaceae* (Figura 14) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).



Figura 14: Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), conhecida como barba-de-timão, borãozinho-roxo, casca-da-virgindade, uabatimô. Árvore decídua, de copa alongada (4-5 m altura), com floração em janeiro, apresenta frutos cilíndricos, com grande número de sementes.
Fonte: Imagens obtidas no Google Imagens. Figura organizada pelo autor.

Os compostos químicos são, geralmente, extraídos da casca e entrecasca do caule seco da planta, entre eles se destacam os taninos, expressos em pirogalol e utilizados para quantificação via método espectrofotométrico. Os metabólitos secundários como o ácido gálico e a galocatequina também fazem parte da estrutura química e podem ser quantificados via cromatografia líquida e detector ultravioleta, enquanto o teor total de fenóis da matriz química varia de acordo com o tipo de extrato utilizado (hidroalcoólico ou hidroacetônico). Além destes, o extrato do barbatimão podem contar mucilagens, saponinas e flavonóides (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Taninos são substâncias fenólicas que apresentam 3 principais propriedades responsáveis pela maior parte das atividades farmacológicas: (1) a formação de complexos com íons metálicos, (2) a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e (3) a capacidade de formar complexos com outras moléculas tais como proteínas e polissacarídeos (BATTESTIN *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2010). Segundo Trolezi *et al.*, (2017), os taninos apresentam propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, antifúngicas e cicatrizantes, comprovando a conformidade com a medicina popular onde a planta é utilizada externamente (via tópica) em lesões cutâneas, úlceras e infecções, por exemplo. Já a ingestão é feita para tratar problemas gastrointestinais como a diarreia e ainda infecções respiratórias. Os produtos obtidos de *S. adstringens* estão aptos a serem incorporados a pomadas e sabonetes mantendo suas propriedades cicatrizantes e antisépticas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As propriedades medicinais do barbatimão parecem estar relacionadas principalmente a alta concentração de compostos fenólicos, flavonóides, além da epigalocatequina-galato

(EGCG) e proantocianidinas importantes como a prorobinetidina e as prodelfinidina, sendo esta última bioativamente caracterizada pelo considerável aumento no processo de cicatrização de lesões cutâneas (SANTOS *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2010; HERNANDES *et al.*, 2010).

Embora as propriedades do barbatimão sejam já muito conhecidas, primeiramente via etnofarmacologia, poucos estudos estão disponíveis, principalmente recentes, corroborando sua eficácia, sendo que nenhum deles tem como alvo células senescentes.

Trolezi *et al.*, (2017) testaram a capacidade fungicida do barbatimão e dos taninos contra *Pythium insidiosum*, um agente micológico resistente as terapias antifúngicas, em um estudo *in vitro* e *in vivo*. No primeiro caso, ambas as substâncias foram capazes de, não apenas agir contra o patógeno, como também causaram alterações na membrana celular deste. No entanto, no estudo *in vivo* utilizando coelhos como modelo experimental, não houve remissão das lesões inoculadas com *Pythium insidiosum*, nem com administração intralesional das substâncias, nem com a ingestão de extrato bruto de barbatimão.

Freitas *et al.*, (2018), também testaram o efeito fungicida dos taninos do extrato de barbatimão, por sua vez, contra *Candida sp.* Neste estudo, tanto a solução de taninos isolada, quanto a associada à fluconazol (fármaco usado como antimicótico) apresentaram inibição de proliferação de leveduras de *Candida sp.* em estudos *in vitro* e *in vivo*, sem toxicidade ao tecido vaginal de camundongos utilizados no estudo.

Rebecca *et al.*, (2003) avaliaram o extrato de barbatimão em um estudo utilizando fígado com perfusão e mitocôndrias isoladas, onde verificaram sua ação metabólica. Aqui, resultados mostraram-se diferentes em estruturas íntegras e alteradas, sendo que no caso da mitocôndria, a atividade das ATPases (catalisadoras da molécula de ATP) foram estimuladas em mitocôndrias normais, e inibidas em mitocôndrias danificadas. Associado ao fator metabólico isolado das mitocôndrias, os fígados com perfusão apresentaram alto consumo de oxigênio após a adição do extrato, sugerindo, segundo os autores, que este prejudicaria o metabolismo hepático.

Pinto *et al.*, (2015) utilizaram do extrato de barbatimão para verificar sua estimulação em processos cicatriciais em ratos diabéticos. Este estudo corrobora com o atual entendimento da capacidade proliferativa do barbatimão, uma vez que foi verificada sua eficácia em promover a migração e proliferação celular de queratinócitos. Pinto *et al.*, (2015) avaliaram ainda a capacidade de penetração do extrato utilizado em gel nos tecidos, encontrando sua presença nas camadas dérmicas.

O estudo mais recente envolvendo o extrato de barbatimão, além da copaíba (*Copaifera spp.* L.) foi realizado por Ricardo *et al.*, (2018) e é uma extensa revisão da literatura envolvendo achados do período compreendido entre 1576 e 2011. Nesta análise de cerca de 500 anos foram localizados informações etnobotânicas referente ao período colonial brasileiro. Estes autores confirmaram o uso do barbatimão como adstringente e a copaíba como cicatrizante. No entanto, os autores sugerem que, mesmo tendo embasamento para serem considerados medicamentos efetivos, é necessária a melhora das fórmulas farmacêuticas, possibilidade apenas conseguida através de pesquisas.

Com base nas evidências a partir da medicina tradicional e de estudos científicos que mostram a ação cicatrizante do barbatimão, uma questão que precisa ser melhor elucidada diz respeito ao quanto o barbatimão poderia modular fatores do envelhecimento de fibroblastos, servindo como potencial produto desacelerador deste processo. Aqui é importante comentar que, o envelhecimento da pele tem um grande impacto nas pessoas e, influenciando não só os aspectos fisiológicos e funcionais do organismo, mas também atuando diretamente em aspectos psicossociais do mesmo.

Assim como existe um grande conjunto de estratégias voltadas à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, a manutenção da aptidão funcional e da autonomia dos idosos, estudos que busquem identificar e desenvolver produtos que desacelerem o envelhecimento da pele podem ser considerados relevantes dentro de um contexto interdisciplinar.

2 HIPÓTESES

Considerando que a modulação de vias celulares envolve o tipo de composto e o estado funcional das células, várias possibilidades podem ser inferidas quanto à exposição ao extrato aquoso de barbatimão, sendo:

Hipótese 1: O extrato de barbatimão apresenta efeito proliferativo *in vitro* na regeneração e senescência proliferativa de fibroblastos e na modulação de marcadores inflamatórios, de dano ao DNA e apoptóticos.

Hipótese 2: O extrato de barbatimão não apresenta efeito proliferativo *in vitro* na regeneração e senescência proliferativa de fibroblastos e na modulação de marcadores inflamatórios, de dano ao DNA e apoptóticos.

Hipótese 3: O extrato de barbatimão não apresenta efeito proliferativo *in vitro* na regeneração e senescência proliferativa de fibroblastos, porém exerce modulação de marcadores inflamatórios, de dano ao DNA e apoptóticos.

Hipótese 4: O extrato de barbatimão apresenta efeito proliferativo *in vitro* na regeneração e senescência proliferativa de fibroblastos, mas não exerce modulação de marcadores inflamatórios, de dano ao DNA e apoptóticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito modulatório do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) em marcadores de senescência de fibroblastos dérmicos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em cultura de células da linhagem HFF-1 de fibroblastos humanos, avaliar o efeito da exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), visando:

- Mensurar por ensaios espectrofotométricos a viabilidade e proliferação celular;
- Avaliar modificações morfológicas através da comparação de culturas jovens e senescentes e senescentes expostas às diferentes concentrações do extrato;
- Taxas de dano ao DNA;
- Expressão de marcadores apoptóticos;
- Expressão gênica de proteínas marcadoras de senescência;

4 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL.

4.1 DELINEAMENTO GERAL – MANUSCRITO 1:

O objetivo foi avaliar a capacidade modulatória do extrato hidroalcoólico de barbatimão em marcadores citofuncionais de fibroblastos humanos senescentes (HFF1-old) (Figura 15).

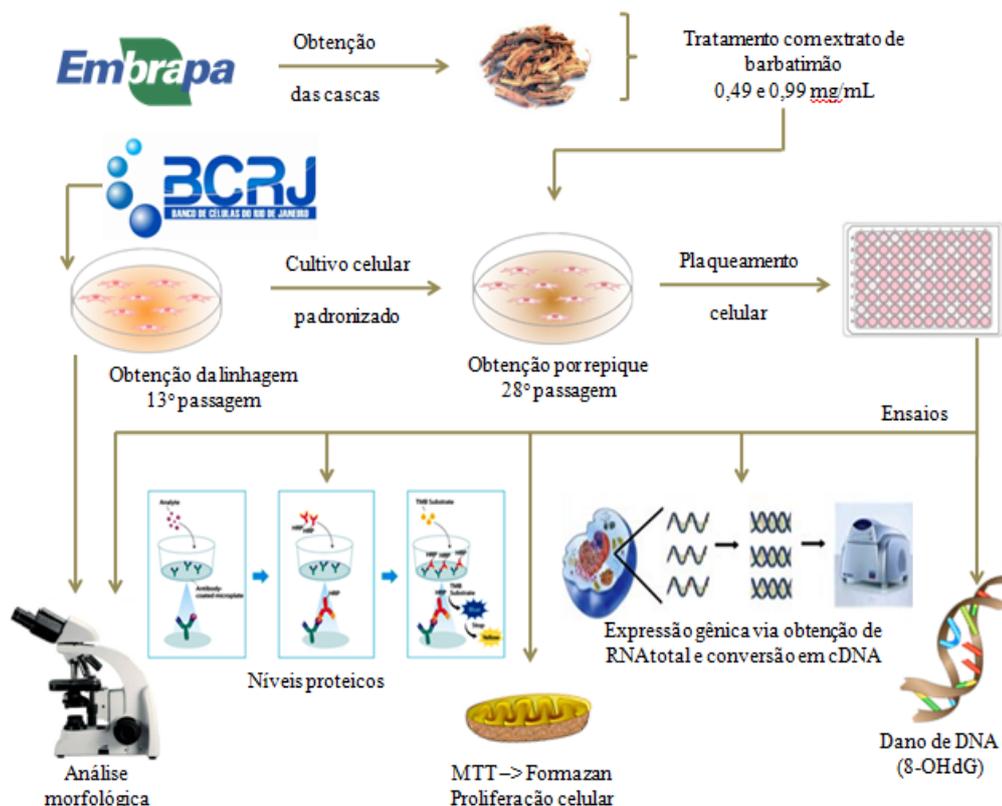


Figura 15: Delineamento geral do manuscrito da dissertação. BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro; Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; RNA: Ácido Ribonucleio; cDNA: DNA complementar; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide. Fonte: o autor.

Para tal, foi obtida a linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1) originárias do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em condições padronizadas, mantidas em estufa com 5% de gás carbônico (CO₂), 37°C, em meio de cultivo adequado sendo utilizado *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com 15% de soro fetal bovino (DMEM 15%) e 1% de antibiótico. As células foram mantidas em cultivo sendo repicadas até atingirem morfologia senescente observada via microscopia confocal. Após, foram tratadas com barbatimão e cultivadas por 24 e/ou 72 horas para realização dos testes. A

definição das doses de barbatimão utilizadas foram baseadas em estudos prévios e estão descritas por Pellenz *et al.*, (2018).

5 RESULTADOS

Os resultados estão descritos sob a forma de um manuscrito científico submetido à revista *Biogerontology*, fator de impacto 3.23, qualis Capes A1, na área interdisciplinar.

5.1 MANUSCRITO

Article type: Regular Article

***Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville, a Brazilian wound healing plant, restores some cytofunctional markers of senescent human dermal fibroblasts.**

Moisés Henrique Mastella^{1,5}, Neida Luiza Pellenz^{2,5#}, Cibele Ferreira Teixeira^{2,5}, Verônica Farina Azzolin^{2,5}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, João Ricardo Malheiros de Souza⁴, Beatriz Sadigursky⁵, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,5}, Euler Esteves Ribeiro⁶, Fernanda Barbisan^{1,2,5}

¹Postgraduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

²Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

³Lutheran University of Brazil (ULBRA), Brazil.

⁴Postgraduate Program of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

⁵Biogenomic Laboratory, Morphology Department, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

⁶State University of Amazonas, Open University of the Third Age (UEA/UnATI), Brazil.

Moisés Henrique Mastella and Neida Luiza Pellenz have contributed equally to produce the present study.

Corresponding author: Fernanda Barbisan; Department Gerontology, Avenue Roraima nº 1000, build 51- Zip Code 97105-900- Santa Maria, RS- Brazil

E-mail: fernandabarbisan@gmail.com

Running Title: Wound healing plant and senescent fibroblasts

Abstract

Modification of body tissues, such as skin, over time leads to reduced tissue integrity due to decreased cell functions, among which the fibroblast is highlighted. Despite the many changes caused by cellular senescence, the most notable is the decrease in tissue healing capacity. In the search for therapies that improve biological functions, the barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mar.) Coville) is a plant native to Brazil with a well-known cicatrization capacity, but little explored. Using the aged human fibroblast cell line (HFF-1), this study sought to demonstrate the potentialities of barbatimão extract in the modulation of cellular senescence genes, in anti-inflammatory action, proliferation, apoptosis and morphology. The results demonstrated the ability of the extract to increase the expression of senescence marker genes without, however, significantly altering cell proliferation, in addition to reducing mortality rates. Our results suggest that barbatimão is capable of restoring the metabolism of senescent skin cells.

Key-words: Cell senescence. Skin. Barbatimão. Telomerase. Gene Expression.

Introduction

The skin ageing is triggered by interaction of an inevitable development genetic program (intrinsic factor) and environmental and lifestyle variables (extrinsic factors), that can accelerate or decelerate this events. This aging process is associate to reduction of skin physiological function and an increased susceptibility to age-related dermatoses including dry skin, itching, ulcers, dyspigmentation, wrinkles, fungal infections and benign or malignant skin cancers [1]. These modifications are strongly related to fibroblast senescence, since this cell has a crucial role on skin matrix structure. In fact, when these cells become senescent are

unable to proliferate, but remain metabolically active and are able to interfere in the skin tissue structure and function [2].

Evidence from *in vitro* studies showed that senescent fibroblasts display several established hallmarks of ageing, such as genomic instability, epigenetic modifications, loss of proteostasis, telomere shortened, mitochondrial dysfunction, replicative senescence and altered intercellular communication [3]. Perhaps the most relevant skin dysfunction triggered by senescent fibroblast is related to wound healing process that can be impaired in aged-persons. In fact, fibroblast senescence leads to decreased migratory and contractile functions and a reduced capacity to be activated into myofibroblasts, which is consistent with the wound healing defects seen in aged skin [2,4].

Due high impact that skin aging has on human health searching there are a large number of studies related to identification that pharmacological or non-pharmacological strategies that could be positively modulate this process. A possible strategy could be to analyse the potential effect on some fibroblast senescent markers of plant extract with have known wound healing properties. Actually, the use of plant extracts is in historical common practice that can accelerate wound healing (repair) process [5].

Brazil presents a megadiversity of plants, some ones traditionally used in the wound healing treatment. This is the case of *Stryphnodendron adstringens* (Mar.) Coville belonging a Fabaceae family, popularly named barbatimão. Bark extracts of this plant are traditionally used as cicatrizing, astringent, anti-inflammatory, and antimicrobial properties been these properties confirmed by scientific reports [6,7]. This plant is richest in tannins, presenting high levels of epigallocatechin-gallate (EGCG) and gallic acid molecules existing some Brazilian commercial ointments that include barbatimão in this formula. In a series case [8] authors described potential use of barbatimão on wound healing of extensive physical trauma including nail drilling in diabetic patients, and also other skin injuries in elderly patients submitted a surgical intervention, such as rejection of breast graft and safenectomy. Barbatimão wound healing effect seems to involve differential oxidative and inflammatory modulation triggered by skin, cells including fibroblasts [6].

In this context, we postulated that hydroalcoholic aqueous extract of barbatimão could present some modulatory effects on senescent markers of dermal aged-fibroblasts. To test this hypothesis, we conducted an *in vitro* study using HFF1-aged fibroblast exposed to different barbatimão concentrations analysing effects on cellular proliferation, cell cycle markers, oxidative markers, inflammatory markers and cell senescence markers.

Material and Methods

Experimental Design

This *in vitro* study included commercial human HFF-1 fibroblasts obtained from American Type Culture Collection – ATCC, (Manassas, USA). As soon as fibroblasts arrived at the Biogenomic Laboratory, we cultivated them under suitable conditions for 7 days, and with part of these fibroblasts the analyzes of what we considered as young cells were performed. The remaining cells were maintained in cell culture for about 50 days, when they reached senescent morphology, and then at this time, we performed the barbatimão treatments and the analyzes with the old cell group.

A HFF-1 and HFF1-old fibroblast cultures was used as *in vitro* model to evaluate barbatimão effect on morphology using cultures at near confluence that were treated and non-treated with barbatimão's extract. HFFs were photographed through a microscope at a digital camera (Leica DFC 340 FX, Leica Microsystems, Germany) and Leica Application Suite Advanced Fluorescence Software (Leica Microsystems, Germany) magnification of epifluorescence microscope (Leica, DMI 4000B). Therefore, 0 hour as considered the start point and 72h hours as the endpoint used to estimate the structural modification. Images then were analyzed by comparison between the groups: HFF-1 *versus* HFF1-old fibroblasts and HFF1-old fibroblasts treated and non treated with barbatimão's extract.

All analyses involving the measurement of absorbance or fluorescence were performed using SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The gene expression analysis was performed after 24h of exposure to barbatimão, in contrast all other analyzes were performed within 72h after exposure to treatment.

Cell culture and treatments

HFF-1 fibroblast were cultured in DMEM supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 µL/mL), and streptomycin (100 mg/mL). The cultures were maintained at 37°C under standard humidity and 5% CO₂ in a standardized, controlled incubator. All experiments were repeated at least three times. Therefore, initially, fibroblasts were exposure to barbatimão extract concentrations ranging from 0.49 - 3.99 mg/mL to choose a

concentration in the cellular viability of young fibroblasts. The concentration 0.49 and 0.99 were chosen for the experiment. It is important to cite that the concentration of 0.99 mg/mL is used in commercial formulations in Brazil. All reagents used in cell culture are obtained from Vitrocell – Embriolife (Campinas-Brazil).

Cell Proliferation Assay

Cellular proliferation were evaluated by the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay, as described previously by Barbisan et al (2017) [9]. That analyze the cell metabolism through of the reduction yellow salt MTT by mitochondrial dehydrogenase in living cells to produce insoluble purple formazan crystals that are quantitatively measured by absorbance read spectrophotometrically at 560 nm.

Mortality Assay

To evaluate the potential cytotoxic of barbatimão in HFF-1, the concentration of free double stranded DNA (dsDNA) in cell culture was determined in a black, 96-well plate using a Quant-I TTMPicoGreenkit, purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA) and diluted in Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) with reagents of the highest purity/grade purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The fluorimetric analyses were performed at an excitation of 480 nm and an emission of 520 nm recorded at room temperature.

Growth Factors

Quantitative measurement of KGF and human FGF proteins was performed on cell culture supernatants, according to manufacturer's instructions (Abcam (Cambridge, MA, USA). The SimpleStep ELISA® employs an affinity tag labeled capture antibody and a reporter conjugated detector antibody which immune capture the sample analyte in solution. To perform the assay, samples or standards are added to the wells, followed by the antibody mix. After incubation, the wells are washed to remove unbound material. TMB substrate is added and during incubation is catalyzed by HRP, generating blue coloration. This reaction is then stopped by addition of Stop Solution completing any color change from blue to yellow.

Signal is generated proportionally to the amount of bound analyte and the intensity is measured at 450 nm.

DNA oxidation

DNA damage was determined by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) using an ELISA immunoassay kit obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Caspases and Quantification of cytokine levels

The analyses of CASP -3, -8, was performed by Caspase Immunoassay to measure CASP in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions (Abcam-Cambridge, MA, USA). Levels of cytokines IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF α , and IL-10 in cell culture were measured using Quantikine Human Kits (Abcam – Cambridge, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed before adding 50 μ L of RD1W (assay diluent) to each well, was added 100 μ L of each standard After, 100 μ L of sample and 1X Control Solution to the appropriate wells. Next 50 μ L of appropriate antibody and was kept in incubation for 3 hours at room temperature (18-25°C). The liquid from each well was aspirated and was added 300 μ L of 1X Wash Buffer into each well. Aspirate the liquid from each well. Next, 100 μ L of substrate solution into each well and incubate in the dark for 12-15 minutes at room temperature. Add 100 μ L of Stop Reagent into each well. Results must be taken immediately after the addition of Stop Reagent, or within one hour, if the microplate is stored at 2-8°C in the dark. Read absorbance of each well on a spectrophotometer using 450 nm.

Gene expression analysis

Gene expression. was evaluated by qRT-PCR assays using messenger RNA (mRNA) obtained from cell culture after 24 hours of contact with the barbatimão. Extraction of RNA was performed using Trizol (Ludwig Biotec – Brazil) according to the manufacturers recommendations. After RNA quantification through a NanoDrop 1000 Spectrophotometer System (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Total RNA (1 μ g) was treated with DNase

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) at 37 °C for 5 min to eliminate DNA contamination. RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using iScript™ Reverse Transcription Supermix for qRT-PCR (Bio-rad – California, USA). The qRT-PCR analysis was conducted with the following reaction conditions: 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 seconds followed by a melt curve of 60–90 °C in 0.5 °C increments for 5 seconds. All qRT-PCR reactions were performed in triplicate, using 1 µM of each primer, 1000 ng/µL of cDNA, RNAase-free water, and 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Germany), in a final volume of 20 µL. The primers used in this study are listed in table 1. *Beta-actin* was used as the housekeeping gene to normalize the gene expression of all samples. Relative expression was calculated using comparative Cytosine-Thymine (CT) and was expressed as fold expression compared to control. The primers analyzed here was: *p53* (Forward) TTGGGTCTTTGAACCCTTGCT and (Reverse) GTGCAGGCCAACTTGTTTCAGT; *Sirtuin 1* (Forward) ACAGGTTGCGGGAATCCAA and (Reverse) TCGTACAGCTTCACAGTCAACTTTG; *Telomerase* (Forward) CCTGTGCTACGGCGACATG and (Reverse) ACCAACAAGAAATCATCCACCA. The primer of *β-actin* gene used as housekeeping was: (Forward) TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA and (Reverse) TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA.

Statistical analysis

The data was first transformed to percentages against a negative control group. All assays were performed in triplicate as independent experiments with at least five repetitions. Statistical analyses were conducted employing GraphPad Prism 5 software. The results of treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey or Dunnet post hoc tests. The results of these analyses were expressed as mean ± standard deviation. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Initially hydroalcoholic aqueous extract of barbatimão used in experiments performed here was chemically characterized and main results are presented in Table 1 showing higher

levels of gallic and caffeic acids. Catechins, quercetin and quercitrin also presented high levels in barbatimão chemical matrix.

Table 1 – Components of *barbatimão* extract.

Compounds	<i>Barbatimão</i>
	mg/g
Gallic acid	12.48 ± 0.05 a
Catechin	5.93 ± 0.01 b
Caffeic acid	8.06 ± 0.02 c
Quercitrin	4.71 ± 0.01 d
Quercetin	8.16 ± 0.04 c
Kaempferol	1.37 ± 0.01 e

In comparison with newer 13th cell culture passage, the HFF1 at 28th cell culture passage (after ± 50 days) presented the following age-phenotype characteristics recognized in senescent fibroblasts (Figure 1): change in the fibroblast morphological pattern, higher mortality rate, decreasing in the proliferative rate and in the levels of two fibroblasts growing factors (FGF and KGF). Therefore, this last cell culture passage was used to test the potential modulatory barbatimão extract effect on fibroblast senescence markers.

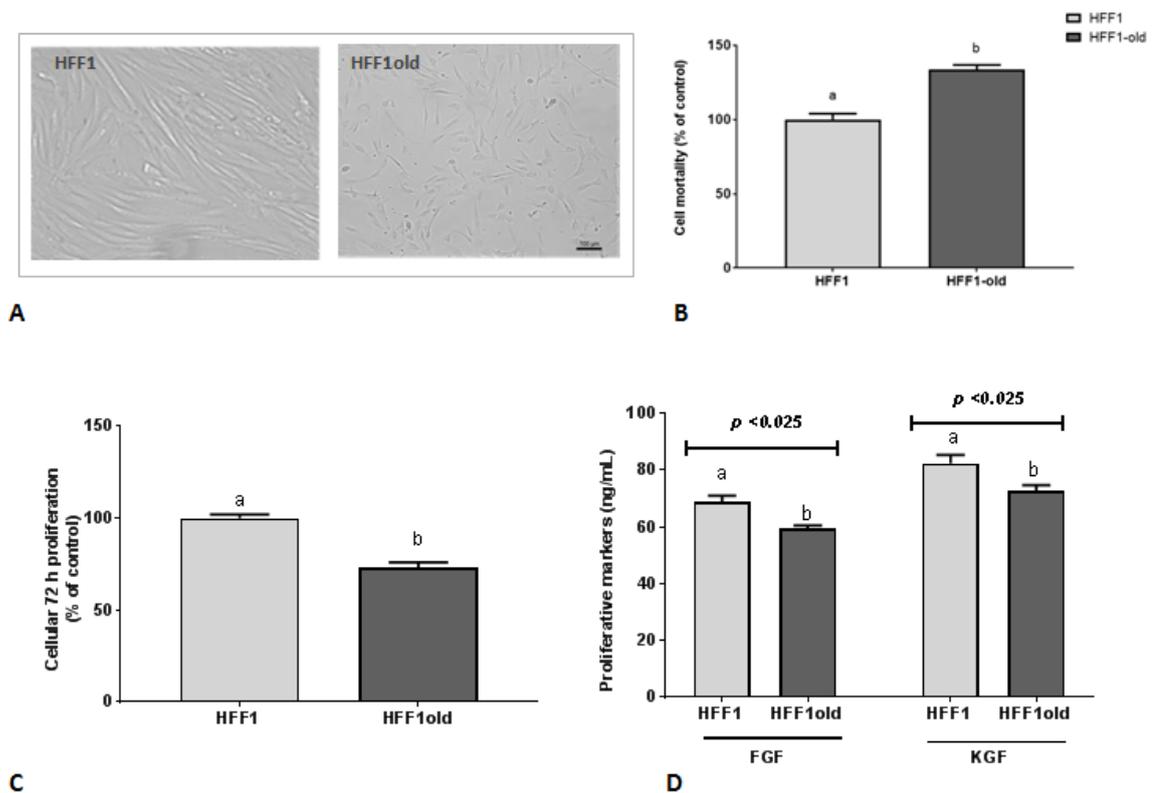


Figure 1: Morphological changes, proliferative and mortality rates on HFF-1 and HFF1-old fibroblasts. (A) Morphological pattern differences between both cultures of newer and old fibroblasts. (B) Cell mortality rates of HFF1-old against the control (newer 13th). (C) Cellular proliferation after 72h on cell culture. (D) Proliferative markers of KGF (Keratinocyte Growth Factor) and FGF (Fibroblast Growth Factor). Data are presented as mean values \pm standard error (SE) and express as percentage of the control value. Different letters indicate statistical differences among control and barbatimão at different concentrations, by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's post hoc test at $p \leq 0.05$.

Barbatimão effects at two therapeutic concentrations on aged-fibroblast proliferative markers was analysed here. Barbatimão did not change proliferative rate of HFF1-old, however HFF1-old barbatimão exposed increased significantly levels of two proliferative biomarkers studied here (FGF and KGF). Barbatimão action on FGF as dose-dependent, whereas similar higher KGF levels were observed in both concentrations tested here (Figure 2A).

During fibroblast senescence process DNA damage levels associated to apoptosis triggering are common events. For this reason, barbatimão effects on DNA oxidation as well as caspases 3 and 8 levels, molecules that participate of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways were also analysed here (Figure 2B). Barbatimão decreased significantly DNA oxidation levels in a dose-dependent way. Caspase 3 levels decreased just in HFF1-old exposed at higher barbatimão concentration (0.99 mg/mL), whereas on caspases 3 barbatimão presented a lowering effect in both concentrations tested here. HFF1-old cultures changed the

cytomorphological pattern when barbatimão-exposed presenting some similarities of fibroblast young-cultures in terms of cellular organization. This cytomorphological effect was similar in both barbatimão concentrations analysed here (Figure 2C).

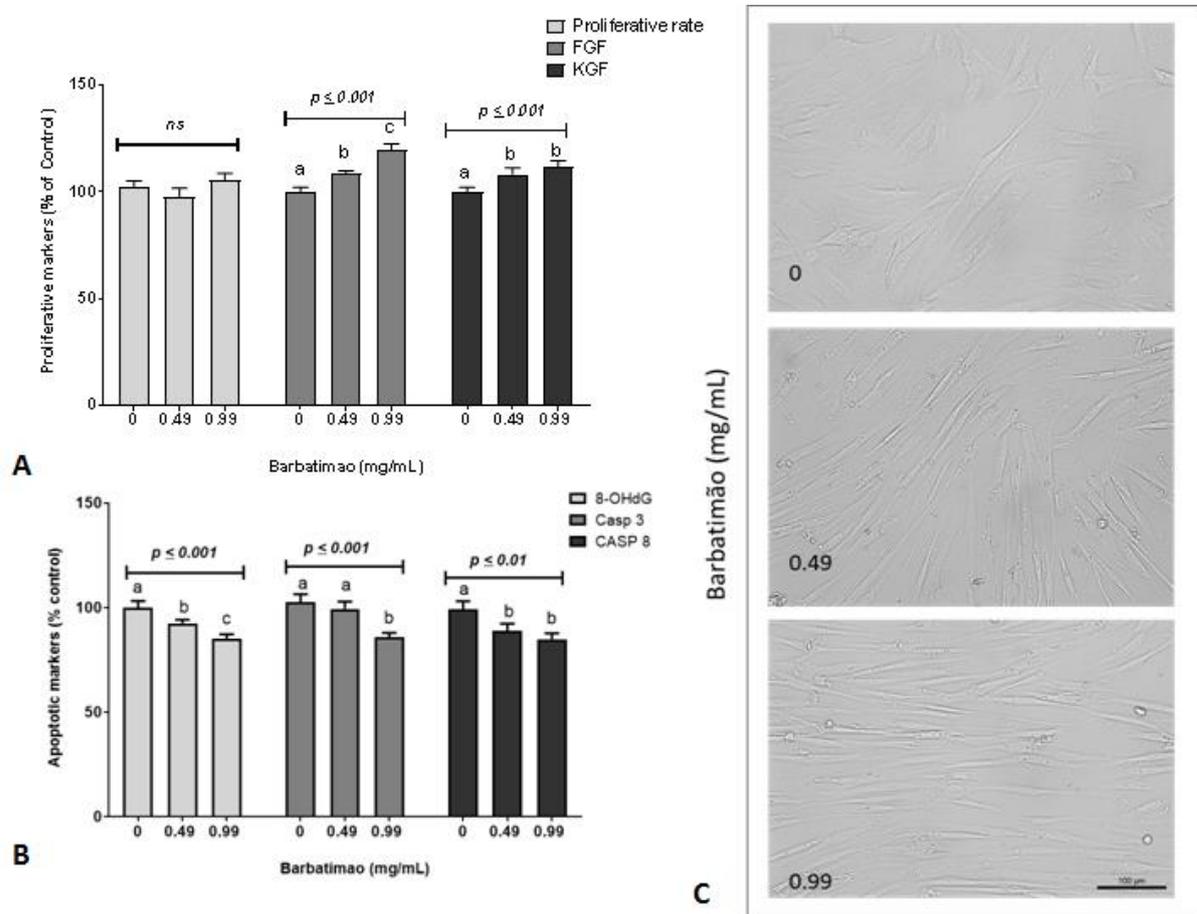


Figure 2: Barbatimão's effect cultures at 0.49 and 0.99 mg/mL concentrations on proliferative markers, apoptotic rates and morphological changes in HFF1-old cells. (A) Barbatimão's extract did not alter significantly the proliferative rates, but improves the proliferative markers KGF and FGF in dose-dependent way. (B) Barbatimão's extract decrease the levels of cellular apoptosis and the levels of apoptotic markers. (C) Morphological pattern changes in HFF1-old cultures are also dose-dependent by barbatimão's extract. Data are presented as mean values \pm standard error (SE) and express as percentage of the control value. Different letters indicate statistical differences among control and barbatimão at different concentrations, by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's post hoc test at $p \leq 0.05$.

Modulatory effect of barbatimão on inflammatory metabolism of HFF1-old was also evaluated (Figure 3A), showing decreasing in the levels of all proinflammatory cytokines (IL-1B, IL-6, TNF- α , IFN- γ) tested here, whereas levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine increased significantly in these cultures. A complementary analysis was performed in order to evaluate potential barbatimão's genomic effect on regulation of three genes that are closely associated to cell cycle and cellular senescence: p53 protein, Sirtuin 1 and telomerase (Figure

3B). Considering non-treated HFF1-old cells as reference, p53 gene was down-regulated in cultures supplemented with barbatimão extract. Sirtuin 1 gene was upregulated just in culture exposed to higher barbatimão concentration tested here (0.99 mg/mL), whereas telomerase gene was upregulated in cultures exposed to both barbatimão concentrations.

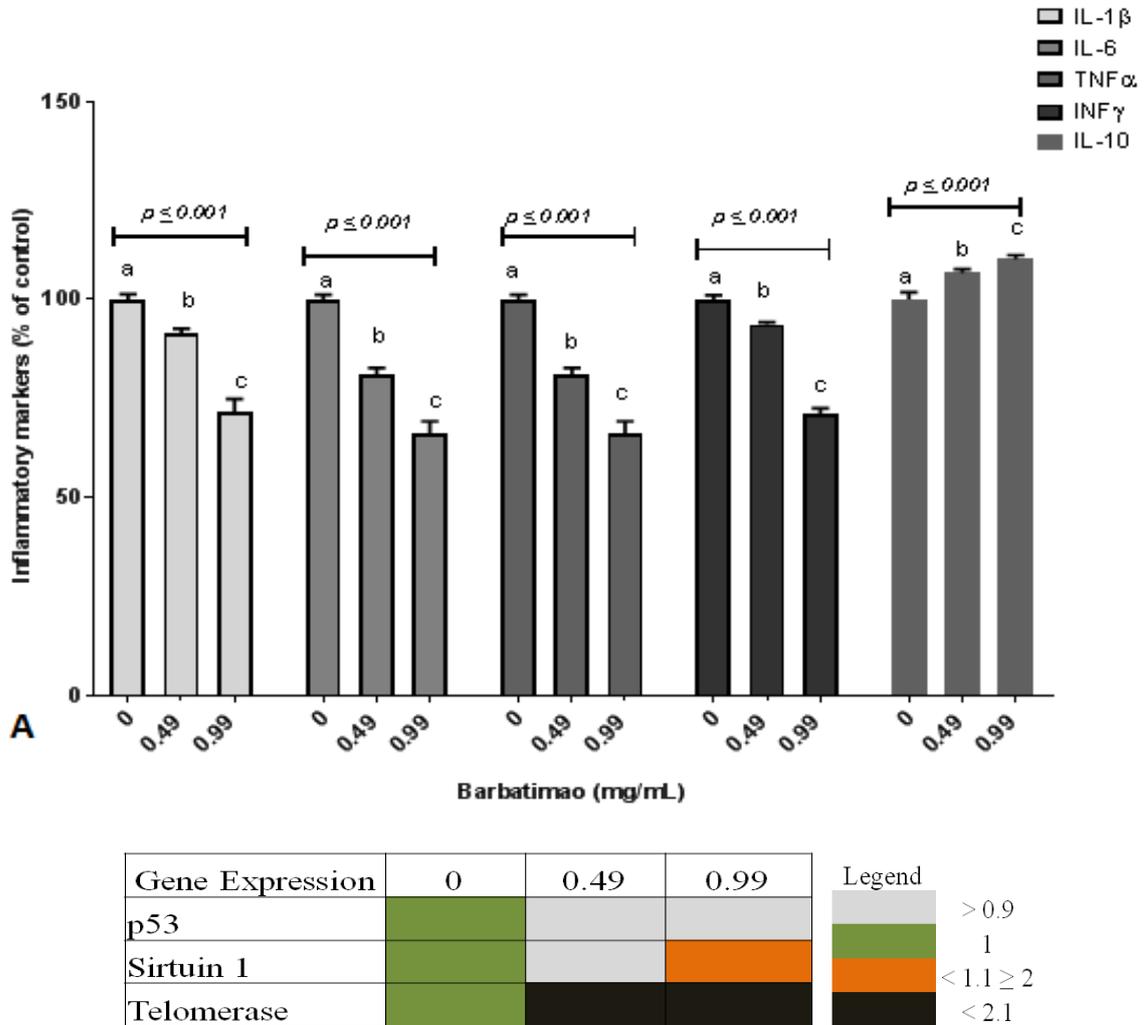


Figure 3: Barbatimão's effect cultures at 0.49 and 0.99 mg/mL concentrations on inflammatory metabolism markers of HFF1-old fibroblasts. (A) Barbatimão's extract decrease all proinflammatory cytokines (IL-1B, IL-6, TNF- α , INF- γ) and increased a anti-inflammatory cytokine marker (IL-10). (B) Barbatimão's extract genomic effect on genes associated to cellular senescence (p53 protein, Sirtuin 1 and telomerase). Data are presented as mean values \pm standard error (SE) and express as percentage of the control value. Different letters indicate statistical differences among control and barbatimão at different concentrations, by ANOVA one-way analyses followed by Tukey's post hoc test at $p \leq 0.05$.

All results found are summary in the figure 4.

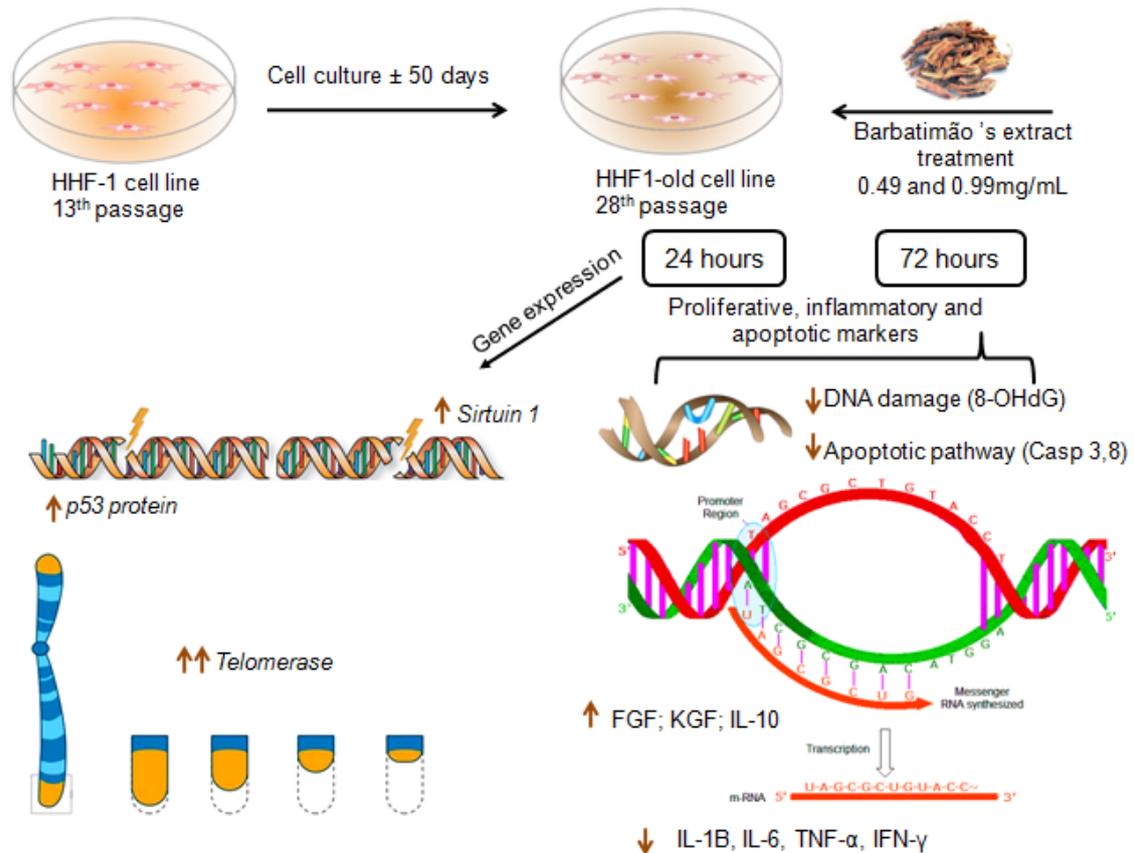


Figure 4: Schematic illustration of the results found in young and old HFF-1 fibroblasts exposed to concentrations of 0.49 and 0.99 mg/mL barbatimão. IL (Interleukin) 1, 6 and 10; TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha); FGF (Fibroblast Growth Factor); KGF (Keratinocyte Growth Factor).

Discussion

Considering that wound healing involves complex processes that some investigation to test if a hydroalcoholic aqueous extract of this plant also could modulate differential non-injured and aged human dermal fibroblast. Despite barbatimão did not alter proliferative rate of old-fibroblast, in general was observed an improvement on cytomorphology and some proliferative, apoptotic, inflammatory and longevity markers. These results could be relevant since frequency of elderly people is increasing in developed and developing countries, and this population trend to present high prevalence of skin dysfunctions and wound-healing impairment [5].

From results obtained here it is relevant to highlight some aspects starting to barbatimão chemical composition that is rich in polyphenols that contributes with its wound healing property. Previous studies have described important effect of catechins [10], gallic

acid [11] and caffeic acid [12]. Moreover, quercetin, a potent flavonoid identified in barbatimão extract is a molecule that currently has received much attention due its antioxidant and anti-inflammatory properties that improves substantially wound healing processes [13,14,15].

However, until moment there are few number of studies evaluating preventive or restoring effects fibroblast senescence. Perhaps the limitation in these studies is related to concept that cellular senescence cannot be stopped [16]. In fact, complete reversal of cell senescence seems not to be possible, but some functional aspects of senescent fibroblasts seem to be partially reversed or even its progression slowed down.

This effect could be modulated by bioactive molecules presented in some wound healing plants. This presumption is based in some prior investigations involving fibroblast aging modulation by chemical compounds found in barbatimão extract. For example, the preventive action of epigallocatechin-3-O-gallate against replicative senescence of human dermal fibroblasts was already described [17]. Prior investigations also described that gallic and caffeic acids are able to modulate fibroblast aging [18,19]. From these results we considered that barbatimão effect on aged-fibroblast could be triggered by interaction of these molecules presented in its chemical matrix.

Barbatimão effect on proliferative pattern of aged-fibroblast showed results apparently conflicting since was not observed increasing in the cellular proliferation, whereas two fibroblast proliferative markers (FGF1 and KGF) presented higher levels in cells treated with this plant extract. One of the great milestones of biogerontology was the Hayflick study that constructed the concept of proliferative senescence from studies with chicken fibroblast cultures. In these terms, cellular senescence was first reported in human fibroblasts as a state of stable *in vitro* growth arrest following extended culture [20]. However, evidence showed that senescent fibroblast changes its cellular cytomorphological pattern and also disrupt the composition and structural organization of the dermal extracellular matrix. This disruption causes loss of fibroblast spreading and mechanical force, which inextricably lead to an "aged" phenotype. Therefore, no-occurrence of increase in cellular proliferation of HFF1-old cells in the presence of barbatimão could be considered just carefully, since other proliferative markers indicates potential modulatory action of barbatimão on aged-fibroblasts.

Actually, evidence showed that FGF1 is a protein that play an important role on regeneration and skin proliferation. This molecule belongs to FGF family that have a broad cellular function, mainly in mitosis, cellular survival activities, morphogenesis, tissue repair, etc. Prior studies suggested that FGF1 could to be included among signalling molecules as a

potential therapeutic or cosmetic agent for skin damaged or wrinkles and other aging alterations [21]. KGF is also a very important molecule to skin function, since is synthesized by several epithelial cells, as well as fibroblast to promote re-epithelization of wounds. Studies have demonstrated that this molecule has a protective effect mainly on mucosal damage induced by irradiation, chemotherapy and graft-versus-host diseases [22].

Furthermore, of increase in the FGF1 and KGF levels of HFF1-old barbatimão-exposed it was observed decreasing in the DNA oxidation, that could trigger apoptosis events and also differential modulation of some important genes senescence-related. In general, evidences have suggested that cellular senescence is accompanied by elevated levels of p53 and p21, decreased telomere length and telomerase activity, increased of oxidative markers and DNA damage [23]. During *in vitro* ageing, the telomeres shorten gradually in each sub-cultivation. Therefore, telomere shortening is considered as primary cause of human fibroblasts senescence, that is associated to decrease in the telomerase gene expression [16]. In these terms, downregulation of p53 protein gene and upregulation of telomerase gene in aged-fibroblast exposed to barbatimão, mainly in the higher concentration tested here reinforce the action of this extract on senescence modulation.

Sirtuin 1 gene was also upregulated in HFF1-old exposed to barbatimão extract. The product of this gene act in the cell via histone deacetylase and/or adenosine diphosphate ribosyltransferase enzymatic activity that target histone and non-histone substrates. Among the substrates that Sirtuin 1 act are transcription regulators, tumor suppressors, structural proteins, DNA repair proteins, cell signalling proteins, transport proteins, and enzymes. Therefore, Sirtuin 1 has crucial role regulating many cellular processes such as cell metabolism, apoptosis, DNA repair, cell cycle and immune response. Due to pleiotropic activity, Sirtuins are considered “longevity proteins”, and their role on dysfunctions and dermatological diseases has been identified in recent years [24]. Moreover, evidence from fibroblasts studies suggested decreasing of Sirtuin levels in aged fibroblasts that could act on the chronological aging processes [25]. As Sirtuin 1 is able to deacetylates p53 in a NAD⁺-dependent manner to inhibit transcription activity of p53 [26], it is possible to infer that upregulation of Sirtuin 1 could be associated to downregulation of p53 gene observed in aged-fibroblasts exposed to barbatimão.

Barbatimão was also able to modulate differentially DNA oxidation and caspases 3 and 8 levels indicating a potential antiapoptotic action on aged-fibroblasts. Most authors consider that senescence and apoptosis constitute types of cellular responses that normally ensure homeostasis, when endogenous or exogenous signals occur [27]. In these terms,

deregulation of these processes is often observed during aging and also various pathologies, including cancer. Furthermore, recent investigations also suggested that, in general postmitotic cells are able to enter a state of senescence without necessarily apoptosis induction. However, it is expected that some aged-cells that accumulating DNA damage undergoing to apoptosis, in order to protect the organism against pathological events, specially cancer [28,29]. That way, decreasing in the DNA oxidation and caspases also suggested a protective effect of barbatimão against apoptosis associated to cellular aging processes.

The modulation of protein and gene products associated to some restoring of non-senescent patterns in the HFF-1 cells was followed by changes in the fibroblast morphology and its disposition on extracellular matrix in 72h cell cultures. In this case, there is a clear alteration of cell culture where fibroblast presented a fusiform pattern with more organized distribution than HFF1-old cultures obtained without barbatimão supplementation. Therefore, these results corroborate with proliferative markers studied here.

Finally, it is important to point out some considerations about barbatimão effect on inflammatory cytokines produced by aged-fibroblasts. In fact, senescent fibroblasts present a well-known pro-inflammatory secretory response. In dermal tissue, increasing in the DNA damage can help to induce production of pro-inflammatory cytokines by aged-fibroblast. In its turn, elevated levels of these cytokines can attract and activate immune cells collaborating to promote “inflammatory states” that also have influence on mesenchymal stem-cells that are responsible to regenerate this tissue [30]. In the present investigation, the levels of proinflammatory cytokine 1 of HFF1-old cells dropped when cultures were supplemented with barbatimão. At contrary, IL-10 levels increased corroborating with previous studies that reported anti-inflammatory effect of this plant [7].

In summary, despite methodological constrains associated to *in vitro* studies, results described here suggested that barbatimão extract could modulate some senescence parameters of dermal aged-fibroblasts. These results could be considered relevant to understand the causal mechanisms associated with some plant extracts that has beneficial action on kin aging. Moreover, results open the possibility to developing products based in the barbatimão extract to use in the restoring of some functions that are found mainly in young fibroblasts.

Author Contribution

Conceived and designed the experiments: MHM, NLP, IBMC and FB. Performed the experiments: MHM, NLP, FB, CFT, VFA, MMMFD, JRS and BS. Analyzed the data: MHM, IBMC, NLP and FB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MMMFD, IBMC, JRS and EER. Contributed to the writing of the manuscript: MHM, NLP, IBMC and FB.

Acknowledgement

The authors thank all Lab Biogenomic researchers who gave technical support to performance of *in vitro* assays.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Blume-Peytavi U, Kottner J, Sterry W *et al.* Age-Associated Skin Conditions and Diseases: Current Perspectives and Future Options. [Internet]. *Gerontologist* 2016; **56 Suppl 2**: S230-42.
2. Toutfaire M, Bauwens E, Debacq-Chainiaux F. The impact of cellular senescence in skin ageing: A notion of mosaic and therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol* 2017; **142**: 1–12.
3. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E *et al.* The hallmarks of fibroblast ageing. *MechAgeingDev* 2014; **138**: 26–44.
4. Darby I A, Laverdet B, Bonté F *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014; **7**: 301–311.
5. Das U, Behera S S, Pramanik K. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. *Phyther Res* 2017; **31**: 579–590.
6. Ricardo L M, Dias B M, Mügge F L B *et al.* Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: The case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. *J Ethnopharmacol* 2018; **219**: 319–336.

7. Souza-Moreira T M, Queiroz-Fernandes G M, Pietro R C L R. Stryphnodendron Species Known as "Barbatimão": A Comprehensive Report. *Molecules*. 2018; **23(4)**: 910–935.
8. Pellenz N L, Barbisan F, Azzolin V F *et al.* The healing activity of Stryphnodendron adstringens (Mar.), a Brazilian tannin-richest species: review of literature and series case
9. Barbisan F, Azzolin V F, Teixeira C F *et al.* Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro. *Biomed Res Int* 2017: **2017**.
10. Li M, Xu J, Shi T *et al.* Epigallocatechin-3-gallate augments therapeutic effects of mesenchymal stem cells in skin wound healing [Internet]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; **43**: 1115–1124.
11. Yang D J, Moh S H, Son D H *et al.* Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. *Molecules* 2016: **21**.
12. Song H S, Park T W, Sohn U D *et al.* The effect of caffeic acid on wound healing in skin-incised mice. *Korean J Physiol Pharmacol* 2008; **12**: 343–347.
13. Doersch K M, Newell-Rogers M K. The impact of quercetin on wound healing relates to changes in α V and β 1 integrin expression. *Exp Biol Med* 2017; **242**: 1424–1431.
14. Jangde R, Srivastava S, Singh M R, *et al.* In vitro and In vivo characterization of quercetin loaded multiphase hydrogel for wound healing application. *Int J Biol Macromol*. 2018; **115**: 1211–1217.
15. Yin G, Wang Z, Wang Z, Wang X. Topical application of quercetin improves wound healing in pressure ulcer lesions. *Exp Dermatol*. 2018: **2018**.
16. Magalhães J P de, Passos J F. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev* 2018; **170**: 2–9.
17. Han D W, Lee M H, Kim B *et al.* Preventive effects of epigallocatechin-3-O-gallate against replicative senescence associated with p53 acetylation in human dermal fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev* 2012: **2012**.
18. Hwang E, Park S Y, Lee H J *et al.* Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. *Phyther Res* 2014; **28**: 1778–1788.
19. Lim H, Park B K, Shin S Y *et al.* Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation. *Arch Pharm Res* 2017; **40**: 524–535.

20. Hayflick L, Moorhead P S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; **25**: 585–621.
21. An J J, Eum W S, Kwon H S *et al.* Protective effects of skin permeable epidermal and fibroblast growth factor against ultraviolet-induced skin damage and human skin wrinkles. *J Cosmet Dermatol* 2013; **12**: 287–295.
22. Yen T T, Thao D T, Thuoc T L. An overview on keratinocyte growth factor: from the molecular properties to clinical applications. 2014; **21(3)**: 306–317.
23. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E *et al.* Downregulation of methyltransferase Dnmt2 results in condition-dependent telomere shortening and senescence or apoptosis in mouse fibroblasts. *J Cell Physiol* 2017; **232**: 3714–3726.
24. Serravallo M, Jagdeo J, Glick S A *et al.* Sirtuins in dermatology: Applications for future research and therapeutics. *Arch Dermatol Res* 2013; **305**: 269–282.
25. Garcia-Peterson L M, Ndiaye M A, Singh C K, *et al.* SIRT6 histone deacetylase functions as a potential oncogene in human melanoma. *Genes & Cancer*. 2017; **8(9-10)**: 701–712.
26. Ong A L C, Ramasamy T S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. *Ageing Res Rev* 2018; **43**: 64–80.
27. Aliper A M, Csoka A B, Buzdin A *et al.* Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)* 2015; **7**: 26–37.
28. Chu Y L, Xu Y R, Yang W X *et al.* The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia. *Aging (Albany NY)* 2018; **10**: 305–321.
29. Sapienza P, Mallette F A. Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. *Trends Cell Biol.* 2018; **2018**.
30. Burton D G A, Faragher R G A. Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. *Age (Omaha)* 2015; **37**: 1–19.

6 DISCUSSÃO

Considerando que a cicatrização de feridas envolve processos complexos algumas investigações surgem para testar se o extrato aquoso hidroalcoólico do barbatimão é capaz de modular também, de modo diferenciado a células com injúria, os processos de senescência de fibroblastos dérmicos. Apesar de o barbatimão não alterar a taxa proliferativa de fibroblastos senescentes, foi observada uma melhora na citomorfologia e em alguns marcadores proliferativos, apoptóticos, inflamatórios e de longevidade. Esses resultados podem ser relevantes, uma vez que a frequência de idosos está aumentando nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, e essa parcela populacional apresenta alta prevalência de disfunções da pele e comprometimento da cicatrização (DAS *et al.*, 2017).

A partir dos resultados obtidos aqui é relevante destacar alguns aspectos relacionados a composição química do barbatimão, rica em polifenóis, que contribuem para sua propriedade cicatrizante. Estudos anteriores já descreveram o importante efeito de catequinas (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2018), do ácido gálico (YANG *et al.*, 2016) e do ácido cafeico (SONG *et al.*, 2008), compostos também encontrados no barbatimão. Além disso, a quercetina, um potente flavonóide, é uma molécula que atualmente tem recebido muita atenção devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que melhoram substancialmente os processos de cicatrização de feridas (DOERSCH e NEWELL-ROGERS, 2017; JANGDE *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2018).

No entanto, até o momento, há poucos estudos avaliando os efeitos preventivos ou restauradores da senescência dos fibroblastos. Talvez as limitações nesses estudos estejam relacionadas ao conceito de que a senescência celular não pode ser interrompida (CRUZ, 2014; MAGALHÃES e PASSOS, 2018). De fato, a reversão completa da senescência celular parece não ser possível, mas alguns aspectos funcionais dos fibroblastos senescentes parecem ser parcialmente revertidos ou mesmo desacelerados.

Este efeito pode ser modulado por moléculas bioativas presentes em algumas plantas cicatrizantes. Esta ideia baseia-se em algumas investigações prévias envolvendo a modulação do envelhecimento de fibroblastos por compostos químicos encontrados no extrato de barbatimão. Por exemplo, a ação preventiva da epigallocatequina-3-O-galato contra a senescência replicativa de fibroblastos dérmicos humanos já foi descrita (HAN *et al.*, 2012). Investigações anteriores também descreveram que os ácidos gálico e cafeico são capazes de modular o envelhecimento dos fibroblastos (HWANG *et al.*, 2014; LIM *et al.*, 2017). A partir

desses resultados, considerou-se que o efeito do barbatimão no fibroblasto senescente poderia ser desencadeado pela interação dessas moléculas apresentadas em sua matriz química.

O efeito de barbatimão no padrão proliferativo de fibroblastos envelhecidos mostrou resultados aparentemente conflitantes, uma vez que não foi observado aumento na proliferação celular, enquanto dois marcadores proliferativos (FGF1 e KGF) apresentaram níveis mais elevados em células tratadas com o extrato da planta. Um dos grandes marcos da biogerontologia foi o estudo de *Hayflick*, que construiu o conceito de senescência proliferativa a partir de estudos com culturas de fibroblastos de galinha. Nestes termos, a senescência celular foi relatada pela primeira vez em fibroblastos humanos como um estado estável de paragem de crescimento *in vitro* após cultura prolongada (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961). Entretanto, evidências mostraram que o fibroblasto senescente altera seu padrão citomorfológico e também rompe a composição e organização estrutural da MEC dérmica. Esta ruptura provoca a perda e dispersão de fibroblastos, além da força mecânica, o que leva a um fenótipo "envelhecido". Portanto, a não ocorrência de aumento na proliferação celular de células velhas de HFF1 (HFF1-old) na presença de barbatimão pode ser aceita, uma vez que outros marcadores proliferativos indicam potencial ação modulatória do barbatimão nos fibroblastos envelhecidos.

Na verdade, evidências mostraram que o FGF1 é uma proteína que desempenha um papel importante na regeneração e proliferação da pele. Esta molécula pertence à família FGF que possui ampla função celular, principalmente na mitose, atividades de sobrevivência celular, morfogênese, reparo tecidual, entre outras. Estudos anteriores sugeriram que o FGF1 poderia ser incluído entre moléculas sinalizadoras como um potencial agente terapêutico ou cosmético para a pele danificada ou ainda com rugas e outras alterações do envelhecimento (AN *et al.*, 2013). O KGF é também uma molécula muito importante para a função da pele, uma vez que é sintetizada por várias células epiteliais, bem como fibroblastos para promover a reepitelização de feridas. Estudos demonstraram que esta molécula tem um efeito protetor principalmente no dano da mucosa induzida por irradiação, quimioterapia e doenças do enxerto contra o hospedeiro (YEN *et al.*, 2014).

Além do aumento nos níveis de FGF1 e KGF de HFF1-old expostos ao barbatimão, observou-se decréscimo na oxidação do DNA, que poderia desencadear eventos de apoptose e também modulação diferencial de alguns genes importantes relacionados à senescência. Em geral, evidências sugerem que a senescência celular é acompanhada por níveis elevados de p53 e p21, diminuição do comprimento dos telômeros e atividade da telomerase, aumento de marcadores oxidativos e danos no DNA (RANG e DALE, 2012; LEWINSKA *et al.*, 2017).

Durante o envelhecimento *in vitro*, os telômeros encurtam gradualmente em cada sub cultura (denominado repique celular). Portanto, o encurtamento dos telômeros é considerado como causa primária da senescência dos fibroblastos humanos, que está associada à diminuição da expressão gênica da telomerase (MAGALHÃES e PASSOS, 2018). Nestes termos, a regulação negativa do gene da proteína p53 e o aumento da expressão do gene da telomerase em fibroblastos envelhecidos expostos ao barbatimão, principalmente na maior concentração testada, reforçam a ação deste extrato na modulação da senescência.

O gene da Sir1 também foi suprarregulado em HFF1-old expostos ao extrato de barbatimão. O produto deste gene atua na célula através da atividade enzimática da histona desacetilase e/ou da adenosina difosfato ribosiltransferase que tem como alvo substratos de histonas e não histonas. Entre os substratos que a Sir1 atua estão reguladores de transcrição, supressores de tumor, proteínas estruturais, proteínas de reparo de DNA, proteínas de sinalização celular, proteínas de transporte e enzimas. Portanto, a Sir1 tem papel crucial na regulação de muitos processos celulares, como metabolismo celular, apoptose, reparo de DNA, ciclo celular e resposta imune. Devido à atividade pleiotrópica, as sirtuínas são considerados “proteínas da longevidade”, e seu papel nas disfunções e doenças dermatológicas tem sido identificado nos últimos anos (SERRAVALLO *et al.*, 2013; GOYARTS *et al.*, 2017). Além disso, evidências de estudos com fibroblastos sugeriram diminuição dos níveis de sirtuína em fibroblastos envelhecidos que poderiam influenciar nos processos de envelhecimento cronológico (GARCIA-PETERSON *et al.*, 2017). Como a Sir1 é capaz de desacetilar a p53 de maneira dependente de NAD⁺ (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) para inibir a atividade de transcrição da p53 (ONG e RAMASAMY, 2018), é possível inferir que a regulação positiva da Sir1 poderia estar associada à regulação negativa do gene p53 observado em fibroblastos expostos ao barbatimão.

O barbatimão também foi capaz de modular diferencialmente a oxidação do DNA e os níveis das caspases 3 e 8, indicando uma potencial ação antiapoptótica nos fibroblastos envelhecidos. A maioria dos autores considera que a senescência e a apoptose constituem tipos de respostas celulares que normalmente asseguram a homeostase, quando ocorrem sinais endógenos ou exógenos (ALIPER *et al.*, 2015). Nestes termos, a desregulação destes processos é frequentemente observada durante o envelhecimento e também várias patologias, incluindo o câncer. Além disso, investigações recentes também sugeriram que, em geral, as células pós-mitóticas são capazes de entrar em um estado de senescência sem necessariamente a indução de apoptose. No entanto, espera-se que algumas células envelhecidas que acumulam danos no DNA sofram apoptose com a finalidade de proteger o organismo contra

eventos patológicos, especialmente câncer (CHU *et al.*, 2018; SAPIEHA e MALLETT, 2018). Dessa forma, diminuindo a oxidação do DNA e as caspases também se sugere um efeito protetor do barbatimão contra a apoptose associada aos processos de envelhecimento celular.

A modulação de proteínas e produtos gênicos associados a alguma restauração de padrões não senescentes nas células HFF-1 foi seguida por mudanças na morfologia dos fibroblastos e sua disposição na matriz extracelular em culturas de 72h. Neste caso, há uma clara alteração na cultura de células em que os fibroblastos apresentam um padrão fusiforme com distribuição mais organizada do que as culturas de HFF-1 obtidas sem suplementação com barbatimão. Portanto, esses resultados corroboram com os marcadores proliferativos aqui estudados.

Por fim, é de valia ressaltar algumas informações acerca do efeito do barbatimão sobre as citocinas inflamatórias produzidas pelos fibroblastos senescentes. De fato, essas células em questão apresentam uma resposta secretora pró-inflamatória bem conhecida. No tecido dérmico, o aumento do dano ao DNA pode ajudar a induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo fibroblasto senescente e, como consequência, níveis elevados dessas citocinas podem atrair e ativar as células imunológicas, colaborando para promover “estados inflamatórios” que também influenciam as células-tronco mesenquimais responsáveis pela regeneração desse tecido (BURTON e FARAGHER, 2015). Na presente investigação, os níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 β de células HFF1-old diminuíram quando as culturas foram suplementadas com barbatimão. Pelo contrário, os níveis de IL-10 aumentaram, corroborando com estudos anteriores que relataram efeito anti-inflamatório desta planta (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2018).

De fato, embora a resposta do barbatimão não tenha contemplado todos os marcadores aqui utilizados (quando considerada a questão da taxa proliferativa) é de conhecimento que a modulação por outras vias celulares, como pelo KGF e FGF, é capaz de produzir efeitos sobre todos os pontos avaliados em fibroblastos senescentes deste estudo. Ainda, dada a diversidade de modulações metabólicas ocasionadas pela exposição ao extrato aquoso dessa planta, como a nível inflamatório e de dano ao DNA, a possibilidade de efeitos positivos restauradores em outras células senescentes pode ser interessante para o estudo do envelhecimento ao nível tecidual.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos a partir desse estudo nossas conclusões são que:

- A linhagem celular de fibroblastos humanos HFF-1 obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro apresentava morfologia normal quando comparada a fibroblastos jovens em cultivos *in vitro*, bem como apresentava características citofuncionais associadas a taxa de proliferação e produção de fatores de crescimento semelhantes a outros resultados verificados na literatura, vindo a ser considerada envelhecida (HFF1-old) a partir de alterações morfológicas visíveis ao microscópico ótico condizentes com processo visuais de modificações celulares já conhecidas;

- O extrato hidroalcoólico de barbatimão utilizado nas concentrações de 0,49 mg/mL e 0,99 mg/mL afeta a taxa de proliferação celular de modo diferenciado, uma vez que foi mostrado uma maior incidência de replicação celular nos fibroblastos senescentes expostos a maior concentração, enquanto a menor teve diagnóstico menor que o grupo do controle negativo (CN);

- O extrato hidroalcoólico de barbatimão influencia positivamente a produção de fatores de diferenciação, crescimento e proliferação celular, como foi mostrado nos resultado para KGF e FGF de HFF1-senescentes de modo dose-dependente, sendo assim, a maior concentração utilizada tendeu a estimular melhor as células expostas;

- Uma vez avaliado os danos ao DNA e os marcadores apoptóticos, seguiu-se verificando a eficiência do barbatimão de modo dose-dependente ao atuar reduzindo a expressão do marcador de dano e das caspases pró-apoptóticas;

- Quanto à morfologia, quando comparadas ao controle negativo, as células apresentaram maior afinamento e comprimento. O espraiamento é característico de fibroblastos jovens uma vez que possibilita maior interação tecidual. Esse processo foi visualizado na concentração de 0,49 mg/mL, porém foi mais intenso na maior concentração onde ainda se verificou uma maior organização tecidual, confirmando que o barbatimão também estimula a estruturação do tecido;

- Para os marcadores de inflamação, foi relatada redução de todos os fatores pró-inflamatórios de modo dose-dependente, sugerindo que o extrato do barbatimão também atuaria modulando a produção de citocinas, visto que o fator anti-inflamatório sofreu *upregulation* também em modo dose-dependente;

- A expressão dos genes relacionados a senescência celular confirmou a capacidade do barbatimão em atuar diretamente como modulador da senescência replicativa dos fibroblastos

humanos. Dado o fato de que o gene da telomerase e SIR1 sofreram upregulation em ambas as concentrações e o gene p53 teve aumento mediano quando comparados ao controle negativo;

O conjunto dos resultados sugere que a ação do barbatimão pode ser direta ou indireta quando avaliada do ponto de vista da senescência biológica, considerada a característica do extrato em modular não apenas as vias gênicas associadas à senescência, mas fatores influentes no processo de envelhecimento como o quadro de inflamação celular. Assim, embora apenas uma das concentrações não tenha se mostrado positiva atuando na proliferação celular, todos os resultados foram benéficos uma vez que atuaram aumentando a eficiência celular. Apesar das limitações metodológicas associadas a estudos *in vitro*, nossos resultados podem ser considerados relevantes, uma vez que demonstraram ação desaceleradora do barbatimão no processo de senescência celular em fibroblastos humanos, sendo estes resultados interessantes para a prática clínica e estética.

Uma vez que a pele envelhecida apresenta maior número de células em senescência tendo assim maior probabilidade de rompimento ocasionando o aparecimento de lesões de pele, um grave problema de saúde principalmente entre idosos. Outra questão é estética relacionada à aparência, uma vez que o barbatimão parece ter efeito pró fibroblastos, então esta molécula poderia potencialmente ser utilizada para o desenvolvimento de compostos a serem utilizados para fins estéticos. Mais estudos precisam ser realizados para comprovação dos resultados aqui apresentados, a níveis de organismo, incluindo toda a fisiologia.

REFERÊNCIAS

ABREU, D.R.O.M. *et al.* Fatores associados à recorrência de quedas em uma coorte de idosos. **Cien. Saude Colet.**, v.21, p.3439-3446, 2016.

ADAMS, D. H. *et al.* Native Australian plant extracts differentially induce Collagen I and Collagen III in vitro and could be important targets for the development of new wound healing therapies. **Fitoterapia**, v.109, p.45-51, 2016.

ALIPER, A. M. *et al.* Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. **Aging, Albany (NY)**, v. 7(1), p. 26-37, 2015.

ALMEIDA, A. J. P. O. **ENVELHECIMENTO: ASPECTOS MOLECULARES E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2017.

AN, J.J.*et al.* Protective effects of skin permeable epidermal and fibroblast growth factor against ultraviolet-induced skin damage and human skin wrinkles. **J CosmetDermatol.**, v. 12, p. 287–295, 2013.

ARKING, R. **Biologia do envelhecimento**. 2a ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2008.

ATCC. **The Global Bioresource Center**. Disponível em:<<http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 04 abr., 2018.

BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133-152, 2015.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63- 72, 2004.

BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do metotrexato na resposta citotóxica de células mononucleares periféricas do sangue**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

BARBISAN, F. *et al.* Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. **PlosOne**, v. 9, p. e107299, 2014.

BARBISAN, F. **A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR FATORES GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDO IN VITRO**. Tese (Doutorado e Farmacologia). 2017. 201 pgn. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 2017.

BARBON, F. J.; WIETHOLTER P.; FLORES, R.A. Alterações celulares no envelhecimento humano. **J Oral Invest**, v.5, n.1, p. 61-65, 2016.

BARROS, E. J. L. *et al.* Ações ecossistêmicas e gerontotecnológicas no cuidado

de enfermagem complexo ao idoso estomizado. **Rev Bras Enferm.**, v. 67(1), p. 91-6, 2014.

BEARD, J. R. *et al.* The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **The Lancet**, v. 387(10033), p. 2145-2154, 2016.

BENGTSON, V. *et al.* Global Aging and Challenges to Families. New York: **Routledge**, p. 1-24, (2003).

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.224(3), p. 241–248, 2007.

BLANDER, G. *et al.* SIRT1 Promotes Differentiation of Normal Human Keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p.41–49, 2009.

BOILY, G. *et al.* SirT1 Regulates Energy Metabolism and Response to Caloric Restriction in Mice. **Plos One.**, v. 3(3), 2008.

BRASH, D. E. *et al.* Colonization of adjacent stem cell compartments by mutant keratinocytes. **Seminars in Cancer Biology**, v.15, p.97–102, 2005.

BURTON, D.G.A.; FARAGHER, R.G.A. Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. **Age (Omaha)**, v. 37, p. 1–19, 2015.

CALOY, L. **Necessidades da atuação da fisioterapia dermatofuncional em uma instituição de longa permanência de idosos.** 47 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia Biomédica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CAMARANO, A. A.; PASINATO, M. T. Envelhecimento, pobreza e proteção social na América Latina. Rio de Janeiro: **Ipea**, 2007.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.

CÁRCANO, FM. **Study of clinico pathological associations with molecular and genetic alterations in testicular germ cell tumors.** Thesis (Doctorate's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital, 2016.

CARVALHO, L. F. P. **Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose pélvica.** (Dissertação de Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2012.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. **Nature reviews Endocrinology**, v. 8(5), p.287-96. 2012.

CHANDRA, J. *et al.* Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 29 (3-4), p. 323-333, 2000.

CHU, Y.W. *et al.* The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia. **Aging (Albany NY)**, v. 10, p. 305–321, 2018.

CLARK, R. A. F. *et al.* Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **J Invest Dermatol.**, v. 127, n. 5, p. 1018-1029, 2007.

CRUZ, I. B. M. Genetics of aging and its impact on human longevity: theories and evidences that helps to prevent age-associated diseases. **Pan American Journal of Aging Research.** v. 2(1), p. 3-14, 2014.

CRUZ, I. B. M.; SCHWANKE, C. H. A. Reflexões sobre biogerontologia como uma ciência generalista, integrativa e interativa. **Estud. Interdiscip. envelhec.**, Porto Alegre, v.3, p.7-36, 2001.

CUNHA, G. L. Mecanismos Biológicos do Envelhecimento. **Tratado de geriatria e gerontologia**/Elizabete Viana de Freitas ... [et al.]. - 3.ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2013.

DAS, U.; BEHERA, S.S.; PRAMANIK, K. Ethno-Herbal-Medico in WoundRepair: AnIncisive Review. **Phyther Res**, v. 31, p. 579–590, 2017.

DEBEER, S. *et al.* Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. **Eur J Dermatol.**, v. 23(4), p. 456-466, 2013.

DESCHÊNES, M.; CHABOT, B. The emerging role of alternative splicing in senescence and aging. **Aging Cell**, v.16, p. 918–33, 2017.

DIMRI, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 92(20), p. 9363-9367, 1995.

DOERSCH, K.M.; NEWELL-ROGERS, M.K. The impact of quercetin on wound healing relates to changes in αV and $\beta 1$ integrin expression. **Exp Biol Med**, v.242, p. 1424–1431, 2017.

DONADUSSI, M. **Revisão sistemática da literatura sobre a efetividade clínica do plasma rico em plaquetas para o tratamento dermatológico estético.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DONMEZ, G. *et al.* SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. **Cell.**, v.142(2), p.320-32, 2010.

DONMEZ, G. *et al.* SIRT1 protects against alpha-synuclein aggregation by activating molecular chaperones. **J Neurosci.**, v.32(1), p.124-32, 2012.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas** – [6 Ed.] - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DREAMSTIME ILLUSTRATION. **Human skin structure.** Disponível em: <www.dreamstime.com/stock-illustration-human-skin-structure-hair-cross-section-anatomy-diagram-image83813234> Acesso em: 04 abr., 2018.

ELLER, M. S. Induction of apoptosis by telomere 3' overhang-specific DNA. **Exp. Cell Res.**, v. 276, p. 185–193, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FEIO, A.; OLIVEIRA, C. C. Confluências e divergências conceituais em educação em saúde. **Saúde soc.**, v. 24(2), p. 703-715, São Paulo, 2015.

FERRER, D. M. P. *et al.* Contribuição dos telômeros e da telomerase no surgimento de neoplasias e no processo de envelhecimento. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde**, v. 4(2), p. 89-99, 2017.

FORD, E. *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. **Genes & development.**, v. 20(9), p. 1075-80, 2006.

FREITAS, A. L. D. *et al.* Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against fluconazole-resistant *Candida* spp. and treat vaginal candidiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 184-190, 2018.

FUNK, W.D. *et al.* Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. **Exp. Cell Res.**, v.258, p.270–278, 2000.

GAO, K. *et al.* Can Genomic Amplification of human telomerase gene and C-MYC in Liquid-Based Cytological Specimens be use as a method for opportunistic cervical cancer screening? **Gynecol Obstet Invest**, v.80, p.153-163, 2015.

GARCIA-PETERSON, L.M.*et al.* SIRT6 histone deacetylase functions as a potential oncogene in human melanoma. **Genes & Cancer.**, v. 8(9-10), p. 701–712,2017.

GROB, A. *et al.* Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. **J Cell Sci.**, v.122(4), p.489-98, 2009.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Transact.**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3 ed. Rev. ampl., São Paulo: Senac, 2009.

HAN, D. W.*et al.* Preventive effects of epigallocatechin-3-O-gallate against replicative senescence associated with p53 acetylation in human dermal fibroblasts. **Oxid Med Cell Longev**, 2012.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res.**, v. 25, p. 585–621, 1961.

HEIDENREICH, B.; KUMAR, R. TERT promoter mutations in telomere biology. **Mutation Research**, v.771, p. 15-31, 2017.

- HERNANDES, L. *et al.* Wound healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 431- 436, 2010.
- HOWITZ, K.T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature.**, v. 425(6954), p.191-6, 2003.
- HUANG, J. *et al.* DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. **Ageing Res Rev.**, v. 24(Pt A), p. 3-16, 2015.
- HWANG, E.*et al.* Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. **Phyther Res.**, v.28, p. 1778–1788, 2014.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Envelhecimento da população.** 2017. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao.html> > Acesso em: 14 mar., 2018.
- JANGDE, R. *et al.* In vitro and In vivo characterization of quercetin loaded multiphase hydrogel for wound healing application. **Int J Biol Macromol.**, v. 115, p. 1211–1217, 2018.
- JENKINS, G. Mechanisms of Ageing and Development. **Mech Ageing Dev.**, v. 123(7), p. 801-810, 2002.
- JERONIMO, M. C. **Caracterização química, físico-química, atividade antioxidante e avaliação dos efeitos citotóxicos da pitaia-vermelha [*hylocereusUndatus* (haw.) Britton & rose] cultivada no Brasil.** Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília. Brasília, 2016.
- JI-SEON, L. Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirtuin 1 (Sirt1) in skin tissue. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 1060–1066, 2010.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** – [12. Ed]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Res Rev.**, v. 21, p. 16-29, 2015.
- KANFI, Y. *et al.* The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. **Nature.**, v. 483 (7388), p. 218-21, 2012.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology, **Facial Plast Surg Clin North Am.**, v. 19(2), p. 229-234, 2011.
- KIM, H. S. *et al.* SIRT2 Maintains Genome Integrity and Suppresses Tumorigenesis through Regulating APC/C Activity. **Cancer Cell**, v.20(4), p.487-99, 2011.
- KOSMADAKI, M. G.; GILCHREST, B. A. The role of telomeres in skin aging/photoaging. **Micron**, v.35, p. 155–159, 2004.

KOTOLENA Innovative Skincare. **Bio Platform**. Disponível em <<http://kotolena.com/bio/>> Acesso em: 04 abr., 2018.

LeBLANC, K. *et al.* Skin tears: state of the science: consensus statements for the prevention, prediction, assessment, and treatment of skin tears. **Adv Skin Wound Care**, v. 24(9), p. 2-15, 2011.

LEMOS, C.A.R.C. **Aspectos estruturais e funcionais do complexo telômero/telomerase**. 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

LEONARDI, I. *et al.* CX3CR1+ mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. **Science**, v. 359(6372), p. 232-236, 2018.

LEVINE, A. J., BERGER, S.L. The interplay between epigenetic changes and the p53 protein in stem cells. **Genes Dev.**, v. 31(12), p. 1195-1201, 2017.

LEWINSKA, A. *et al.* Downregulation of methyltransferase Dnmt2 results in condition-dependent telomere shortening and senescence or apoptosis in mouse fibroblasts. **J Cell Physiol.**, v.232, p. 3714–3726, 2017.

LI, G. Z. Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.100, p.527–531, 2003.

LI, S. *et al.* Prospective randomized controlled study of a Chinese herbal medicine compound TangzuYuyang Ointment for chronic diabetic foot ulcers: A preliminary report. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 543-550, 2011.

LIBERTINI, G.; FERRARA, N. Possible interventions to modify aging. **Biochemistry**, Moscow, v. 81, n. 12, pp. 1413- 1428, 2016.

LIM, C.S. SIRT1: Tumor promoter or tumor suppressor? **Med Hypotheses.**, v.67(2), p.41-4, 2006.

LIM, H.*et al.* Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation. **Arch Pharm Res.**, v. 40, p. 524–535, 2017.

LIMA-COSTA, M. F., MATOS, D. L., CAMARANO, A. A. Evolução das desigualdades sociais em saúde entre idosos e adultos brasileiros: um estudo baseado na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD 1998, 2003). **Ciênc. saúde coletiva**, v.11(4), p. 941-950, Rio de Janeiro, 2006.

LIMA, C. R. O. **Reparação de lesões cutâneas incisionais em coelhos após o tratamento com barbatimão e quitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010.

LIPSKY, M. S.; KING, M. Biological theories of aging. **Dis Mon.**, v. 61(11), p.460-6, 2015.

- LIU, R.; XING, M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.24, n.2, p.97-106, 2016.
- LIU, T.; LIU, P.Y.; MARSHALL, G.M. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. **Cancer Res.**, v.69(5), p.1702-5, 2009.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v; 123, p. 95-113, 2018.
- LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell.**, v.153(6), p.1194-217, 2013.
- LUPA, D. M. W. *et al.* Characterization of Skin Aging–Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, p. 1954-1968, 2015.
- MACHADO, A. K. **Efeito cito-genômico do peróxido de hidrogênio e do guaraná (*Paullinia cupana*) em células tronco mesenquimais.** 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.
- MACEDO, J. L. *et al.* Eficácia da fitoterapia no processo de cicatrização tecidual de pacientes com diagnóstico de *diabetes mellitus*. **Ciência& Saberes**, v. 3(1), p. 1-5, 2017.
- MACIEJOWSKI, J.; DE LANGE, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 3, p. 175-186, 2017.
- MACIEL A.C.C., GUERRA, R. O. Prevalência e fatores associados ao déficit de equilíbrio em idosos. **Ver Bras Ciênc Mov.**, v. 13(1), p. 37-44, 2005.
- MAGALHÃES, J.P.; PASSOS, J.F. Stress, cell senescence and organismal ageing. **Mech Ageing Dev**, v. 170, p. 2–9, 2018.
- MAIER, B. *et al.* Modulation of mammalian life span by the shortisoform of p53. **Genes Dev.**, v.18, p.306–319, 2004.
- MAO, Z. Y. *et al.* Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. **P Natl Acad Sci USA**, 109(29):11800-52012, 2012.
- MARCOLINO, A. C. S. **Análise do impacto estrutural de polimorfismos de base única não-sinônimos (nsSNPs) presentes no gene da uroguanilina mediante simulações por dinâmica molecular de longa duração.** 2016. 114 pgn. Dissertação (Mestrado em Genômica e Biotecnologias), Universidade Católica de Brasília (UCB). 2016.
- MARTÍNEZ, P., BLASCO, M. A. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, Madrid. v. 216(4), p. 875-887, 2017.
- MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. **Textbook of Dermatology**, cap. 3 – [7 Ed.] – Blackwell Science Ltd, 2008.

MELO, C. O. A. **Avaliação de polimorfismos nos genes de reparo e detoxificação e a associação com o dano no DNA em etilistas.** 2017. 95 pgn. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal de Goiás (UFG). 2017.

MELO, V.C. *et al.* Produção científica sobre envelhecimento e câncer: uma revisão integrativa. **Anais CIEH**, v. 2, n.1, 2015.

MICHISHITA, E. *et al.* Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. **Molecular biology of the cell**, v.16(10), p.4623-35, 2005.

MIN, S. W. *et al.* Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. **Neuron.**, v.67(6), p.953-66, 2010.

MIRKIN, B.; WEINBERGER, M. B. The demography of population ageing. **Population Bulletin of the United Nations**, v.42(43), p.37–53, 2001.

MONTAGNER, G. F. S. **Efeito *in vitro* do polimorfismo Ala16Val do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos.** 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol.**, v. 84(3), p. 263-269, 2009.

NASCIMENTO, M.R. **Feminização do Envelhecimento Populacional: expectativas e realidades de mulheres idosas quanto ao suporte familiar. O envelhecimento da população brasileira e o aumento da longevidade – subsídio para políticas orientadas ao bem-estar do idoso.** Dissertação (Mestrado), Departamento de Demografia-Cedeplar, Faculdade de Ciências Econômicas, Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar: ABEP, 2001.

NASRI, F. O Envelhecimento Populacional no Brasil. **Einstein**, v. 6(11), p. 54-56, 2008.

NEVES, G. Y. S. *et al.* Avaliação do consumo de alimentos ricos em antioxidantes e do conhecimento sobre os radicais livres por partes dos acadêmicos de Ciências Biológicas e Enfermagem da FAFIMAN. **Diálogos & Saberes**, Mandaguari, v. 10, n. 1, p. 47-62, 2014.

NICOLAI, S. *et al.* DNA repair and aging: the impact of the p53 family. **Aging (Albany)**, v. 7(12), p. 1050-1065, 2015.

ONG, A.L.C.; RAMASAMY, T.S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. **Ageing Res Rev.**, v. 43, p. 64–80, 2018.

Organização Mundial de Saúde. 2016. Disponível em: <
<http://cemi.com.pt/2016/03/04/conceito-de-saude-segundo-oms-who/> > Acesso em: 14 mar., 2018.

PANSANI, T N *et al.* Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. **Lasers in Medical Science**, São Paulo, Brasil, v. 32, p. 4552-1034, 2016.

PEHAR, M. *et al.* P44, the “longevity-assurance” isoform of P53, regulates tau phosphorylation and is activated in an age-dependent fashion. **Aging Cell**, v.13, p.449–456, 2014.

Pellenz N L, Barbisan F, Azzolin V F *et al.* The healing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mar.), a Brazilian tannin-richest species: review of literature and series case, 2018.

PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 9, p. 674-686, 2013.

PERES, G. R. P. **Prevalência e fatores associados às lesões por fricção em idosos de instituições de longa permanência.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 75 p. São Paulo, 2014.

PINTO, S. C. G. *et al.* *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med.**, v. 81, p. 1090–1096, 2015.

PIOVESAN, A. R. **A TERRITORIALIZAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA SOCIAL E A PROTEÇÃO SOCIAL DAS PESSOAS IDOSAS USUÁRIAS DO BENEFÍCIO DE PRESTAÇÃO CONTINUADA NO COREDE VALE DO RIO PARDO/RS.** 2016. 143 pgn. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). 2016.

PRAIA, R. S. *et al.* Brazilian elderly affective disorders and suicide: trends on morbidity and health service costs. **MOJ Gerontology & Geriatrics**, v. 3, p. 95, 2018.

PRATES MORI, M.; SOUZA-PINTO, N.C. Role of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of DNA repair disorders. **Cell Biol Int.**, v. 42(6), p. 643-650, 2018.

QUAN, C. *et al.* Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. **J BiomedSci.**, v.22(1), p.62, 2015.

RAMOS, C. S. **Efeito do extrato de coité (*Crescentia cujete*) sobre o reparo tecidual em lesões cutâneas não contaminadas e contaminadas em ratos.** 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia.** 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REBECCA, M. A. *et al.* Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**. v. 143, p. 55-63, 2003.

RICARDO, L. M. *et al.* Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: the case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera spp.* (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**. In, 2018.

RINNERHALER, M. *et al.* Oxidative Stress in Aging Human Skin. **Biomolecules**, v. 5(2), p. 545-589, 2015.

RUFINI, A. *et al.* Senescence and aging: the critical roles of p53. **Oncogene**, v. 32, n. 43, p. 5129-5143, 2013.

ROGINA, B.; HELFAND, S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. **P Natl Acad Sci, USA.**,v.101(45), p.15998-6003, 2004.

SAAD, P. M. Envelhecimento Populacional: Demandas e Possibilidades na Área da Saúde. **In: Workshop Demografia dos Negócios**, Salvador, Anais, ABEP: Campinas, 2016.

SAPIEHA, P.; MALLETT, F.A. Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. **Trends Cell Biol.**, 2018.

SANTOS, D. C. A.; BIANCHI, L. R. O. Envelhecimento Morfofuncional: diferença entre os gêneros. **Arquivos do MUDI**, v. 18, n 2, p. 33-46, 2014.

SANTOS, M. A. Câncer e suicídio em idosos: determinantes psicossociais do risco, psicopatologia e oportunidades para prevenção. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22(9), p. 3061-3075, 2017.

SANTOS, N. C. M. **Anatomia e fisiologia humana** – [2. Ed]. - São Paulo: Érica, 2014.

SANTOS, S.C. *et al.* Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v.73, p.292-299, 2002.

SCHNEIDER, R. H.; IRIGARAY, T. Q. O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais. **Estudos de Psicologia**, v. 25, p. 585-593, 2008.

SERRAVALLO, M.*et al.* Sirtuins in dermatology: Applications for future research and therapeutics. **Arch Dermatol Res.**, v.305, p. 269–282, 2013.

SINHA, M. *et al.* Restoring Systemic GDF11 Levels Reverses Age-Related Dysfunction in Mouse Skeletal Muscle.**Science**, v. 9, p. 649-652, 2014.

SONG, H.S.*et al.* The effect of caffeic acid on wound healing in skin-incised mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 12, p. 343–347, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; QUEIROZ-FERNANDES, G.M.; PIETRO, R.C.R.L. Stryphnodendron Species Known as "Barbatimão": A Comprehensive Report. **Molecules.**, v. 23(4), p. 910–935, 2018.

SOUZA, D.M.S.T.; SANTOS, V.L.C.G. Fatores de risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão em idosos institucionalizados. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15(5), p. 57, 2007.

STREHLER, B.L. Aging Research: Current and Future. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 73(1), p.2-7, 1979.

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

TENNEN, R.I.; BERBER, E.; CHUA, K.F. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. **Mechanisms of ageing and development**, v.131(3), p.185-92. 2010.

TESTON, A.P. *et al.* ENVELHECIMENTO CUTÂNEO: TEORIA DOS RADICAIS LIVRES E TRATAMENTOS VISANDO A PREVENÇÃO E O REJUVENESCIMENTO. **Uningá Review**, v. 1, p. 71-84. Maringá – PR, Brasil.

TISSENBAUM, H.A.; GUARENTE, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 410(6825), p. 227-30, 2001.

TROLEZI, R. *et al.* Stryphnodendron adstringens and purified tannin on Pythium insidiosum: in vitro and in vivo studies. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 16(7), p. 183-193, 2017.

VANZELLA, E.; DO NASCIMENTO J.A.; DOS SANTOS, S.R. O envelhecimento, a transição epidemiológica da população brasileira e o impacto nas hospitalizações. **Rev. Elet. Estácio Saú.** v.7, n.1, 2018.

VARGAS, A.C.; PORTELLA, M. R. O diferencial de um grupo de convivência: equilíbrio e proporcionalidade entre os gêneros. **Revista Kairós Gerontologia**, v.16(3), p. 227-238. São Paulo (SP), Brasil, 2013.

VASTO, S. *et al.* Inflammation, ageing and câncer. **Mech Ageing Dev.**, v. 130(1-2), p. 40-5, 2009.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. **Nat. Rev. Endocrinol.** v.9, p. 228–240, 2013.

VELOSO, A. A. **O EFEITO DO ENVELHECIMENTO NAS FORÇAS DE ADESÃO À DENTINA.** 2016. 71 pgn. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ. 2016.

YANG, D.J *et al.* Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. **Molecules**, v.21,2016.

YEN, T.T.; THAO, D.T.; THUOC, T.L. An overview on keratinocyte growth factor: from the molecular properties to clinical applications. **Protein Pept Lett.**, v. 21(3), p. 306–317, 2014.

YIN, G. *et al.* Topical application of quercetin improves wound healing in pressure ulcer lesions. **Exp Dermatol.**, 2018.

ZHANG, C. *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 39, p. 16259-16264, 2011.

ANEXO A: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Comprovante de submissão do manuscrito para a revista *Biogerontology*.

www.editorialmanager.com/bgen/default.aspx

BIOGERONTOLOGY Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: fernandabarbisian

Submissions Being Processed for Author Fernanda Barbisan, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View Reference Checking Results Send E-mail	BGEN-D-18-00050	Stryphnodendron adstringens (Mart) Coville, a Brazilian wound healing plant, restores some cytofunctional markers of senescent human dermal fibroblasts.	24 May 2018	25 May 2018	Editor Assigned

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ANEXO B: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO MANUSCRITO 1, NÃO VINCULADO A DISSERTAÇÃO

Manuscrito intitulado “*Photoexposure: Effects of low level laser use on tissues and fibroblast lineage (a minireview)*”, sendo autores: Moisés Henrique Mastella; Melissa Gewehr; Ivana Beatrice Mânica da Cruz; Margrid Beuter, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte; Fernanda Barbisan. O manuscrito está submetido ao periódico *Alternative Therapies in Health and Medicine* (Qualis B1 – área interdisciplinar), desde 24 de março de 2018.

Dear Fernanda Barbisan:

I am pleased to inform you that your manuscript, “Photoexposure: Effects of low level laser use on tissues and fibroblasts lineage (a minireview),” has been accepted for peer review for *Alternative Therapies in Health and Medicine*.

Your manuscript has been assigned MS #5959, and I will soon begin the process of forwarding it to our expert peer reviewers, who are familiar with this topic. Depending on the availability and schedules of the peer reviewers, the review process can take anywhere from a few weeks to a few months. Please be patient as we make every effort to give your submission the time and attention it deserves.

If you have any colleagues you can recommend for peer review we would be happy to consider them.

If you have any questions regarding your manuscript, please don't hesitate to contact me, and please reference your manuscript number in your inquiry.

Thank you for your submission to *ATHM*. I will be in touch again as soon as I receive the reviewers' completed reviews.

Sincerely,

Peer Review Team
Alternative Therapies in Health and Medicine

ANEXO C: COMPROVANTES DE SUBMISSÃO MANUSCRITO 2 NÃO VINCULADO A DISSERTAÇÃO

Manuscrito intitulado “A pele em que se habita: uma reflexão sobre envelhecimento e estética na atualidade” sendo autores: Moisés Henrique Mastella; Flávio Castagna de Freitas; Angelita Alice Jaeger; Margrid Beuter; Ivana Beatrice Mânica da Cruz; Fernanda Barbisan. O manuscrito está submetido ao periódico *Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento* (Qualis B2 – área interdisciplinar), desde 24 de maio de 2018.

ESTUDOS INTERDISCIPLINARES SOBRE O ENVELHECIMENTO

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#) [NOTÍCIAS](#)

Capa > Usuário > Autor > Submissões Ativas

SUBMISSÕES ATIVAS

ATIVO ARQUIVO

ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
83184	24/05/2018	EA	Mastella, de Freitas, Jaeger, Beuter,...	A PELE EM QUE SE HABITA: UMA REFLEXÃO SOBRE...	Aguardando designação

1 a 1 de 1 itens

INICIAR NOVA SUBMISSÃO
CLIQUE AQUI para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento. ISSN: 1517-2473 (impresso) e 2316-2171 (eletrônico)
Qualis Capes 2013, área interdisciplinar: B1

Ajuda do sistema

USUÁRIO
Logado como: febarbisan
Meus periódicos
Perfil
Sair do sistema

CONTEÚDO DA REVISTA
Pesquisa

Escopo da Busca
Todos
Pesquisar

Procurar
Por Edição
Por Autor
Por título
Outras revistas