

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS

BÁRBARA HAKIM DE MORAES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SENOSTÁTICO DE COMBINAÇÕES DE
FÁRMACOS E POLIFENÓIS**

CAMPINAS

2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
BÁRBARA HAKIM DE MORAES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SENOSTÁTICO DE COMBINAÇÕES DE
FÁRMACOS E POLIFENÓIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências da Saúde da Escola de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dra. Alessandra Gambero

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica elaborada por Adriane Elane Borges de Carvalho CRB
8/9313 Sistema de Bibliotecas e Informação - SBI - PUC-Campinas

616 M827a	<p>Moraes, Bárbara Hakim de</p> <p>Avaliação do potencial senostático de combinações de fármacos e polifenóis / Bárbara Hakim de Moraes. - Campinas: PUC-Campinas, 2023.</p> <p>35 f.: il.</p> <p>Orientador: Alessandra Gambero.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2023. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Doenças crônicas. 2. Células - Envelhecimento. 3. Fármacos - Polifenóis. I. Gambero, Alessandra. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Escola de Ciências da Vida. Programa de Pós graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p>23. ed. CDD 616</p>
--------------	--

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BÁRBARA HAKIM DE MORAES
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SENOSTÁTICO DE COMBINAÇÕES DE
FÁRMACOS E POLIFENÓIS

Dissertação defendida e aprovada em 18 de dezembro de 2023 pela Comissão Examinadora



Prof.(a) Dr. (a) Alessandra Gambero

Orientador(a) da Dissertação e Presidente da Comissão


Examinadora

Pontifícia Universidade Católica de Campinas
(PUC-Campinas)



Prof.(a) Dr.(a) Augusto Etchegaray

Pontifícia Universidade Católica de Campinas
(PUC-Campinas)



Prof. (a)Dr.(a) Cintia Rabelo e Paiva Caria

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Especificos.....	12
3 PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS.....	13
3.1 Cultura de células.....	13
3.2 Doses de trabalho dos fármacos e polifenóis.....	13
3.3 Padronização do modelo de senescência celular.....	14
3.4 Ensaio senostáticos.....	14
3.5 Análises estatísticas.....	14
4 RESULTADOS.....	15
5 REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

A células senescentes estão associadas ao envelhecimento, se acumulam nos tecidos e são responsáveis por diversas doenças que causam mortalidade e morbidade. Elas são caracterizadas por apresentar um fenótipo secretor, conhecido como SASP (*Senescent associated secretory phenotype*) que atinge as células adjacentes além de serem resistentes a apoptose e apresentarem baixa taxa de proliferação. Fármacos capazes de controlar esse fenótipo secretor, denominados senostáticos, tem sido estudados como abordagens promissoras no controle de várias doenças associadas ao envelhecimento. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial senostático *in vitro* em culturas de fibroblastos pulmonares senescentes de combinações de metformina e polifenóis e de rapamicina e polifenóis. Foi utilizada em sua metodologia fibroblastos de pulmão humano da linhagem MRC-5 e a indução de senescência foi realizada com doxorubicina. A atividade senostática foi avaliada pela quantificação de fatores secretados IL-1 β , IL-8 e IL-6 pelas células senescentes. Os resultados foram apresentados como média de experimentos realizados em triplicata e com uma repetição, seguido do erro padrão da média. Foi possível observar que a combinação de metformina (10 mM) e ácido cafeico (1mM) apresentou atividade senostática, sendo capaz de inibir a produção de IL-6 e IL-8 pelas células senescentes apresentando-se como uma opção que deve ser estudada em doenças associadas ao envelhecimento.

Palavras-chaves: Senescência celular; Senoterapêuticos; Doenças crônicas; Polifenóis.

ABSTRACT

Senescent cells are associated with aging, accumulate in tissues and are responsible for several diseases that cause mortality and morbidity. They are characterized by presenting a secretory phenotype, known as SASP (Senescent associated secretory phenotype) that affects adjacent cells, in addition to being resistant to apoptosis and having a low proliferation rate. Drugs capable of controlling this secretory phenotype, called senostatics, have been studied as promising approaches to control several diseases associated with aging. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* senostatic potential in senescent lung fibroblast cultures of combinations of metformin and polyphenols and rapamycin and polyphenols. Human lung fibroblasts of the MRC-5 lineage were used in their methodology and senescence induction was carried out with doxorubicin. The senostatic activity was evaluated by quantifying the factors IL-1 β , IL-8 and IL-6 secreted by senescent cells. The results were presented as the average of experiments performed in triplicate and with one repetition, followed by the standard error of the mean. It was possible to observe that the combination of metformin (10 mM) and caffeic acid (1mM) presented senostatic activity, being able to inhibit the production of IL-6 and IL-8 by senescent cells, presenting itself as an option that should be studied in diseases associated with aging.

Key words: Cellular senescence; Senotherapeutics; chronic diseases; polyphenols.

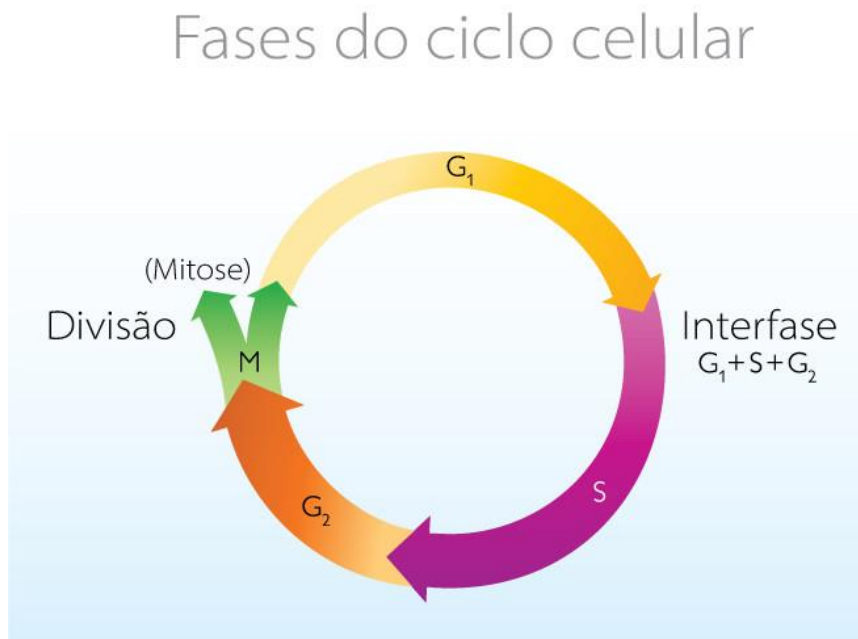
1 INTRODUÇÃO

1.1. Senescência celular

A senescência celular está relacionada a um estado irreversível de parada de ciclo celular e associada ao estabelecimento de um fenótipo secretor característico que envolve a produção de diversos fatores pró- inflamatórios e proteolíticos (*senescence-associated secretory phenotype*; SASP), mantendo a célula metabolicamente ativa e sem entrar no processo de morte (ROGER *et al.*, 2021).

A parada irreversível do ciclo celular em células senescentes é imposta principalmente por um aumento de expressão de inibidores do ciclo celular ou supressores tumorais p16, p21 e p53 (CHEN *et al.*, 2000). A senescência celular é um mecanismo chave para impedir a propagação de células danificadas atuando como um mecanismo supressor da formação de tumores, por exemplo. E diferentemente das células quiescentes que param numa fase estável chamada G0 e tem a capacidade de reentrar no ciclo celular, as células senescentes param nos pontos de verificação G1, G1/S ou G2 de forma irreversível (LUCAS *et al.*, 2023).

Figura 1. Fases do ciclo celular.



Fonte: Google imagens (2023).

O SASP envolve a produção de diferentes fatores solúveis como interleucinas (IL), principalmente a IL-6 e IL-1 β , quimiocinas, fatores de crescimento e proteases e fatores insolúveis como proteínas secretadas e componentes da matriz extracelular (MEC) (KUMARI; JAT, 2021). Entretanto, os fatores secretados podem afetar o microambiente tecidual levando a muitas doenças crônicas como o diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (REGULSKI, 2017).

A resistência a apoptose é atribuída a regulação positiva de certas proteínas como as anti-apoptóticas BCL-2 ou Bcl-xL (HU *et al.*, 2022).

Adicionalmente, observa-se em culturas celulares alterações morfológicas como a presença de um citoplasma achatado, células alargadas, inúmeros vacúolos e núcleos. As células senescentes são responsáveis por acumular lipofuscina, um líquido formado pela digestão lipossômica, que pode também ser visualizado histologicamente. Nos tecidos estas alterações também ocorrem, mas a observação é mais difícil, pois as modificações morfológicas são limitadas pela arquitetura tecidual. Diversos métodos são utilizados para identificar células senescentes *in vitro*, sendo os mais utilizados a observação de alterações morfológicas, expressão de β -galactosidase e expressão de proteínas que caracterizam o SASP (BECK *et al.*, 2020). *In vivo* ainda é um desafio à detecção das células senescentes, visto a baixa sensibilidade dos marcadores atuais (LIU, 2022).

1.2. Indutores de senescência celular

A senescência replicativa foi inicialmente observada por Leonard Hayflick (Hayflick, 1965). Trabalhando com linhagens celulares primárias de fibroblastos humanos, Hayflick observou que estas paravam de proliferar após um número prolongado de passagens, o que ficou conhecido como Limite de Hayflick. Uma causa bem citada da senescência replicativa é a erosão dos telômeros, um processo no qual os telômeros encurtam gradualmente com sucessivas divisões celulares (HARLEY *et al.*, 1990). Os telômeros disfuncionais geram danos ao DNA. Desta forma, as células com telômeros disfuncionais, passam pela sinalização de resposta a danos ao DNA (DDR) persistente e ativação das proteínas p53 (CAMPISI, 2013).

Além da senescência replicativa, outros fatores são capazes de induzir a senescência celular como a radiação ionizante e não-ionizante, o estresse oxidativo, fármacos genotóxicos ou estímulos que levam a reações de metilação e acetilação do DNA (RAYESS *et al.*, 2012).

1.3 Senoterapêuticos: evidências terapêutica dos senostáticos e senolíticos

No campo pré-clínico, os senolíticos foram capazes de melhorar a função cardíaca e vascular em camundongos de 24 meses de idade (equivalente a cerca de 80 anos em humanos), com reversão parcial dos declínios relacionados à idade na fração de ejeção cardíaca, na redução na calcificação dos vasos e restauração da reatividade dos vasos (ROOS *et al.*, 2016). A administração de senolíticos a camundongos com obesidade induzida por dieta ou obesidade genética melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (PALMER *et al.*, 2019). Reduziu também as complicações hepáticas associadas à obesidade como a esteatose hepática, a cirrose e a falência hepática em camundongos (PALMER *et al.*, 2019; PALMER *et al.*, 2016).

Nos ensaios clínicos, a administração de dasatinibe + quercetina por via oral em pacientes com diabetes foram encontradas evidências de efeito senolítico. Após 11 dias, as células senescentes p16INK4a+ e SA-βgal+ diminuíram no tecido adiposo dos indivíduos diabéticos. Além disso, dasatine + quercetina diminuiu a inflamação do tecido adiposo, conforme evidenciado pela redução de macrófago e de mediadores de SASP (HICKSON *et al.*, 2019). Um outro ensaio clínico foi realizado em pacientes com fibrose pulmonar intersticial onde o dasatinibe + quercetina melhorou a condição física após 3 semanas de tratamento, usando a combinação de senolíticos por 3 dias/semana. Nos pacientes com fibrose pulmonar também houve redução das citocinas pró-inflamatórias relacionadas à SASP, proteases de remodelação da matriz e micro-RNAs (JUSTIÇA *et al.*, 2019).

As drogas senostáticas são substâncias químicas que não matam as células senescentes, porem bloqueiam a produção do SASP, inibindo a propagação da senescência e o estabelecimento de um micro-ambiente inflamatório chamado atualmente de “inflammaging” (FIELDER *et al.*, 2022).

A droga metformina, é um fármaco responsável por bloquear a sinalização SASP: desta forma inibindo a propagação da senescência. Possui um excelente perfil de segurança, comprovada durante sua história clínica o que faz com que seja o fármaco de primeira escolha como hipoglicemiante oral no tratamento do diabetes melito tipo 2. Seu efeito hipoglicemiante ocorre pela inibição da gliconeogênese hepática após ser captada ativamente pelos hepatócitos, o que causa um efeito de oposição à ação do glucagon. A inibição do complexo mitocondrial I resulta em sinalização defeituosa de cAMP e proteína quinase A em resposta ao glucagon. A estimulação da proteína quinase ativada por 5'-AMP (AMPquinase), embora dispensável para o efeito hipoglicemiante da metformina, confere sensibilidade à insulina, principalmente pela modulação do metabolismo lipídico (FIELDER *et al.*, 2022). Possui ação anti-inflamatória e efeitos associados à senescência celular sendo capaz de reduzir a inflamação, o dano oxidativo, a glicação de proteínas. (FRASCA *et al.*, 2021). Outro estudo mostrou que o tratamento com metformina induziu autofagia de maneira AMPK dependente em células do núcleo pulposo, o que confere efeito anti-apoptose e anti-senescência contra o estresse oxidativo, sugerindo que a metformina pode prevenir a degeneração discal, nos pacientes com diabetes mellitus (CHEN *et al.*, 2016).

A rapamicina é um fármaco com grande potencial de intervenção antienvhecimento, baseado em resultados de diversos estudos em modelos pré-clínicos. Possui capacidade de alterar a função celular em todas as células submetidas a ela, devido ao seu complexo mTOR nos processos celulares. Comprovada em estudos que aumenta a longevidade de camundongos, mesmo em animais relativamente mais velhos. Foi realizado um estudo para avaliar a ação da rapamicina, em aspectos celulares e moleculares em pele senescente. Foi revelado que ocorreu uma redução na expressão da proteína p16^{INK4A} na pele, foram avaliados também as proteínas p21^{Cip2} e tp23 revelando uma redução nas amostras tratadas com rapamicin. Foi comprovada também nas amostras tratadas uma redução de elastose solar na pele (CHUNG *et al.*, 2019).

Desta forma a categoria farmacológica senoterapêutica, inclui drogas senolíticas responsáveis pelo apoptose das células senescentes; e as drogas senostáticas responsáveis por bloquear o fator de sinalização SASP, inibindo o

desenvolvimento das células senescentes. Entre as diversas vantagens da utilização desses senoterapêuticos está no controle dos efeitos das células senescentes no ambiente tecidual, diminuindo o risco de doenças crônicas como câncer, doenças metabólicas e neurodegenerativas (DÍAZ *et al.*, 2022).

1.4 Relação entre senescência celular e doenças crônicas

A principal característica do envelhecimento é a perda da função ou degeneração; ocorrendo em diferentes níveis como o molecular, celular, e/ou tecidual do organismo. A perda da função relacionada à idade acontece em todos os organismos que envelhecem. Na espécie humana as patologias relacionadas à degeneração são bem conhecidas como: sarcopenia; osteoporose; diversas insuficiências; neurodegeneração e dentre outras (CAMPISI, 2012).

Há cada vez mais evidências que a senescência celular, esta relacionada a diversas patologias de envelhecimento: tanto as degenerativas como hiperplásicas. Não são todas as patologias do envelhecimento que estão relacionadas à senescência, porém grande número está relacionado direta ou indiretamente a resposta senescente (CAMPISI, 2012). A senescência das células imunes e parenquimatosas contribui para diversos distúrbios metabólicos, como nos rins levando para progressão da doença renal aguda para a doença renal crônica (HUANG, 2022).

A imunosenescência resulta em maior suscetibilidade a infecções; resposta diminuída em relação a vacinas, inflamações crônicas e câncer. A autofagia é um fator que contribui para imunosenescência, o que gera danos ao DNA. O envelhecimento também induz a senescência de células – tronco o que contribui para diversas doenças como: osteoartrite, remodelação óssea prematura, e degradação de cartilagem (HUANG, 2022).

As doenças pulmonares intersticiais fibrosantes (DPIs) são doenças pulmonares crônicas e fatais relacionadas ao envelhecimento. São caracterizadas pelo acúmulo de tecido cicatricial no parênquima pulmonar. Diversos estudos vêm demonstrando que a senescência celular das células epiteliais alveolares e dos

fibroblastos pulmonares de pacientes com FPI determinam um fenótipo celular com capacidade aumentada de secreção de citocinas associadas ao SASP, de fatores pró-fibróticos, fatores de crescimento, mediadores angiostáticos e pró-coagulantes e, proteases que promovem uma resposta anormal de cicatrização no pulmão levando ao estabelecimento destas doenças fibrosantes crônicas. Pensar no potencial de uso dos senoterapêuticos para pacientes com DPIs é especialmente atraente, embora ainda restem algumas questões que precisam ser abordadas como se o controle da produção do SASP pode realmente impactar no controle da doença (GONZALEZ *et al.*, 2022).

1.5 Polifenóis e potencial senoterapêutico

Os polifenóis são bioquímicos naturais, encontrados em frutas, sementes de vegetais, especiarias e café. Possui diversas atividades sendo conhecidos como bioativos naturais, como atividade antioxidante, propriedades antitumorais, de eliminação de radicais livres, anti-inflamatória e antimicrobiana. Diversos são os fitoquímicos polifenólicos capazes de reduzir os efeitos do envelhecimento, através de suas atividades biológicas como alguns exemplos: a quercetina, cianidina e reverastrol. O reverastrol tem capacidade de potencializar enzimas antioxidantes endógenas, e se combinado a agentes quimioterápicos de bloquear os três estágios do câncer (PYO *et al.*, 2020). A quercetina é um composto fenólico do grupo dos flavonóides, alvo em estudos de morte celular programada e senescência celular, pois possui diversos efeitos a saúde humana como: efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e cardioprotetores (OZSOY *et al.*, 2020).

Os primeiros testes clínicos utilizando a combinação senolítica quercetina e desatinibe, demonstram a diminuição de células senescentes no tecido adiposo de pacientes diabéticos com doença renal, e em pacientes com fibrose pulmonar idiopática. São necessários diversos ensaios clínicos em modelos de envelhecimento e doença, para determinar se podem ser agregados ao arsenal terapêutico atual. A quercetina e desatinibe vem demonstrando resultados promissores na segurança, em diversos ensaios clínicos, o desatinibe é utilizado na prática clínica desde 2006 (GERDES *et al.*, 2021).

1.3 Justificativa

Considerando que a metformina e a rapamicina demonstraram potencial senostático e que os polifenóis podem adicionar potencial anti-senescente, que há muitas fontes de extração de polifenóis a partir de resíduos associadas a cadeia de produção de alimentos no Brasil e que as doenças pulmonares associadas ao envelhecimento poderiam ser beneficiadas com o emprego de senoterapêuticos, este trabalho visou avaliar o potencial senostático das combinações de metformina e diferentes polifenóis e da rapamicina e diferentes polifenóis em um modelo de células pulmonares senescentes *in vitro*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial senostático *in vitro* em culturas de fibroblastos pulmonares senescentes de combinações de metformina e polifenóis e de rapamicina e polifenóis.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar concentrações não-tóxicas de metformina e rapamicina associadas a diferentes polifenóis.
- Padronizar um modelo de senescência em fibroblastos pulmonares humanos com o uso de doxorubicina.
- Avaliar em fibroblastos pulmonares com senescência induzida por doxorubicina a capacidade da metformina e da rapamicina isoladamente ou combinada a diferentes polifenóis em inibir o SASP.

3 MÉTODOS

3.1 Cultura de células

A linhagem MRC-5 (BCRJ 0180) de fibroblastos de pulmão humano foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, sendo recebida com a passagem 22. As células foram expandidas e a linhagem estabelecida no laboratório. A MRC-5 foi cultivada em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não-essenciais (NEAA) e 1% de penicilina-estreptomicina/fungizone, a 37 graus, em atmosfera com 5% de CO₂,

3.2 Doses de trabalho dos fármacos e polifenóis

As células MRC-5 foram semeadas em placas de 96 poços (passagem 22-24, denominadas jovens) e incubadas por 24 horas com diferentes concentrações dos fármacos metformina (0,5-50 mM) e rapamicina (2-200 nM). Os intervalos de concentrações foram definidos após revisão cuidadosa de dados já publicados para diferentes usos dos fármacos em ensaios *in vitro*. Os fármacos foram diluídos em DMEM quando hidrossolúveis (metformina) ou em DMSO seguido de diluições em DMEM (rapamicina) até o limite máximo final de 0,5% de DMSO (v/v). Os polifenóis foram também diluídos em DMEM quando solúveis (ácido clorogênico e ácido gálico) ou em DMSO conforme instruções anteriores. As células MRC-5 jovens foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações (1-1000 µM) dos polifenóis ácido cafeico, ácido ferúlico, epicatequina, resveratrol, ácido clorogênico e ácido gálico, exceto quando houve limitações para a diluição como o ácido elágico, hesperidina e quercetina cujas concentrações máximas foram de 100 µM.

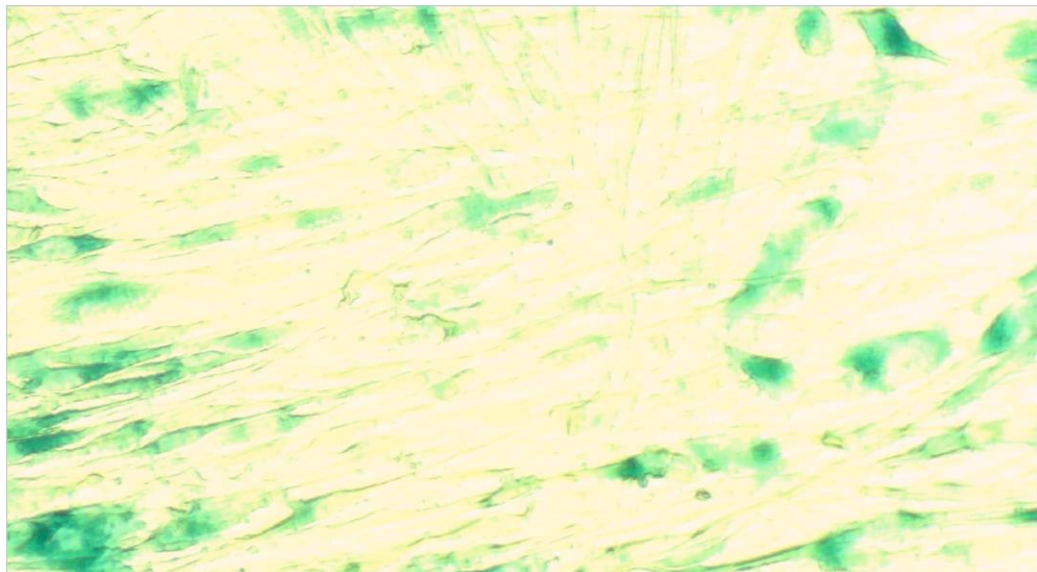
Após 24 horas de incubação as células foram submetidas à avaliação de citotoxicidade pelo teste de MTT. A viabilidade celular foi avaliada por leitura de absorbância (540 nm) do lisado celular após 2 horas de incubação, em condições de cultivo celular, com solução de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide dissolvido em PBS (0,5 mg/mL). As concentrações não tóxicas de metformina (10 mM) e

rapamicina (100 nM) foram co-incubadas com as concentrações não tóxicas dos polifenóis em um novo grupo de experimentos e a viabilidade celular novamente avaliada.

3.3 Padronização do modelo de senescência celular

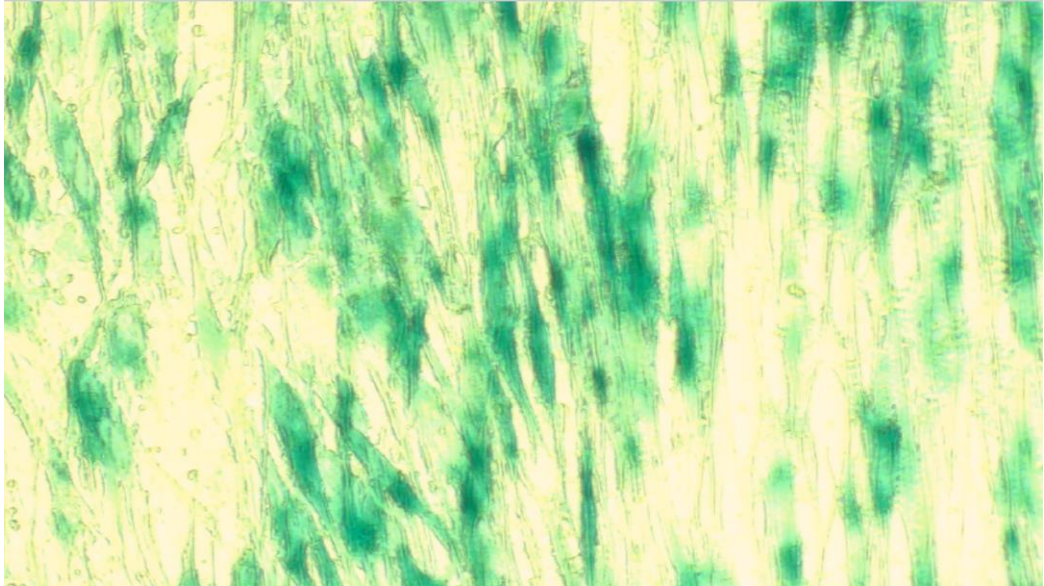
A indução de senescência foi realizada com doxorrubicina. A doxorrubicina foi diluída em DMSO e empregada em duas concentrações descritas na literatura em ensaios anteriores com linhagens de fibroblastos⁸⁻¹¹. A indução de senescência foi avaliada pela marcação de galactosidase e pela produção de SASP (IL-6).

Figura 2. Controle de betagalactosidase de células jovens



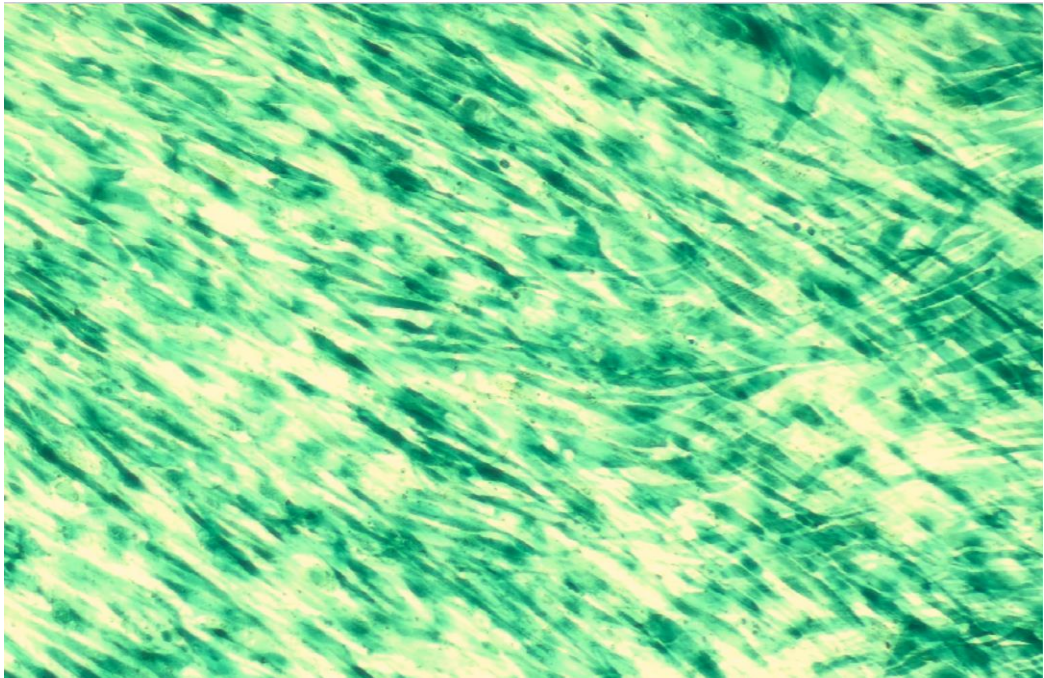
Fonte: Alessandra Gambero (2023).

Figura 3. Células senescentes com doxorrubicina de 1,5 uM após 6 dias



Fonte: Alessandra Gambero (2023).

Figura 4. Células senescentes com doxorubicina de 1,5 μ M após 20 dias



Fonte: Alessandra Gambero(2023).

3.4 Ensaios senostáticos

A atividade senostática foi avaliada pela quantificação de fatores secretados IL-1 β , IL-8 e IL-6 por células com senescência induzida pela doxorubicina expostas ou não a combinações de fármacos e polifenóis. A quantificação de IL-1 β , IL-8 e IL-6 foi realizada em amostras de sobrenadante da cultura de células MRC-5 senescente empregando-se kits comerciais de ELISA (OptEIA B.D. Bioscience) e seguindo as instruções do fabricante.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média de experimentos realizados em triplicata e com uma repetição, seguido do erro padrão da média. Valores estatisticamente significantes foram determinados após Análise de Variância seguida por pós-teste de Dunnet, considerando valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação da citotoxicidade dos fármacos e polifenóis nas células MRC-5

Empregando-se células jovens da linhagem celular MRC -5 (passagem 22), avaliou-se a presença de toxicidade dos fármacos e polifenóis após incubação de 24 horas. Podemos observar na Figura 1 que somente a maior concentração de metformina e de rapamicina apresentaram potencial tóxico e para os experimentos futuros a concentração de 10 mM de metformina e 100 nM de rapamicina foram escolhidas. Na Figura 2 mostramos os resultados da viabilidade celular da linhagem MRC -5 jovem, após 24 horas de incubação com diferentes concentrações dos polifenóis ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico, epicatequina, hesperidina, quercetina, resveratrol, ácido clorogênico e ácido gálico. Para os experimentos subsequentes foram escolhidas as concentrações de não tóxicas, a saber: ácido cafeico 1000 μ M; ácido ferúlico 1000 μ M; ácido elágico 100 μ M; epicatequina 1000 μ M; hesperidina 100 μ M; quercetina 100 μ M; resveratrol 100 μ M; ácido clorogênico 1000 μ M; e ácido gálico em 100 μ M.

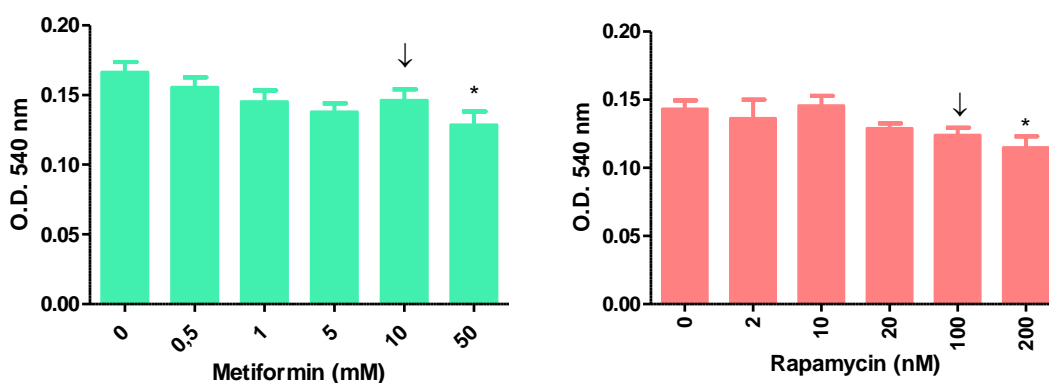


Figura 1. Análise da citotoxicidade da metformina e rapamicina após 24 horas de incubação nas células MRC-5 jovens. As barras representam a média e EPM de dois experimentos realizados em triplicata. As ↓ indicam as concentrações escolhidas para os experimentos subsequentes e * $p < 0.05$ quando comparado às células não-tratadas.

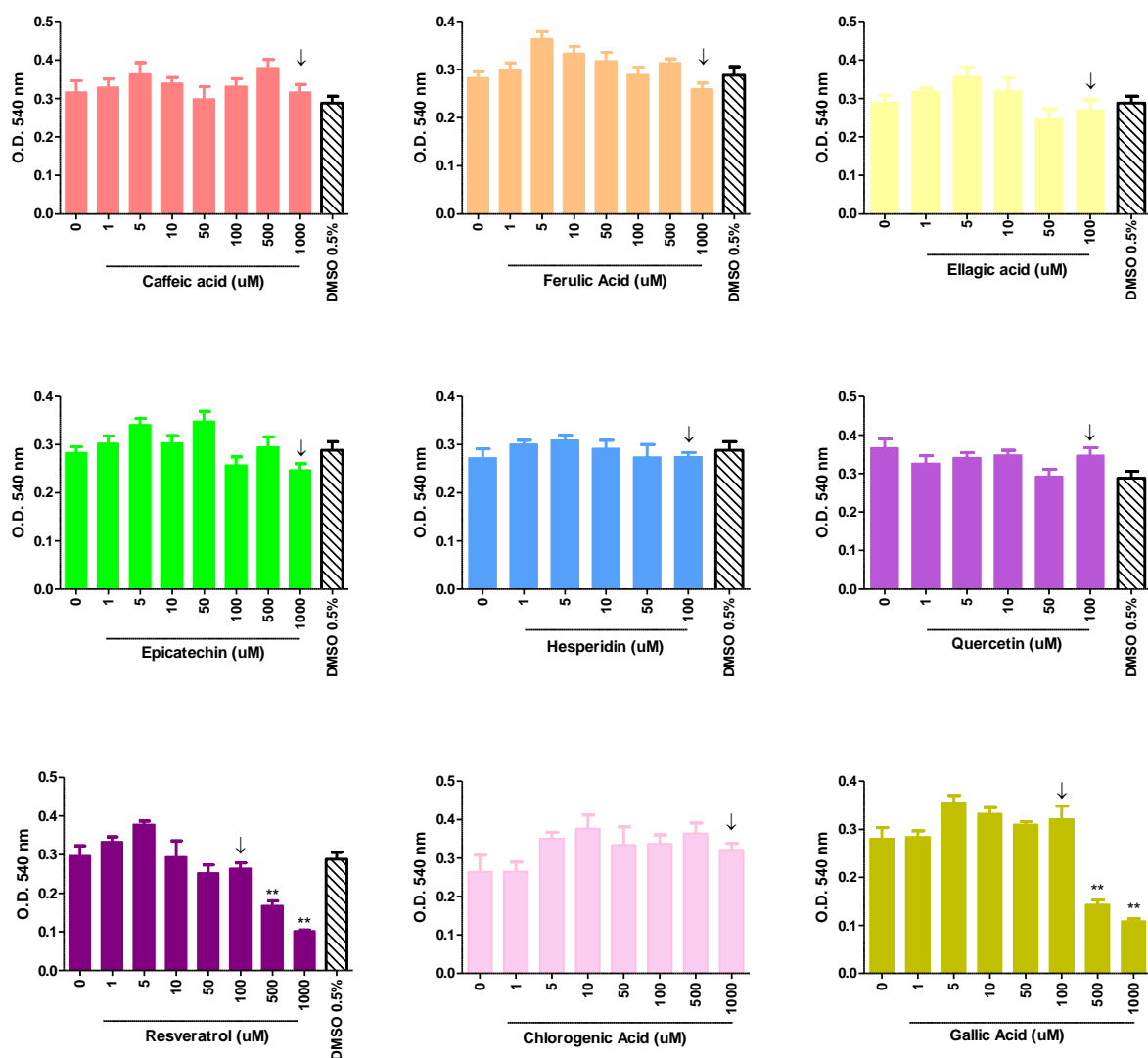


Figura 2. Análise da citotoxicidade dos polifenóis após 24 horas de incubação nas células MRC-5 jovens. As barras representam a média e EPM de dois experimentos realizados em triplicata. As ↓ indicam as concentrações escolhidas para os experimentos subsequentes e * $p < 0.05$ quando comparado às células não-tratadas.

Em um novo grupo de experimentos, ainda empregando-se células jovens, a citotoxicidade foi avaliada empregando-se as combinações de fármacos e polifenóis. Na Figura 3 vemos o resultado das combinações dos fármacos metformina (10 mM) e rapamicina (100 nM), com os polifenóis ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico, epicatequina, hesperidina, quercetina, ácido clorogênico e ácido gálico. O ácido cafeico combinado com a metformina apresentou efeito citotóxico em células jovens.

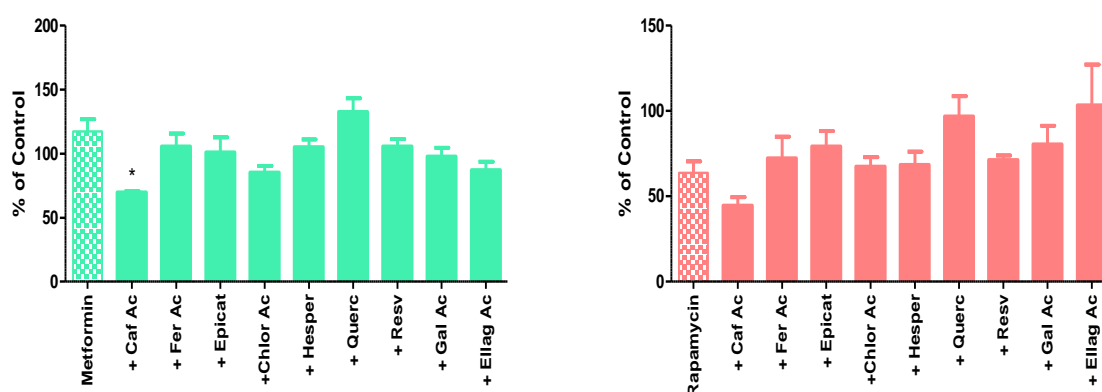


Figura 3. Viabilidade celular após 24 horas de incubação com combinações de fármacos e polifenóis. na linhagem MRC-5 jovem. As barras representam a média e EPM de 2 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado às células tratadas somente com os fármacos.

4.2. Padronização de um modelo de senescência em células MRC-5

Iniciamos a padronização de um modelo de senescência para a linhagem MRC-5 empregando-se o fármaco doxorrubicina em duas concentrações reportadas na literatura como indutoras de senescência em fibroblastos, após uma única exposição de 24hs e a avaliação da indução da senescência feita após 6 e 20 dias. Podemos observar na Figura 4 que o tratamento com a maior concentração de doxorrubicina e uma avaliação após 20 dias produziu os melhores resultados, pois observamos uma baixa capacidade proliferativa das células quando comparada ao controle (pelo ensaio de MTT) e mais de 80% de células positivas para β -

galactosidase. Os níveis de IL-6 no sobrenadante, o principal marcador de SASP, foram significativamente mais altos nesta condição experimental.

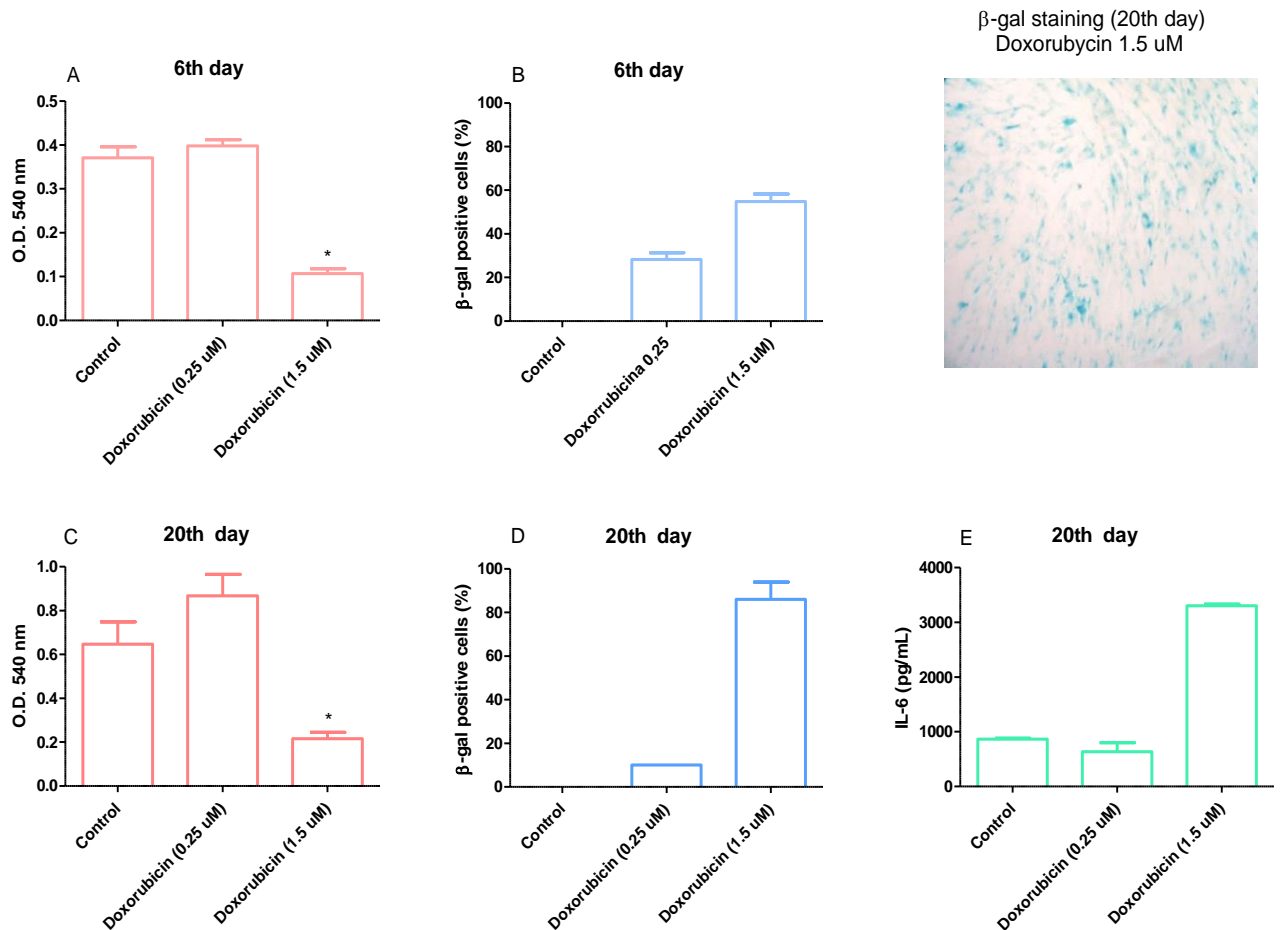


Figura 4. Viabilidade celular da linhagem MRC-5 após 6 (Painel A) e 20 dias (Painel C) da incubação com doxorrubicina nas concentrações de 0,25 μM e 1,25 μM. Porcentagem de células MRC-5 positivas para β-galactosidase após 6 (Painel B) e 20 dias (Painel D) da incubação com doxorrubicina nas concentrações de 0,25 μM e 1,25 μM. Imagem representativa da reação de β-galactosidase em células MRC-5 (superior a direita). Quantificação de IL-6 no sobrenadante de células MRC-5 após 20 dias (Painel E) da incubação com doxorrubicina nas concentrações de 0,25 μM e 1,25 μM. As barras representam à média e EPM de dois experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado às células não-tratadas.

4.3. Comparação do efeito citotóxico dos fármacos e polifenóis em MRC-5 jovens e senescentes

Desta forma, prosseguimos com os estudos sobre o potencial citotóxico dos fármacos combinados aos polifenóis empregando a MRC-5 senescente após 20 dias da exposição à doxorrubicina. Podemos observar na Figura 5, que as células senescentes são mais resistentes que as células jovens à exposição aos fármacos e polifenóis. Note que a combinação metformina + ácido cafeico que havia mostrado toxicidade significativa inicialmente, não altera a viabilidade celular em células senescentes. No entanto, observamos um efeito citotóxico da combinação de rapamicina e quercetina nas células senescentes sugerindo um efeito senolítico.

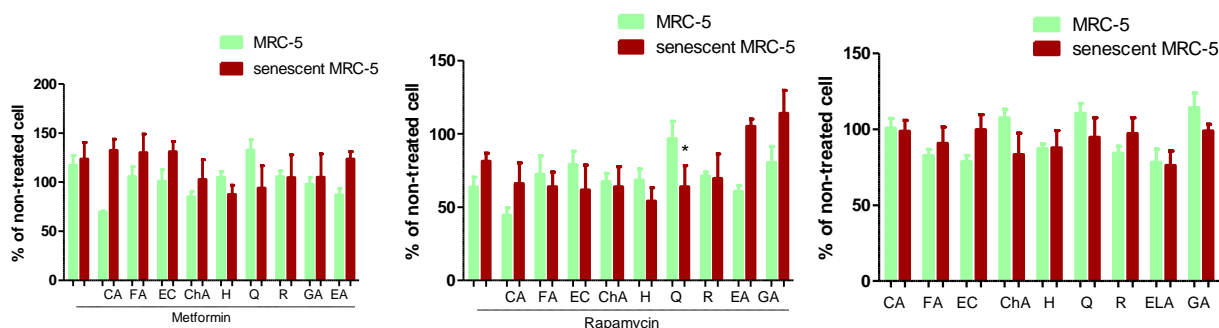


Figura 5. Viabilidade celular após 24 horas de incubação com combinações de fármacos e polifenóis. na linhagem MRC-5 jovem e senescente. As barras representam a média e EPM de 2 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado às células jovens com as células senescentes.

4.4. Avaliação das combinações de fármacos e polifenóis na produção de interleucinas associadas ao SASP

A avaliação da produção de IL-6, considerada o principal marcador de SASP, mostrou que a metformina de forma isolada apresentou atividade inibitória. A combinação da metformina com o ácido cafeico (CA) apresentou efeito inibitório

maior que o observado para a metformina isolada (Figura 6). A rapamicina não foi capaz de inibir a produção de IL-6 nas células senescentes de forma isolada, somente quando combinada ao ácido caféico (CA) (Figura 6).

A produção de IL-1 β não foi inibida pela metformina de forma isolada ou combinada aos polifenóis (Figura 7). A rapamicina foi capaz de inibir a produção de IL-1 β nas células senescentes de forma isolada, mas nenhum polifenol mostrou efeito inibitório aditivo (Figura 7).

E finalmente, a avaliação da produção de IL-8 mostrou que a metformina de forma isolada apresentou atividade inibitória. A combinação da metformina com o ácido caféico (CA), epicatequina (Epi), ácido clorogênico (ChA) e ácido gálico (GA) apresentou efeito inibitório maior que o observado para a metformina isolada (Figura 8). A rapamicina não foi capaz de inibir a produção de IL-8 nas células senescentes de forma isolada, somente quando combinada ao ácido caféico (CA), epicatequina (Epi), ácido clorogênico (ChA), hesperidina (H) e resveratrol (RSV) (Figura 8).

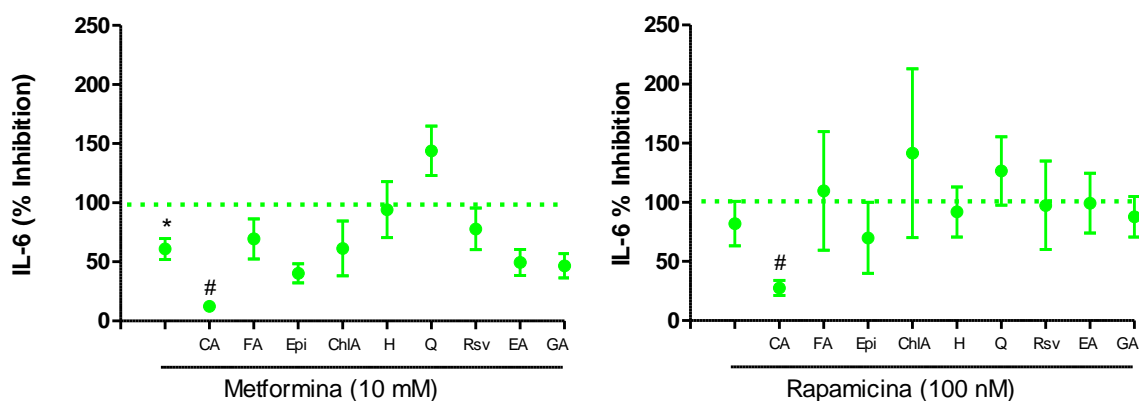


Figura 6. Inibição da produção de interleucina-6 (IL-6) pelas MRC-5 senescentes após 24 horas de incubação com combinações de fármacos e polifenóis. Os pontos representam média e EPM de 2 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$

quando comparado ao controle senescente (traço) e # $p < 0.05$ quando comparado ao fármaco isolado.

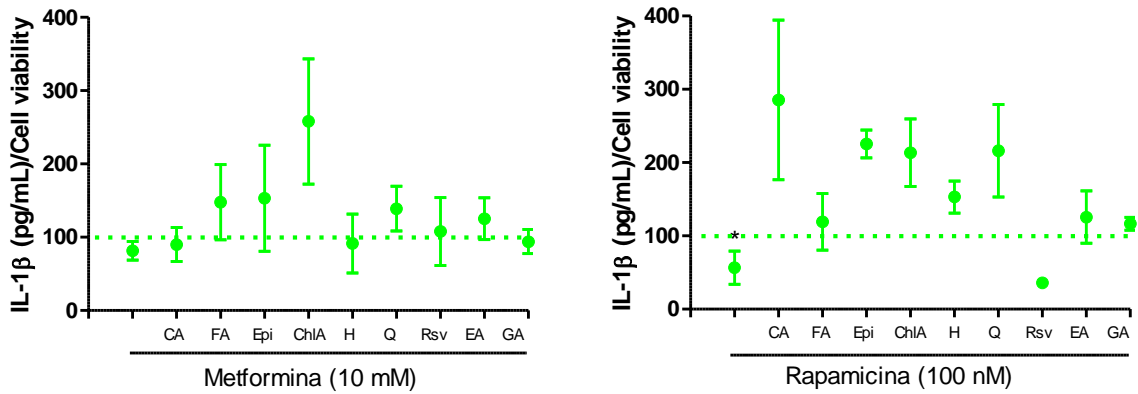


Figura 7. Inibição da produção de interleucina-1 β (IL-1 β) pelas MRC-5 senescentes após 24 horas de incubação com combinações de fármacos e polifenóis. Os pontos representam média e EPM de 2 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado ao controle senescente (traço) e # $p < 0.05$ quando comparado ao fármaco isolado.

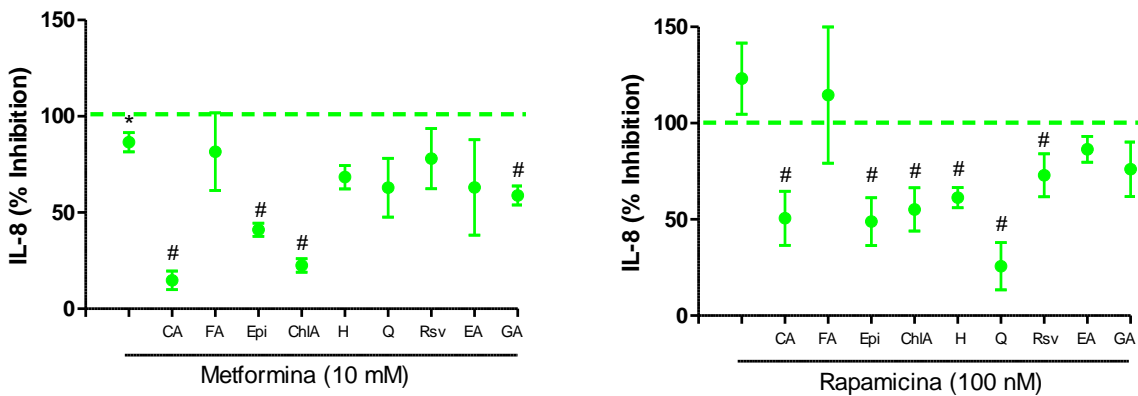


Figura 8. Inibição da produção de interleucina-8 (IL-8) pelas MRC-5 senescentes após 24 horas de incubação com combinações de fármacos e polifenóis. Os pontos representam média e EPM de 1 experimento realizado em triplicata. * $p < 0.05$ quando comparado ao controle senescente (traço) e # $p < 0.05$ quando comparado ao fármaco isolado.

5. DISCUSSÃO

As células senescentes se acumulam nos tecidos com o envelhecimento e participam da maior parte das doenças associadas ao envelhecimento cronológico ou às alterações cardiometabólicas. Neste trabalho empregamos um modelo de indução de senescência *in vitro* com a doxorubicina, pois a senescência pode ser induzida pela constante divisão celular (senescência replicativa) ou induzida por substâncias químicas, como o fármaco doxorubicina.

Para MEREDITH e DASS (2016) foi demonstrado que a administração de doxorubicina causa disfunção respiratória nas mitocôndrias através da produção de espécies reativas de oxigênio, e o dano subsequente às células pode levar à morte celular por apoptose ou a senescência. Em um estudo realizado por WANG et al. (2021), senescência induzida por doxorubicina foi usada para avaliar o papel regulatório da proteína B7-H3. Neste estudo a doxorubicina foi usada na concentração de 100 nM para células HCT116 e 50 nM para células RKO, considerada baixa dose, mas que na ausência da proteína B7-H3 foram capazes de induzir senescência celular. Em células MRC-5, a dose de 100 nM foi empregada na indução da senescência, resultando em cerca de 70% de células positivas para a β -galactosidase. Mas até 200 nM não foi observado perda de viabilidade nas MRC-5 expostas a doxorubicina (DI HAN *et al.*, 2023). No presente estudo foi demonstrado que o tratamento com a maior concentração de doxorubicina, ou seja, 1,5 μ M em uma avaliação após 20 dias produziu os melhores resultados, pois foi observado uma baixa capacidade proliferativa das células quando comparada ao controle e mais de 80% de células positivas para β -galactosidase, associada a um efeito citotóxico inicial.

Desta forma, empregando células senescentes por doxorubicina avaliamos o potencial de fármacos e polifenóis como senoterapêuticos. As drogas senolíticas são responsáveis por desativar as vias anti – apoptóticas das células senescentes, causando a apoptose das mesmas, retardando, aliviando ou prevenindo diversas doenças crônicas (KIRKLAND; TCHKONIA, 2020). As drogas senostáticas, por sua

vez, são responsáveis por bloquear a secreção de diferentes substâncias pelas células senescentes, que caracterizam o SASP ou inibir e reverter o desenvolvimento das células senescentes (DÍAZ *et al.*, 2022).

A quercetina e desatinibe, é uma combinação senolítica, vem demonstrando resultados promissores na segurança em diversos ensaios clínicos que tem como alvo doenças associadas à senescência celular (NAMBIAR *et al.*, 2023; GONZALEZ *et al.*, 2023). Estes estudos clínicos ainda não foram realizados com senostáticos, embora a metformina apresente efeitos antienvhecimento quando usada como fármaco anti-diabético (MATSUBAYASHI *et al.*, 2023)

No estudo realizado por MASADEH *et al.* (2021) o perfil de segurança da metformina foi avaliado em linhagem celular de mamíferos VERO mas associada a diferentes antimicrobianos. A concentração de 100 mM não foi tóxica para células de mamíferos mesmo associada aos antimicrobianos em concentração inibitória para o crescimento bacteriano. Em células MRC-5 foi calculado o IC50 para a metformina de 1.74 ± 0.02 mM (O'Brien *et al.*, 2015). No presente estudo fizemos a avaliação inicial da toxicidade em linhagens de fibroblastos pulmonares MRC-5. Foi avaliado que somente a maior concentração do fármaco metformina, ou seja, 50 mM foi tóxico para as células controle. A rapamicina na concentração de 100 nM foi empregada em trabalho in vitro com a MRC-5 exposta ao veneno paraquat revertendo sua toxicidade (VONGPHOUTTHA *et al.*, 2018). Em nosso trabalho somente a concentração de 200 nM de rapamicina mostrou toxicidade em MRC-5, sendo condizente com o estudo anterior.

Para ZONARI *et al.* (2022) os senoterapêuticos possuem capacidade de tratar diversas doenças relacionadas a idade, diminuindo a senescência celular, mas atualmente poucas moléculas senoterapêuticas foram descritas, entre elas temos as sintéticas e naturais. Descrevendo que os senoterapêuticos naturais possuem baixa toxicidade, porém exercem menos efeitos benéficos. E que os senolíticos sintéticos, apresentam mais efeitos benéficos, porém possuem maior potencial de toxicidade, a combinação destes pode ser uma alternativa. Os polifenóis também possuem diversas atividades sendo conhecidos como bioativos naturais, como atividade antioxidante, propriedades antitumorais, de eliminação de radicais livres, anti-inflamatória, antimicrobiana e mais recentemente tem se destacado dentro do

cenário de senoterapêuticos. Diversos são os fitoquímicos polifenólicos capazes de reduzir os efeitos do envelhecimento. Destaque tem sido dada para a quercetina, pelo seu potencial senolítico (OZSOY *et al.*, 2020). Atualmente há estudos baseado em evidências de que o uso tópico ou a ingestão oral de algumas plantas ricas em polifenóis pode prevenir ou reduzir, entre outras, condições indesejáveis de envelhecimento da pele (CSEKES; RACKOVA, 2021). O efeito antiinflamatório dos flavonóides apigenina, quercetina, kaempferol, naringenina e wogonina foi testado em fibroblastos do prepúcio humano com senescência induzida pela bleomicina. Neste estudo, todos os flavonóides, exceto a naringenina, inibiram significativamente a secreção dos citocinas como a IL-6, IL-8 e IL-1 β (CSEKES; RACKOVA, 2021).

No presente estudo foi analisado um conjunto de polifenóis que não mostraram toxicidade na linhagem MRC-5 de forma isolada ou combinada com os fármacos sintéticos metformina e rapamicina. Também foi avaliado no presente estudo se a combinação de fármacos e polifenóis era capaz de inibir a produção de interleucinas relacionadas à SASP e apresentaram resultados promissores na inibição dos marcadores SASP IL-6, IL-8 e IL-1 β , tanto na forma isolada quanto combinada. Mas a combinação que mostrou efeito aditivo mais consistente foi da metformina com o ácido cafeico ao inibir a IL-6 e a IL-8. Vários constituintes vegetais se mostraram capazes de causar inibição considerável da produção de IL-6 como o cafeato de metila. O cafeato de metila regulou negativamente fatores SASP, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, CXCL1, MCP-2 e MMP-3 sem afetar os níveis de expressão dos marcadores de senescência, p21 ou pRb. O ácido cafeico foi capaz de inibir a expressão de IL-6 em cerca de 20% em fibroblastos senescentes (LIM *et al.*, 2017). A metformina de forma isolada também foi descrita como capaz de inibir a produção de IL-6 em camundongos idosos SONG *et al.*, (2022). Entretanto em outro trabalho, a metformina administrada a camundongos foi capaz de inibir a expressão de P53, P21 e P16 associadas ao envelhecimento, assim como aumentar a expressão de sistemas antioxidantes, mas não foi capaz de inibir de forma significativa *in vivo* a expressão de marcadores do SASP TNF- α , IL-1 β e IL-6 no fígado dos camundongos velhos (KANG *et al.*, 2021). Até o momento nenhum trabalho avaliou estes compostos de forma combinada e estamos sugerindo que a adição do ácido cafeico à metformina pode ser uma estratégia promissora de

controle da inflamação associada ao envelhecimento. Se essa combinação de metformina e ácido cafeico controla outros marcadores da senescência celular também precisa ser estudado futuramente. O uso combinado de fármacos em abordagens terapêuticas é sempre positivo quando estes apresentam diferentes mecanismos de ação. O ácido cafeico apresenta atividade antioxidante e capacidade de inibição de metaloproteases de matriz (MMP-2 e MMP-9) (ESPINDOLA *et al.*, 2019), atividade antiinflamatória por inibição da via NF-κB e da produção de citocinas inflamatórias (EHTIATI *et al.*, 2023). A metformina por sua vez, parece inibir a via NF-Kb por mecanismos dependentes e independentes de seu principal mecanismo de ação que é a ativação de AMPK (SAISHO, 2015). Considerando ainda o perfil de segurança para o uso da metformina e do ácido cafeico em humanos, esse trabalho deve encorajar que testes pré-clínicos e clínicos sejam feitos para validar nossa hipótese de que a combinação pode controlar a inflamação associada à senescência.

6. CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados nesse estudo foi possível obter as seguintes conclusões:

Na linhagem MRC-5 de fibroblastos pulmonares, apenas as maiores concentrações de Metformina e Rapamicina apresentaram potencial citotóxico. Foi possível determinar concentrações não-tóxicas dos fármacos, dos polifenóis e de suas combinações. A padronização do modelo de senescência avaliado pelo fármaco doxorubicina, obteve melhores resultados em maior concentração e no prazo de 20 dias. Apresentando 80% de células positivas para β -galactosidase e produção de maiores níveis de IL-6, principal citocina presente no SASP. A metformina combinada com o ácido caféico, apresentou efeito inibitório maior que o observado para a metformina isolada para produção de IL-6. A rapamicina apresentou efeito inibitório sobre IL-6 apenas quando combinada ao ácido cafeico. A metformina não foi capaz de inibir a produção de IL-1 β , já a rapamicina apresentou inibição para produção de IL-1 β de forma isolada. Quando combinada ao ácido caféico (CA), epicatequina (Epi), ácido clorogênico (ChA) e ácido gálico (GA), a metformina apresentou maiores efeitos inibitórios para produção de IL-8. A rapamicina somente foi capaz de inibir a produção de IL-8 quando combinada ao ácido caféico (CA), epicatequina (Epi), ácido clorogênico (ChA), hesperidina (H) e resveratrol (RSV). Considerando que a IL-6 é apontada como principal citocina associada ao SASP e que de forma consistente a combinação de metformina e ácido cafeico foz capaz de inibir IL-6 e também IL-8, esta combinação parece apresentar o maior potencial senostático em fibroblastos de pulmão com senescência induzida por doxorubicina.

7. REFERÊNCIAS

O'BRIEN A. *et al.* Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells ex vivo through inhibition of de novo lipogenesis. **Biochem J**, 469 (2), 177-87, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25940306/>. Acessado em: 5/11/2023.

BECK J; HORIKAWA I; HARRIS C. Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models. **Vet Pathol**, 57 (6), 747-757, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744147/>. Acessado em: 04/04/2022.

BLAGOSKONNY M. V. Cancer prevention with rapamycin. **ONCOTARGET**, 14, 342–350, 2023. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10103596/>. Acessado em: 01/09/2023.

CAMPISI J. Aging, cellular senescence and câncer. **PMC**, 75, 685-705, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166529/>. Acessado em: 12/04/2022.

CHEN D. *et al.* Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo. **Cell Death Dis**, 7 (10), e2441, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27787519/>. Acessado em: 05/05/2022.

CHEN, Q. M; MERRETT, J. L. J.B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. **Biochem J**, 347(Pt 2), 543-51, April 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10749685/>. Acessado em: 17/03/2022.

CHUNG C. L. *et al.* Topical rapamycin reduces markers of senescence and aging in human skin: an exploratory, prospective, randomized trial. **GeroScience**, 41 (6), 861–869, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6925069/>. Acessado em: 05/09/2023.

CHUNG C. L. Topical rapamycin reduces markers of senescence and aging in human skin: an exploratory prospective, randomized trial. **GeroScience**, 41 (6), 861–869, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6925069/>. Acessado em: 01/06/2022.

CSEKES E, RACKOVA L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **Int J Mol Sci**, 22 (23), 12641, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657738/>. Acessado em: 10/07/2023.

CSEKES E; RACKOVA L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **Int J Mol Sci**, 22 (23), 12641, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884444/>. Acessado em: 05/05/2022.

DÍAZ L. S *et al.* Senotherapeutics in Cancer and HIV. **Cells**, 11 (7), 1222, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8997781/>. Acessado em: 22/04/2022.

EHTIATI P. *et al.* Promising influences of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against natural and chemical toxins: A comprehensive and mechanistic review. **Journal of Function Foods**, 107, 105637, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464623002372>. Acessado em: 26/11/2023.

ESPÍNDOLA K. M. M. *et al.* Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. **Front Oncol**, 21(9), 541, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31293975/>. Acessado em: 18/11/2023.

FIELDER E. *et al.* Short senolytic or senostatic interventions rescue progression of radiation – induced frailty and premature ageing in mice. **Elife**, 4 (11), 75492, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35507395/>.

FRASCA D. *et al.* Metformin Enhances B Cell Function and Antibody Responses of Elderly Individuals With Type – 2 Diabetes Mellitus. **Front Aging**, 2, 715981, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9261392/>. Acessado em: 25/05/2022.

GERDES E. O. W. *et al.* Strategies for Late Phase Preclinical and Early Clinical Trials of Senolytics. **Mech Ageing Dev**, 200, 11591, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8627448/>. Acessado em: 10/06/2022.

GONZALES M. M. *et al.* Senolytic therapy in mild Alzheimer's disease: a phase 1 feasibility trial. **Nat Med**, 29 (10), 2481-2488, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37679434/>. Acessado em: 30/10/2023.

GONZALEZ F. H. *et al.* Cellular Senescence in Lung Fibrosis. **Int J Mol Sci**, 22 (13), 7012, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8267738/>. Acessado em: 05/06/2022.

HAN D. *et al.* Hesperidin inhibits lung fibroblast senescence via IL-6/STAT3 signaling pathway to suppress pulmonary fibrosis. **Phytomedicine**, 112, 154680, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36736168/>. Acessado em: 20/10/2023.

HARLEY C. B; FUTCHER A. B; GREIDER C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, 345 (6274), 458- 60, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2342578/>. Acessado em: 13/04/2022.

HAYFLICK L. The Limited in Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains. **Exp Cell Res**, 37, 614-36, 1965. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14315085/>. Acessado em: 11/04/2022.

HICKSON L. J, LANGHI PRATA L. G. P, BOBART S. A. *et al.* Os senolíticos diminuem as células senescentes em humanos: relatório preliminar de um ensaio clínico de Dasatinib mais quercetina em indivíduos com doença renal diabética. **EBioMedicine**, 47, 446–56, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6796530/>. Acessado em: 10/06/2022.

HU L. *et al.* Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: Na Insight for senolytic Development. **Front Cell Dev Biol**, 16 (10), 822816, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35252191/> . Acessado em: 28/03/2022.

HUANG W. *et al.* Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. **Nat Rev Nephrol**, 18 (10), 611 – 627, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35922662/>. Acessado em: 27/04/2022.

JUSTIÇA J. N, NAMBIAR A. M, TCHKONIA T. *et al.* Senolíticos na fibrose pulmonar idiopática: resultados de um primeiro estudo piloto aberto em humanos. **EBioMed**, 40, 554–63, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6412088/>. Acessado em: 15/06/2022.

KIRKLAND J. L; TCHKONIA T. Senolytic drugs: from Discovery to translation. **J intern Med**, 288 (5), 518-536, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32686219/>. Acessado em: 20/04/2022.

KUDLOVA N. *et al.* Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. **Int J Mol Sci**, 23 (8), 4168, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9028163/>. Acessado em: 12/05/2022.

KUMARI R; JAT P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Front Cell Dev Biol**, 29 (9), 645593, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33855023/>. Acessado em: 24/03/2022.

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**, 40 (4), 524-535, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28299617/>. Acessado em: 26/10/2023.

LIU R. M. Aging, Cellular Senescence and Alzheimer's Disease. **PMC**, 23 (4), 1989, 2022 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8874507/>. Acessado em: 08/04/2022.

LUCAS V; CAVADAS C; AVELEIRA C. A. cellular senescence: from mechanisms to current biomarkers and senotherapies. **Pharmacol rev**, 75 (2), 2022-000622, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36732079/>. Acessado em: 20/03/2022.

MASADEH M. M. *et al.* Metformin as a Potential Adjuvant Antimicrobial Agent Against Multidrug Resistant Bacteria. **Clin Pharmacol**, 13, 83–90, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8123943/>. Acessado em: 1/08/2023.

MASADEH M. M. *et al.* Metformin as a Potential Adjuvant Antimicrobial Agent Against Multidrug Resistant Bacteria. **Clin Pharmacol**, 13, 83-90, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8123943/>. Acessado em: 15/10/2023.

MATSUBAYASHI S. *et al.* Drugs against metabolic diseases as potential senotherapeutics for aging-related respiratory diseases. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3 (14), 1079626, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37077349/>. Acessado em: 1/11/2023.

MEREDITH A. M; DASS C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **J Pharm Pharmacol**, 68(6), 729-41, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26989862/>. Acessado em: 20/08/2023.

MURAKAMI A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. **Elsevier**, 557, 3-10, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986114001490?via%3Dihub>. Acessado em: 28/10/2023.

MUSI N, VALENTINE J. M, SICKORA K. R. *et al.* A agregação da proteína Tau está associada à senescência celular no cérebro. **Célula Envelhecimento**, 17 (6), e12840, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6260915/>. 1/06/2022.

NAMBIAR A. *et al.* Senolytics dasatinib and quercetin in idiopathic pulmonary fibrosis: results of a phase I, single-blind, single-center, randomized, placebo-controlled pilot trial on feasibility and tolerability. **EBioMedicine**, 90, 104481, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36857968/>. Acessado em: 28/10/2023.

OZSOY S. *et al.* Quercetin – Mediated Apoptosis and Cellular Senescence in Human Colon Cancer. **Anticancer Agents Med Chem**, 20 (11), 1387-1396, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32268873/>. Acessado em: 10/05/2022.

PALMER A. K, GUSTAFSON B, KIRKLAND J. L, Smith U. Senescência celular: no nexo entre envelhecimento e diabetes. **Diabetologia**, 62 (10), 1835–1841, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6731336/>. Acessado em: 25/05/2022.

PALMER A. K, XU M, ZHU Y *et al.* O direcionamento de células senescentes alivia a disfunção metabólica induzida pela obesidade. **Célula Envelhecimento**, 18 (3), e12950, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6516193/>. Acessado em: 20/04/2022.

PYO I. S. *et al.* Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age- Related Diseases. *Molecules*, 25 (10), 4649, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33053864/>. Acessado em: 25/04/2022.

RAYESS H, WANG M. B, SRIVATSAN E. S. Cellular senescence and tumor supressor gene p16. *PMC*, 13 (8), 1715- 25, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288293/>. Acessado em: 15/04/2022.

REGULSKI M. J. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*, 29 (6), 168-174, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28682291/>. Acessado: 25/04/2022.

ROGER L; TOMAS F; GIRE V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *PMC*, 22 (23), 13173, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884978/>. Acessado em: 15/03/2022.

ROOS C. M, ZHANG B, PALMER A. K. *et al.* O tratamento senolítico crônico alivia a disfunção vasomotora estabelecida em camundongos idosos ou ateroscleróticos. *Aging Cell*, 15 (5), 973–977, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013022/>. Acessado em: 17/05/2022.

ROSS C. M. *et al.* Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15 (5), 973–977, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013022/>. Acessado em: 03/09/2023.

SAISHO Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 15 (3), 196-205, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25772174/>. Acessado em: 20/11/2023.

SONG H. *et al.* Metformin attenuated sepsis-associated liver injury and inflammatory response in aged mice. *Bioengineered*, 13 (2), 4598-4609, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35156512/>. Acessado em: 12/11/2023.

VONGPHOUTTHA C. *et al.* Rapamycin protects against paraquat-induced pulmonary epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Exp Ther Med*, 15(3), 3045-3051, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29599839/>. Acessado em: 10/11/2023.

WANG R. *et al.* B7-H3 suppresses doxorubicin-induced senescence-like growth arrest in colorectal cancer through the AKT/TM4SF1/SIRT1 pathway. *Cell Death Dis*, 12 (5), 453, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8102521/>. Acessado em: 25/09/2023.

ZHANG S. *et al.* Roflumilast Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Targeting Inflammation and Cellular Senescence in Cardiomyocytes Mediated by

SIRT1. **Drug Des Devel Ther**, 15, 87-97, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7810683/>. Acessado em: 03/10/2023.

ZHU Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. **Aging Cell**, 15 (3), 428–435, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4854923/>. Acessado em: 01/09/2023.

ZONARI A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* toxicity assessment of the senotherapeutic Peptide 14. **Toxicol Rep**, 9, 1632–1638, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9742937/>. Acessado em: 15/09/2023.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
Programa de Pós Graduação em Ciência da Saúde

ATA COMPLEMENTAR

Título: **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SENOSTÁTICO DE COMBINAÇÕES DE FÁRMACOS E POLIFENÓIS**
Autor(a): **BÁRBARA HAKIM DE MORAES** RA: 22007219
Orientador: **DR ALESSANDRA GAMBERO**
Membros da Banca:
Membro interno: DR(A) AUGUSTO ETCHEGARAY JUNIOR
Membro externo: DR(A) CÍNTIA RABELO E PAIVA CARIA

Mudança de título? Sim Não

Se sim, especificar o novo título: _____

Mudanças relevantes exigidas no corpo? Sim Não

Especificar: Evitar a repetição da introdução na discussão.
Complementar a metodologia e corrigir erros
gramaticais. Acrescentar figuras no texto.

Como zelo às boas práticas de pesquisa e em atendimento ao Regimento do Programa de Pós Graduação em Ciência da Saúde, o relatório de similaridade relativo ao exemplar da Dissertação foi devidamente analisado pelo orientador, utilizando-se o instrumento recomendado pela Instituição?

Sim Não

O orientador verificará se as mudanças foram efetivadas e informará a Secretaria quanto à aceitabilidade para depósito definitivo dos exemplares.

Campinas, 18 de dezembro de 2023.

Presidente: Gambero

Membro: Augusto Etchegaray

Membro: Barbára

A candidata terá até 30 dias para o depósito da versão definitiva da dissertação, comprometendo-se a pagar as mensalidades referentes à orientação de dissertação, até que o processo de homologação do título de Mestre esteja concluído.

Campinas, 18 de dezembro de 2023.

Ciência do candidato: Barbára HM