



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PADRÕES DE IMUNOEXPRESSÕES DE LAMINA B1 E B-GALACTOSIDASE  
DURANTE O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO INTRÍNSECO HUMANO**

**Tamsin Arabella Burgues**

**Rio de Janeiro**

**2025**

**PADRÕES DE IMUNOEXPRESSÃO DA LAMINA B1 E DA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE DURANTE O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO  
INTRÍNSECO HUMANO**

Tamsin Arabella Burgues

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Cirúrgicas, Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientadores:

Professora Doutora Christina Maeda  
Takiya

Professor Doutor César Silveira  
Cláudio-da-Silva

Doutor Chang Yung Chia

Rio de Janeiro  
2025

**PADRÕES DE IMUNOEXPRESSÃO DA LAMINA B1 E DA  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE DURANTE O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO  
INTRÍNSECO HUMANO**

Tamsin Arabella Burgues

Orientadores: Professora Doutora Christina Maeda Takiya  
Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva  
Doutor Chang Yung Chia

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Christina Maeda Takiya

Professora Doutora Sueli Coelho da Silva Carneiro

Professor Doutor Leandro Miranda Alves

Professor Doutor Wagner Baetas da Cruz (Suplente)

Rio de Janeiro  
2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

Burgues, Tamsin Arabella

Padrões de imunoexpressão da lamina b1 e da  $\beta$ -galactosidase durante o envelhecimento cutâneo intrínseco humano / Tamsin Arabella Burgues, 2025

Orientadores: Profa. Dra. Christina Maeda Takiya, Prof. Dr. César Silveira Cláudio-da-Silva e Dr. Chang Yung Chia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas, 2020.

Referências bibliográficas: f.47-65.

1. Envelhecimento 2. Envelhecimento Intrínseco 3. Pele 4. Senescência 5. Humanos – Dissertação. I. Takiya, Christina Maeda. II. Cláudio-da-Silva. III. Chang, . IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação Em Medicina (Ciências Cirúrgicas). V. Título

## **AGRADECIIMENTOS**

Gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação às seguintes pessoas: Professora Doutora Christina Maeda Takiya, Doutor Chang Yung Chia e o Professor Doutor José Eduardo Ferreira Manso:

A Professora Christina, a minha profunda gratidão pelo seu incentivo, apoio e o seu valioso ensinamento em histopatologia.

Ao meu orientador e mestre Professor Chang pelo ensinamento, apoio e orientação.

Ao Professor José Eduardo Ferreira Manso pelo apoio incondicional.

Gostaria agradecer a Leila pela sua ajuda sempre que eu precisava e os outros professores da Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas.

Gostaria de também agradecer a Professores Doutores Jarlene Alecia Assis, a Carla Medeiros da Silva e o Rodrigo Fortunato pelo seu trabalho no laboratório.

Minha família e meus amigos por sempre me apoiar. Minha gratidão a Deus por ter sido meu guia e luz durante este percurso. Gostaria de agradecer a Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade de estudar e realizar um mestrado em Ciências Cirúrgicas.

Gostaria de agradecer as pacientes que concordaram em fazer parte deste estudo.

## **RESUMO**

### **PADRÕES DE IMUNOEXPRESSÃO DA LAMINA B1 E DA $\beta$ -GALACTOSIDASE DURANTE O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO INTRÍNSECO HUMANO**

Tamsin Arabella Burgues

Orientadores: Professora Doutora Christina Maeda Takiya  
Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva  
Doutor Chang Yung Chia

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina.

BURGUES, T. Padrões da imunoexpressão da lamina B1 e da  $\beta$ -galactosidase durante o envelhecimento cutâneo intrínseco em humanos. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

O envelhecimento cutâneo é um processo multifatorial caracterizado pela mudança na funcionalidade da pele, e diretamente associado a uma regulação negativa do metabolismo, da expressão gênica, exaustão de células-tronco, disfunção na comunicação intercelular e a senescência celular. Células senescentes são incapazes de se dividir, mas são metabolicamente ativas. Elas se acumulam na pele durante o envelhecimento extrínseco, sendo pouco conhecido sua presença no envelhecimento intrínseco da pele. Vários biomarcadores tem sido utilizados para a detecção das células senescentes, dentre eles, a  $\beta$ -galactosidase associada à senescência, níveis elevados dos inibidores do ciclo celular p21WAF1 e p16INK4A, HMGB1, remodelamento da cromatina, lesão do DNA e a expressão diminuída da lamina B1, componente estrutural da membrana nuclear. Estes biomarcadores não são específicos para senescência, recomendando-se a demonstração de mais de dois biomarcadores. Este estudo tem como objetivo a demonstração da lamina B1 e  $\beta$ -galactosidase na epiderme humana durante o envelhecimento intrínseco, através da imunohistoquímica e quantificados. As amostras de pele de região protegida da luz solar foram obtidas de pele remanescente de cirurgia estética da mama, oriundas de mulheres saudáveis, sem história de exposição frequente à luz solar, ou tabagismo, uso de hormônios e IMC > 28. As 35 amostras foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a idade (grupo I: 18-29 anos, n=12; grupo II: 30-49 anos, n=13; grupo III: 50-70 anos, n=10). O estudo foi aprovado

pelo comitê de ética em pesquisa da instituição, registro de no. 4.118.956. Cortes histológicos obtidos de blocos de parafina e corados com hematoxilina-eosina (HE) foram utilizados para a definição da pele envelhecida; os parâmetros: espessura da epiderme e o índice de interdigitação (achatamento da borda inferior da junção dermo-epidérmica) foram obtidos. Foi realizada a técnica de imunofluorescência indireta nos cortes parafinados utilizando o anticorpo anti-lamina B1 e  $\beta$ -galactosidase, ambos, anticorpos policlonais (coelho), revelados com o anticorpo secundário conjugado com Cy3. Lamina B1 está presente na membrana nuclear de células da epiderme, com intensidades variadas, avaliadas através de escore histológico numérico (0 – 3), onde 3 representa a marcação intensa em toda a membrana nuclear; 2 representa marcação moderada em toda a membrana e 1, marcação leve da membrana nuclear. Os cortes histológicos demonstram haver um declínio progressivo da espessura da epiderme com achatamento da junção dermo-epidérmica, progressivos e significantes com o envelhecimento intrínseco. A  $\beta$ -galactosidase está presente no citoplasma (lisossomos) de células da epiderme. Com o envelhecimento houve aumento significativo do número de células com escore 1 e diminuição significativa do número de células com escore 2 e 3 na epiderme. O percentual de células  $\beta$ -galactosidase+ aumentou, de forma significativa em células das camadas basal-suprabasal e espinhosa-granular da epiderme. Em conclusão, os dois biomarcadores utilizados, de forma semelhante à da literatura, foram capazes de evidenciar a presença de células senescentes durante o envelhecimento intrínseco, validando tanto o escore numérico da lamina B1 utilizado como o anticorpo contra a  $\beta$ -galactosidase para a detecção de células senescentes.

Palavra-chave: Pele; Senescências; Lâmina B1;  $\beta$ -galactosidase; Envelhecimento.

## ABSTRACT

### PATTERNS OF LAMIN B1 AND $\beta$ -GALACTOSIDASE IMMUNOEXPRESSIONS DURING HUMAN INTRINSIC CUTANEOUS AGING

Tamsin Arabella Burgues

Orientadores: Professora Doutora Christina Maeda Takiya  
Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva  
Doutor Chang Yung Chia

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina.

BURGUES, T. Patterns of lamin B1 and  $\beta$ -galactosidase immunoexpressions during human intrinsic cutaneous aging. Dissertation (Masters in Surgical Sciences)

Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2025.

Aging of the skin is a multifactorial process characterized by changes in skin functionality and is directly associated with downregulation of metabolism, gene expression, stem cell depletion, dysfunction in intercellular communication, and cellular senescence. Senescent cells are not capable of dividing but are metabolically active. They accumulate in the skin during extrinsic aging, and their presence in intrinsic skin aging is poorly understood. Several biomarkers have been used to detect senescent cells, including senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, elevated levels of cell cycle inhibitors p21WAF1 and p16INK4A, HMGB1, chromatin remodeling, DNA damage, and decreased expression of lamin B1, a structural component of the nuclear membrane. These biomarkers are not specific for senescence, and it is recommended to demonstrate more than two biomarkers. This study aims to demonstrate lamin B1 and  $\beta$ -galactosidase in human epidermis during intrinsic aging, through immunohistochemistry and quantification.

Skin samples from the sun-protected area were obtained from skin remnants after aesthetic breast surgery, from 35 volunteers (healthy women) with no history of frequent exposure to sunlight, or smoking, hormone use, and with BMI > 28. The volunteers were distributed into 3 groups according to age (group I: 18-29 years, n=12; group II: 30-49 years, n=13; group III: 50-70 years, n=10). The study was approved by the research ethics committee of the institution, registration no: 4.118.956.



Histological sections obtained from paraffin blocks and stained with hematoxylin-eosin (HE) were used to define aged skin; the following parameters were obtained: epidermal thickness and interdigitation index (flattening of the lower edge of the dermal-epidermal junction). Indirect immunofluorescence was performed on paraffin sections using anti-lamin B1 and beta-galactosidase antibodies, both polyclonal antibodies (rabbit), revealed with the secondary antibody conjugated with Cy3. Lamin B1 is present in the nuclear membrane of epidermal cells, with varying intensities, evaluated by means of a numerical histological score (0–3), where 3 represents intense staining throughout the nuclear membrane; 2 represents moderate staining throughout the membrane; and 1, mild staining of the nuclear membrane.

Histological sections demonstrate a progressive decline in epidermal thickness with flattening of the dermal-epidermal layer, progressive and significant with intrinsic aging.  $\beta$ -galactosidase is present in the cytoplasm (lysosomes) of epidermal cells. With aging, there was a significant increase in the number of cells with score 1 and a significant decrease in the number of cells with scores 2 and 3 in the epidermis. The percentage of  $\beta$ -galactosidase+ cells increased significantly in cells of the basal-suprabasal and spinous-granular layers of the epidermis. In conclusion, the two biomarkers used, similarly to those in the literature, were able to demonstrate the presence of senescent cells during intrinsic aging, validating both the numerical score of lamin B1 used and the antibody against  $\beta$ -galactosidase for the detection of senescent cells.

**Keywords:** Skin; Senescence; Lamin B1 ;  $\beta$ -galactosidase; Aging.

## SUMÁRIO

|         |                                                                                                      |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.      | INTRODUÇÃO.....                                                                                      | 1  |
| 1.1     | Fundamentação teórica.....                                                                           | 6  |
| 1.1.1   | Envelhecimento.....                                                                                  | 6  |
| 1.1.2   | Envelhecimento cutâneo.....                                                                          | 8  |
| 1.1.3   | Senescência celular.....                                                                             | 9  |
| 1.1.4   | Biomarcadores e características das células senescentes da pele.....                                 | 10 |
| 1.1.5   | Fenótipo secretor associado à senescência.....                                                       | 12 |
| 1.1.6   | Remodelação da lâmina nuclear.....                                                                   | 14 |
| 1.1.7   | Células senescentes nos diferentes compartimentos da pele...                                         | 17 |
| 1.1.8   | Senescência da derme.....                                                                            | 18 |
| 1.1.9   | Senescência da epiderme.....                                                                         | 19 |
| 2.      | OBJETIVO.....                                                                                        | 21 |
| 3.      | MÉTODO.....                                                                                          | 22 |
| 3.1     | Tipo de estudo.....                                                                                  | 22 |
| 3.2     | Considerações éticas.....                                                                            | 22 |
| 3.3     | População e recrutamento.....                                                                        | 22 |
| 3.3.1   | Critérios de elegibilidade.....                                                                      | 23 |
| 3.3.1.1 | Critérios de inclusão.....                                                                           | 23 |
| 3.3.1.2 | Critérios de exclusão.....                                                                           | 23 |
| 3.4     | Coleta e processamento das amostras de pele.....                                                     | 24 |
| 3.5     | Desenho do estudo.....                                                                               | 24 |
| 3.6     | Caracterização e quantificação dos parâmetros histológicos do envelhecimento cutâneo.....            | 24 |
| 3.7     | Espessura da epiderme.....                                                                           | 25 |
| 3.8     | Achatamento da junção dermo-epidérmica.....                                                          | 26 |
| 3.9     | Imunolocalização da lamina B1 e $\beta$ -galactosidase associada à senescência (s- $\beta$ gal)..... | 26 |
| 3.10    | Quantificação de Lamina B1 (pontuação histológica).....                                              | 28 |
| 3.11    | Quantificação de $\beta$ -galactosidase (%).....                                                     | 28 |
| 3.12    | Análise estatística.....                                                                             | 29 |
| 4.      | RESULTADOS.....                                                                                      | 30 |
| 5.      | DISCUSSÃO.....                                                                                       | 50 |
| 6.      | CONCLUSÃO.....                                                                                       | 55 |
| 7.      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                      | 56 |
| 8.      | ANEXO 1 & 2.....                                                                                     | 75 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

|                    |                                                 |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| 3D                 | Tridimensional                                  |
| ANOVA              | Analysis of variance                            |
| BSA                | Albumina sérica bovina                          |
| CAAE               | Certificado de Apresentação do Apreciação Ética |
| Col-7              | Colágeno tipo VII                               |
| CDKs               | Cyclin-dependent kinases                        |
| DJE                | Junção dermo-epidérmica                         |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid                           |
| DP                 | Desvio Padrão                                   |
| ECM                | Matriz extracelular                             |
| EMT                | Epitelial-mesenquimal                           |
| EUA                | Estados Unidos de América                       |
| HCA2               | Hydroxycarboxylic acid receptor 2               |
| HE                 | Hemotoxilina-Eosina                             |
| HMGB1              | High-Mobility Group Box 1                       |
| HUCFF              | Hospital Universitário Clementino Fraga Filho   |
| IBCCF              | Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho      |
| IL                 | Interleucina                                    |
| JDE                | Junção dermo-epidérmica                         |
| MEC                | Matriz extracelular                             |
| MIN                | Minute                                          |
| mM                 | Millimolar                                      |
| MMPs               | Matrix metalloproteinases                       |
| EN                 | Envelope nuclear                                |
| LN                 | Lâmina nuclear                                  |
| NH <sub>4</sub> Cl | Ammonium Chloride                               |
| NU                 | Nações Unidas                                   |
| PBS                | Phosphate-Buffered Saline                       |
| pH                 | Potential of hydrogen                           |
| ROS                | Reactive Oxygen Stress                          |
| SA- $\beta$ -gal   | Senescence Associated beta-galactosidase        |
| SASP               | Senescence-Associated Secretory Phenotype       |
| SD                 | Standard deviation                              |

|                |                                        |
|----------------|----------------------------------------|
| SOD            | Superóxido dismutase                   |
| TGF- $\beta$ 1 | Transforming Growth Factor-- $\beta$ 1 |
| TGF- $\beta$ 3 | Transforming Growth Factor- $\beta$ 3  |
| UV             | Radiação ultravioleta                  |
| UFRJ           | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| VEGF           | Vascular Endotelial Growth Factor      |
| $\beta$ -gal   | Beta-galactosidase                     |
| $\mu$ m        | Micrometer                             |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Histologia da pele (cortes corados pela HE) de indivíduo com 20 anos e indivíduo com 70 anos e representação gráfica dos resultados da espessura da epiderme e o achatamento da junção dermo-epidérmica.
- Figura 2 - Imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo com 18 anos (Grupo I) e sua quantificação.
- Figura 3 - Imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo do grupo II (40 anos) e sua quantificação. Representação gráfica da quantificação do escore 3 de lamina B1 entre os grupo de pacientes.
- Figura 4 - Imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo do grupo III (70 anos) e sua quantificação.
- Figura 5 - Representação gráfica da quantificação do escore 1 de lamina B1 entre os grupo de pacientes.
- Figura 6 - Representação gráfica da quantificação do escore 2 de lamina B1 entre os grupo de pacientes.
- Figura 7 - Representação gráfica da quantificação do escore 3 de lamina B1 entre os grupo de pacientes.
- Figura 8 - Imagens representativas da imunofluorescência para  $\beta$ -galactosidase em indivíduo do grupo I (19 anos), indivíduo do grupo II (35 anos) e em indivíduo do grupo III (760 anos), e controle negativo da reação.
- Figura 9 - Imagem representativa da imunofluorescência para  $\beta$ -galactosidase após a incubação do anticorpo secundário conjugado com Cy3, os cortes histológicos incubados com o corante nuclear Hoechst, e expressão gráfica dos resultados.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Atribuição de grupos de acordo com a idade do indivíduo

Tabela 2 - Dados demográficos

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é caracterizado pelo afinamento da estrutura da pele e alteração das suas funções tais como comprometimento da barreira física com prejuízo da homeostase hídrica e térmica, aumento da inflamação e maior suscetibilidade a vários distúrbios de pele, incluindo câncer (Velarde e Demaria, 2016). O envelhecimento cutâneo é um processo multifatorial e atualmente há um consenso de que o envelhecimento está diretamente associado à regulação negativa do metabolismo, padrões de expressão gênica, exaustão do pool de células-tronco, disfunção na comunicação intercelular e senescência celular (Di Micco et al., 2021; Schmeer et al., 2019). Além disso, o comprometimento, relacionado à idade, na sua capacidade redox resulta no acúmulo de ROS (Reactive Oxygen Stress) (Davalli et al., 2016; Hensley & Floyd, 2002), o que leva à disfunção celular devido ao efeito prejudicial sobre os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (Gniadecka et al., 1998; Gu et al., 2020). Em resposta a fatores de estresse, incluindo danos ao DNA, as células entram em um estado de parada irreversível do crescimento, que é chamado de senescência celular (Hayflick, 1965).

A senescência celular é considerada um mecanismo de defesa em resposta aos estímulos prejudiciais e desempenha um papel importante no processo de envelhecimento da pele (Fitsiou et al., 2021; Wlaschek et al., 2021; Kim et al., 2020; Gerasymchuk et al., 2022; Papaccio et al., 2022). Embora seja um mecanismo compensatório benéfico em resposta a danos celulares e estresse

no organismo envelhecido, a senescência pode se tornar prejudicial em combinação com exaustão de células progenitoras e/ou redução da renovação celular. (López-Otín et al., 2013; Sharpless & DePinho, 2007).

Atualmente, a senescência celular é considerada uma das marcas registradas do envelhecimento, contribuindo para o declínio da funcionalidade do tecido com a velhice (López-Otín et al., 2013). As células senescentes se acumulam na pele durante o envelhecimento (Dimri et al., 1995; Ressler et al., 2006; Waaijer et al., 2012) e, embora incapazes de se dividir, permanecem metabolicamente ativas. Elas exibem um secretoma alterado, denominado secreção liberada por algumas células senescentes, aquelas denominadas fenótipo secretor associado à senescência (SASP), que compreende citocinas pró-inflamatórias que alteram consideravelmente o microambiente da pele (Campisi, 2013).

As células senescentes da pele exibem os marcadores clássicos de senescência celular. A detecção da atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA $\beta$ -gal) continua sendo o padrão ouro para identificar células senescentes. No entanto, sua detecção é dificultada por uma série de desafios e obstáculos técnicos, como a incapacidade de detectar a atividade enzimática da SA $\beta$ -gal em amostras fixadas e atividade não específica em certos tipos de células e compartimentos de tecido (Dimri et al., 1995; Krishna et al., 1999; Lee et al., 2006).  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -gal) é um termo coletivo para enzimas que clivam resíduos de  $\beta$ -D-galactose não redutores em  $\beta$ -D-galactosídeos.  $\beta$ -gals são ativos contra uma ampla gama de substratos, como o queratano sulfato de



glicosaminoglicano, ácido contendo galactose, o núcleo proteoglicano de condroitina 4-sulfato e glicolipídios, como gangliosídeo GM1 e gangliosídeo asialo-GM1 (Gossrau et al., 1991).

O pH ótimo do  $\beta$ -gal lisossomal varia de 3 a 5 e é dependente de espécie, órgão, substrato e tampão e, portanto, é comumente chamado de  $\beta$ -gal ácido. Além disso, a atividade de  $\beta$ -gal em pH 6 é considerada inerente às células senescentes (Dimri et al., 1995; Thomas et al., 1998; Litaker et al., 1998; Mendez et al., 1998; Naasani et al., 1998; van der Loo et al., 1998) e, portanto, agora é comumente referida como b-galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$  gal). Existem duas formas de  $\beta$ -gal, uma forma lisossomal e a SA-b-gal; a diferenciação entre elas é baseada no pH (ótimo) no qual a reação de coloração química é realizada.

Como as células senescentes são células terminais, com parada do ciclo celular, reguladores do ciclo celular como p16INK4a, p21CIP1 e p53 (Collado e Serrano, 2010) têm sido comumente empregados para detectar células senescentes. Fibroblastos da pele humana após radiação ultravioleta regulam positivamente p16INK4a, p21CIP1 e p53 simultaneamente (Chen et al., 2008). As células senescentes positivas para p16INK4a acumulam-se em vários tecidos, incluindo a pele, de forma dependente da idade (Krishnamurthy et al., 2004; Michaloglou et al., 2005; Ressler et al., 2006; Coppé et al., 2011; Waaijer et al., 2012), bem como em algumas lesões pré-neoplásicas, incluindo nevos humanos benignos, ricos em melanócitos, causados por mutações ativadoras de N-RAS ou em seu alvo ajuante, BRAF (Michaloglou et al., 2005; Ivanov et al., 2013).

Além disso, níveis diminuídos da proteína nuclear não histona HMGB1, reorganização da cromatina, danos ao DNA, expressão diminuída da lâmina B1, um componente estrutural da lâmina nuclear (Ho & Dreesen, 2021; Wang & Dreesen, 2018) e focos de danos ao telômero também são considerados biomarcadores presentes em células senescentes da pele (Choi et al., 2020; Ryu et al., 2019; Victorelli et al., 2019; Waaijer et al., 2012). No entanto, todos esses biomarcadores não são específicos para a senescência.

Embora o número de células senescentes aumente durante o envelhecimento cronológico da pele humana (Dimri et al., 1995; Ressler et al., 2006; Waaijer et al., 2012; Dreesen et al., 2013a; Ghosh e Capell, 2016), a frequência de células senescentes na epiderme é baixa, mesmo quando a epiderme é constantemente exposta a estímulos prejudiciais (Idda et al., 2020; Ho & Dreesen, 2021). Uma explicação pode ser que o tempo de renovação dos queratinócitos ocorre ao longo de aproximadamente 20–28 dias. Devido a esse período limitado de vida dos queratinócitos, foi sugerido que não haveria tempo para o acúmulo de um pool duradouro de queratinócitos senescentes na pele (Bergstresser e Richard Taylor, 1977).

De fato, a proteína p16INK4a é indetectável em queratinócitos de pessoas jovens, mas o número de células positivas para p16INK4a aumenta com a idade nos compartimentos epidérmico e dérmico, e a expressão de p16INK4a se correlaciona diretamente com o envelhecimento cronológico da pele humana *in vivo* (Cordisco et al., 2010; Ressler et al., 2006). A proteína p16INK4a foi detectada em biópsias de pele humana de áreas expostas ao sol (Chung et al.,

2019; Yoon et al., 2018; Fitsiou et al., 2021), enquanto, em pessoas jovens, p16INK4a é indetectável em queratinócitos. Foi demonstrado que as células positivas para p16INK4a em tecidos de pele de áreas fotoprotegidas de doadores jovens e de idosos eram predominantemente melanócitos e não queratinócitos na camada epidérmica. (Freund et al., 2012; Waaijer et al., 2012, 2016, 2018; Pawlikowski et al., 2013) Além disso, marcadores de células senescentes como p16INK4a, lamina B1 e HMGB1 foram detectados em queratinócitos de ceratoses actínicas, lesões associadas a UV (Hodges & Smoller, 2002).

A senescência celular provoca uma remodelação dramática da lâmina nuclear, uma rede de proteínas localizada abaixo da membrana nuclear interna (Shimi et al., 2011; Freund et al., 2012; Dreesen et al., 2013a). A lamina B1, um filamento intermediário expresso em todas as células somáticas (Stewart e Burke, 1987; Hoger et al., 1988), é regulada negativamente em células em senescência in vitro (Shimi et al., 2011; Freund et al., 2012; Dreesen et al., 2013; Ivanov et al., 2013; Sadaie et al., 2013; Shah et al., 2013; Wang et al., 2017) e in vivo durante o envelhecimento cronológico da pele humana (Dreesen et al., 2013), em melanócitos senescentes dentro de nevus humanos (Ivanov et al., 2013), na epiderme da pele de camundongos exposta a UV (Wang et al., 2017), fígado de camundongos irradiados (Freund et al., 2012) e em rins de um modelo de camundongo com envelhecimento prematuro (Baar et al., 2017). Além disso, com base na imunoexpressão de lamina B1, alguns trabalhos mostram o acúmulo de células senescentes na epiderme humana (Dreesen et al., 2013), mas uma

caracterização mais detalhada da redução da lamina B1 na epiderme é necessária, conforme apontado por Wang & Dreesen (2018).

Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar com maior detalhe, in situ, o declínio da lamina B1 em células epidérmicas de pele humana protegida (envelhecimento intrínseco) em associação com a imunocoloração de  $\beta$ -galactosidase.

## **1.1 - Fundamentação Teórica**

### **1.1.1 - Envelhecimento**

A população mundial está envelhecendo rapidamente. Entre 1974 e 2024, a parcela mundial de pessoas com 65 anos quase dobrou, aumentando de 5,5% para 10,3%. Entre 2024 e 2074, haverá um incremento de quase um dobro, chegando a 20,7% (UN de *United Nations*), de acordo com projeções populacionais das Nações Unidas (UN de *United Nations*). Durante o mesmo período, o número de pessoas com 80 anos ou mais deverá aumentar mais de três vezes. Estima-se que 2,1 bilhões de pessoas ou, 1 em 6 terá a idade de 60 anos pelo ano de 2030 (Organização Mundial da Saúde, 2022). A maior proporção de idosos hoje está presente nos países desenvolvidos; porém estamos verificando que os países em desenvolvimento, também estão vivenciando uma rápida elevação da taxa de envelhecimento populacional (UN).

O envelhecimento é um processo inevitável da vida que culmina com o declínio funcional gradual do organismo além de resultar em um alto risco para o

desenvolvimento de doenças crônicas como a diabetes, câncer e doença cardíaca.

O envelhecimento cronológico é um processo biológico dependente do tempo que acarreta alterações graduais da estrutura e funções de todos os tecidos que compõem o organismo. Estas modificações tendem a diminuir a capacidade de resposta adaptativa e da reparação tecidual portanto aumenta a susceptibilidade para doenças e morte. O programa genético que determina a vida útil e o envelhecimento tem sido investigado em modelos animais, incluindo as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), vermes (*Caenorhabditis elegans*), insetos (*Drosophila melanogaster*) e mamíferos (*Mus musculus*) (Guarente & Kenyon, 2000). Nos humanos, doenças genéticas que apresentam sinais clínicos de envelhecimento precoce, como as síndromes progeroides são importantes fontes de informação para a identificação de efetores moleculares envolvidos no envelhecimento (Martin & Oshima, 2000).

Os estudos, em indivíduos centenários, têm demonstrado a importância de polimorfismos alélicos específicos para a predisposição de humanos para a longevidade ou resistência para desordens relacionadas ao envelhecimento (Capri et al., 2006). Além de fatores genéticos intrínsecos, o envelhecimento cronológico é controlado através de mecanismos epigenéticos, e é afetado por parâmetros ambientais incluindo a nutrição (Finch & Tanzi, 1997) o que indica que o envelhecimento é um processo biológico complexo, multifatorial.

### **1.1.2 - Envelhecimento cutâneo**

A pele é o maior e o mais exposto órgão do nosso corpo. Está continuamente exposto aos fatores ambientais como a radiação ultravioleta (UV), o fumo, calor e a poluição ambiental. Os danos consequentes a essas agressões são considerados de “envelhecimento extrínseco”. A pele também é submetida ao envelhecimento intrínseco ou cronológico. O processo de envelhecimento intrínseco pode ser considerado como o envelhecimento programado, que resulta da agressão continua ao núcleo por vários fatores, sendo o mais representativo o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). As células exibem um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (SOD), tripeptídeo glutatona e catalase (Steenvoorden & van Henegouwen, 1997). O comprometimento relacionado a idade da capacidade redox resulta no acúmulo de ROS, que tem efeito deletério aos componentes celulares como as proteínas, lipídeos e ao ADN resultando na disfunção celular (Gniadecka et al., 1998; Gu et al., 2020). As ROS geradas pelos fatores externos tais como a radiação UV e a poluição ambiental também tem papel significativo no envelhecimento extrínseco.

A pele envelhecida normalmente apresenta características que incluem rugas, flacidez, adelgaçamento e pigmentação aberrante (Ortonne, 1990; Ho and Dreesen, 2021). Embora essas características sejam comumente consideradas preocupações estéticas, elas significam uma deterioração subjacente na fisiologia e na função da pele (Ortonne, 1990). Como a pele consiste em uma população celular diversificada com interações complexas entre diferentes células

residentes, o mecanismo pelo qual diferentes tipos de células contribuem para várias manifestações do envelhecimento da pele permanece obscuro.

No envelhecimento da pele, há uma redução no número de fibroblastos e dos vasos que irrigam a pele (Castelo-Branco et al., 1992). A síntese de colágeno e elastina da pele diminui 1% a cada ano, levando à desorganização do tecido conjuntivo. Esta depleção de colágeno e elastina causa o desenvolvimento de rugas na pele na camada dérmica (Lovell et al., 1987). A pele exposta ao sol leva gradualmente à flacidez da pele. Isto leva à perda de fibrilas e colágeno tipo VII (Col-7) que retardam a ligação entre a epiderme e a derme, levando a uma pele extrinsecamente envelhecida (Curtis et al., 2005). O envelhecimento da pele pode ocorrer em qualquer camada da pele.

No entanto, há uma crescente quantidade de evidências que apontam para as células senescentes como um fator-chave do processo de envelhecimento em vários órgãos, incluindo a pele (Wang e Dreesen, 2018; Victorelli et al., 2019; Fitsiou et al., 2021; Low et al., 2021).

### **1.1.3 - Senescência celular**

O estado senescente pode ser caracterizado como uma parada irreversível do ciclo celular, associada à supressão de genes alvo E2F (Narita et al., 2003) que estão envolvidos na promoção da proliferação celular e na progressão do ciclo celular na fase S (Ren et al., 2002). As células senescentes são acompanhadas pela expressão de um fenótipo secretor associado à senescência (SASP) e por

um aumento da resistência à apoptose (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; He & Sharpless, 2017; Kuilman et al., 2010).

Após aproximadamente 40-60 duplicações populacionais (dependendo do tipo de célula), o comprimento dos telômeros atinge um limiar crítico que provoca uma ativação permanente dos pontos de verificação de vigilância de danos ao DNA e, por sua vez, induz a senescência celular replicativa (Fagagna et al., 2003). Está agora claro que, além do desgaste dos telômeros, as células também podem sofrer senescência em resposta a vários fatores, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e metabólica, bem como ativação oncogênica (Regulski, 2017; Wang e Dreesen, 2018).

Como tal, a senescência limita a proliferação de células danificadas, servindo assim como uma barreira para prevenir a proliferação descontrolada, como visto na neoplasia. O papel das células senescentes é extremamente dinâmico, variando de efeitos benéficos, como promover a inflamação durante a cicatrização de feridas e interromper o desenvolvimento do câncer, até papéis prejudiciais, como prejudicar o reparo e regeneração de tecidos, causando inflamação persistente e degradação da matriz extracelular (ECM) através do SASP (Andrade et al., 2022; Domen et al., 2022).

#### **1.1.4 - Biomarcadores e características das células senescentes da pele**

In vitro, as células senescentes podem ser identificadas pela sua morfologia distinta, como núcleo aumentado, tamanho celular aumentado e aparência achatada. Um fenótipo menos frequente é a presença de múltiplos



núcleos com vacúolos aumentados (Rhinn et al., 2019). Além destas alterações morfológicas, as células senescentes também apresentam um perfil molecular distinto que permite a sua detecção e quantificação. Por exemplo, as células senescentes aumentaram a atividade da beta-galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal) em pH 6,0 e aumentaram a massa lisossomal (Kurz et al., 2000; Coppé et al., 2008). SA- $\beta$ -gal é uma  $\beta$ -galactosidase lisossomal e um biomarcador comum de células senescentes (Dimri et al., 1995; Coppé et al., 2008; Sharpless & Sherr, 2015).

Embora a atividade de SA- $\beta$ -gal atinja o pico em pH 6,0, outras isoformas de  $\beta$ -gal expressas em células normais ou não senescentes exibem maior atividade enzimática em pH 4-4,5, permitindo assim a distinção entre células senescentes e não senescentes (Dimri et al., 1995).

No entanto, vários estudos relataram atividade inespecífica de SA- $\beta$ -gal em células não senescentes dentro de folículos capilares, glândulas sebáceas e écrinas, ductos na pele, lúmen do duodeno do intestino delgado in vivo, bem como em células confluentes in vitro (Dimri et al., 1995; Going et al., 2002). Além disso, baseado em SA- $\beta$ -gal a detecção de tipos de células senescentes pode ser desafiadora, embora não impossível, em tecidos criopreservados ou fixados, pois o ensaio requer atividade enzimática ativa, que muitas vezes é perdida após a fixação do tecido (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Jannone et al., 2020).

Por último, vale ressaltar que a atividade SA- $\beta$ -gal não é necessária para a indução da senescência, uma vez que os fibroblastos de pacientes sem  $\beta$ -galactosidase lisossomal funcional ainda sofrem senescência, conforme

detectado por outros marcadores de senescência, como a regulação positiva de p16, p21 e p53 (Lee et al., 2006). Assim, recomenda-se a utilização da coloração SA- $\beta$ -gal em conjunto com outros biomarcadores de senescência (McConnell et al., 1998; Kumari and Jat, 2021).

#### **1.1.5 - Fenótipo secretor associado à senescência (SASP)**

As células senescentes exibem um fenótipo hipersecretor conhecido como SASP, que consiste em citocinas, fatores de crescimento e proteases (Coppé et al., 2008; Coppé et al., 2010a; Chien et al., 2011). As células senescentes, através do seu SASP, impõem os seus efeitos biológicos às células vizinhas, contribuindo assim para o declínio da função tecidual relacionado com a idade (Rodier et al., 2009; Coppé et al., 2011; Wilkinson e Hardman, 2020). O SASP depende de uma ativação robusta de vias de resposta a danos no DNA e foi proposto como consistindo em duas ondas de secretomas distintos (Nacarel-li et al., 2019). A primeira onda é de natureza imunossupressora e inclui fatores como TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3, enquanto o secretoma pró-inflamatório secundário inclui proteínas como interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Hoare et al., 2016; Ito et al., 2017). O SASP pode causar efeitos deletérios devido a fatores pró-inflamatórios como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs) (Kuilman et al., 2008; Campisi, 2013). Foi relatado que esses fatores induzem proliferação descontrolada, inflamação e angiogênese de maneira parácrina e autócrina (Bavik et al., 2006; Coppé et al., 2006; Yang et al., 2006; Campisi, 2013; Lopes-Paciencia et al., 2019).

*High mobility group box 1* (HMGB1) é considerada outro componente do SASP e tem sido caracterizada como um marcador de senescência celular *in vitro* e *in vivo*. HMGB1 pode ser encontrado em meios condicionados de células senescentes; níveis reduzidos de HMGB1 e lamina B1 foram encontrados na epiderme de lesões pré-cancerosas de ceratose actínica (Wang et al., 2022).

O SASP também pode induzir senescência em células vizinhas não senescentes através da ativação de quimiocina CC, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e receptores TGF- $\beta$  em um fenômeno conhecido como senescência parácrina (Acosta et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o SASP promove a proliferação de células epiteliais pré-malignas, bem como induz a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de câncer de mama humano não agressivas, o que levou a um aumento na invasividade das células cancerígenas (Coppé et al., 2008; Coppé et al., 2010). Além disso, também foi relatado que a quimioterapia citotóxica induz uma resposta SASP resultando em quimiorresistência, via resistência à apoptose mediada pela senescência parácrina, bem como ativação da proliferação e migração conduzida por WNT16B (Gilbert e Hemann, 2010; Sun et al., 2012). No entanto, também foi relatado que o SASP recruta células imunes para lesões pré-malignas, resultando na inibição da progressão tumoral, eliminação de células senescentes ou cancerosas e aumento da quimiossensibilidade (Xue et al., 2007). Isto destaca a dualidade do SASP e seu papel tanto como supressor de tumor quanto como impulsionador de inflamação, proliferação e metástase. Embora tenha havido numerosos estudos publicados sobre os efeitos do SASP, estes concentraram-se amplamente em

fatores solúveis comuns do SASP, como IL-1, IL-6, IL-8 e várias metaloproteinases de matriz (MMPs). Como tal, ainda há muito a ser compreendido sobre o SASP e suas implicações em diferentes tipos de células senescentes, em resposta a diferentes estímulos indutores de senescência, bem como seu papel na regulação da regeneração e deterioração tecidual (Basisty et al., 2020).

#### **1.1.6 - Remodelamento da lâmina nuclear**

A remodelação do envelope nuclear é uma das características mais importantes das células senescentes. As células eucarióticas possuem núcleos circundados pelo envelope nuclear (EN), uma rede de proteínas que forma a lâmina nuclear, separando o nucleoplasma do citoplasma. O EN é formado pela lâmina nuclear (LN) e duas bicamadas lipídicas justapostas, a membrana nuclear interna e a membrana nuclear externa. A LN está localizada abaixo da membrana nuclear interna e é composto por uma rede de proteínas fibrosas e proteínas associadas à membrana nuclear (Gruenbaum & Foisner, 2015). O LN fornece principalmente integridade estrutural às membranas nucleares, e as laminas são os principais constituintes do LN. As laminas são filamentos intermediários do tipo V. Elas são classificados como tipo A ou tipo B, de acordo com homologia em sequência, padrão de expressão, propriedades bioquímicas e sua localização celular na mitose (revisado em Stuurman et al., 1998).

As laminas do tipo A são expressas em células diferenciadas, possuem pontos isoelétricos neutros e tornam-se completamente solúveis no citoplasma

durante a mitose. As laminas do tipo B são expressas em todas as células, possuem pontos isoelétricos ácidos e durante a mitose tendem a permanecer associadas às membranas (Gerace e Burke, 1988). Os genomas dos vertebrados contêm dois genes de lamina tipo B, denominados B1 e B2, e um gene de lamina tipo A. Esses três genes codificam pelo menos sete polipeptídeos diferentes: laminas A, AD10, C1 e C2, que são variantes de *splicing* do gene da lamina A, e laminas B1–3. Lamina B3 é uma variante do *splice* do gene da lamina B2. As laminas B3 e C2 são específicas para células germinativas (Furukawa e Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994), onde provavelmente desempenham um papel na reorganização da cromatina durante a meiose (Alzheimer et al., 1996).

A perda do receptor da lamina B1 e da lamina B foi observada em vários tipos de células submetidas a diferentes tipos de senescência, incluindo senescência replicativa, induzida por oncogene, bem como senescência induzida por radiação UV (Freund et al., 2012; Dreesen et al., 2013; Ivanov et al., 2013; Lukášová et al., 2017). A regulação negativa da lamina B1 nas células HCA2 ocorreu 2 a 4 dias após a irradiação gama, em comparação com a atividade SA- $\beta$ -gal que aumentou somente após 7 a 10 dias após a irradiação gama (Freund et al., 2012). A perda de lamina B1, em conjunto com outros marcadores de senescência, fornece uma ferramenta para detectar e quantificar o acúmulo ou eliminação de tipos de células senescentes em tecidos complexos, como a pele, em resposta a insultos ambientais, como radiação UV, ou após regeneração e tratamento com intervenções antienvhecimento (Baar et al., 2017; Wang et al., 2017; Wang and Dreesen, 2018; Tan et al., 2021; Wang et al., 2022).

Embora a relevância fisiológica do remodelamento da lâmina nuclear permaneça pouco conhecida, a lâmina fornece um ponto de ancoragem para domínios de heterocromatina, que também são reorganizados em células senescentes (Freund et al., 2012; Dreesen et al., 2013; Chojnowski et al., 2015; Wang e Dreesen, 2018). Por exemplo, regiões de heterocromatina altamente condensadas, marcadas por H3K9me3 e H3K27me3, abrigam regiões de DNA silenciadas que são desreprimidas em células senescentes (Bojang e Ramos, 2018; Rocha et al., 2022). Esta remodelação global da cromatina, juntamente com a diminuição na metilação das histonas (H3K9me3 e H3K27me3), pode desempenhar um papel na expressão dos fatores SASP e na mudança no perfil metabólico que é distinto das células senescentes (Lee et al., 2020).

Uma recente revisão sistemática e meta-análise encontrou uma correlação positiva entre a idade cronológica e o aumento dos níveis de senescência em vários tecidos. Dos 51 estudos que avaliaram a atividade dos marcadores de senescência p16, p21, p53, proteína 1 de ligação a p53 (53BP1) e SA-β-gal em indivíduos jovens e idosos, foi relatada uma associação positiva entre envelhecimento e senescência na artéria, sangue, cérebro, olho, coração, rim, pulmão, pâncreas, veia e pele (Tuttle et al., 2020). Esta correlação da idade cronológica com a senescência pode ser devida a muitos fatores. Por exemplo, há um aumento de células senescentes devido a um acúmulo de danos no DNA, levando a um ciclo de feedback positivo de fatores SASP secretados (Passos et al., 2010; Kandhaya-Pillai et al., 2017). Alternativamente, pode estar relacionado a uma falha do sistema imunológico em eliminar células senescentes devido à

imunossenescência relacionada à idade (Song et al., 2020; Hasegawa et al., 2023).

#### **1.1.7 - Células senescentes nos diferentes compartimentos da pele**

Como resultado de fatores intrínsecos e extrínsecos, células senescentes foram observadas nas camadas epidérmica e dérmica da pele. O acúmulo de células senescentes na pele tem sido associado a características fisiológicas da pele envelhecida, como adelgaçamento epidérmico, achatamento da junção dermo-epidérmica (JDE), bem como perda de colágeno e elastina. Curiosamente, acredita-se que a perda de colágeno e elastina seja a força motriz por trás do adelgaçamento da JDE, levando a características típicas da pele envelhecida, como enrugamento e perda de elasticidade (Xia et al., 2013; Waaijer et al., 2016; Weinmüllner et al., 2020).

Estudos que investigam a relação entre a idade do doador e o número de células senescentes positivas para p16 relataram uma correlação positiva entre a idade e o número de células senescentes na epiderme e na derme e o aparecimento de fenótipos de envelhecimento da pele, incluindo rugas finas (Waaijer et al., 2012; Victorelli et al., 2019). Esses achados estão de acordo com relatos de diversas patologias cutâneas associadas à idade, com elevado número de células senescentes nos locais das lesões cutâneas.

### **1.1.8 - Senescência na derme**

A derme é em grande parte composta por fibroblastos que são responsáveis pela produção, organização e degradação da MEC. Numerosos estudos relataram um acúmulo de fibroblastos senescentes na pele envelhecida (Dimri et al., 1995; Ho e Dreesen, 2021; Hasegawa et al., 2023). Numa comparação entre indivíduos jovens (<40 anos) e idosos (>65 anos), constatou-se que fibroblastos dérmicos de indivíduos idosos expressam níveis elevados de p16, bem como uma maior co-localização do marcador de dano ao DNA  $\gamma$ H2AX com telômeros (Pereira et al., 2019).

Além disso, um estudo recente de Hasegawa et al. encontraram um número elevado de células positivas para p16/p21 tanto na epiderme quanto na derme de indivíduos mais velhos, com um aumento maior na derme (Hasegawa et al., 2023). Os fibroblastos senescentes secretam fatores SASP, como as MMPs, que remodelam a MEC ao degradar o colágeno e a elastina (Fisher et al., 2009; Xia et al., 2013). A perda de colágeno (colágeno 7 e 17) na derme e na JDE foi observada na pele envelhecida e acredita-se que causa o adelgaçamento da pele e a perda de elasticidade (Franzke et al., 2002; Langton et al., 2016). Embora os fibroblastos sejam talvez o tipo de célula senescente mais extensivamente estudado (Fitsiou et al., 2021; Ho e Dreesen, 2021), existem muitas diferenças entre fibroblastos senescentes *in vitro* e *in vivo*, incluindo diferenças na composição do SASP (Lupa et al., 2015).



### **1.1.9 - Senescência na epiderme**

A epiderme é composta principalmente por queratinócitos e melanócitos, sendo os queratinócitos o tipo de célula predominante. Apesar do elevado número de queratinócitos na epiderme, as análises histológicas revelaram que as células senescentes neste compartimento da pele (conforme avaliado pela expressão elevada de p16) eram quase exclusivamente melanócitos (Waaijer et al., 2016; Victorelli et al., 2019). Os melanócitos são células produtoras de melanina encontradas na camada basal da epiderme e nos folículos capilares (Victorelli et al., 2019).

Estudos iniciais indicaram que a epiderme muda a cada 40-56 dias, facilitada pela proliferação, maturação e perda de queratinócitos durante a descamação epidérmica (Bergstresser & Richard Taylor, 1977). A alta taxa de renovação epidérmica e a descamação dos queratinócitos no estrato córneo, a camada mais externa da epiderme, podem explicar o baixo acúmulo de queratinócitos senescentes na epiderme (Bergstresser & Richard Taylor, 1977). O acúmulo de melanócitos senescentes positivos para p16 tem sido associado ao aumento de rugas faciais, bem como à reorganização da elastina relacionada à idade a derme (Waaijer et al., 2012; Waaijer et al., 2016; Jarrold et al., 2022).

Foi demonstrado que esses melanócitos positivos para p16 exibem características-chave da senescência, incluindo perda de HMGB1 nuclear, focos de dano ao DNA induzidos por telômeros e níveis mais baixos expressos de sirtuína 1 (SIRT1), que foi previamente associada ao envelhecimento e senescência (Sasaki et al., 2006; Imai e Guarente, 2014). Além disso, os

queratinócitos nas proximidades dos melanócitos senescentes continham focos  $\gamma$ H2AX aumentados, sugerindo que os melanócitos senescentes induzem danos ao DNA nos queratinócitos vizinhos (Victorelli et al., 2019). De acordo com esta noção, o meio condicionado de melanócitos irradiados com raios X continha níveis elevados de fatores SASP e ativou uma resposta a danos no DNA em fibroblastos dérmicos humanos (Victorelli et al., 2019).

Da mesma forma, os queratinócitos que foram cocultivados com melanócitos senescentes em um equivalente de epiderme viva 3D tiveram uma taxa de proliferação mais baixa, aumentaram a expressão de p16 e resultaram em um estrato espinhoso mais fino (Victorelli et al., 2019).

## **2 OBJETIVO:**

Avaliar e quantificar a lâmina b1 e a beta-galactosidase, biomarcadores de senescência celular, na epiderme fotoprotegida (envelhecimento intrínseco) de indivíduos do sexo feminino, com análises da pele de diferentes faixas etárias ao longo do tempo de vida (18-70 anos).

### **3 MÉTODO**

#### **3.1 - Tipo de estudo**

Trata-se de estudo exploratório, prospectivo, controlado e comparativo conduzido no Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e foi realizada com fragmentos de pele remanescente de mamoplastia estética realizada no serviço da cirurgia plástica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho de Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **3.2 - Considerações éticas**

Este estudo foi realizado seguindo as normas da resolução no 466/12 e as subsequentes, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde e aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (número 4.118.956; Plataforma Brasil CAAE: 31996720.6.0000.5257), de acordo com as diretrizes da Lei Federal nº 6.638. Não houve contato, pesquisa, ou questionário direto com os pacientes. Os dados dos pacientes foram obtidos diretamente dos prontuários, garantido o sigilo, o anonimato e a confidencialidade dos participantes.

#### **3.3 - População e Recrutamento**

Foram recrutados, por convite, durante o período de 2019 a 2023, indivíduos do sexo feminino com idades variando de 18 a 70 anos, candidatas a cirurgia estética de mama realizado no serviço da cirurgia plástica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os indivíduos foram informados sobre o tipo de investigação a ser realizado, os benefícios relevantes da pesquisa, riscos e complicações inerentes ao ato cirúrgico, após o qual receberam, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.3.1 - Critérios de Elegibilidade**

#### **3.3.1.1 - Critérios de Inclusão**

- Pacientes aptas a cirurgias estética de mama.
- Pacientes acima de 18 anos de idade
- Pacientes que concordaram em doação e assinaram o TCLE.

Todos os voluntários eram pacientes elegíveis para cirurgia estética de mama e não tinham doenças de pele nem qualquer outro distúrbio físico com influência na pele. Os indivíduos eram do tipo de pele Fitzpatrick II–IV (Fitzpatrick et al, 1975) e sem histórico de queimaduras solares frequentes.

#### **3.3.1.2 - Critérios de exclusão:**

- Comorbidades
- Tabagismo
- Alterações cutâneas no local da biópsia
- -Exposição solar no local da biópsia
- Distúrbios psicológicos

- Uso de medicamento hormonais
- IMC acima 28
- Indivíduos com sinais intensos de envelhecimento extrínseco da pele devido à radiação UV (camas de bronzamento/sol)

### **3.4 - Coleta e processamento das amostras de pele**

Fragmentos da pele da região infra-areolar, medial, em um local que normalmente não afeita aos raios ultravioletas do sol, obtidas na mamoplastia redutora (1 cm<sup>2</sup>) (da parte central do quadrante inferior da mama direita), foram recolhidos, utilizando lâmina de bisturi nº 15 e imediatamente colocadas em frasco contendo líquido fixador (solução de 10% de formaldeído tamponado, pH 7,4) por 72 horas, a 4° C e levados para o Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### **3.5 - Desenho do estudo**

As amostras de pele, da primeira a sexta décadas de vida, foram distribuídas em três grupos etários (grupo I: 18–29 anos; grupo II: 30–49 anos; grupo III: 50–70 anos). O total das amostras coletadas foi de 61 peças.

### **3.6 - Caracterização e quantificação dos parâmetros histológicos do envelhecimento cutâneo**

O envelhecimento intrínseco da pele ou envelhecimento cronológico é uma alteração fisiológica no envelhecimento da pele e compreende alterações na espessura e nas características da epiderme, como afinamento da epiderme, achatamento da junção epidérmica dérmica caracterizada pela perda das cristas da retina e da papila dérmica, bem como diminuição da quantidade de colágeno e elastina na derme.

Parâmetros morfológicos do envelhecimento cutâneo (afinamento epidérmico e achatamento da borda dermoepidérmica foram caracterizados em cortes de parafina de amostras de pele (5 µm de espessura) coradas com hematoxilina-eosina (HE). Imagens de alta qualidade foram obtidas dos cortes corados com uma câmera digital Evolution VR Cooled Color 13 bits (Media Cybernetics, EUA) acoplada a um microscópio de luz (Eclipse E8.0 Nikon, Japão). O software de captura de interface foi o Q-Capture 2.95.0 v.3.05 (Silicon Graphics Inc, EUA) e as imagens de alta resolução (buffer de 2048 X1536 pixels) foram capturadas após calibração para obter cores e parâmetros de contraste apropriados, permanecendo constantes para cada tipo de coloração.

### **3.7 - Espessura da epiderme**

Cortes corados pela HE foram utilizados para obter 10 imagens da junção dermoepidérmica (lente objetiva de 20x) de cada amostra de pele. A espessura epidérmica foi obtida por meio do uso do sistema de análise de imagens Image J (NIH), no qual a espessura epidérmica foi calculada por meio da medida da ferramenta (µm).

### **3.8 - Achatamento da junção dermo-epidérmica**

O achatamento da estrutura DEJ foi caracterizado histologicamente pelo cálculo do índice de interdigitação de acordo com Timor et al (2000) em que a medição da interdigitação na junção epidérmica-dérmica, conhecida por ser diminuída pela idade. Por meio do software Image J, o cursor do mouse foi passado ao longo da borda de interdigitação (junção dermoepidérmica) do ponto A ao B para obter sua medida; então a distância entre o ponto A ao B também foi calculada.

O índice de interdigitação ( $\mu\text{m}$ ) é representado como:

$$\frac{(\text{medida do comprimento da interdigitação entre o ponto A ao B})}{(\text{distância entre o ponto A ao B})}$$

### **3.9 - Imunolocalização da lamina B1 e $\beta$ -galactosidase associada à senescência (S- $\beta$ gal)**

Cortes de parafina foram obtidos e recolhidos em lâminas histológicas com carga (Sakura Finetek, EUA). Após a adesão, as seções foram desparafinadas e hidratadas, e então as seções foram submetidas a um banho de proteína [incubação durante a noite em 5% de albumina de soro bovino (fração V, Sigma-Aldrich, EUA) em tampão fosfato salino (PBS) pH, 7,4]. Então as seções foram refixadas em acetona fria (10 min) para aumentar a penetração do anticorpo, lavadas com PBS, pH 7,4 por 5 min e submetidas ao branqueamento de melanina



com o kit de branqueamento de melanina do produto de acordo com as instruções do fabricante (Polysciences, EUA, cat. 24909-1).

Em seguida, as seções foram incubadas com uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM em PBS, pH 8,0 por 15 min para bloquear resíduos de aldeído, e permeabilizadas com Triton X100 0,5% (Sigma-Aldrich) em PBS, pH 7,4 por 30 min. Posteriormente, as seções histológicas foram submetidas à recuperação antigênica mediada por calor empregando um forno de micro-ondas (800 W) por 3 minutos, em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 para o anticorpo lamina b1 e Tris-EDTA (Tris-base 10 mM, solução EDTA 1 mM), pH 9,0 para S-b gal. Após o resfriamento, as seções histológicas foram incubadas com 5% de albumina sérica bovina (BSA), 5% de soro normal de carneiro (NSS) da Sigma-Aldrich, 0,001% de gelatina (Sigma-Aldrich, cat. G9391), 0,001% de Triton-X100, 0,05% de Tween-20 em PBS, durante 30 min e depois com 0,2 M de glicina em PBS durante 30 min. Depois, o anticorpo anti-lamina B1 (policlonal de coelho, AbCam, cat. nº ab16048, EUA, diluição 1:100) ou anti-S- $\beta$  gal (anticorpo policlonal de coelho, Invitrogen/ThermoFisher, EUA, cat. nº PA5-102503, diluição 1:100) foi incubado durante cerca de 24 horas a 4°C. Em seguida, as seções foram lavadas com 0,25% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) em PBS, seguido de incubação do anticorpo secundário IgG anti-coelho feito em ovelha, fração  $\text{F(ab')}_2$ , conjugada a Cy3, diluição 1:400, Sigma-Aldrich, EUA, cat. C2306] por 1 hora, à temperatura ambiente. Depois disso, as seções foram lavadas com solução de Tween20-PBS 0,25%, duas vezes, contracoradas com Hoechst 33342 (100 ng/mL em PBS,

Cayman Chemical Company) por 10 min, lavadas com PBS e montadas com Vectashield Plus (Vector Laboratories, EUA, cat# H1900).

Os controles negativos foram obtidos pela incubação dos cortes histológicos com soro de coelho não imune ou com o diluente do anticorpo sem o anticorpo primário.

### **3.10 - Quantificação de Lamina B1 (pontuação histológica)**

Dez imagens aleatórias da epiderme preparadas para imunofluorescência foram obtidas de cada pessoa usando a lente objetiva de 40x no EVOS® FL Auto Imaging System for Fluorescence (Life Technologies, Invitrogen). A quantidade de lamina b1 nas imagens foi obtida usando um sistema de pontuação histológica de quatro pontos, considerando as características de coloração da lamina B1 nos núcleos das células epidérmicas. O grau 0 foi atribuído quando a lamina B1 estava ausente nos núcleos; grau 1: a lamina b1 formou uma linha fina, pontilhada ou contínua na membrana nuclear; grau 2: a lamina B1 formou uma linha contínua ocupando < 50% da membrana nuclear; grau 3: a lamina B1 formou uma linha contínua, espessa, decorando > 50% da membrana nuclear (tabela 2). A média da soma de cada grau, nas imagens, foi considerada o padrão de pontuação para cada indivíduo.

### **3.11 - Quantificação de S-β galactosidase (%)**

Após obter a quantidade total de núcleos presentes nas dez imagens obtidas a partir de cortes corados com S-β gal, foi calculado o percentual de células positivas.

### **3.12 - Análise estatística**

Todos os dados e análises estatísticas foram realizados usando o software GraphPad Prism (10.0). Os resultados são mostrados como média  $\pm$  DP ou mediana. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (não paramétrico), de comparações múltiplas, seguido pelo pós-teste de Dunn. Diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 4 RESULTADOS

O total das amostras coletadas foi de 61 peças, porém muitas amostras não reagiram com os anticorpos; o total de amostras foi de 35. A atribuição de grupos, de acordo com a idade do indivíduo estão ilustradas na tabela 1 e os dados demográficos, da população recrutada, na tabela 2.

**Tabela 1. Atribuição de grupos de acordo com a idade do indivíduo**

| Faixa etária | Faixa      | N    | Média $\pm$ DP |
|--------------|------------|------|----------------|
| Grupo I      | 18-29 anos | n=12 | 22 $\pm$ 4.1   |
| Grupo II     | 30-49 anos | n=13 | 29 $\pm$ 5.3   |
| Grupo III    | 50-70 anos | n=10 | 69 $\pm$ 5.7   |

**Tabela 2. Dados demográficos**

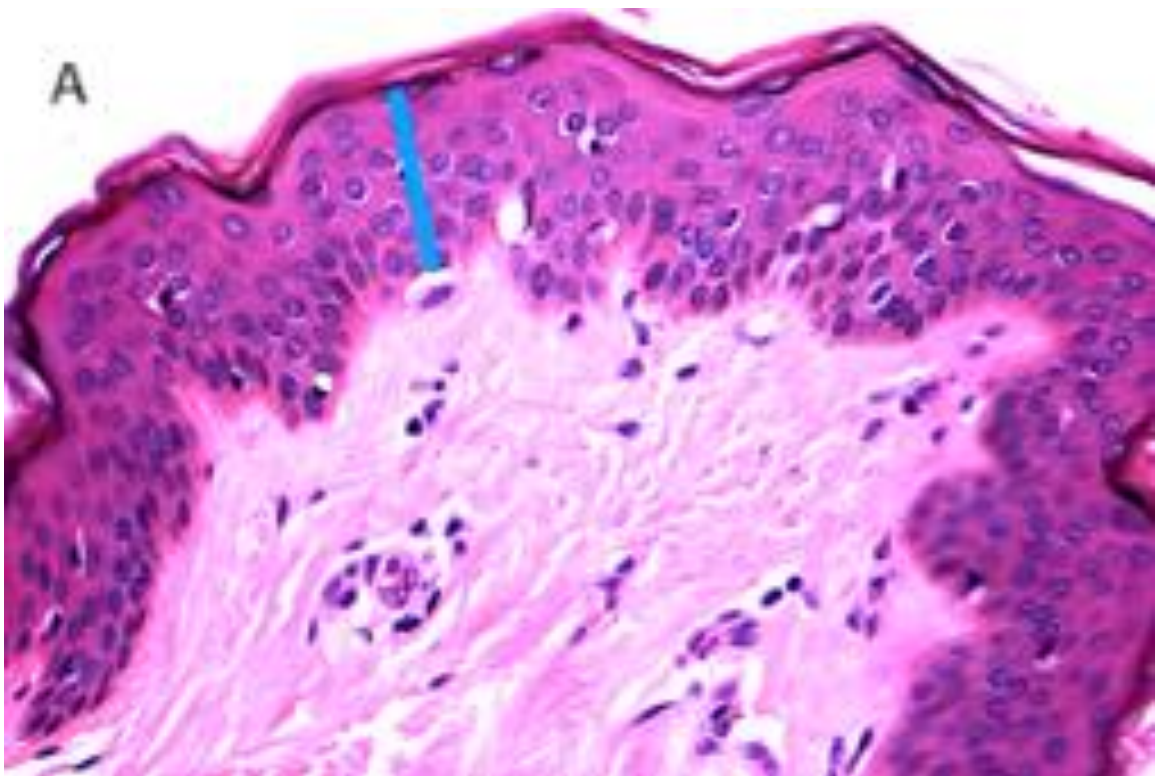
| Grupo I |              |                        |     |
|---------|--------------|------------------------|-----|
|         | Idade (anos) | Fototipo (Fitzpatrick) | IMC |
| 1       | 18           | III                    | 24  |
| 2       | 18           | V                      | 26  |
| 3       | 18           | II                     | 24  |
| 4       | 19           | II                     | 26  |
| 5       | 19           | III                    | 23  |
| 6       | 20           | III                    | 28  |
| 7       | 20           | III                    | 21  |
| 8       | 21           | IV                     | 26  |
| 9       | 25           | V                      | 24  |
| 10      | 26           | II                     | 20  |
| 11      | 27           | III                    | 24  |
| 12      | 29           | II                     | 24  |

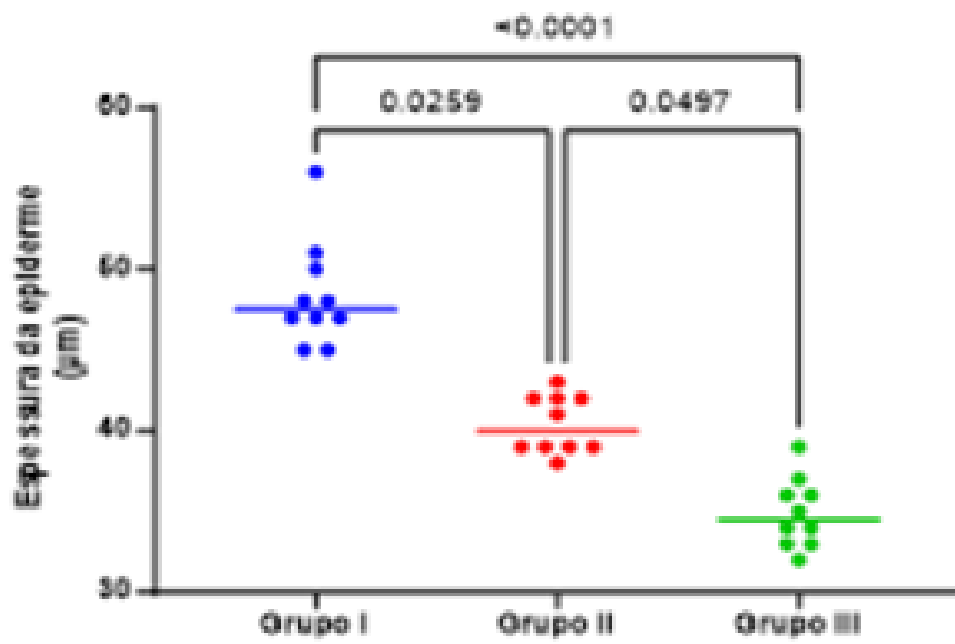
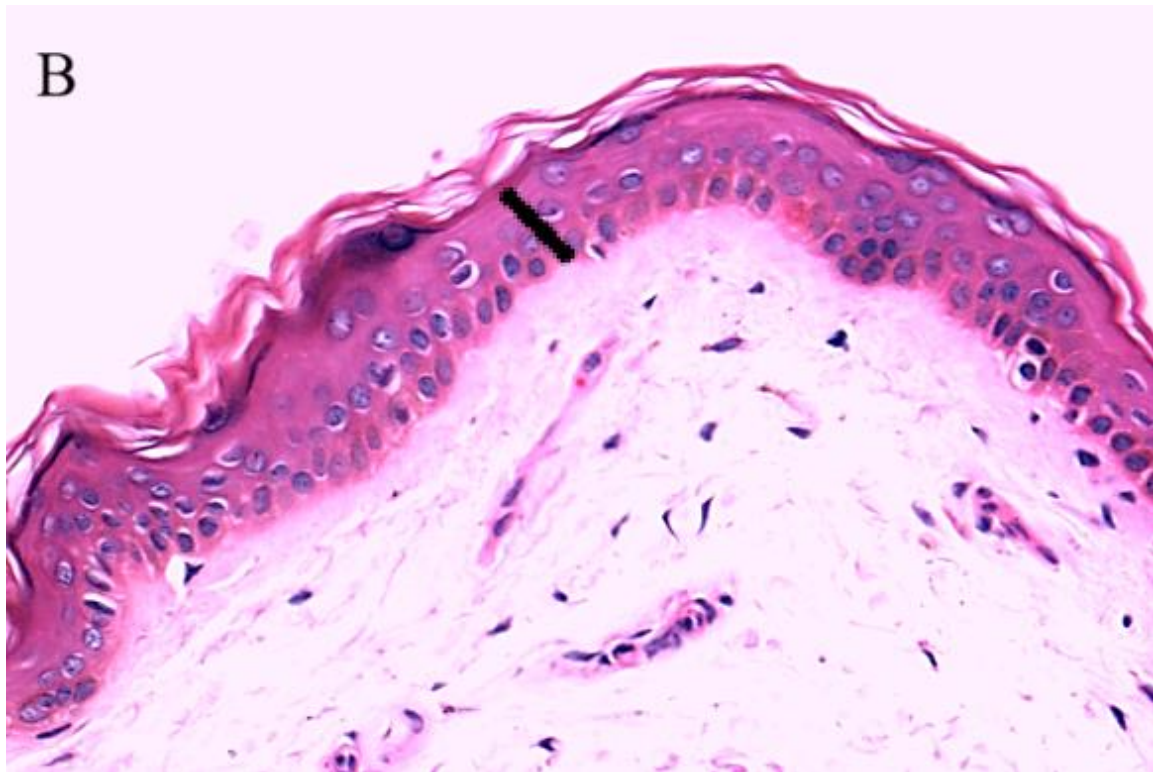
| <b>Grupo II</b> |                     |                               |            |
|-----------------|---------------------|-------------------------------|------------|
|                 | <b>Idade (anos)</b> | <b>Fototipo (Fitzpatrick)</b> | <b>IMC</b> |
| 1               | 30                  | III                           | 28         |
| 2               | 33                  | III                           | 27         |
| 3               | 35                  | V                             | 27         |
| 4               | 37                  | V                             | 28         |
| 5               | 38                  | III                           | 24,5       |
| 6               | 38                  | III                           | 25         |
| 7               | 39                  | IV                            | 28         |
| 8               | 40                  | II                            | 24         |
| 9               | 40                  | III                           | 28         |
| 10              | 43                  | V                             | 24         |
| 11              | 45                  | II                            | 28         |
| 12              | 46                  | III                           | 21         |
| 13              | 49                  | V                             | 28         |

| <b>Grupo III</b> |                     |                               |            |
|------------------|---------------------|-------------------------------|------------|
|                  | <b>Idade (anos)</b> | <b>Fototipo (Fitzpatrick)</b> | <b>IMC</b> |
| 1                | 51                  | IV                            | 23,7       |
| 2                | 54                  | III                           | 24         |
| 3                | 58                  | II                            | 28         |
| 4                | 58                  | II                            | 28         |
| 5                | 59                  | II                            | 22         |
| 6                | 59                  | II                            | 28         |
| 7                | 62                  | V                             | 28         |
| 8                | 63                  | IV                            | 28         |
| 9                | 67                  | III                           | 28         |
| 10               | 70                  | IV                            | 28         |

A análise histológica dos cortes histológicos da pele demonstra a grande variabilidade da espessura da epiderme em dependência da idade (Figura 1A, B). A epiderme de indivíduos jovens (Grupo I) exibe 5 ou mais camadas (Figura 1A), enquanto em pessoas idosas (Grupo III), a epiderme apresenta 3 ou 4 camadas (Figura 1B). Além disso, nota-se que a junção dermo-epidérmica nos indivíduos do grupo I, é ondulada pela presença das cristas epidérmicas e papilas dérmicas (Figura 1A) e nos indivíduos do grupo III se observa um achatamento da borda entre a epiderme e a derme (Figura 1B).

A espessura da epiderme dos indivíduos do grupo I (n=10) varia de 45 a 56  $\mu\text{m}$  (média = 48  $\mu\text{m}$ ; desvio padrão (SD) = 3,3  $\mu\text{m}$ ). No grupo II (n=10), a espessura da epiderme variou de 38 a 42  $\mu\text{m}$  (média= 40  $\mu\text{m}$ ; SD = 1,8  $\mu\text{m}$ ) e no grupo III (n=10), a espessura da epiderme variou de 26 a 33  $\mu\text{m}$  (média= 31  $\mu\text{m}$ ; SD = 1,5  $\mu\text{m}$ ). A diferença entre os grupos é significativa (ver abaixo). Os resultados estão demonstrados nas figuras 1C e D.







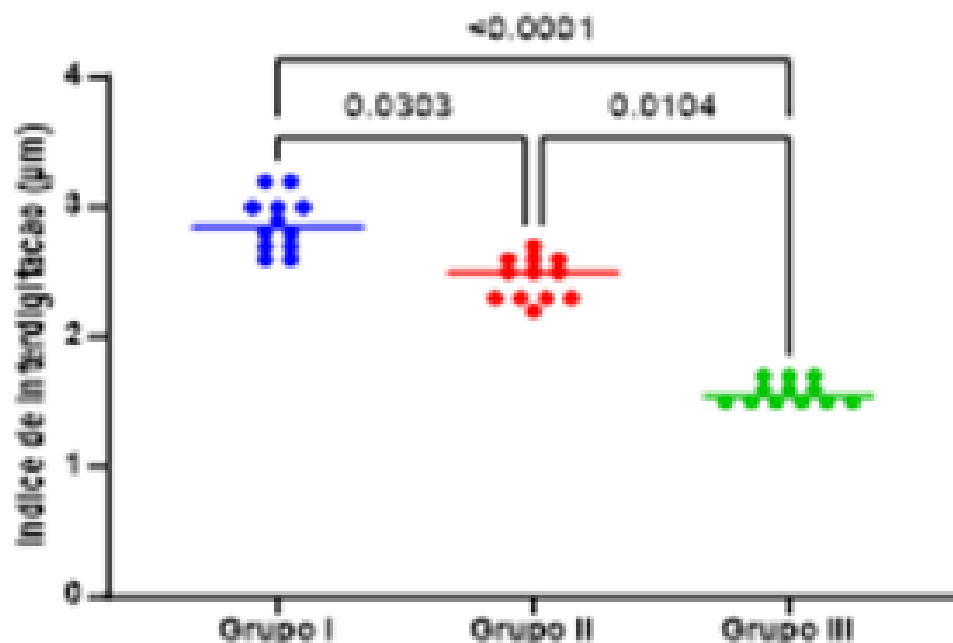


Figura 1. Imagens representativas da histologia da pele (cortes corados pela HE) de indivíduo com 20 anos (A) e indivíduo com 70 anos (B). Escala: 100µm. Nota-se diferenças entre a espessura da epiderme (barra preta) e o achatamento da junção dermo-epidérmica (representada pelo índice de interdigitação – ver a seção de métodos) entre as imagens representadas nas figuras (A) e (B). Representação gráfica dos resultados, espessura da epiderme (C) e o achatamento da junção dermo-epidérmica (D). Os resultados estão expressos como média e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo.

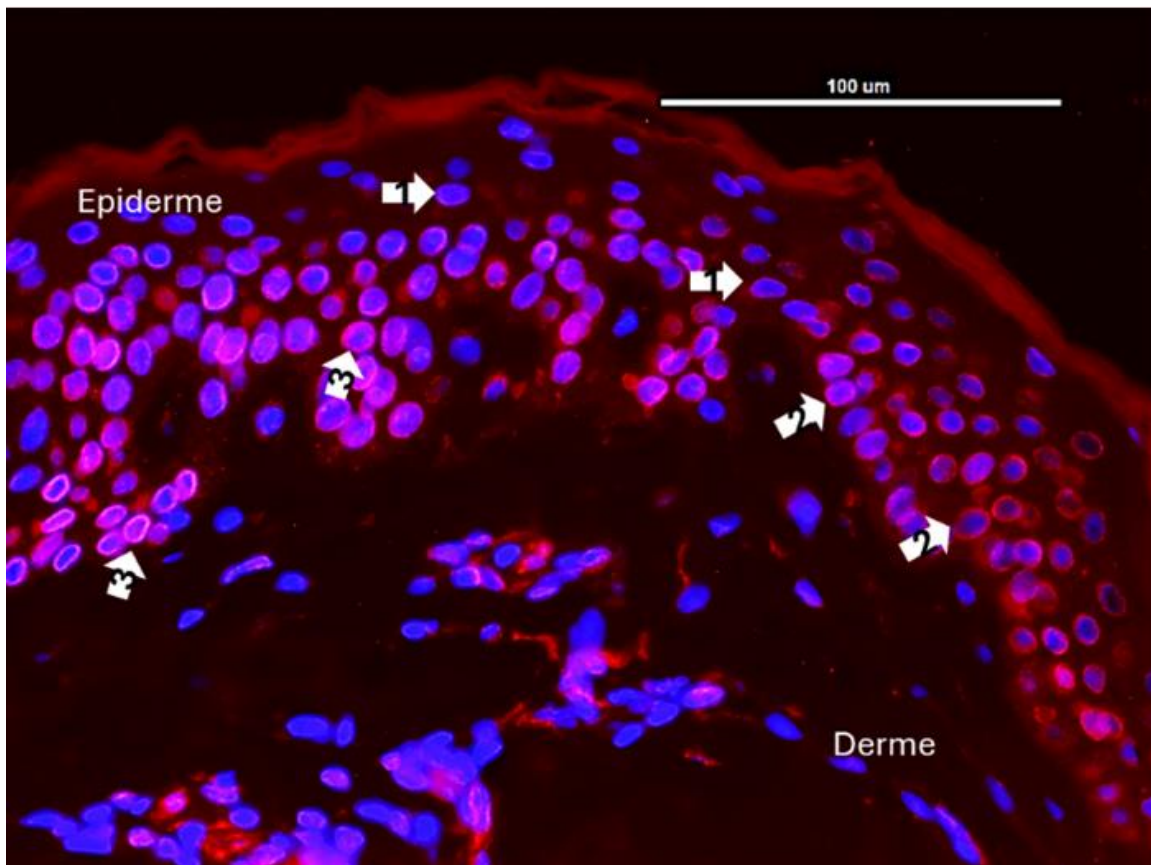
Grupo 1 (n=10); Grupo 2 (n=10); Grupo 3 (n=10).

### **Imunofluorescência e quantificação dos biomarcadores de senescência lâmina B1 e beta-galactosidase na epiderme humana**

A imunofluorescência para lâmina B1 demonstra a presença da proteína lâmina B1 na membrana nuclear das células epidérmicas. O padrão de marcação é variado de forma que, para a sua quantificação estabelecemos um escore histológico; o escore 3 considera uma marcação linear intensa, contínua da

membrana nuclear; escore 2 - marcação linear, de intensidade moderada e o escore 1, uma linha contínua, de intensidade leve.

A figura 2 exibe a imunofluorescência da lâmina B1 na pele jovem (indivíduo de 18 anos, pertencente ao grupo I) (A) e o resultado se sua quantificação (B). Verifica-se haver um nível semelhante de imunomarcação de lâmina B1 entre os escores 1 e 2 e entre 2 e 3 nas células da epiderme (B). Diferença significativa só é vista quando se compara o escore 1 com o 3 ( $P=0,02$ ).



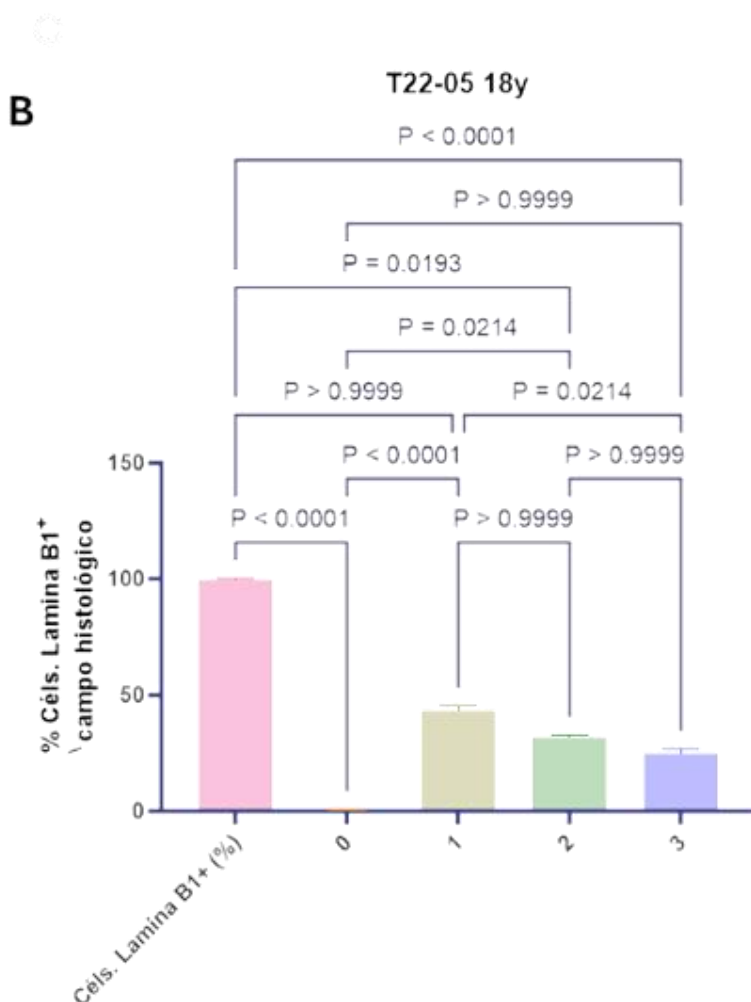
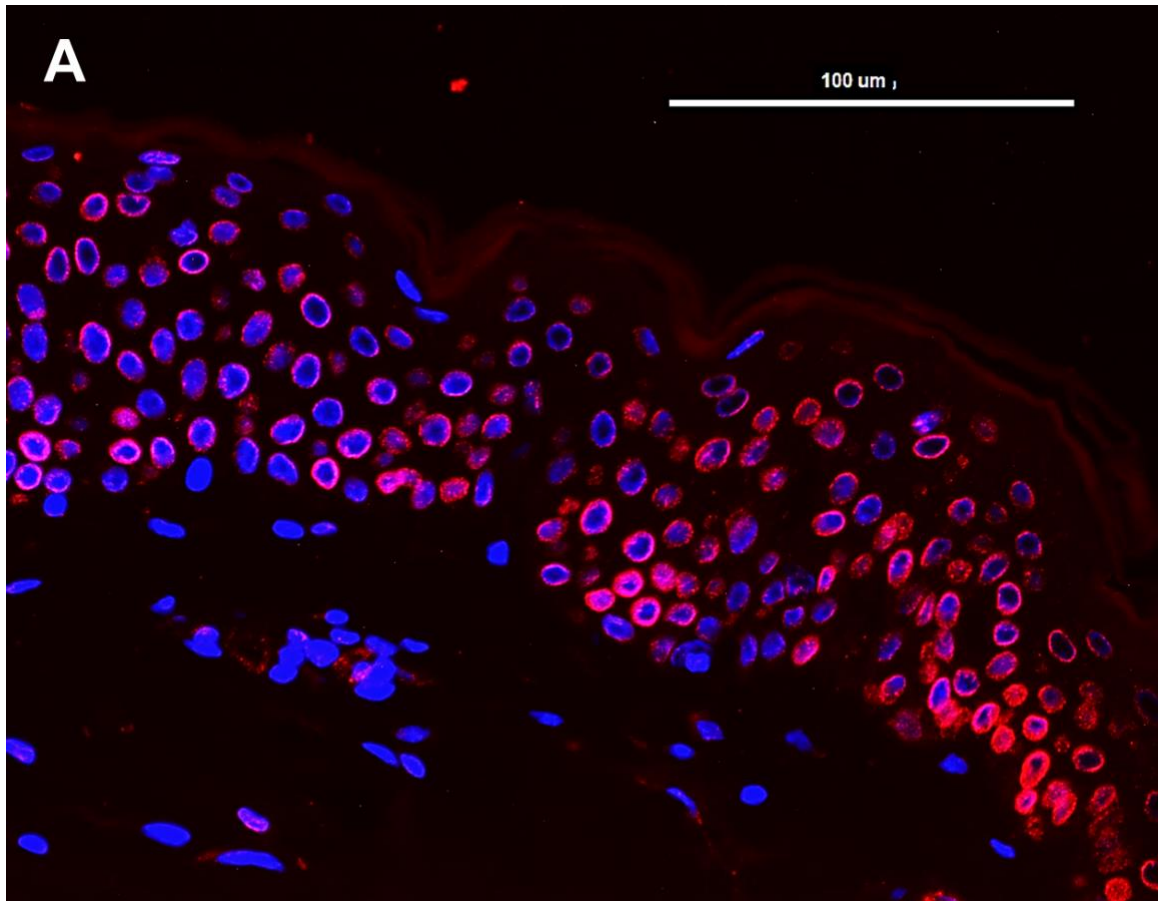


Figura 2. Imagem representativa da imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo com 18 anos (Grupo I) (A) e sua quantificação (B). O percentual de células positivas percentences aos diferentes escores foi obtido. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SD e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo.

A figura 3 demonstra a imunofluorescência da lamina B1 em indivíduo do grupo II, de 40 anos (Figura 3A) e a sua quantificação (3B). Observa-se que a quantidade de células marcadas pela lamina B1, com intensidade leve (escore 1) é um pouco

maior que as dos escores 2 e 3 e de forma semelhante a figura 2, há diferença significativa somente quando os escores 1 e 3 são comparados ( $P=0,03$ ).



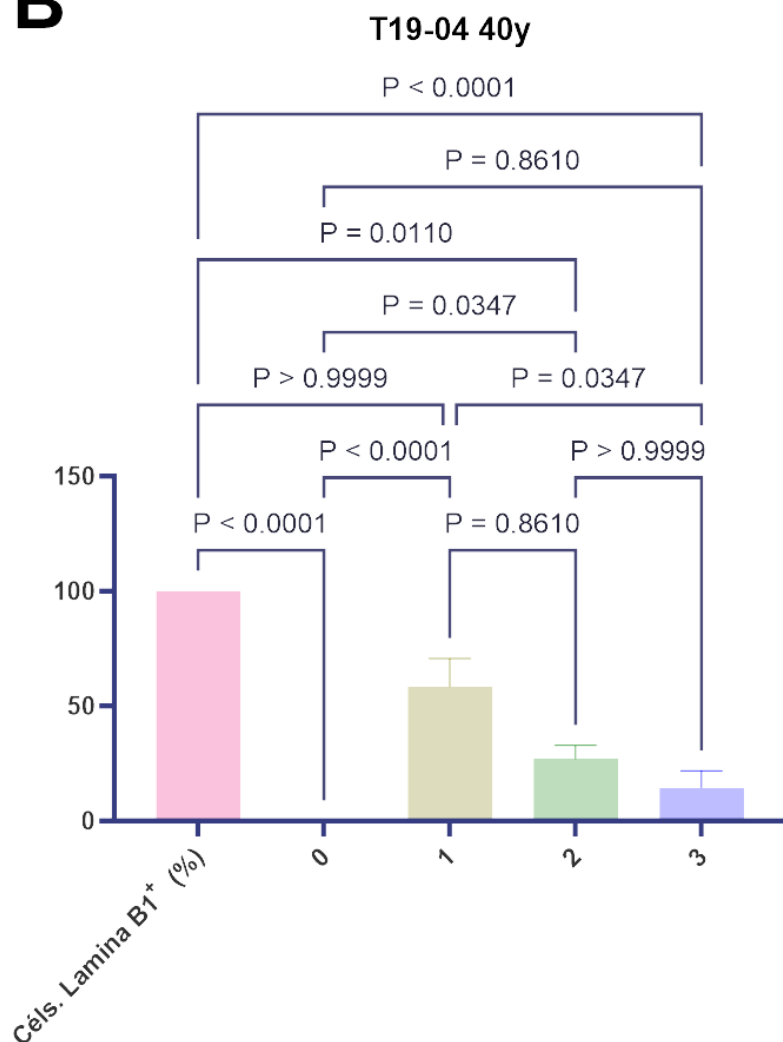
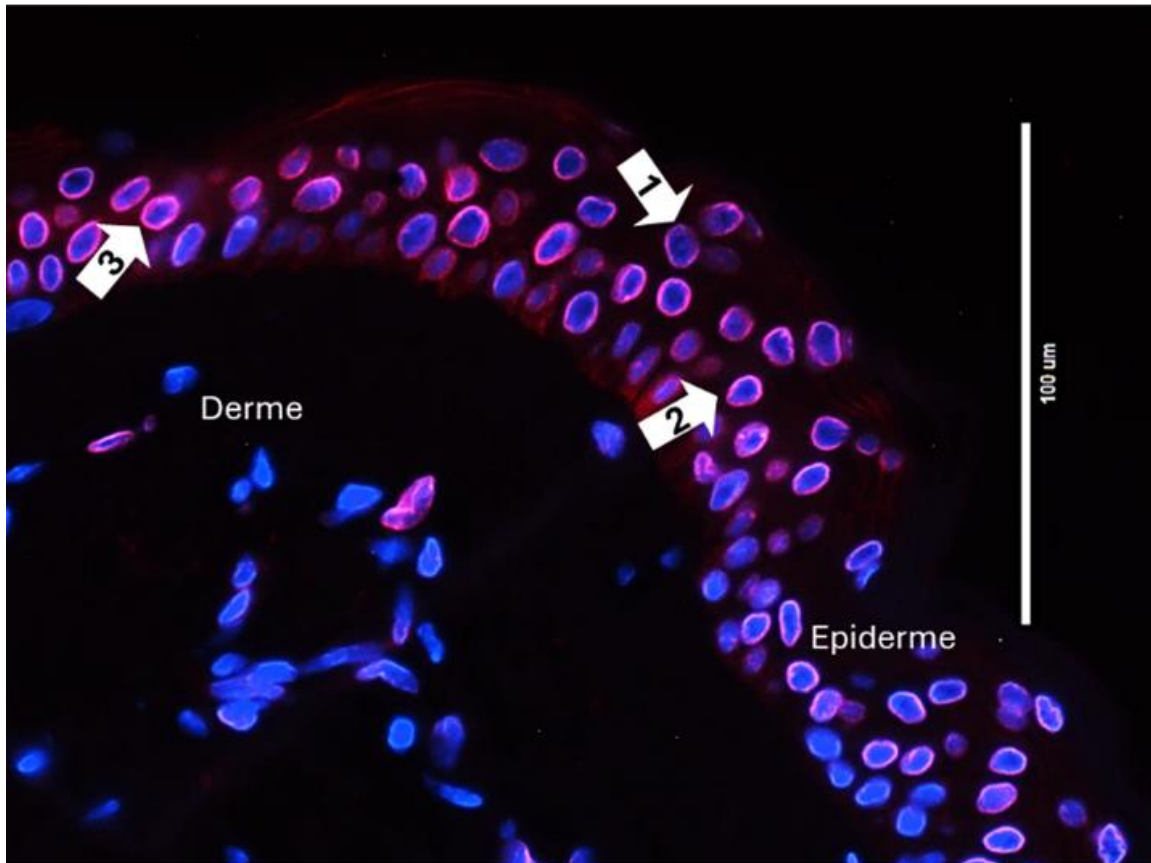
**B**

Figura 3. Imagem representativa da imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo do grupo II (40 anos) (A) e sua quantificação (B). O percentual de células positivas pertencentes aos diferentes escores foi obtido. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SD e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo.

A imunomarcção para lamina B1 em indivíduo do grupo III é mostrada na figura 4 (A) e sua quantificação (B). Observa-se que a epiderme é fina e constituída principalmente por núcleos demonstra a imunofluorescência da lamina B1 em

indivíduo do grupo II, de 40 anos (Figura 4A) e a sua quantificação (4B). Observa-se que as células lamina B1 positivas são principalmente pertencentes aos escore 1 havendo poucas células escores 2 e 3 (Figura 4A e B). Somente há diferença significativa entre os escores 1 e 3 ( $P=0,02$ ).



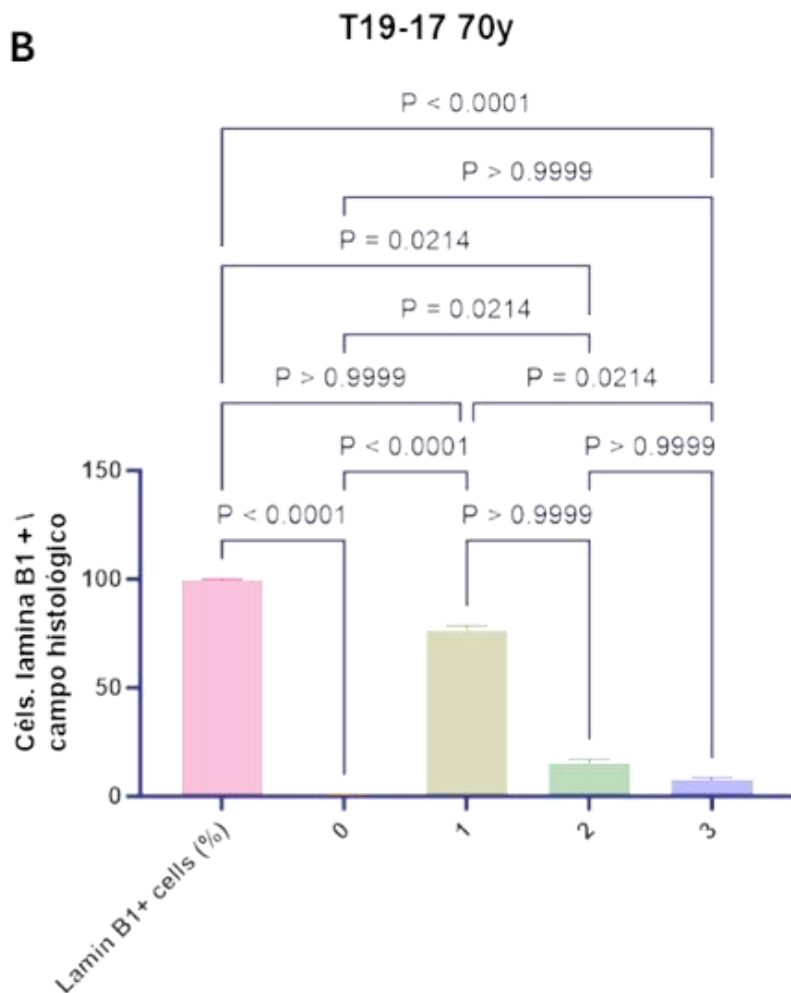


Figura 4. Imagem representativa da imunofluorescência para lamina B1 da pele de indivíduo do grupo III (70 anos) (A) e sua quantificação (B). O percentual de células positivas pertencentes aos diferentes escores foi obtido. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SD e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo.

Quando se compara os resultados do escore 1 de lamina B1 entre os grupos de pacientes, observa-se que há diferença significativa entre os grupos (Figura 5).

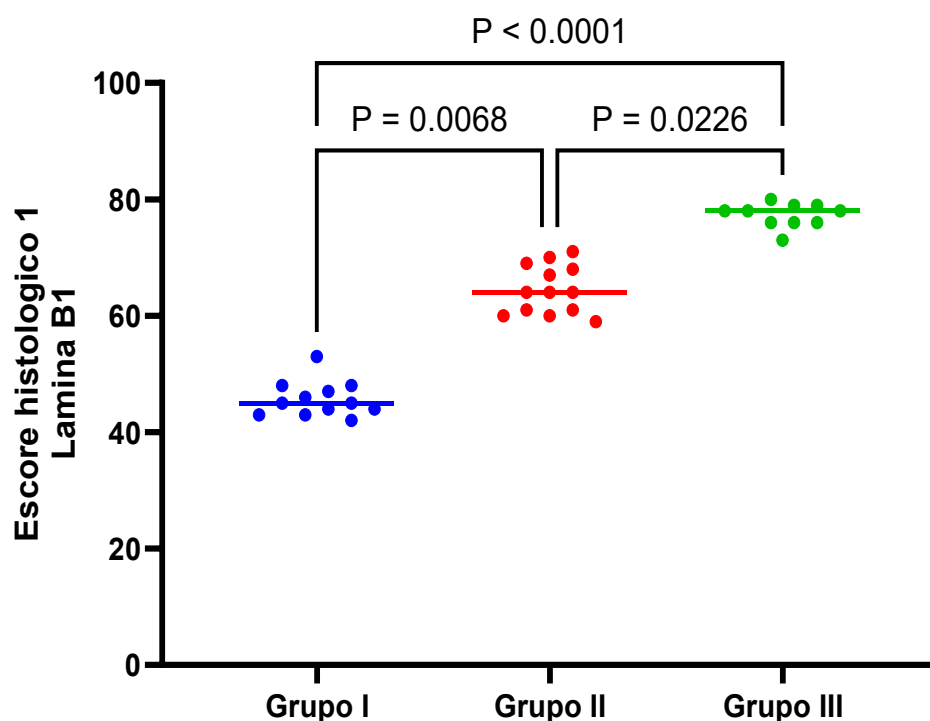


Figura 5. Representação gráfica da quantificação do escore 1 de lamina B1 entre os grupo de pacientes. Os resultados estão expressos como mediana e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste Dunn's test.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo. Grupo 1 (n=12); Grupo 2 (n=13); Grupo III (n=10).

A comparação entre os grupos de pacientes com os dados do escore 2 da lamina B1 mostrou haver uma diferença significativa entre os grupos (Figura 6).



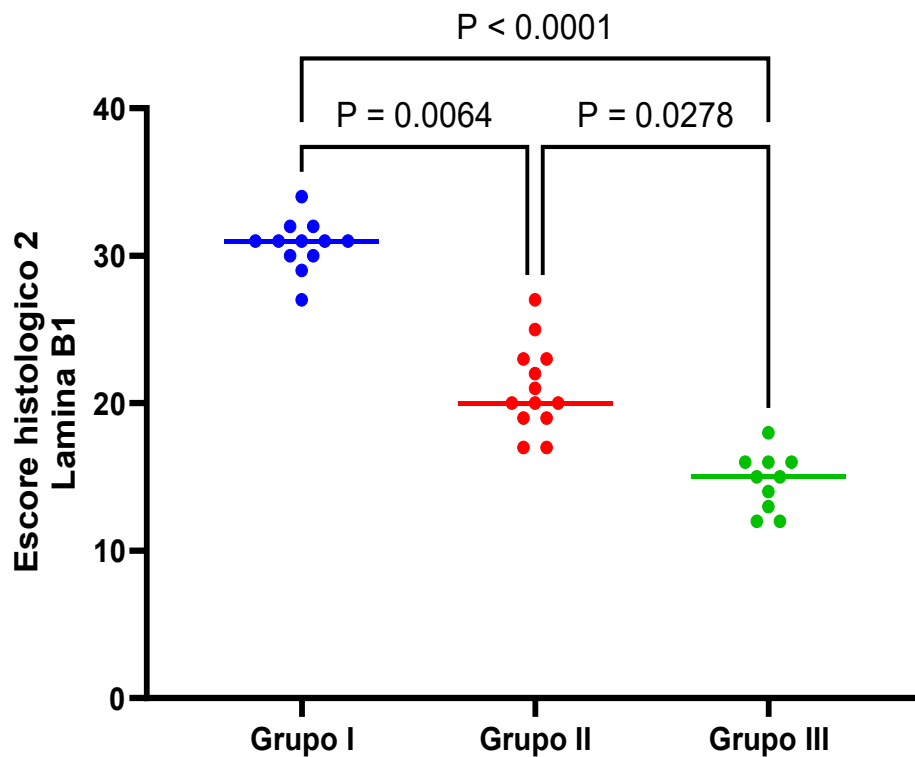


Figura 6. Representação gráfica da quantificação do escore 2 de lamina B1 entre os grupo de pacientes. Os resultados estão expressos como mediana e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo. Grupo 1 (n=12); Grupo 2 (n=13); Grupo III (n=10).

A comparação entre os grupos de pacientes com os dados do escore 3 da lamina B1 também revelou haver uma diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

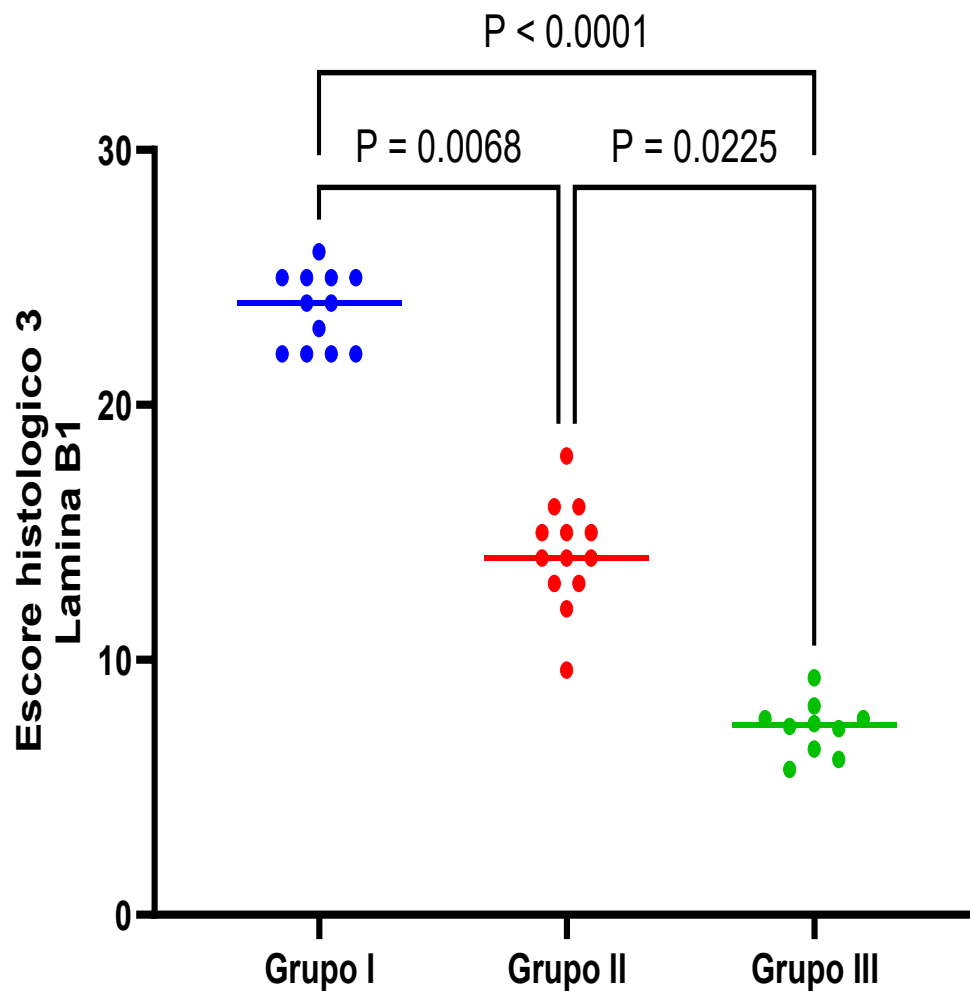
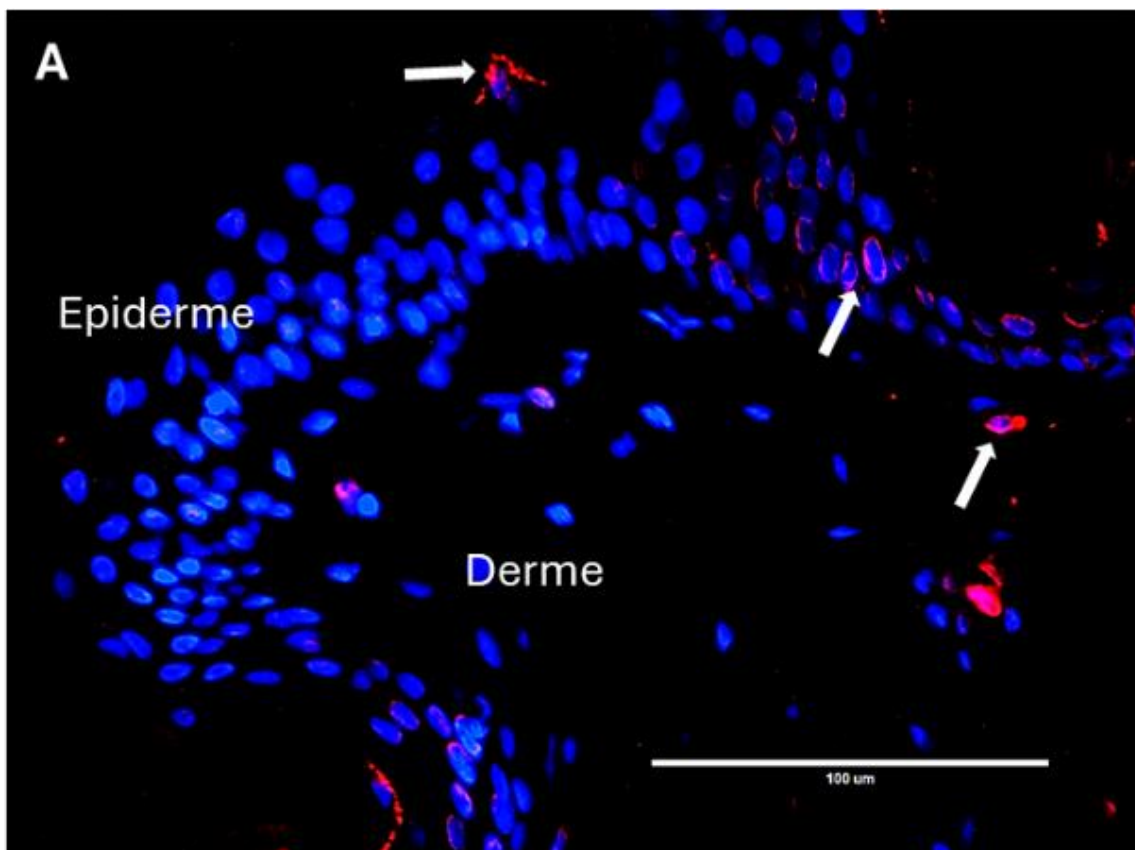
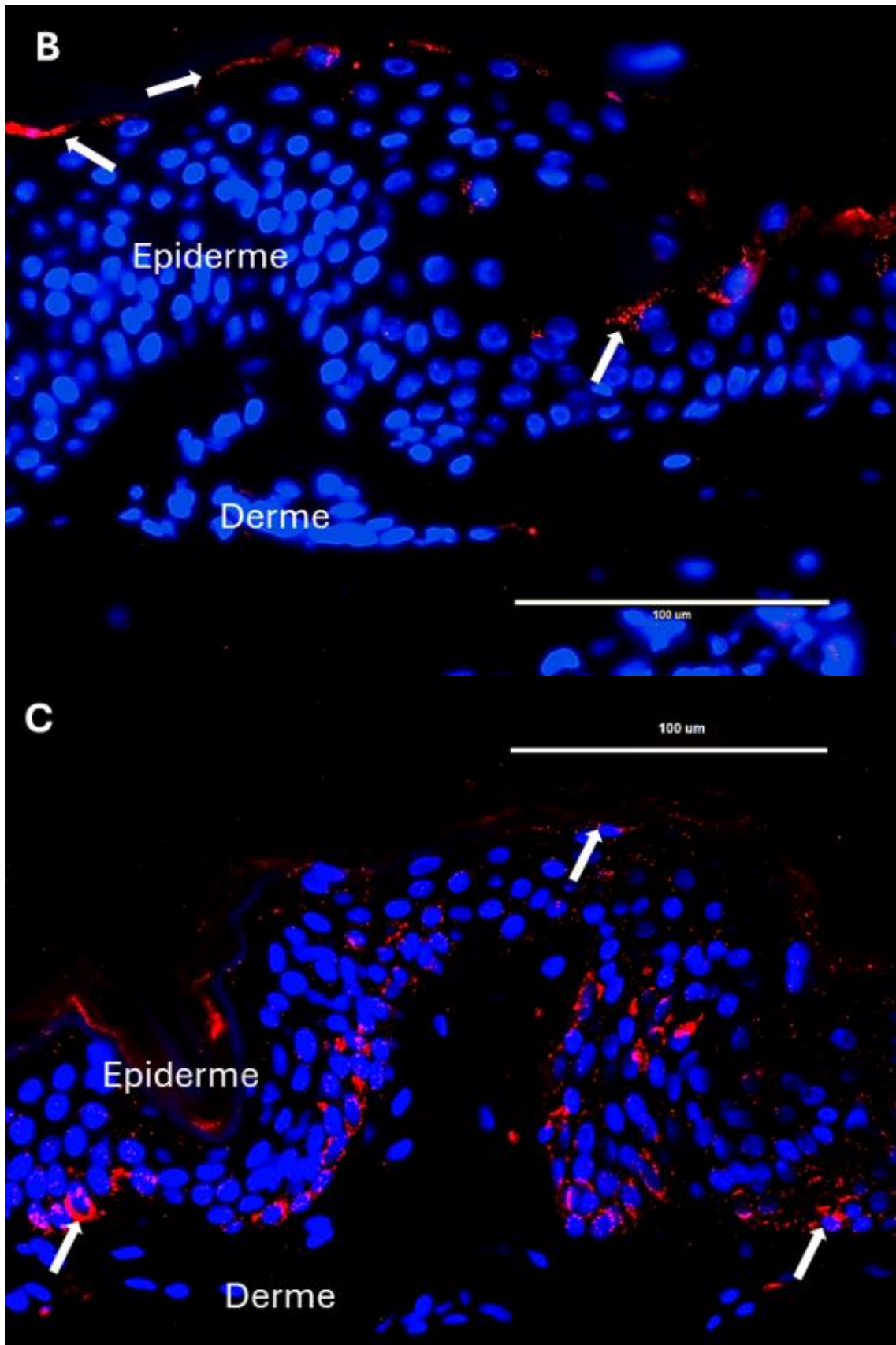


Figura 7. Representação gráfica da quantificação do escore 3 de lamina B1 entre os grupo de pacientes. Os resultados estão expressos como mediana e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo. Grupo 1 (n=12); Grupo 2 (n=13); Grupo III (n=10).

Através da técnica de imunofluorescência para  $\beta$ -galactosidase na epiderme de indivíduos do grupo I (19 anos) demonstra a presença de marcação no citoplasma de raras células epidérmicas, na camada basal e em células da

camada granular da epiderme. Algumas células da derme também são positivas para a  $\beta$ -galactosidase (Figura 8A). No grupo II (indivíduo com 25 anos), a  $\beta$ -galactosidase está presente na camada granular e na basal (Figura 8B), e no grupo III (indivíduo com 70 anos), nota-se um incremento da  $\beta$ -galactosidase nas células da camada basal da epiderme e em células suprabasais, de forma punctiforme no citoplasma (Figura 8C). Na figura 8D observa-se ausência de marcação no corte histológico de pele humana no controle negativo da reação (ausência de incubação do anticorpo primário).





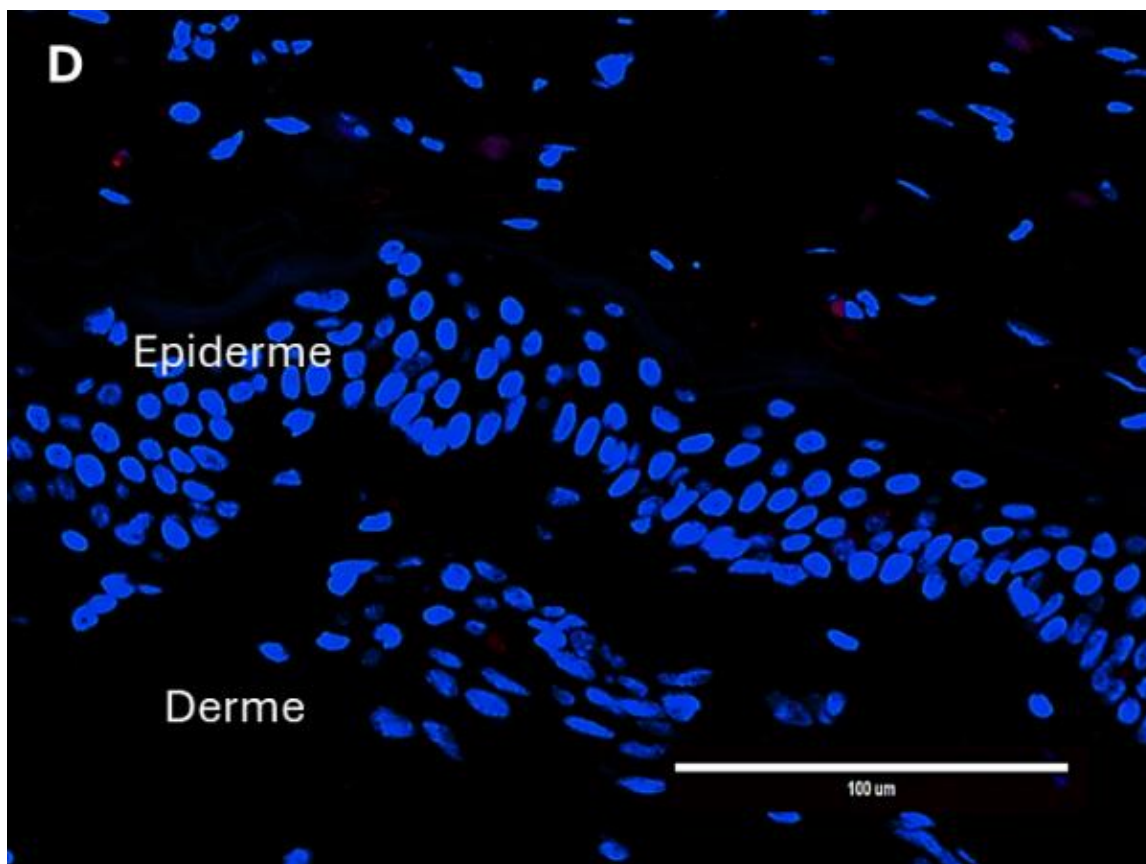
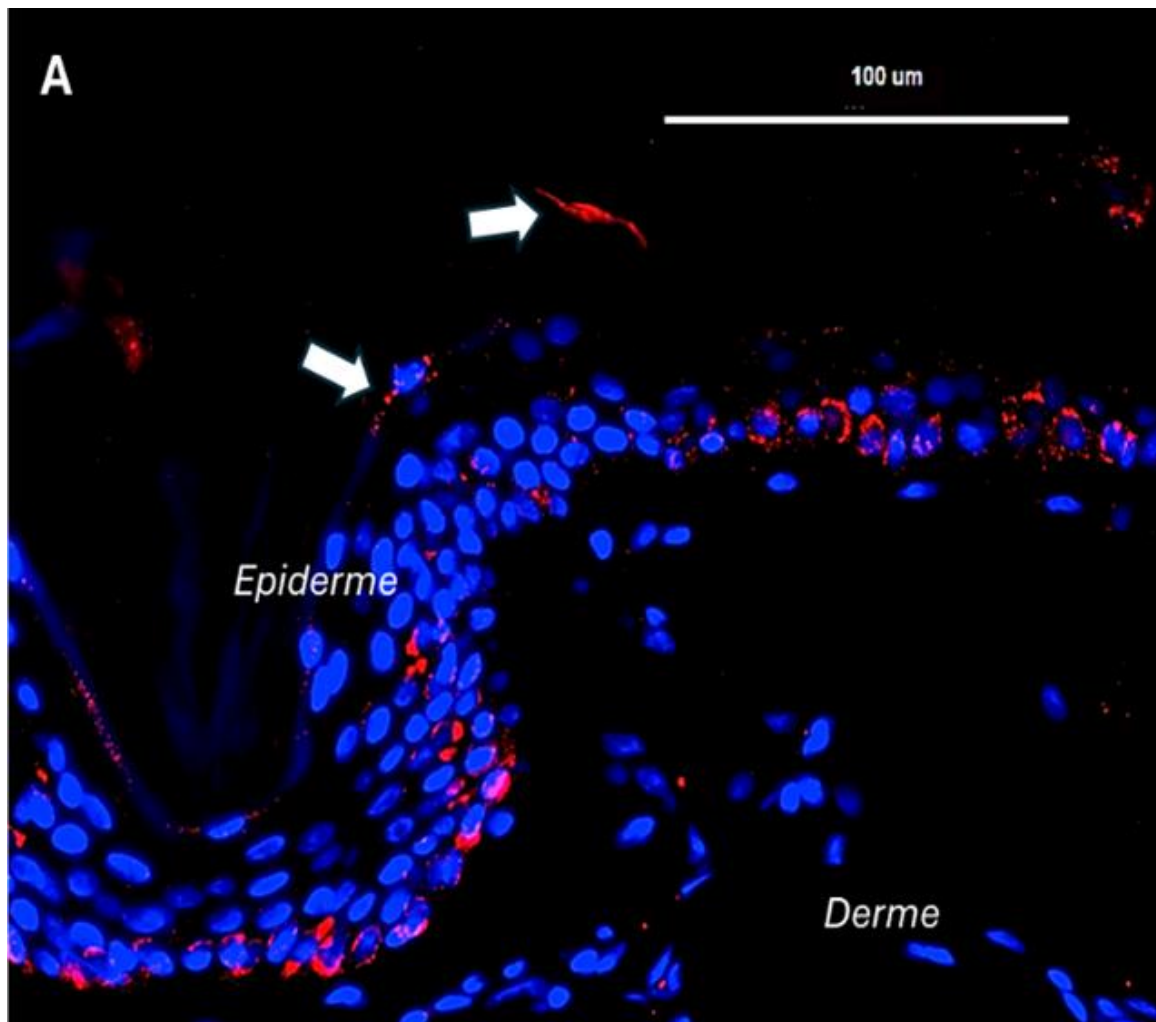


Figura 8. Imagens representativas da imunofluorescência para  $\beta$ -galactosidase em indivíduo do grupo I (19 anos) (A), indivíduo do grupo II (35 anos) (B) e em indivíduo do grupo III (760 anos) (C). Controle negativo da reação (D). Após a incubação do anticorpo secundário conjugado com Cy3 (vermelho), os cortes histológicos foram incubados com o corante nuclear Hoechst (azul). Barra de calibração: 100  $\mu$ m.

A figura 9A demonstra, com maior detalhe, a presença da  $\beta$ -galactosidase na pele de indivíduo do grupo III. A marcação é pontilhada, citoplasmática, presente em células da camada basal, em algumas células suprabasais e em células da camada granulosa. O percentual de células  $\beta$ -galactosidase positivas na epiderme, nos diferentes grupos, está demonstrado no gráfico (Figura 9B); a  $\beta$ -galactosidase aumenta progressivamente com o envelhecimento intrínseco, de

forma significativa (grupo I vs grupo II; grupo II vs grupo III -  $p=0,04$ ; grupo I vs grupo III –  $p<0,0001$ ).



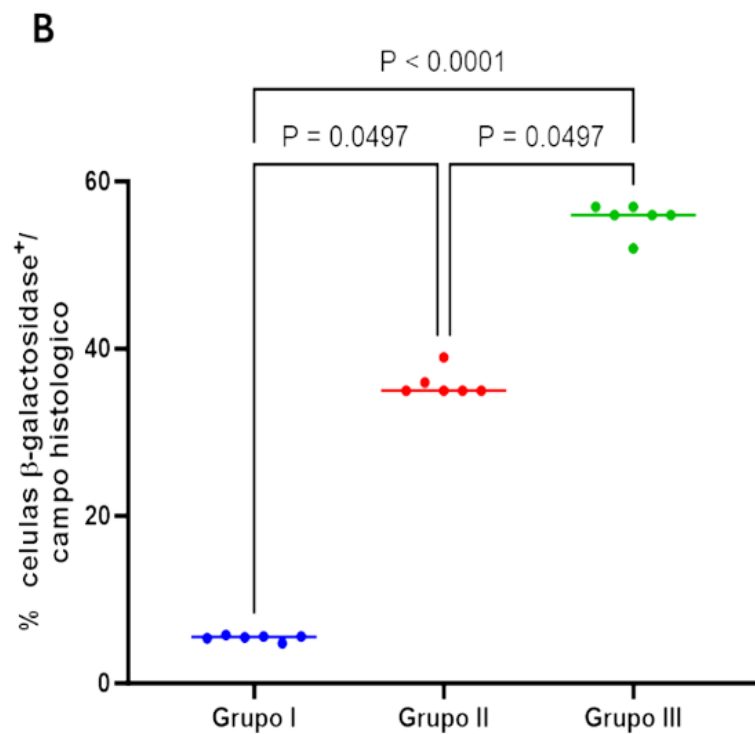


Figura 9. Imagem representativa da imunofluorescência para  $\beta$ -galactosidase. Após a incubação do anticorpo secundário conjugado com Cy3 (vermelho), os cortes histológicos foram incubados com o corante nuclear Hoechst (azul). Os resultados estão expressos como mediana e foram submetidos ao teste ANOVA não paramétrico, de comparações múltiplas, seguido do pós-teste de Dunn.  $P < 0.5$  foi considerado como significativo. Grupo 1 (n=6); Grupo 2 (n=6); Grupo III (n=6).

## 5 DISCUSSÃO

O envelhecimento biológico é definido como a perda da integridade fisiológica que progride com a idade cronológica e se acelera com estressores, como a luz ultravioleta (López-Otín et al., 2013, 2023). Dentro das características da idade biológica incluem-se a senescência celular, caracterizada como uma parada irreversível do ciclo celular em resposta a estressores diversos. A resposta aos diferentes estímulos indutores da senescência pode ser tanto benéfica, durante vários processos patológicos e fisiológicos, como na reparação de feridas e na supressão de tumores quanto nocivas para os organismos, especialmente durante o processo do envelhecimento (He & Sharpless, 2017). Dentre os marcadores bem estabelecidos para a senescência celular estão incluídos os inibidores do ciclo celular, p21WAF1 e a p16INK4, apesar de não serem específicos para senescência (Idda et al., 2020).

Uma série de evidências tem mostrado que a maquinaria celular envolvida na diferenciação dos queratinócitos está acoplada a fatores celulares responsáveis pela senescência replicativa durante a diferenciação dos queratinócitos humanos, incluindo p21WAF1 e p16INK4A (Yu et al., 2025). A senescência replicativa é um estado permanente de não divisão que ocorre na maioria das células somáticas, após um número predeterminado de divisões celulares. É o que ocorre com as células em cultura após uma série de passagens (Hayflick & Morehead, 1961), e é resultado do encurtamento dos telômeros (Bodnar et al., 1998), e acarreta uma parada irreversível do ciclo celular,



modificações na expressão gênica e na morfologia celular assim como mudança nas funções celulares (Campisi, 1996). Acredita-se que a senescência replicativa é um dos mecanismos envolvidos no envelhecimento) e no desenvolvimento de certas condições patológicas relacionadas ao envelhecimento (López-Otín et al., 2013).

O incremento dos níveis celulares de p21WAF1 (Paramio et al., 2001) e p16INK4A (Alcorta et al., 1996) estão associadas a senescência replicativa em algumas células cultivadas (Sedivy et al., 1998) e *in vivo* (Dimri et al., 1995). Apesar de p21WAF1 e a p16INK4 estarem envolvidas na parada do ciclo celular nas células senescentes, elas funcionam através de mecanismos distintos. O produto do gene p16, p16INK4, compete com a ciclina D para se ligar com as quinases dependentes de ciclina 4/6 (CDK 4/6), inibindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (RB) e bloqueia a transição da fase G1 para a fase S. Além disso, a p16INK4 promove a degradação da RB fosforilada, inibindo a progressão do ciclo celular (Aprelikova et al., 1995). A p21WAF1, por sua vez, inibe as CDKs A, D e a E, prevenindo a progressão do ciclo celular na transição G1/S and G2/M transitions (Huang et al., 2022; Romanov & Rudolph, 2016). Além de suas diferenças nas vias da parada do ciclo celular, p16INK4 e p21WAF1 também variam em relação as subpopulações de células senescentes associadas, ao tipo do estresse e mecanismos de regulação do estresse, fenótipos secretórios (Yu et al., 2025).

Para a detecção de células senescentes recomenda-se, pela não especificidade dos biomarcadores de senescência, a combinação de vários

marcadores para superar a sensibilidade limitada e a forte heterogeneidade dos marcadores nos diferentes tecidos (Gorgoulis et al., 2019; Wiley et al., 2017). Além disso, pelo fato da p16INK4 e p21WAF1 estarem implicadas na diferenciação epidérmica, como visto acima, optamos, neste trabalho, pela utilização de outros marcadores, não implicados na diferenciação dos queratinócitos como a  $\beta$  galactosidase e a lamina B1.

. O aumento da atividade da enzima S- $\beta$  gal é um dos biomarcadores mais utilizados na detecção de senescência. Porém, sua detecção nos tecidos é problemática uma vez que depende de amostras de tecido congeladas, nem sempre acessíveis. Além disso, a reação histoquímica para sua detecção depende de condições estritas, com controle de pH e utilização de reagentes onerosos.

A  $\beta$ -D-galactosidase ácida (EC 3.2.1.23) é uma hidrolase de eucariotos presente nos lisossomos (Suzuki et al., 1995). Seu pH ótimo para o funcionamento é ácido (pH 4,0-4,5), semelhante ao meio do lisossomo. A atividade da  $\beta$ -galactosidase lisossomal pode ser detectada in situ através de uma reação citoquímica realizada no pH 4,0 utilizando o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal) (Dimri et al., 1995; van der Loo et al, 1998). Atividade da  $\beta$ -galactosidase no pH 6,0 foi descrita em cultura de fibroblastos senescentes, mas não em células em cultura quiescentes ou terminalmente diferenciadas assim como em biópsias de pele humana de indivíduos idosos (Dimri et al., 1995). Esta reação citoquímica é considerada como a forma para se detectar células em senescência replicativa em cultura (Reznikoff

et al., 1996; Serrano et al., 1997; Bodnar et al., 1998; Van der Loo et al., 1998; Tsukamoto et al., 1998; Matsunaga et al., 1999) e *in vivo* (Sigal et al., 1999; Mishima et al., 1999) sendo atualmente conhecida como  $\beta$ -galactosidase associada a senescência (SA- $\beta$ -galactosidase), também presente nos lisossomos (Lee et al., 2006). Kurz e colaboradores sugerem que a atividade da SA- $\beta$ -galactosidase é manifestação do aumento da expressão e da atividade da  $\beta$ -galactosidase ácida, lisossomal clássica (Kurz et al., 2000), que é identificada no pH subótimo pH 6 ou até mesmo no pH 5,8 (Jannone et al., 2020). Portanto, estes dados validam a utilização do anticorpo anti- $\beta$ -galactosidase comercial, para a detecção da SA- $\beta$ -galactosidase, assim como os trabalhos que utilizaram este anticorpo (Zhang et al., 2023; Zou et al., 2023). Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram a presença de células senescentes  $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> na camada basal da epiderme e nas células da camada espinhosa/granular da epiderme (Dimri et al., 1995; Velarde et al., 2012).

No momento, ainda há poucos estudos caracterizando a diminuição da lamina B1 como biomarcador de senescência. Predominam os estudos *in vitro* onde, cultura de células em senescência replicativa foram testados e os níveis da proteína lamina B1 foram verificados por imunocitoquímica, *western blot*, citometria de fluxo (Dreesen et al., 2013; Freund et al., 2012) ou a expressão gênica por PCR (Shah et al., 2013). *In situ*, na pele humana ou em murinos, a diminuição da lamina B1 em queratinócitos senescentes foi mostrada através da técnica imuno-histoquímica (Dreesen et al., 2013; Wang et al., 2017). Golubtsova e colaboradores (2016) investigaram a diminuição da lamina B1 na pele humana

desde a pele fetal até a idade de 85 anos, num total de 106 biópsias de 44 indivíduos de sexo feminino e 62 do sexo masculino. Porém seu foco era o fibroblasto. A atenuação da imunoexpressão de lamina B1 é bastante heterogênea na pele humana, em particular na epiderme, devido ao maior número de camadas epidérmicas. Indivíduos com 18 anos apresentam alguns queratinócitos com expressão menor. Não há uma clara definição de quanto de decréscimo da lamina B1 é necessário para se considerar senescência. Deste modo optamos, neste estudo, quantificar o decréscimo de lamina B1, através de escore histológico numérico e examinar o resultado da quantificação. Pudemos verificar que acima de 30 anos há progressivamente o aumento de células epidérmicas com imunoexpressão leve de lamina B1 na membrana nuclear.

## **6 CONCLUSÃO**

Com o envelhecimento cronológico da pele, há um aumento significativo de células com níveis baixos de lamina B1 na membrana nuclear de células epidérmicas e incremento da proteína  $\beta$ -galactose indicando haver o incremento de células com fenótipo de célula senescente na epiderme humana durante o envelhecimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15, 978–990. doi: 10.1038/ncb2784.

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; 93, 13742–13747.

Alsheimer M, Benavente R. Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res.* 1996; 228, 181-188.

Andrade AM, Sun M, Gasek NS, et al. Role of senescent cells in cutaneous wound healing. *Biology.* 2022; 11, 1731. doi:10.3390/biology11121731.

Aprelikova O, Xiong Y, Liu ET. Both p16 and p21 families of CDK inhibitors block CDK phosphorylation by the CDK activating kinase (CAK). *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 18195-18197.

Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell.* 2017; 169, 132–147. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.031.

Basisty N, Kale A, Jeon OH, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* 2020; 18(1), e3000599. doi: 10.1371/journal.pbio.3000599.

Bavik C, Coleman I, Dean JP, et al. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through

paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 2006; 66, 794–802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.

Bergstresser PR, Richard Taylor J. Epidermal ‘turnover time’—a new examination. *Br. J. Dermatol.* 1977; 96, 503–509. doi:10.1111/j.1365-2133.1977.tb07152.x.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998; 279, 349–352. doi: 10.1126/science.279.5349.349.

Bojang PJr, Ramos KS. Epigenetic reactivation of LINE-1 retrotransposon disrupts NuRD corepressor functions and induces oncogenic transformation in human bronchial epithelial cells. *Mol. Oncol.* 2018; 12(8): 1342–1357. doi: 10.1002/1878-0261.12329.

Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8, 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 2013; 75, 685–705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.

Campisi J. Replicative Senescence: An Old Lives’ Tale? *Cell.* 1996; 84, 497–500. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81023-5.

Capri M, Salvioli S, Sevini F, et al. The genetics of human longevity. *Ann New York Acad Sci.* 2006; 1067, 252–263.

Chen M, Chen Z-Q, Cui P-G et al. The methylation pattern of p16INK4a gene promoter in psoriatic epidermis and its clinical significance. *Br J Dermatol.* 2008; 158, 987–993. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08505.x.

Chien Y, Scuoppo C, Wang X, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Dev.* 2011; 25, 2125–2136. doi:10.1101/gad.17276711.

Choi EJ, Kil IS, Cho EG. Extracellular Vesicles Derived from Senescent Fibroblasts Attenuate the Dermal Effect on Keratinocyte Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21, 1022. doi: 10.3390/ijms21031022.

Chojnowski A, Ong PF, Wong ES, et al. Progerin reduces LAP2-telomere association in Hutchinson-Gilford progeria. *eLife* 2015; 4, e07759. doi:10.7554/eLife.07759.

Chung CL, Lawrence I, Hoffman M, et al. Topical rapamycin reduces markers of senescence and aging in human skin: an exploratory, prospective, randomized trial. *GeroScience.* 2019; 41, 861–869. doi: 10.1007/s11357-019-00113-y.

Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Rev Cancer.* 2010; 10, 51–57. doi: 10.1038/nrc2772.

Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol Mech. Dis.* 2010; 5, 99–118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Coppé J-P, Kauser K, Campisi J, et al. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 29568–29574. doi: 10.1074/jbc.M603307200.



Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PloS one* 2010; 5, e9188. doi: 10.1371/journal.pone.0009188.

Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008; 6, 2853–2868. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.

Coppé J-P, Rodier F, Patil CK, et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 2011; 286, 36396–36403. doi: 10.1074/jbc.M111.257071.

Davalli P, Mitic T, Caporali A et al. (2016) ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and Age-Related diseases, *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:3565127. doi: 10.1155/2016/3565127.

Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 2009; 4, 1798–1806. doi: 10.1038/nprot.2009.191.

Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2020; 22, 75–95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.

Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92, 9363–9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Domen A, Deben C, Verswyvel J, et al. Cellular senescence in cancer: clinical detection and prognostic implications. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022; 41, 360–435. doi: 10.1186/s13046-022-02555-3.

Dreesen O, Chojnowski A, Ong PF, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J. Cell Biol.* 2013; 200, 605–617. doi: 10.1083/jcb.201206121.

Fagagna F, Ad, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003; 426(6963), 194–198. doi: 10.1038/nature02118.

Finch CE, Tanzi, RE. Genetics of Aging. *Science.* 1997; 278(5337), 407–411. doi: 10.1126/science.278.5337.407.

Fisher GJ, Quan T, Purohit T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am. J. Pathol.* 2009; 174, 101–114. doi: 10.2353/ajpath.2009.080599.

Fitsiou E, Pulido T, Campisi J, et al. Cellular senescence and the senescence-associated secretory phenotype as drivers of skin photoaging. *J. Invest Dermatol.* 2021; 141, 1119–1126. doi: 10.1016/j.jid.2020.09.031.

Floyd, R, Hensley, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases, *Neurobiol Aging.* 2002; 23, 795–807. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00019-2.

Franzke C-W, Tasanen K, Schäcke H, et al. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* 2002; 21, 5026–5035. doi: 10.1093/emboj/cdf532.

Freund A, Laberge R-M, Demaria M, et al. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell.* 2012; 23, 2066–2075. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.

Furukawa K, Inagaki H, Hotta Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* 1994; 212, 426–430. doi: 10.1006/excr.1994.1164.

Furukawa K, Hotta Y. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* 1993; 12, 97–106. doi: 10.1002/j.1460-075.1993.tb05635.x.

Gerace L, Blum A, Blobel G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol.* 1978; 79, 546–566. doi: 10.1083/jcb.79.2.546.

Gerasymchuk M, Robinson GI, Groves A, et al. Phytocannabinoids Stimulate Rejuvenation and Prevent Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Cells* [online]. 2022; 11, 3939–3939. doi: 10.3390/cells11233939.

Ghosh K, Capell BC. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *J Invest Dermatol.* 2016; 136, 2133–2139. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.621.

Gilbert LA, Hemann MT. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell.* 2010; 143: 355–366. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.043.

Gniadecka M, Nielson OF, Wessel S, et al. Water and Protein Structure in Photoaged and Chronically Aged Skin. *J Invest Dermatol.* 1998; 111, 1129–1133. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00430.x.

Goings JJ, Stuart RC, Downie M, et al. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J. Pathol.* 2002; 196, 394–400. doi:10.1002/path.1059.

Golubtsova NN, Filippov FN, Gunin AG. Lamin B1 and lamin B2 in human skin in the process of aging. *Adv Gerontol.* 2016; 6, 275–281. doi: 10.1134/s2079057016040068.

Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular senescence: Defining a path forward. *Cell*, 2019; 179, 813–827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.

Gossrau R. Catalytic histochemistry of acid and neutral hydrolases in plant seedlings. *Histochem J.* 1991; 23, 483–489. doi: 10.1007/BF01041379.

Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annual Rev Biochem.* 2015; 84, 131–164. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034115.

Gu C, Xu H-Y, Zhou Y-H, et al. Multiomics analyses unveil the involvement of microRNAs in pear fruit senescence under high- or low-temperature conditions. *Hortic Res.* 2020; 7, 196. doi: 10.1038/s41438-020-00420-y.

Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature.* 2000; 408, 255–262. doi: 10.1038/35041700.

Hasegawa T, Oka T, Son HG, et al. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells eliminate senescent cells by targeting cytomegalovirus antigen. *Cell.* 2023; 186, 1417–1431. e20. doi: 10.1016/j.cell.2023.02.033.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25, 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965; 37, 614–636. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.

He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease. *Cell*, 2017; 169, 1000–1011. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015.

Ho CY, Dreesen O. Faces of cellular senescence in skin aging. *Mech. Ageing Dev.* 2021; 198, 111525. doi: 10.1016/j.mad.2021.111525.

Hoare M, Ito Y, Kang T-W, et al. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat. Cell Biol.* 2016; 18, 979–992. doi:10.1038/ncb3397.

Huang W, Hickson LJ, Eirin A et al. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol.* 2022; 18, 611–627. doi: 10.1038/s41581-022-00601-z.

Idda ML, McClusky WG, Lodde V et al. Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging* 2020; 12, 4052-4066. doi: 10.18632/aging.10290.

Imai S-I, Guarente L. NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* 2014; 24, 464–471. doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.002.

Ito Y, Hoare M, Narita M. Spatial and temporal control of senescence. *Trends Cell Biol.* 2017; 27, 820–832. doi: 10.1016/j.tcb.2017.07.004.

Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J. Cell Biol.* 2013; 202, 129–143. doi: 10.1083/jcb.201212110.

Jannone G, Rozz, M, Najimi M, et al. An optimized protocol for histochemical detection of senescence-associated beta-galactosidase activity in cryopreserved liver tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 2020; 68, 269–278. doi: 10.1369/0022155420913534.

Jarrold BB, Tan CYR, Ho CY, et al. Early onset of senescence and imbalanced epidermal homeostasis across the decades in photoexposed human skin: fingerprints of inflammaging. *Exp. Dermatol.* 2022; 31, 1748–1760. doi: 10.1111/exd.14654.

Kandhaya-Pillai R, Miro-Mur F, Alijotas-Reig J, et al. TNF- $\alpha$  senescence initiates a STAT-dependent positive feedback loop, leading to a sustained interferon signature, DNA damage, and cytokine secretion. *Aging.* 2017; 9, 2411–2435. doi: 10.18632/aging.101328.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004; 114, 1299–1307. doi: 10.1172/jci22475.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes & Dev.* 2010; 24, 2463–2479. doi:10.1101/gad.1971610.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008; 133, 1019–1031. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.039.

Kumari R, Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9, 485. doi:10.3389/fcell.2021.645593.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2000; 113, 3613–3622. doi: 10.1242/jcs.113.20.3613.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2000; 113, 3613–3622. doi: 10.1242/jcs.113.20.3613.

Langton AK, Halai P, Griffiths CE, et al. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech. Ageing Dev.* 2016; 156, 14–16. doi: 10.1016/j.mad.2016.03.006.

Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal. *Aging Cell.* 2006; 5, 187–195. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.

Lee J-H, Kim EW, Croteau DL, et al. Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging. *Exp. Mol. Med.* 2020; 52, 1466–1474. doi: 10.1038/s12276-020-00497-4.

Litaker JR, Pan J, Cheung Y, et al. Expression profile of senescence-associated beta-galactosidase and activation of telomerase in human ovarian surface epithelial cells undergoing immortalization. *Int J Oncol.* 1998; 13, 951–956. doi: 10.3892/ijo.13.5.951.

Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell M-C. et al. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* 2019; 117, 15–22. doi: 10.1016/j.cyto.2019.01.013.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013; 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Lovell CR, Smolenski KA, Durance VC. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Brit J Dermatol*. 1987; 117, 419–428. doi: 10.1111/j.1365-2133.1987.tb04921.x.

Low E, Alimohammadiha G, Smith LA, et al. How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing? *Ageing Res. Rev.* 2021; 71, 101456. doi: 10.1016/j.arr.2021.101456.

Lukášová E, Kovarčík A, Bacčíková A, et al. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem. J.* 2017; 474, 281–300. doi: 10.1042/BCJ20160459.

Lupa DMW, Kalfalah F, Safferling K, et al. Characterization of skin aging–associated secreted proteins (SAASP) produced by dermal fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135, 1954–1968. doi: 10.1038/jid.2015.120.

Martin GM, Oshima J. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*. 2000; 408, 263–266. doi: 10.1038/35041705.

Matsunaga H, Handa JT, Aotaki-Keen A et al. Beta-galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 1999; 40, 197-202. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9888444>

McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* 1998; 8, 351–354. doi: 10.1016/s0960-9822(98)70137-x.



Mendez M, Stanley A, Park H, et al. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg*. 1998; 28, 876–883. doi: 10.1016/s0741-5214(98)70064-3.

Michaloglou C, Vredeveld CW, Soengas MS, et al. BRAF<sup>V600E</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005; 436(7051), 720–724. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03890>.

Mishima K, Handa JT, Aotaki-Keen A. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis. Sci*. 1999; 40, 1590–1593. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10359342>

Naasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase Inhibition, Telomere Shortening, and Senescence of Cancer Cells by Tea Catechins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249, 391–396. doi:<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9075>.

Nacarelli T, Lau L, Fukumoto T, et al. NAD<sup>+</sup> metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat. Cell Biol*. 2019; 21, 397–407. doi:10.1038/s41556-019-0287-4.

Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003; 113, 703–716. doi:[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x).

Ortonne JP. Pigmentary changes of the ageing skin. *Br. J. Dermatol*. 1990;122, 21–28. doi:10.1111/j.1365-2133.1990.tb16121.x.

Papaccio F, D'Arino A, Caputo S, et al. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants*. 2022; 11, 1121. doi:<https://doi.org/10.3390/antiox11061121>.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, et al. The ink4a/arf Tumor Suppressors Cooperate with p21cip1/waf in the Processes of Mouse Epidermal Differentiation, Senescence, and Carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2001; 276, 44203–44211.

Passos JF, Nelson G, Wang C, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol*. 2010; 6, 347. doi:10.1038/msb.2010.5.

Pawlikowski J, McBryan T, Tuyn J van. Wnt signaling potentiates neovogenesis. *Proc Nat Acad Sci*. 2013; 10, 16009–16014. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1303491110>.

Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejic M, et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat. Commun*. 2019; 10, 2387. doi:10.1038/s41467-019-10335-5.

Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2017; 29, 168-174.

Ren B, Cam H, Takahashi Y, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes & Development*. 2002; 16, 245–256. doi:<https://doi.org/10.1101/gad.949802>.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. 2006; 5, 379–389. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x>.

Reznikoff CA, Yaeger TR, Belair CD, et al. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res*. 1996; 56, 2886-2990.

Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. 2019; 146(20):dev151837. doi:10.1242/dev.151837.

Rocha A, Dalgarno A, Neretti N. The functional impact of nuclear reorganization in cellular senescence. *Briefings Funct. Genomics*. 2022; 21, 24–34. doi:10.1093/bfpg/elab012.

Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009; 11, 973–979. doi:10.1038/ncb1909.

Romanov VS, Rudolph KL. p21 shapes cancer evolution. *Nat Cell Biol*. 2016; 18, 722–724. doi:<https://doi.org/10.1038/ncb3382>.

Ryu Y, Kang KA, Piao MJ, et al. Particulate matter-induced senescence of skin keratinocytes involves oxidative stress-dependent epigenetic modifications. *Exp Mol Med*. 2019; 51, 1-14. doi: 10.1038/s12276-019-0305-4.

Sasaki T, Maier B, Bartke A, et al. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell*. 2006; 5, 413–422. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00235.x.

Schmeer C, Kretz A, Wengerodt D, et al. Dissecting Aging and Senescence. Current Concepts and Open Lessons. *Cells*. 2019; 8, 1446. doi: 10.3390/cells8111446.

Sedivy JM. Can ends justify the means? Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1998; 95, 9078–9081. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9078>.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997; 88, 593-602.

Shah PP, Donahue G, Otte GL, et al. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev*. 2013; 27, 1787–1799. doi: 10.1101/gad.223834.113.

Sharpless NE, DePinho, RA, How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8, 703–713. doi:<https://doi.org/10.1038/nrm2241>.

Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer*. 2015; 15, 397–408. doi:10.1038/nrc3960.

Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev*. 2011; 25, 2579–2593. doi:<https://doi.org/10.1101/gad.179515.111>.

Sigal SH, Rajvinshi P, Gorla GR, et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*. 1999; 276, G1260-G1272.

Song P, An J, Zou M-H. Immune clearance of senescent cells to combat ageing and chronic diseases. *Cells*. 2020; 9, 671. doi:10.3390/cells9030671.

Steenvoorden DP, van Henegouwen GM. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B*. 1997; 41: 1-10. doi: 10.1016/s1011-1344(97)00081-x.

Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *J Struct Biol*. 1998; 122(1-2), 42–66. doi:<https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3987>.

Sun Y, Campisi J, Higano C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat. Med.* 2012; 18, 1359–1368. doi:10.1038/nm.2890.

Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A. (1995).  $\beta$ -galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th Ed. (ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet and W. S. Sly), pp. 2801-2810. New York: McGraw-Hill.

Tan CYR, Tan CL, Chin T, et al. Nicotinamide prevents UVB-and oxidative stress-induced photoaging in human primary keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 2021; 142, 1670–1681.e12. doi:10.1016/j.jid.2021.10.021.

Thomas T, Voss AK, Gruss P. Distribution of a murine protein tyrosine phosphatase BL- $\beta$ -galactosidase fusion protein suggests a role in neurite outgrowth. *Dev Dyn.* 1998; 212, 250–257.

Tsukamoto A, Kaneko Y, Yoshida T, et al. 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Metabolite of Estrogen, Enhances Apoptosis and  $\beta$ -Galactosidase Expression in Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 248, 9-12. doi: 10.1006/bbrc.1998.8902.

Tuttle CS, Waaijer ME, Slee-Valentijn MS, et al. Cellular senescence and chronological age in various human tissues: a systematic review and meta-analysis. *Aging Cell.* 2020; 19, e13083. doi:10.1111/acer.13083.

United Nations Population Funds. Ageing. United Nations Population Fund. <https://www.unfpa.org/> (Acessado 16 March 2025).

Van der Loo B, Fenton MJ, Erusalimsky JD. Cytochemical detection of a senescence-associated  $\beta$ -galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Exp. Cell Res.* 1998; 241: 309-315.

Velarde MC, Demaria M. Targeting Senescent Cells: Possible Implications For Delaying Skin aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2016; 62, 513–518. <https://doi.org/10.1159/000444877>.

Victorelli S, Lagnado A, Halim J, et al. Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J.* 2019; 38, e101982. doi:10.15252/embj.2019101982.

Waaiker MEC, Gunn DA, Adams PD, et al. P16INK4a positive cells in human skin are indicative of local elastic fiber morphology, facial wrinkling, and perceived age. *Journals Gerontology Ser. A Biomed. Sci. Med. Sci.* 2016; 71, 1022–1028. doi:10.1093/gerona/glv114.

Waaiker MEC, Parish WE, Strongitharm BH, et al. The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell.* 2012; 11, 722–725. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00837.x.

Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Front. Genet.* 2018; 9: 247. doi:10.3389/fgene.2018.00247.

Wang AS, Nakamizo S, Ishida Y, et al. Identification and quantification of senescent cell types by lamin B1 and HMGB1 in Actinic keratosis lesions. *J. Dermatol Sci.* 2022; 105, 61–64. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.12.001.

Wang AS, Ong PF, Chojnowski A, et al. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci. Rep.* 2017; 7, 15678. doi: 10.1038/s41598-017-15901-9.

Weinmüllner R, Zbiral B, Becirovic A, et al. Organotypic human skin culture models constructed with senescent fibroblasts show hallmarks of skin aging. *NPJ Aging Mech. Dis.* 2020; 6, 4. doi: 10.1038/s41514-020-0042-x.

Wiley CD, Flynn JM, Morrissey C, et al. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence. *Aging Cell.* 2017; 16, 1043–1050. doi: 10.1111/accel.12632.

Wilkinson HN, Hardman MJ. Senescence in wound repair: emerging strategies to target chronic healing wounds. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8, 773. doi: 10.3389/fcell.2020.00773.

Wlaschek M, Maity P, Makrantonaki E, et al. Connective Tissue and Fibroblast Senescence in Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology.* 2021; 141, 985–992. doi: 10.1016/j.jid.2020.11.010.

World Health Organization (2022). Ageing and health. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (Acessado 10 Março 2025)

Xia W, Hammerberg C, Li Y, et al. Expression of catalytically active matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts induces collagen fragmentation and functional alterations that resemble aged human skin. *Aging Cell.* 2013; 12, 661–671. doi: 10.1111/accel.12089.

Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007; 445(7128), 656–660. doi: 10.1038/nature05529.

Yang G, Rosen DG, Zhang Z, et al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103, 16472–16477. doi: 10.1073/pnas.0605752103.

Yoon JE, Kim Y, Kwon S, et al. Senescent fibroblasts drive ageing pigmentation: A potential therapeutic target for senile lentigo. *Theranostics*. 2018; 8, 4620–4632. doi: 10.7150/thno.26975.

Yu GT, Ganier C, Allison DB, et al. Mapping epidermal and dermal cellular senescence in human skin aging. *Aging Cell*. 2025; 24, e14358. doi: 10.1111/accel.14358.

Zhang J, Brown R, Hogan MV, et al. Metformin Improves Tendon Degeneration by Blocking Translocation of HMGB1 and Suppressing Tendon Inflammation and Senescence in Aging Mice. *J Orthop Res*. 2023; 41, 1162–1176. doi: 10.1002/jor.25470.

Zou M, Mangum KD, Magin JC, et al. Prdm6 drives ductus arteriosus closure by promoting ductus arteriosus smooth muscle cell identity and contractility. *JCI Insight* 2023; 8, e163454. doi: 10.1172/jci.insight.163454.



## 8 ANEXO 1

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** A Pele - Análise de Parâmetros Imunohistoquímica e Ultraestrutural por Faixa Etária e Padrão de Pigmentação - Estudo do Envelhecimento.

**Pesquisador:** CESAR SILVEIRA CLAUDIO DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31996720.6.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** HOSPITAL UNIVERSITARIO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.118.956

##### Apresentação do Projeto:

Protocolo 137-20. Respostas recebidas em 19.6.2020.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1559407.pdf", postado em 19/05/2020.

##### Introdução:

A pele, além de ser a barreira que protege o corpo das agressões do ambiente externo como infecções, perda hídrica, variações de temperatura, radiação solar, tem também um importante papel social e na estética, e, expressa várias repercussões de desequilíbrios dos sistemas endocrinológicos, neurológicos, inflamatórios, etc. Inúmeras pesquisas de tratamentos funcionais e estéticas cutâneas são realizadas, entretanto, parece que há uma carência na literatura de um estudo histológico da pele normal, da área de mínima exposição solar, de acordo com a faixa etária e com a pigmentação cutânea como parâmetro para comparações. Um estudo da sequência cronológica da histologia da pele normal permite também compreender melhor o processo de

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.118.956

envelhecimento.

**Hipótese:**

O envelhecimento apresenta características histológicas, além das já conhecidas, que favorecem ou desfavorecem as cirurgias das mamas, de acordo com o envelhecimento intrínseco.

**Metodologia Proposta:**

Serão aproveitadas peças cirúrgicas descartada de mamoplastias estéticas. Após descarte da peça cirúrgica, um fragmento de um centímetro quadrado de pele e subcutâneo localizadas na junção dos quadrantes inferiores da mama, será retirada e fixada imediatamente na solução de formol zinco e enviado para o laboratório.

**Critério de Inclusão:**

Pacientes aptas a cirurgia estética de mama, Pacientes acima de 18 anos de idade, Pacientes que concordarem em doação e assinarem o TCLE

**Critério de Exclusão:**

Co-morbididades Tabagista Alterações cutâneas no local da biópsia Exposição solar frequente no local da biópsia Distúrbios psicológicos Uso de medicamentos hormonais IMC acima de 28

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar se há diferenças nas características histológicas normais da pele de acordo com a faixa etária e tipo de pigmentação, e estudar as características do envelhecimento intrínseco.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o pesquisador:

Riscos: Risco de danos físicos aos prontuários médicos, bem como perda de confidencialidade, por se tratar de análise de dados. Estes serão reduzidos a riscos mínimos por ter a sua análise restrita aos membros da pesquisa, em ambiente apropriado, no arquivo do próprio serviço. O material biológico é descarte da peça cirúrgica de procedimentos estéticos em pacientes saudáveis após avaliação pré-operatória de rotina do Serviço de Cirurgia Plástica do HUCFF, sem agentes

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.118.956

infecciosos ou neoplásicos, realizada no ambiente cirúrgico, e a peça será formalizada imediatamente após a biópsia.

**Benefícios:** Não haverá benefícios diretos ao participante. A elaboração do presente trabalho, um atlas de parâmetros de pele normal por faixa etária e tipo de pigmentação cutânea aprofundará os conhecimentos da morfologia cutânea e do processo de envelhecimento, servindo como material didático e, principalmente, facilitará futuras pesquisas morfológicas da pele.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma resposta ao parecer CEP n. 4.093.184, datado em 17/06/2020.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide item "Conclusões ou Pendências e Listas de Inadequações".

**Recomendações:**

Vide item "Conclusões ou Pendências e Listas de Inadequações".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (arquivo intitulado "TCLE\_.pdf", postado em 19/05/2020:

Lê-se na pág. 4 de 5: "CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o (a) Dr. (Dra.) \_\_\_\_\_, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.118.956

atendimento nesta instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha." Todo esse trecho deve ser removido, pois reafirmando o exposto na Resolução CNS nº 466 de 2012 e nas demais normativas éticas, no que tange ao TCLE, entende-se que a assinatura do participante de pesquisa, por si só, basta para consagrar seu consentimento para ser incluído no estudo. Caso o pesquisador queira inserir uma frase final declarativa do participante de pesquisa, essa deve ter redação simples, como "li e concordo em participar da pesquisa" ou "declaro que concordo em participar da pesquisa". As menções a rubricas e vias devem ir para o corpo do TCLE. Solicita-se adequação.

Resposta: Realizada adequação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme solicitação, apresentando-se de acordo após devidas correções.

Análise: pendência atendida.

2. Solicita-se anexar os currículos dos pesquisadores

Resposta: Os currículos foram postados na submissão prévia, com o nome do arquivo intitulado "CV\_investigadores". Realizo novamente o anexo do documento contendo os currículos dos pesquisadores em "OUTROS" conforme anexado em submissão anterior

Análise: pendência atendida.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n. 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais - a contar da data de aprovação do protocolo - que permitam ao Cep acompanhar o desenvolvimento dos projetos. Esses relatórios devem conter as informações detalhadas - naqueles itens aplicáveis - nos moldes do relatório final contido no Ofício Circular n.

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

**UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ**



Continuação do Parecer: 4.118.956

062/2011:

<[http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/aquivos/conep/relatorio\\_final\\_encerramento.pdf](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/conep/relatorio_final_encerramento.pdf)>, bem como deve haver menção ao período a que se referem. Para cada relatório, deve haver uma notificação separada. As informações contidas no relatório devem ater-se ao período correspondente e não a todo o período da pesquisa até aquele momento.

2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas de forma clara e sucinta, identificando-se, por cor, negrito ou sublinhado, a parte do documento a ser modificada, isto é, além de apresentar o resumo das alterações, juntamente com a justificativa, é necessário destacá-las no decorrer do texto (item 2.2.H.1, da Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                              | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1559407.pdf | 18/06/2020<br>21:26:46 |                                    | Aceito   |
| Outros                                                    | _CV_investigadores_.pdf                       | 18/06/2020<br>21:26:09 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| Outros                                                    | _CV_investigadores.doc                        | 18/06/2020<br>21:25:52 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEc_.pdf                                    | 18/06/2020<br>21:24:21 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEc.docx                                    | 18/06/2020<br>21:24:07 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| Outros                                                    | CV_investigadores.doc                         | 18/06/2020<br>21:23:31 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| Outros                                                    | carta_resposta.docx                           | 18/06/2020<br>21:21:04 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito   |
| Parecer Anterior                                          | Parecer_anterior.pdf                          | 19/05/2020             | CESAR SILVEIRA                     | Aceito   |

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br



UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.118.956

|                                                                       |                             |                        |                                    |        |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Parecer Anterior                                                      | Parecer_anterior.pdf        | 11:29:13               | CLAUDIO DA SILVA                   | Aceito |
| Outros                                                                | termo_anuencia_.pdf         | 19/05/2020<br>11:27:50 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | termo_anuencia.docx         | 19/05/2020<br>11:27:28 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLE_.pdf                   | 19/05/2020<br>11:26:40 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLE.docx                   | 19/05/2020<br>11:26:31 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | declar_comprometimento_.pdf | 19/05/2020<br>11:26:14 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Outros                                                                | decla_comprometimento.docx  | 19/05/2020<br>11:26:01 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                                           | carta_de_apresentacao_.pdf  | 19/05/2020<br>11:24:52 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores                                           | carta_de_apresentacao.docx  | 19/05/2020<br>11:24:39 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | materialbio_.pdf            | 19/05/2020<br>11:23:40 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | materialbio.docx            | 19/05/2020<br>11:23:29 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                            | decla_infraestrutura_.pdf   | 19/05/2020<br>11:23:17 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                            | decla_infraestrutura.docx   | 19/05/2020<br>11:23:07 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Cronograma                                                            | cronograma.pdf              | 19/05/2020<br>11:22:55 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Cronograma                                                            | Cronograma.docx             | 19/05/2020<br>11:22:47 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura                                          | Projeto.docx                | 19/05/2020<br>11:22:36 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 4.118.956

|                |                                 |                        |                                    |        |
|----------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| Investigador   | Projeto.docx                    | 19/05/2020<br>11:22:36 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Outros         | folha_de_rosto_pdf_editavel.pdf | 19/05/2020<br>11:22:14 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |
| Folha de Rosto | folha_de_rosto.pdf              | 19/05/2020<br>11:21:41 | CESAR SILVEIRA<br>CLAUDIO DA SILVA | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 02 de Julho de 2020

---

**Assinado por:**  
**Carlos Alberto Guimarães**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br



ANEXO 2

Dermatologic Surgery <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Thu, Mar 20,  
8:05 PM (5 days  
ago)

to me

20-Mar-2025

Dear Dr. Tamsin Burgues

RE: manuscript no. DS-00254-2025

Your paper entitled Patterns of lamin B1 and  $\beta$ -galactosidase immunoexpressions during human intrinsic cutaneous aging has been received and is being given full consideration for publication in Dermatologic Surgery.

Once you have uploaded your word document, the software system converts it over to pdf. for protection during the review process. Once you have submitted your paper, it is not necessary to send hardcopies by mail to the editorial office, until the time of acceptance.

Also, patient permissions will be collected at the time of acceptance. Please be sure to have these readily available so as not to delay the publication of your manuscript.

You are required to upload ALL of the author publication forms with your submission, however if you have not please note that both the copyright assignment form and the conflict of interest forms completed and signed by all authors will be required prior to publication. These forms are attached and are also available at the author center, under instructions and forms. Each author is NOW required to complete both the copyright assignment form and conflict of interest form.

You can check what is happening in the review process at any time by logging in to the Author Center at <https://mc.manuscriptcentral.com/ds>. Please remember to use only one account when submitting separate manuscripts for publication. Please mention the manuscript number in any correspondence. If, in the future, there are any changes to your contact details, please update your ScholarOne Manuscripts user account.

Sincerely,  
William P. Coleman, III, MD  
504-455-3180

