

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Hiperglicemia e senescência celular: efeitos da
suplementação com vitaminas C e E**

Daniely Soares Lino Kertesz

**Trabalho apresentado à disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II -
0060029, como requisito parcial para
graduação no curso de Nutrição da
FSP/ USP, turma nº 77.**

**Orientadora: Profa. Dra. Marinilce
Fagundes dos Santos**

**São Paulo
2023**

Hiperglicemia e senescência celular: efeitos da suplementação com vitaminas C e E

Daniely Soares Lino Kertesz

**Trabalho apresentado à disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II -
0060029, como requisito parcial para
graduação no curso de Nutrição da
FSP/ USP, turma nº 77.**

**Orientadora: Profa. Dra. Marinilce
Fagundes dos Santos**

São Paulo

2023

O conteúdo deste trabalho é publicado sob a Licença Creative Commons Atribuição
4.0 Internacional - CC BY 4.0



Agradecimentos

Realizar este trabalho não seria possível sem a colaboração de muitas pessoas. É possível que eu não me lembre de todas, mas desde já presto os meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, deste trabalho e também da minha trajetória acadêmica.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos, por me acolher em seu laboratório e acreditar na minha capacidade de realizar esta pesquisa. Sou muito grata por todo o apoio e também pelo incentivo de continuar a trilhar este caminho.

Agradeço imensamente também à Gabriélla Malheiros Moraes, minha instrutora de bancada, que me auxiliou em todos os momentos que precisei, seja me ensinando a realizar os experimentos, prosseguindo-os quando fiquei doente ou mesmo me motivando a seguir em frente. Sem sua ajuda este trabalho não seria possível e o seu apoio foi essencial para eu chegar até aqui.

Sou grata também a todos os meus amigos do laboratório: Cilene, Gabriela, Kelliton e Júlia, pelas suas contribuições com os experimentos e por sempre elevarem meu ânimo com a sua companhia. O acolhimento que recebi de vocês foi muito importante para eu seguir em frente.

Agradeço também à Profa. Dra. Dania Emi Hamassaki, minha orientadora durante três anos em um projeto do Programa Unificado de Bolsas (PUB) e amiga, que me apresentou à minha orientadora de TCC. Obrigada por estar sempre próxima e se preocupar comigo.

Expresso minha gratidão também à Bárbara Moraes da Silva Pessoa, minha grande amiga que esteve ao meu lado durante esses anos de graduação. Sou profundamente grata por todo o seu companheirismo ao longo do curso e pelo apoio emocional, especialmente em um momento bastante difícil para mim. Sua amizade tornou meus dias mais alegres e os desafios mais leves.

Agradeço também ao meu marido, Daniel Kertesz Alves, pelo apoio incondicional desde o meu ingresso na faculdade. Obrigada por ser sempre parceiro, compreensivo e por estar ao meu lado. Sua cumplicidade foi a mola propulsora que me possibilitou realizar este sonho.

E por fim, agradeço à agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho. Suas contribuições foram fundamentais para que pudéssemos adquirir os recursos necessários para desenvolver essa pesquisa.

Kertesz DSL. Hiperglicemia e senescência celular: efeitos da suplementação com vitaminas C e E. [Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Nutrição]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2023.

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que acarreta diversas complicações e tem impactos negativos na qualidade de vida das pessoas. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença, destacam-se o envelhecimento e a obesidade, os quais estão associados à senescência celular. A senescência celular é um processo irreversível de parada no ciclo celular, no qual a célula não morre por apoptose e sofre uma série de transformações morfofuncionais que interferem na adequada homeostase dos tecidos. Uma das possíveis causas da senescência celular é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante de neutralizá-las, podendo ser desencadeado por diversos fatores, entre eles a hiperglicemia. A defesa antioxidante do organismo é mediada por um sistema enzimático e outro não enzimático, no qual destacam-se componentes provenientes principalmente da alimentação. Nesse sentido, duas vitaminas amplamente reconhecidas por seu potencial efeito antioxidante são as vitaminas C e E. Com o objetivo de avaliar a senescência celular em condições de normoglicemia e hiperglicemia, bem como o efeito das vitaminas C e E nesse processo, este trabalho avaliou a expressão dos potenciais marcadores β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal), lipofuscina e Ki67 (marcador de proliferação celular). Para isso, foram realizados experimentos com fibroblastos dérmicos humanos cultivados em meios com concentração normal ou elevada de glicose, suplementados durante 7 dias com as vitaminas e um grupo controle com o antioxidante N-acetilcisteína. Além disso, foi realizado o cultivo de fibroblastos dérmicos de ratos normoglicêmicos e diabéticos previamente submetidos a um tratamento intraperitoneal com as mesmas vitaminas. Os resultados obtidos nos experimentos com SA- β -gal em fibroblastos murinos indicaram que, em condições de normoglicemia, as vitaminas podem reduzir a senescência celular. No entanto, o

mesmo não foi verificado em condições de hiperglicemia. Nos fibroblastos dérmicos humanos, a exposição à glicose elevada reduziu a atividade de SA- β -gal, enquanto o tratamento com NAC aumentou esta atividade, sugerindo que espécies reativas de oxigênio podem modular a atividade da enzima, não necessariamente ligada ao estado de senescência. Por outro lado, os experimentos com lipofuscina (marcador não específico que pode encontrar-se aumentado em células senescentes) e Ki67 (marcador de proliferação celular) demonstraram que uma alta concentração de glicose pode induzir a senescência (avaliada por células lipofuscina⁺ e Ki67⁺). As vitaminas não tiveram efeito em fibroblastos humanos; experimentos adicionais são necessários para comprovar sua atividade antioxidante sob as condições utilizadas *in vitro* neste estudo. Dessa forma, para avaliar o efeito conjunto das vitaminas C e E sobre a senescência celular em um ambiente hiperglicêmico, assim como o potencial da hiperglicemia para a promoção da senescência em fibroblastos, são necessários novos estudos com outros biomarcadores que possam, em conjunto, confirmar o estado de senescência.

Descritores: Hiperglicemia; Senescência Celular; Vitamina C; Vitamina E

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	7
2- OBJETIVOS	13
3- MÉTODOS	13
3.1- EXPERIMENTOS COM ANIMAIS (AMOSTRAS JÁ OBTIDAS)	13
3.1.1- Descrição dos Métodos Empregados para o Tratamento dos Animais e Obtenção das Células	13
3.1.2- Cultivo de Fibroblastos Dérmicos Murinos	15
3.2- EXPERIMENTOS COM FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS	16
3.2.1- Cultivo de Fibroblastos Dérmicos Humanos	16
3.3- EVIDENCIAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA- β -GAL)	16
3.4- EVIDENCIAÇÃO DE LIPOFUSCINA E KI67	17
3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4- RESULTADOS	18
5- DISCUSSÃO	24
6- CONCLUSÕES	26
7- IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA NO CAMPO DE ATUAÇÃO	27
8- REFERÊNCIAS	27

1- INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica não transmissível (DCNT), caracterizada pela hiperglicemia persistente, decorrente da deficiência na ação ou produção de insulina (COBAS et al., 2021). As DCNT estão entre as principais causas de morbimortalidade no mundo e geram importante impacto humano e socioeconômico. Nesse cenário, devido às suas complicações, o DM está associado a prejuízos à capacidade funcional, autonomia e qualidade de vida dos indivíduos (COSTA et al., 2017). De acordo com os dados do Atlas do *International Diabetes Federation* (IDF), em 2021, 537 milhões de pessoas no mundo apresentavam a doença; destes, mais de 15 milhões correspondem ao Brasil.

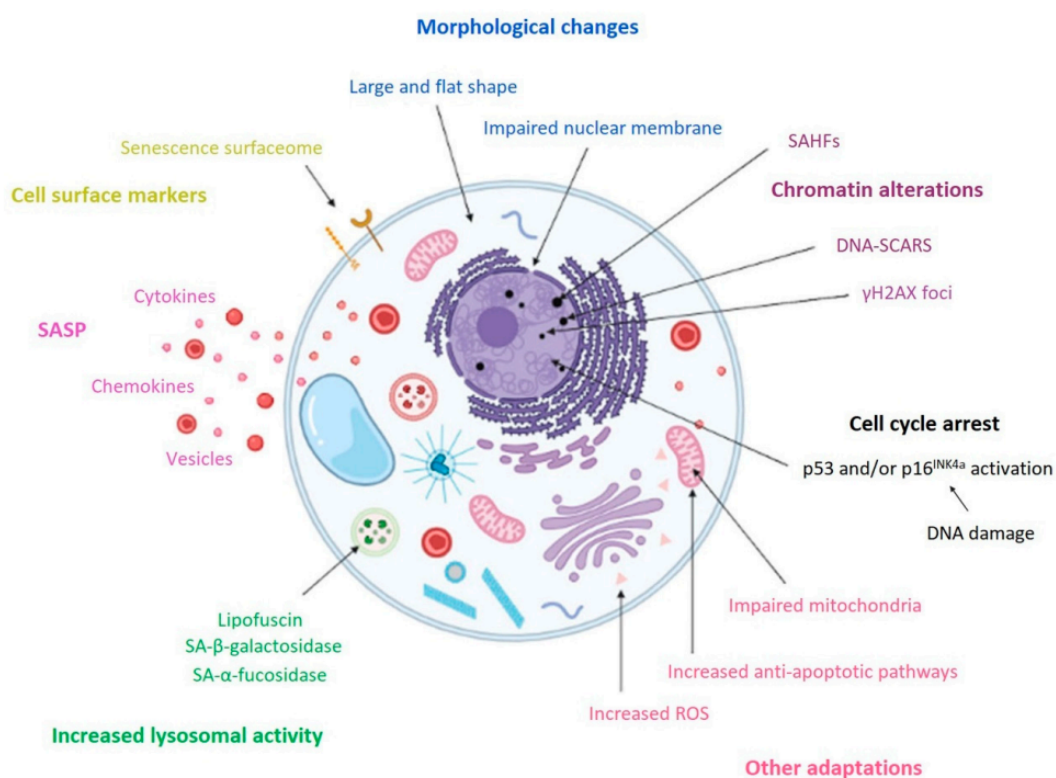
A estimativa do IDF (2021) para 2045 é que mais de 23 milhões de brasileiros sejam afetados pelo DM, fazendo com que o país mantenha a 6ª posição no ranking mundial. O crescimento exponencial com características epidêmicas é preocupante, uma vez que a patologia traz impactos significativos à saúde pública e exerce uma carga importante sobre os sistemas de saúde (SARTORELLI; FRANCO, 2003). Em 2018, estima-se que os custos totais com hipertensão, diabetes e obesidade para o Sistema Único de Saúde (SUS) tenham ultrapassado R\$ 3,4 bilhões, dos quais 30% foram referentes ao diabetes (NILSON et al., 2020).

Entre os principais fatores de risco para o DM destacam-se o envelhecimento e a obesidade. Ambos, além de contribuírem para o desenvolvimento da patologia, estão relacionados ao aumento de células senescentes (NARASIMHAN et al., 2021). A senescência celular pode ser definida como um processo de parada irreversível no ciclo celular, desencadeada por fatores intrínsecos e extrínsecos, em que a célula perde a sua capacidade de morrer por apoptose e pode desenvolver um fenótipo secretor específico, conhecido em inglês como SASP (*Secretory Associated Senescence Phenotype*), que leva a uma série de consequências para a homeostase funcional dos tecidos (KUDLOVA; SANCTIS; HAJDUCH, 2022).

Células senescentes sofrem uma série de mudanças morfológicas e funcionais. Em comparação com células normais, por exemplo, elas se tornam maiores e mais planas. Além disso, outras alterações incluem remodelação da cromatina, perda nuclear de lamina B1 e aumento da atividade lisossômica (KUDLOVA et al., 2022). Essas transformações resultam em características que

podem ser utilizadas como marcadores de senescência, sendo possível avaliá-las e quantificá-las em experimentos *in vitro*. A Figura 1 ilustra algumas dessas mudanças.

Figura 1 - Principais alterações morfofuncionais associadas às células senescentes.



Fonte: Kudlova et al. (2022, p. 3)

Atualmente, não existe um marcador único para a senescência, devendo ser avaliada por uma combinação entre os marcadores existentes. Dois marcadores comumente utilizados, associados à atividade lisossômica, são a β -galactosidase associada à senescência (ou SA- β -gal) e a lipofuscina. A SA- β -gal é uma enzima lisossômica expressa em maior quantidade em células senescentes, que pode ser detectada utilizando o reagente X-gal, formando um precipitado azul após clivagem (MILLER, 1972 apud DIMRI et al., 1995, p. 9364). A lipofuscina, por sua vez, é um agregado de proteínas danificadas e produtos da peroxidação lipídica (HÖHN et al., 2010), resultando em um resíduo de cor amarelo-marrom armazenado nos lisossomos, que se acumula nos tecidos envelhecidos (GEORGAKOPOULOU et al.,

2013). Sua detecção pode ser realizada utilizando o reagente Sentrator[®], que forma grânulos arroxeados no citoplasma das células.

Além dos marcadores descritos acima, outro indicador bastante utilizado é a avaliação da expressão de Ki67. O Ki67 é um marcador de proliferação celular ausente em células senescentes, uma vez que elas deixam de proliferar. Quando esse marcador está positivo, ele apresenta coloração nuclear de acordo com o cromógeno utilizado na reação imunohistoquímica (ESPOSITO et al., 2000), indicando que a célula possivelmente não está senescente.

A senescência celular é um dos principais fatores causais que contribuem para o envelhecimento e surgimento de doenças associadas à idade. Além do diabetes, outras condições relacionadas incluem distúrbios neurodegenerativos, doenças cardiovasculares, artrite, sarcopenia e câncer (DIWAN; SHARMA, 2022). A indução das células a um programa de senescência pode ocorrer em resposta a diversos estímulos, como encurtamento dos telômeros, desregulação epigenética, dano genômico e disfunção mitocondrial, por meio do estresse oxidativo (MCHUGH; GIL, 2018).

O estresse oxidativo é provocado por um desequilíbrio entre a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo de neutralizá-las. Essa disfunção é responsável pela oxidação de biomoléculas, causando danos oxidativos às células e tecidos, o que, por sua vez, pode agravar o processo etiológico de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (BARBOSA et al., 2010).

No estágio inicial da senescência, a função mitocondrial é prejudicada, o que compromete a capacidade de fosforilação oxidativa e resulta em uma superprodução de EROs. Além disso, em células senescentes, o número e o tamanho das mitocôndrias estão alterados, o que ocorre devido à perda de sensibilidade à mitofagia, mecanismo pelo qual as células eliminam mitocôndrias disfuncionais por autodegradação (ROGER; TOMAS; GIRE, 2021). Dessa forma, é possível observar que tanto o estresse oxidativo pode desencadear a senescência, quanto está aumentado na presença dela.

Outro fator que pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo é a hiperglicemia. A hiperglicemia, condição presente no diabetes, é caracterizada por concentrações de glicose no sangue superiores a 126 mg/dL (COBAS et al., 2021), o que estimula a atividade mitocondrial e geração de EROs, assim como a formação

endógena dos produtos finais de glicação avançada (BROWNLEE, 2001). Esses produtos são compostos capazes de alterar as propriedades químicas e funcionais de várias estruturas biológicas, através da formação de ligações cruzadas entre proteínas, interação com receptores celulares e geração de radicais livres. Conseqüentemente, eles podem promover alterações morfofuncionais, aumentar a expressão de mediadores inflamatórios e causar o estresse oxidativo, exercendo efeitos patológicos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

O sistema de defesa antioxidante do organismo é mediado, principalmente, pela atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Entretanto, outros componentes não enzimáticos, provenientes principalmente da dieta, também podem atuar como antioxidantes, prevenindo as células contra os danos oxidativos, tais como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010). Nesse contexto, duas vitaminas largamente reconhecidas por seu potencial efeito antioxidante são as vitaminas C e E.

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é amplamente encontrada em frutas cítricas, como laranja, limão, toranja, morango, melancia e abacaxi, além de estar presente em vegetais frescos, como folhas verdes, tomate, brócolis, couve-flor, pimentão e repolho (NAIDU, 2003). Suas principais funções estão relacionadas à sua participação nos processos celulares de oxirredução, na biossíntese das catecolaminas, na prevenção do escorbuto, na atuação no sistema imune, na manutenção da integridade das paredes dos vasos sanguíneos e no seu papel na formação das fibras de colágeno presentes em diversos tecidos (MANELA-AZULAY et al., 2003).

Além disso, estudos indicam que a vitamina C está associada a diversos processos moleculares relacionados ao envelhecimento (OMIDIFAR et al., 2021) e senescência celular (MANUEL; GRAGNANI; FERREIRA, 2012), sugerindo efeitos benéficos na prevenção de doenças relacionadas à idade, como aterosclerose, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas. Isso ocorre devido à capacidade do ácido ascórbico de interceptar a imunossenescência, o envelhecimento inflamatório e o estresse oxidativo (MONACELLI et al., 2017).

Outro papel importante da vitamina C é proteger a vitamina E contra a oxidação e regenerar sua atividade, existindo evidências de que há uma dependência interativa entre as duas vitaminas na defesa antioxidante (PINNELL, 2003). A vitamina E é o nome dado a oito componentes lipossolúveis, dos quais o

α -tocoferol é o que apresenta o maior efeito antioxidante. Sua ação deve-se à sua capacidade de prevenir o dano oxidativo, neutralizando os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio. De forma análoga à vitamina C, a vitamina E também tem sido amplamente estudada por suas possíveis funções no retardo do envelhecimento e na proteção contra as DCNT (BATISTA; COSTA; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007).

Dentre os principais alimentos ricos em vitamina E, destacam-se os óleos vegetais, amendoim, amêndoa, gérmen de trigo (SILVA; NAVES, 2001) e os vegetais verde-escuros (BATISTA et al., 2007). Esses alimentos, ao fazerem parte de uma dieta equilibrada, fornecem as quantidades necessárias desse micronutriente, contribuindo para uma alimentação saudável.

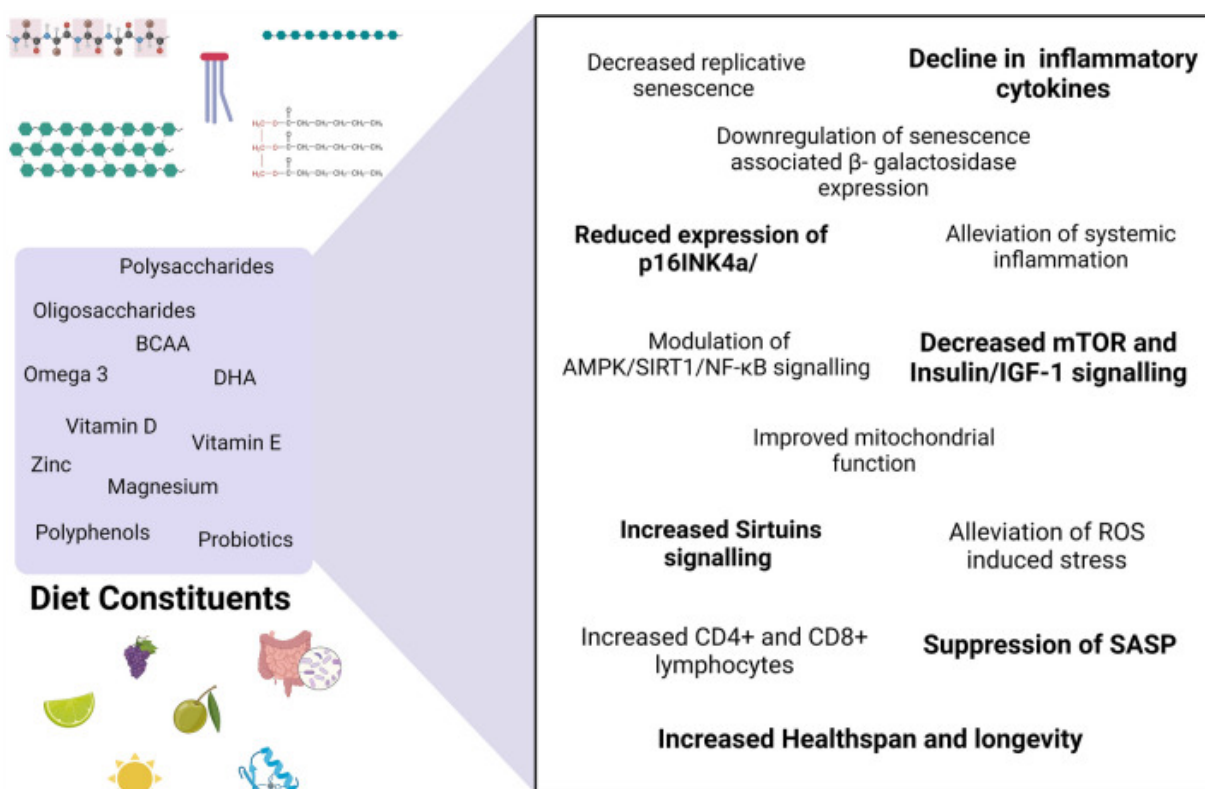
O consumo de alimentos *in natura* e minimamente processados, em detrimento dos alimentos ultraprocessados, conforme as diretrizes do Guia Alimentar para a População Brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças, como o diabetes, e na promoção da saúde no envelhecimento. Nesse cenário, a atuação da nutrição como um modulador dos mecanismos associados ao envelhecimento vem sendo cada vez mais reconhecida (OMIDIFAR et al., 2021).

Padrões dietéticos ricos em alimentos antioxidantes, principalmente de origem vegetal, têm sido vinculados à desaceleração do processo de envelhecimento (DHANJAL et al., 2020) e retardo da senescência celular. A dieta mediterrânea, composta por alimentos como azeite de oliva, frutas, vegetais, peixes, folato e polifenóis, por exemplo, mostrou melhorar diversas características do envelhecimento (SHANNON et al., 2020 apud RUBIO-TOMÁS et al., 2021, p. 4), sendo capaz de inibir o encurtamento dos telômeros (OMIDIFAR et al., 2021), mecanismo indutor da senescência (MCHUGH; GIL, 2018).

Por outro lado, uma dieta pobre em alimentos naturais e rica em ultraprocessados, como biscoitos, salgadinhos e embutidos, está associada ao efeito oposto. Alonso-Pedrero et al. (2020) em seu estudo com 886 participantes com idades entre 57 e 91 anos, demonstrou que o maior consumo de ultraprocessados está associado a quase o dobro de chance de ter telômeros encurtados em comparação àqueles que consumiram em menor quantidade. Além disso, Levy et al. (2021), evidenciaram que o consumo desses alimentos está associado a um maior risco de desenvolver diabetes do tipo 2, podendo chegar a até 44%.

De fato, muitos componentes da dieta podem influenciar os marcadores de senescência celular e o desenvolvimento de patologias, seja de forma benéfica ou não. A Figura 2 ilustra como alguns nutrientes podem impactar positivamente a expressão desses marcadores. É importante salientar que esses nutrientes não atuam isoladamente no organismo, interagindo entre si e com outras biomoléculas. No entanto, Diwan e Sharma (2022) destacam a importância de estudar esses constituintes de maneira isolada, a fim de identificar geroprotetores nutricionais que permitam ampliar a compreensão sobre como a nutrição pode regular as doenças e as consequências do envelhecimento.

Figura 2 - Potenciais efeitos de nutrientes sobre marcadores de senescência celular.



Fonte: Diwan e Sharma (2022, p. 1101)

A pele é o maior órgão do corpo humano (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019), sendo a principal parte do corpo onde é possível notar os primeiros efeitos do envelhecimento. Além disso, é um órgão bastante suscetível aos efeitos deletérios da hiperglicemia, que frequentemente é responsável por dificultar o processo cicatricial em portadores de diabetes (REIBER et al., 1999). A pele é formada pela

derme e epiderme. Os fibroblastos são as principais células residentes na derme, sendo responsáveis por funções importantes como a síntese e degradação de colágenos fibrilares do tipo I e do tipo III, elastina e outros componentes da matriz extracelular (MEC) (VENUS; WATERMAN; MACNAB, 2010). Por sua relevância nessas funções, os fibroblastos são um grupo celular especialmente adequado para avaliar condições que afetam esse tecido.

Sendo assim, com o objetivo de compreender o papel das vitaminas C e E na senescência celular potencialmente induzida pela hiperglicemia (dado o seu potencial efeito sobre o estresse oxidativo), este estudo analisou a expressão dos marcadores de senescência celular SA- β -gal (*Senescence-Associated Beta-Galactosidase*) e lipofuscina, além do marcador de proliferação celular Ki67, em fibroblastos dérmicos humanos e murinos, expostos às vitaminas C e E.

2- OBJETIVOS

Avaliar a expressão dos marcadores SA- β -gal, lipofuscina e Ki67 em fibroblastos dérmicos humanos expostos a uma concentração fisiológica (5 mM) ou elevada (30 mM) de glicose e tratados com vitaminas C e E ou com o antioxidante N-acetilcisteína (controle) durante 7 dias. Além disso, avaliar a expressão desses marcadores em fibroblastos dérmicos de ratos diabéticos e normoglicêmicos após tratamento intraperitoneal com as mesmas vitaminas.

3- MÉTODOS

3.1- EXPERIMENTOS COM ANIMAIS (AMOSTRAS JÁ OBTIDAS)

3.1.1- Descrição dos Métodos Empregados para o Tratamento dos Animais e Obtenção das Células

Foi realizada uma pesquisa quantitativa experimental, a partir de células previamente obtidas da pele de ratos normoglicêmicos e diabéticos submetidos a um

tratamento intraperitoneal com as vitaminas antioxidantes C e E (protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal registrado sob nº 123 na fls. 11 do livro 03). Os roedores eram machos adultos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, oriundos do Biotério de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Durante a experimentação, os animais foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12 horas e em temperatura aproximada de 22°C, sendo alimentados com a ração NUVILAB CR-1, e receberam água sem restrição.

A indução do DM no grupo intervenção foi realizada após um jejum de 12 horas e sob anestesia (ketamina e xilazina - 0,2 mL/100g), a partir da injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5), enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo. Para evitar uma hipoglicemia severa, os animais ingeriram sacarose em solução aquosa (30%) durante 12 horas. Foram considerados diabéticos apenas os animais com glicemia superior a 300 mg/dL e presença de outros sinais ao longo do período, como não alteração/redução do peso corporal, poliúria e polidipsia (mensurados com a utilização de gaiolas metabólicas).

O tratamento com as vitaminas C (Ácido Ascórbico, Sigma-Aldrich) e E (DL- α -Acetato de tocoferol, EMPROVE®USP, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi iniciado imediatamente após a confirmação da hiperglicemia, a partir da injeção intraperitoneal das vitaminas em doses diárias nas seguintes concentrações: 40 mg/Kg de vitamina E e 100 mg/Kg de vitamina C, durante todo o período experimental. Os animais foram sacrificados após 30 dias da indução do DM, utilizando-se uma dose excessiva de ketamina e xilazina. Animais controle foram injetados com o veículo (água).

Para a obtenção das células, realizou-se a raspagem dos pelos da região abdominal e a retirada de um fragmento de pele de aproximadamente 4 cm² após o sacrifício dos animais. A remoção da derme foi feita em meio de cultura por raspagem com bisturi (em ambiente estéril). Os fragmentos foram digeridos com colagenase 0,1% por 1 hora a 37 °C em banho-maria, sob agitação constante. Em seguida, a enzima foi inativada utilizando meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). A mistura resultante foi centrifugada, e as células foram suspensas em meio e transferidas para um frasco de cultivo.

Os fibroblastos foram cultivados em meio contendo 20% de SFB, antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomomicina 100 µg/mL) e fungicida (Fungizona 1%,

apenas na primeira passagem) em estufa umidificada contendo 8% de CO₂ e 92% de ar. A partir das passagens seguintes, que eram realizadas semanalmente, a concentração de SFB foi reduzida para 10%.

Os fibroblastos foram cultivados em meio controle (NG, glicose 5 mM) ou meio hiperglicêmico (HG, 30 mM de glicose). As células provenientes de animais tratados com antioxidante (vitaminas C e E) foram cultivadas nos seus respectivos meios na presença de vitamina C (100 mg/L). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias, e as células foram cultivadas até a terceira passagem, quando foram congeladas em nitrogênio líquido.

3.1.2- Cultivo de Fibroblastos Dérmicos Murinos

Células murinas, obtidas conforme descrito acima, foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de SFB da Gibco, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) e 1% de NEAA (Non-Essential Amino Acids Solution 100x). As passagens foram realizadas a cada 3 ou 5 dias, começando na passagem 4 até a passagem 5. As células foram mantidas em uma estufa umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C.

Para os experimentos, as células foram cultivadas por períodos de 7 dias em meio apropriado, de acordo com os grupos experimentais: CONTROLE (animais normoglicêmicos) - cultivadas em meio DMEM low glucose (5 mM de D-glicose, concentração fisiológica); CONTROLE + VIT (animais normoglicêmicos tratados com as vitaminas C e E) - cultivadas em meio DMEM low glucose (5 mM de D-glicose); DIABÉTICO (animais diabéticos) - cultivadas em meio DMEM high glucose (30 mM de D-glicose, elevada concentração); e DIABÉTICO + VIT (animais diabéticos tratados com as vitaminas) - cultivadas em meio DMEM high glucose (30 mM de D-glicose). O cultivo foi iniciado na quarta passagem e encerrado na quinta passagem.

3.2- EXPERIMENTOS COM FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

3.2.1- Cultivo de Fibroblastos Dérmicos Humanos

Células HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*), doadas pela Profa. Dra. Silvy Engler, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, foram cultivadas em meio DMEM low glucose (Gibco) suplementado com 10% de SFB da Gibco, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco). As transferências para novas placas foram realizadas a cada 3 ou 5 dias, começando na passagem 10 e continuando até a passagem 31. As células foram mantidas em uma estufa umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C.

Para os experimentos, as células foram cultivadas por períodos de 7 dias em meio apropriado, de acordo com os grupos experimentais: (1) Controle - NG, cultivadas em meio DMEM low glucose (5 mM de D-glicose, concentração fisiológica); (2) Glicose elevada - HG, cultivadas em meio DMEM high glucose (30 mM de D-glicose, elevada concentração); (3) NG NAC (NG + 5 mM de N-Acetilcisteína), (4) NG VIT (NG + 25 µM de alfa-tocoferol + 6,25 µM de ácido ascórbico); (5) HG VIT (HG + 25 µM de alfa-tocoferol + 6,25 µM de ácido ascórbico); (6) NG UP (NG, com células de passagem alta); (7) HFF p13 (5 mM de D-glicose); e (8) HFF p28 (5 mM de D-glicose). O experimento foi encerrado na passagem 20 para os grupos 1 a 5, na passagem 31 para o grupo 6, na passagem 13 para o grupo 7 e na passagem 28 para o grupo 8.

3.3- EVIDENCIAÇÃO DE β-GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA-β-GAL)

Cerca de $2,5 \times 10^3$ células foram cultivadas durante 24 h em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel), posicionadas em placas de 24 poços (Corning Costar[®]), em triplicata para cada condição experimental. As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) à temperatura ambiente (TA),

fixadas por 5 minutos à TA em uma solução fixadora contendo paraformaldeído (PFA) 1,8% e glutaraldeído 0,2%, em pH 7,3, e lavadas novamente duas vezes com PBS. Em seguida, a SA- β -Gal foi evidenciada a partir de uma solução corante [X-gal 1 mg, cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, cloreto de magnésio (MgCl₂) 2 mM, ferrocianeto de potássio (C₆FeK₄N₆) 5 mM, ferricianeto de potássio (C₆N₆FeK₃) 5 mM, tampão ácido cítrico (C₆H₈O₇) 40 mM/fosfato de sódio (Na₂HPO₄) 120 mM, pH 6]. As células foram incubadas em uma estufa a 37°C (sem CO₂), no escuro, por 12-16 horas. Para a montagem das lâminas, a solução corante foi removida e foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS. As lamínulas foram colocadas com a face das células voltada para uma gota de meio de montagem, composto por 40% de glicerol em TBS (150 mM de NaCl, 10 mM Tris HCL composição e pH 7,4), em uma lâmina de vidro (Precision[®] Glass Line) e seladas com esmalte. A coloração azul de SA- β -Gal foi visualizada no citoplasma, e as imagens foram capturadas em microscópio de campo claro e contraste de fase EVOS (Thermo Fisher Scientific), do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP), com uma objetiva de 20x. Foram fotografados dois campos equidistantes contendo células passíveis de serem individualizadas na região central da lamínula (de 20 a 30 campos).

3.4- EVIDENCIAÇÃO DE LIPOFUSCINA E KI67

Células HFF foram cultivadas em meios com concentração fisiológica e elevada de glicose, conforme descrito acima, lavadas em PBS e fixadas por cinco minutos em uma solução de paraformaldeído (PFA) 4%, em PBS, pH 7,3. Em seguida, foram lavadas novamente com PBS e armazenadas a 4°C para posterior marcação da lipofuscina utilizando o reagente SenTraGor[™] (CAYM-35568, Interprise[®]) e o anticorpo secundário feito em cabra Anti-biotina conjugada a fosfatase alcalina (ab6652, Abcam). A revelação foi realizada com Nitro-Blue Tetrazolium Chloride e 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine NBT/BCIP (1697471, Roche), acrescido de levamisol 100 mM (ab141217, Abcam). Também foi realizada a marcação de células proliferativas (não senescentes, portanto) utilizando

o anticorpo anti-Ki-67 (D3B5) feito em coelho (Rabbit mAb 12202S, Cell Signaling) e o anticorpo secundário Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (1705046, Bio-rad). A revelação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (D5637, Sigma).

As marcações de Ki67 e lipofuscina foram visualizadas no microscópio Aristoplan Leitz e as imagens foram capturadas em Câmera Nikon DS Ri1, Sistema de Captura Nikon Digital Sight DS-U3 e Software Nikon NIS, em objetiva de 25x. A varredura foi realizada em cinco linhas equidistantes, fotografando apenas os campos que continham células.

3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística, o número total de células e de células marcadas em ambos experimentos foram quantificados e inseridos em uma planilha Excel. A partir desses dados, foram realizados os cálculos do percentual de células marcadas em relação ao total e os resultados foram inseridos no software GraphPad Prism versão 5.0.

O tipo de teste estatístico escolhido para a análise dos dados dependeu do número de grupos avaliados. Para a comparação das médias entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Já na presença de mais de dois grupos, foi aplicada a análise de variância de um fator (One-way ANOVA) com pós teste de Tukey, visando comparar as médias e identificar as significativamente diferentes.

Os resultados foram apresentados a partir das médias, acompanhadas do Erro Padrão da Média (EPM). Além disso, foram exibidas as diferenças percentuais entre os grupos para fins de comparação.

4- RESULTADOS

Células HFF e murinas foram cultivadas em meios com concentração fisiológica ou elevada de glicose por 7 dias, com o objetivo de avaliar se a glicose elevada (equivalente a uma hiperglicemia de 540 mg/dL) é capaz de induzir a

senescência celular. Adicionalmente, as células HFF foram cultivadas com as vitaminas C e E, além do antioxidante N-acetilcisteína, para avaliar seus efeitos nessas condições. As Figuras 3 e 4 ilustram as marcações para SA- β -gal, lipofuscina e Ki67, respectivamente.

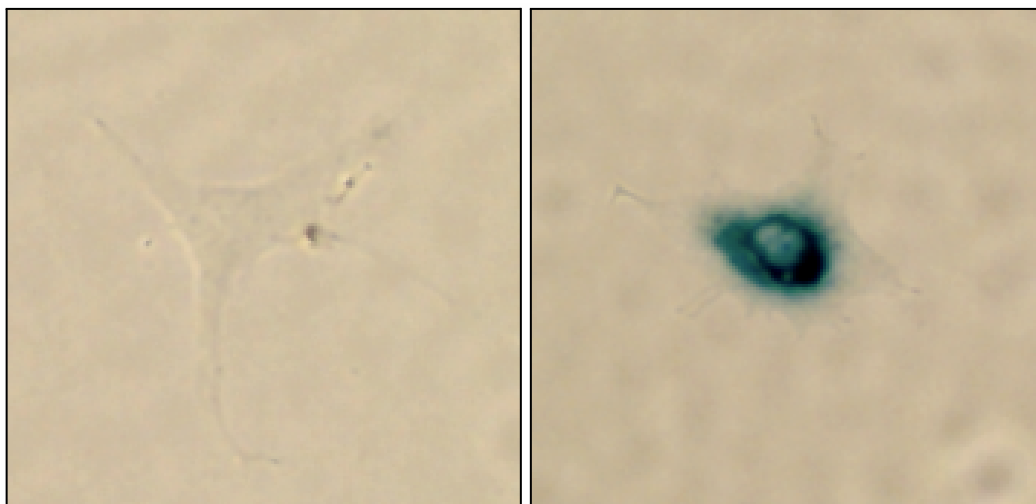


Figura 3 - Marcação para SA- β -gal. Célula HFF não marcada (à esquerda) e marcada para SA- β -gal (à direita). Pode-se visualizar grânulos azuis presentes no citoplasma, principalmente na região do corpo celular. Imagem obtida no microscópio EVOS (CEFAP-USP), aumento de 20x, campo claro/contraste de fase.

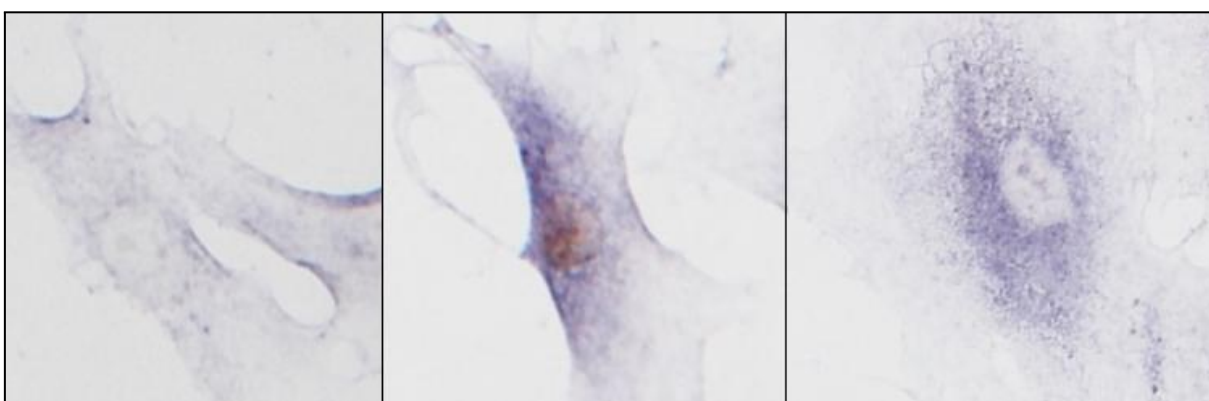


Figura 4 - Marcação para lipofuscina e Ki67. À esquerda, célula HFF considerada não marcada. No centro, célula marcada para lipofuscina (grânulos roxos no citoplasma) e Ki67 (núcleo marrom). À direita, célula marcada apenas para lipofuscina. Imagem obtida no microscópio Aristoplan Leitz em aumento de 25x.

Em relação ao marcador SA- β -gal, o experimento realizado com fibroblastos de passagem baixa (HFF p13) e alta (HFF p28), em meio com concentração fisiológica de glicose (5mM), sugeriu que essa enzima poderia ser considerada um marcador eficaz. Conforme é possível observar na Figura 5, o grupo HFF p28 expressou 37% mais células com atividade da enzima em comparação com HFF p13 (52.44 ± 2.86 vs. 90.19 ± 1.69 , média \pm EPM para HFF p13 e HFF p28), confirmando que a SA- β -gal está mais presente em células com maior tempo de proliferação, o que possivelmente indica um estado mais senescente.

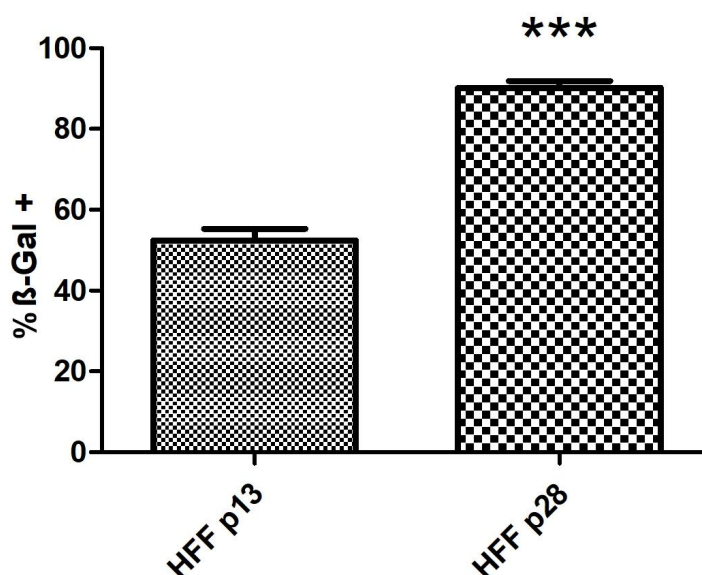


Figura 5 - Marcação para SA- β -gal em HFF p13 e HFF p28. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas para SA- β -gal em culturas sob concentração fisiológica de glicose. Número de células por grupo: HFF p13 (n= 393), HFF p28 (n= 213). ***P<0,001, de acordo com teste t de Student.

No que diz respeito aos experimentos com fibroblastos dérmicos murinos, foi observado que, surpreendentemente, os grupos CONTROLE + VIT (21.07 ± 1.32), DIABÉTICO (7.13 ± 1.95) e DIABÉTICO + VIT (11.30 ± 4.31) apresentaram uma marcação para SA- β -gal significativamente menor (52 a 66%) em comparação com o grupo CONTROLE (73.60 ± 1.52). De forma também inesperada, o grupo DIABÉTICO exibiu a menor expressão de SA- β -gal (7%), sem diferença estatística em comparação com o grupo DIABÉTICO + VIT. No entanto, considerando o grupo

CONTROLE + VIT, houve um aumento na marcação em relação ao grupo DIABÉTICO (14% maior). A Figura 6 ilustra esses resultados.

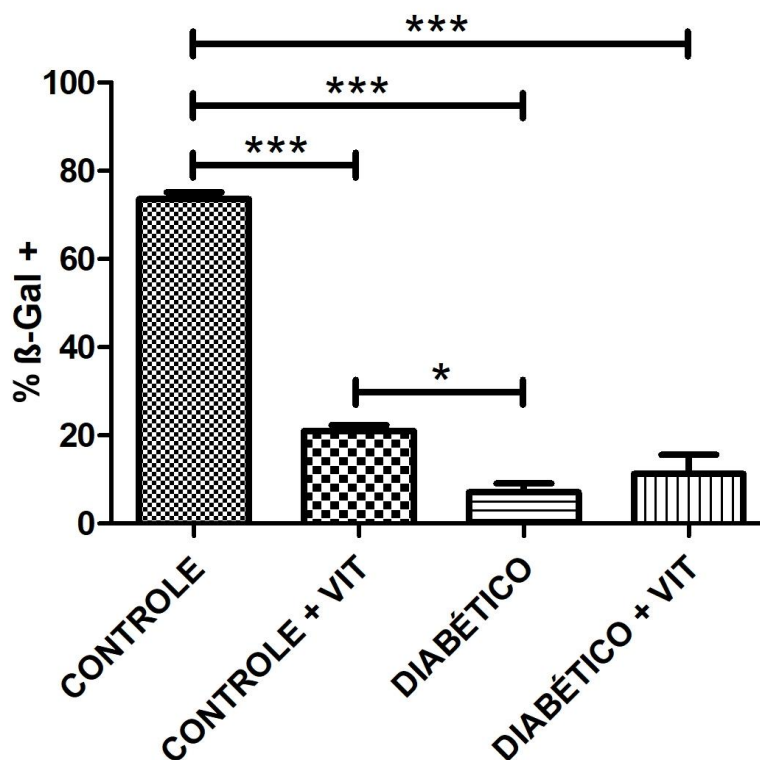


Figura 6 - Marcação para SA-β-gal em fibroblastos dérmicos murinos. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas para SA-β-gal em culturas de fibroblastos de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos tratados ou não com as vitaminas C e E. Número de células por grupo: CONTROLE (n= 412), CONTROLE + VIT (n= 297), DIABÉTICO (n= 434), DIABÉTICO + VIT (n= 604). *P<0,05; ***P<0,001, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Acerca dos experimentos realizados em cultura com os fibroblastos humanos, foi possível notar que não houve diferença significativa entre o grupo NG, representado por células cultivadas em condição normal de glicose, e o grupo HG, formado por células cultivadas em concentração elevada. O mesmo pode-se afirmar em relação ao grupo HG VIT, que não apresentou diferença estatística em relação à HG. Por outro lado, o grupo NG NAC (96.32 ± 1.85) apresentou marcação para

SA- β -gal superior (37 a 43%) a HG VIT (58.79 ± 5.15) e HG (52.94 ± 11.51) e 29 % maior em relação ao grupo NG.

O grupo UP, composto por células de passagem elevada cultivadas em meio com concentração fisiológica de glicose, apresentou marcação 28% maior para SA- β -gal em comparação ao grupo NG (67.75 ± 5.70 vs. 95.62 ± 0.83 , média \pm EPM para NG e UP, respectivamente), resultado semelhante ao que foi encontrado no experimento com HFF p13 e HFF p28. Além disso, UP também exibiu marcação superior (9 a 15%) em relação aos grupos HG VIT e HG. Esses dados podem ser observados na Figura 7.

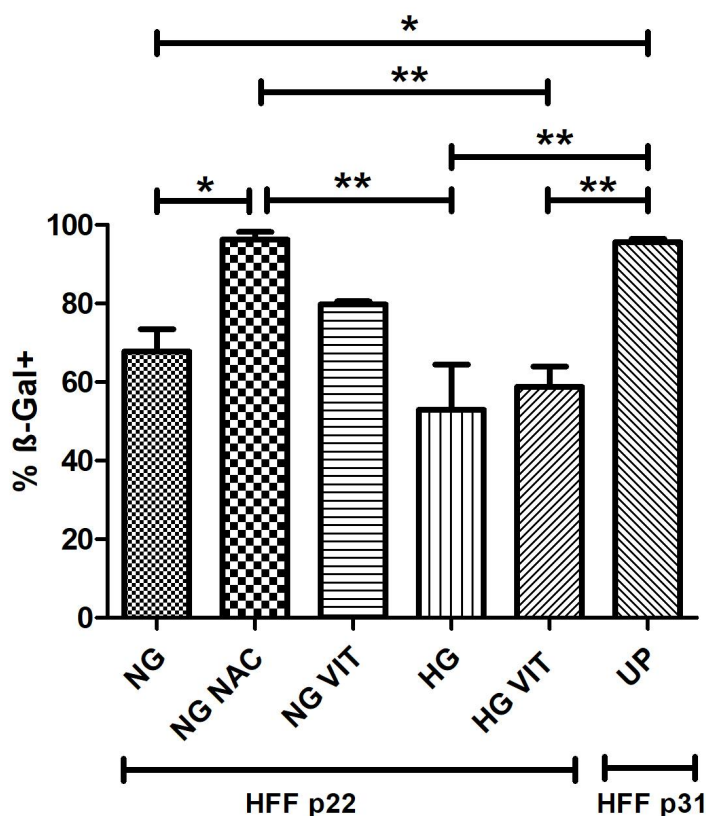


Figura 7 - Marcação para SA- β -gal em fibroblastos dérmicos humanos. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas para SA- β -gal após cultivo em concentração normal de glicose (NG, n= 626), concentração normal de glicose com antioxidante (NG NAC, n= 133), concentração normal de glicose com vitaminas C e E (NG VIT, n= 224), concentração normal de glicose com passagem alta (UP, n= 339), concentração elevada de glicose (HG, n= 168) e concentração elevada de

glicose com vitaminas (HG VIT, n= 160). *P<0,05; **P<0,01, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Os ensaios realizados com lipofuscina e Ki67 revelaram maior marcação em fibroblastos expostos a um meio com elevada concentração de glicose (HG) em comparação ao controle cultivado em meio normoglicêmico (NG). A proliferação celular, indicada pela marcação de Ki67, não apresentou diferenças significativas entre NG e HG, como é possível observar na Figura 8 (A). Em relação à marcação para lipofuscina (B), esta foi substancialmente maior (56%) entre as células expostas à alta concentração de glicose (HG) (15.26 ± 6.37 vs. 70.84 ± 7.71 , média \pm EPM para NG e HG), efeito que se repetiu (33%) ao considerar as células marcadas para Lipofuscina e não marcadas para Ki67 (C) (4.03 ± 2.99 vs. 37.32 ± 5.57 , média \pm EPM para NG e HG, nessa ordem).

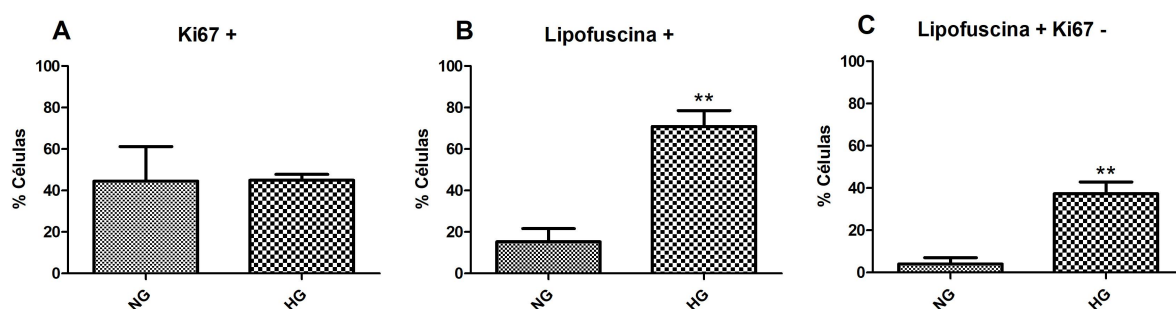


Figura 8 - Marcação para lipofuscina e Ki67 após exposição a uma elevada concentração de glicose. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas para Ki67 (A), Lipofuscina (B) e marcadas para Lipofuscina e não marcadas para Ki67 (C) em células cultivadas em concentração fisiológica de glicose (NG) e em concentração elevada de glicose (HG). Número de células por grupo: NG Ki67+ (n=334), HG Ki67+ (n= 325), NG Lipofuscina + (n=118), HG Lipofuscina + (n=556), NG Lipofuscina + Ki67 - (n=32) e HG Lipofuscina + Ki67 - (n=298). **P<0,01, de acordo com teste t de Student.

5- DISCUSSÃO

Vitaminas são micronutrientes essenciais que devem ser obtidos em pequenas quantidades através da alimentação (DANTAS et al., 2012). Atualmente, diversos estudos têm demonstrado o potencial efeito benéfico das vitaminas, especialmente das vitaminas C e E, sobre a senescência celular, inibindo ou retardando o seu surgimento. Em relação à vitamina C, Kashino et al. (2003) mostraram que, em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e da síndrome de Werner, o ácido ascórbico aliviou o estresse oxidativo e reduziu a taxa de encurtamento dos telômeros, retardando a senescência celular.

Resultado semelhante foi encontrado por Manuel, Gagnani e Ferreira (2012), que demonstraram que a suplementação com a vitamina C é capaz de diminuir a indução à senescência celular em fibroblastos. Já em relação à vitamina E, Fata et al. (2015), em seu experimento *in vitro* com fibroblastos dérmicos humanos e células HUVECs, evidenciaram que a suplementação com essa vitamina é capaz de reduzir o número de células positivas para SA- β -gal (possivelmente senescentes).

O mesmo foi observado por Makpol et al. (2011), que verificaram que a incubação com tocotrienol, uma forma natural da vitamina E, reduziu o percentual de fibroblastos diplóides humanos positivos para SA- β -gal, além de diminuir as características de senescência. Os pesquisadores encontraram ainda que o tratamento protege contra o encurtamento dos telômeros, atribuindo a uma possível prevenção do tocotrienol contra os danos causados pelo estresse oxidativo.

Como é possível verificar, existem diversos estudos que avaliam isoladamente o papel das vitaminas C e E sobre a senescência celular. No entanto, os efeitos conjuntos dessas vitaminas sobre a senescência, considerando a glicose como um fator estressor, ainda são pouco conhecidos. Ao comparar os resultados dos grupos experimentais tratados em condições normais de glicose e vitaminas com os dados presentes na literatura, é possível notar que o experimento com fibroblastos murinos corrobora com o que foi descrito pelos autores citados, visto que o grupo controle tratado com as vitaminas apresentou uma menor marcação para SA- β -gal em relação ao controle não tratado. Entretanto, o mesmo não foi verificado no experimento com fibroblastos humanos, já que não houve diferença

estatisticamente significativa entre o grupo controle (NG) e o grupo suplementado (NG VIT).

Em relação aos grupos hiperglicêmicos, também não foram constatadas diferenças estatísticas entre os grupos (HG) e (DIABÉTICO) e os grupos suplementados (HG VIT) e (DIABÉTICO + VIT) em ambos experimentos. Surpreendentemente, contrariando estudos que sugerem que a glicose pode ser um indutor da senescência, tanto os fibroblastos murinos quanto humanos expostos a um ambiente com alta concentração de glicose apresentaram uma menor marcação para SA- β -gal em comparação aos grupos normoglicêmicos.

Ao contrário do que foi observado, Kitada et al. (2014) demonstraram que a hiperglicemia é capaz de promover a senescência em células epiteliais tubulares renais. Os autores também utilizaram a expressão de SA- β -Gal como parâmetro de análise, a qual foi identificada nos túbulos corticais dos camundongos diabéticos, mas não nos animais não diabéticos. Resultados semelhantes foram evidenciados por Ávila (2012), o qual mostrou que em células mesangiais humanas, a alta concentração de glicose induz a senescência.

Por outro lado, os experimentos realizados com lipofuscina, ao contrário do que foi demonstrado com SA- β -Gal, corroboram os dados presentes na literatura. Os resultados encontrados evidenciaram que os fibroblastos expostos a um ambiente hiperglicêmico são possivelmente mais senescentes em comparação aos expostos a um ambiente normoglicêmico. No entanto, a diferença nos resultados de ambos os marcadores chama a atenção, uma vez que Georgakopoulou et al. (2013) validaram a lipofuscina como um biomarcador de senescência, demonstrando a co-localização entre a marcação de lipofuscina e SA- β -Gal em células senescentes.

De acordo com Faraonio (2022), o tratamento com antioxidantes pode inibir ou retardar a senescência celular induzida pelo estresse oxidativo. No entanto, o grupo controle tratado com o antioxidante N-acetilcisteína (NG NAC) apresentou uma marcação maior para SA- β -Gal, contrariando as expectativas. Em relação ao grupo normoglicêmico tratado com as vitaminas (NG VIT), não foi possível observar diferenças significativas em comparação ao grupo não tratado (NG) e antioxidante (NG NAC).

Uma hipótese que pode ajudar a justificar esses resultados é que o marcador SA- β -Gal pode estar sendo influenciado pela ação de espécies reativas de oxigênio, interferindo em sua atividade e capacidade de marcação na presença de

antioxidantes e em um ambiente hiperglicêmico. Nesse sentido, a SA- β -Gal pode não ser o biomarcador mais adequado para avaliar essa condição experimental, sendo necessários estudos com outros marcadores para confirmar esses resultados.

6- CONCLUSÕES

Os experimentos realizados com o biomarcador de senescência celular SA- β -Gal evidenciaram sua eficácia ao marcar células senescentes em condições de normoglicemia. No entanto, observou-se que o ambiente hiperglicêmico parece afetar a atividade da enzima, o que também foi constatado, de forma oposta, ao expor as células ao antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Basicamente, a condição hiperglicêmica reduziu SA- β -Gal, enquanto o NAC teve efeito contrário.

A influência desses fatores sobre a atividade da enzima pode estar associada à produção de EROs, que podem estar exercendo efeito modulatório nessas condições. Em contrapartida, o ensaio com lipofuscina e Ki67 demonstrou que a elevada concentração de glicose pode ser um indutor da senescência celular, uma vez que fibroblastos expostos a um ambiente hiperglicêmico apresentaram uma maior marcação de lipofuscina e ausência de marcação para proliferação celular.

Em relação à ação das vitaminas, o experimento com fibroblastos murinos em condições de normoglicemia demonstrou melhora significativa no grupo suplementado em comparação ao grupo controle. Contudo, resultado semelhante não foi observado nos fibroblastos dérmicos humanos, nem em outras condições experimentais. Uma limitação desses resultados é o fato de a senescência ter sido avaliada apenas pelo biomarcador SA- β -Gal, o qual aparentemente não foi o mais adequado nesse cenário experimental. Além disso, não comprovamos a ação antioxidante da combinação de vitaminas nos experimentos *in vitro*.

Sendo assim, para avaliar o efeito conjunto das vitaminas C e E sobre a senescência celular em um ambiente hiperglicêmico, são necessários novos estudos com outros biomarcadores potencialmente menos suscetíveis à ação do estresse oxidativo. A compreensão sobre como as vitaminas podem atuar em uma condição de elevada glicemia pode auxiliar, futuramente, o tratamento de portadores de DM, inclusive através da alimentação.

7- IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA NO CAMPO DE ATUAÇÃO

A Resolução CFN N° 600, de 25 de fevereiro de 2018 estabelece oito áreas de atuação do nutricionista, dentre as quais uma delas é a nutrição no ensino, pesquisa e extensão. Em conformidade com o artigo 3º, inciso VI, item C, este trabalho explora a nutrição no campo da pesquisa, uma área de grande importância para a ciência e desenvolvimento humano (BRASIL, 2018).

O papel da nutrição no processo de saúde-doença é inegável. A adoção de hábitos alimentares saudáveis está cada vez mais consolidada como um dos pilares para a prevenção de doenças, auxiliando, inclusive, na terapêutica de muitas delas. O mesmo se aplica à promoção da saúde no envelhecimento. Segundo Mantovani (2007), uma alimentação equilibrada influencia diretamente o controle das principais patologias associadas à idade.

Nesse sentido, a compreensão sobre como os componentes da dieta podem interagir com os sistemas biológicos, beneficiando-os ou não, é importante para o campo da nutrição, especialmente quando se pensa no planejamento de uma alimentação saudável. As vitaminas são nutrientes essenciais para o funcionamento do organismo (DANTAS et al., 2012), sendo obtidas através de uma alimentação balanceada e diversificada. O conhecimento sobre suas funções está em constante evolução, especialmente em relação ao potencial efeito antioxidante e atuação no envelhecimento.

Este trabalho buscou demonstrar o efeito da suplementação das vitaminas C e E sobre a senescência celular de fibroblastos dérmicos humanos e de ratos, em condições de normoglicemia e hiperglicemia. Dessa forma, os resultados obtidos podem ser úteis para guiar futuras pesquisas na área da nutrição, que buscam avaliar a influência dessas vitaminas sobre o envelhecimento celular e o ambiente hiperglicêmico.

8- REFERÊNCIAS

Alonso-Pedrero L, et al. Ultra-processed food consumption and the risk of short telomeres in an elderly population of the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN)

Project. Am J Clin Nutr. 2020;111(6):1259-1266 [acesso em 07 set 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34517097/>

Ávila MDN. Mecanismos de senescencia en células mesangiales humanas en la diabetes y el envejecimiento. [Tese de doutorado]. Universidad de Alcalá; 2012. [acesso em 28 abr 2023]. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=75142>

Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. Arq Bras Endocrinol Metab. 2008;52(6):940-950 [acesso em 24 out 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/tYzW8XKJFvn5GTb638YY68R/?format=html#>

Barbosa KBF, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev Nutr. 2010;23(4):629-643 [acesso em 05 ago 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Batista EdS, Costa AGV, Pinheiro-Sant'Ana HM. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. Rev Nutr. 2007;20(5):525-535 [acesso em 04 out 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/7svXx6XyTHW7vPPDJRtWcvL/#>

Bernardo AFC, Santos K, Silva DP. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. Rev Saúde em Foco. 2019;11:1221-1233 [acesso em 16 set 2023]. Disponível em: <https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites>

Brasil. Resolução CFN N° 600, de 25 de fevereiro de 2018. Conselho Federal de Nutricionistas. 2018 [acesso em 02 out 2023]. Disponível em: <http://sisnormas.cfn.org.br:8081/viewPage.html?id=600>

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813-820 [acesso em 12 nov 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742414/>

Cobas R, et al. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes (2023), Jul 2021 [acesso em 17 set 2023]. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/diagnostico-e-rastreamento-do-diabetes-tipo-2/>

Costa AF, et al. Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. Cad Saúde Pública. 2017;33(2) [acesso em 03 jul 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00197915>

Dantas JIA, et al. Biossíntese de vitaminas em frutos e hortaliças. Agropec Cient Semi-Árido. 2012;8(4):22-37 [acesso em 28 out 2023]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/282859543_Biossintese_de_vitaminas_em_frutos_e_hortalicas

Dhanjal DS, et al. Plant Fortification of the Diet for Anti-Ageing Effects: A Review. *Nutrients*. 2020;12(10):3008 [acesso em 01 out 2023]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/10/3008>

Dimri GP, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9363-7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985 [acesso em 29 set 2023]. Disponível em: [A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. - PMC \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7568133/)

Diwan B, Sharma R. Nutritional components as mitigators of cellular senescence in organismal aging: a comprehensive review. *Food Sci Biotechnol*. 2022;31:1089-1109 [acesso em 15 jul 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.gov/35756719/>

Esposito JP, et al. Expressão imuno-histoquímica dos marcadores PCNA, Ki67 e p53 em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior. *Rev Col Bras Cir*. 2000;27(5):327-331 [acesso em 14 set 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/ijjP3KXSXn8hQxVpQHqmzmdk/?lang=pt>

Faraonio, R. Oxidative Stress and Cell Senescence Process. *Antioxidants*. 2022, 11(9), 1718 [acesso em 15 nov 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox11091718>

Fata GL, et al. Vitamin E Supplementation Delays Cellular Senescence In Vitro. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-11 [acesso em 25 out 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26613084/>

Georgakopoulou EA, et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryopreserved and archival tissues. *Aging*. 2013;5(1):37-50 [acesso em 24 out 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.gov/23449538/>.

Höhn A, et al. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: Role in senescent cells. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(8):1100-1108. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.030 [acesso em 25 set 2023]. Disponível em: [Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: Role in senescent cells - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584903003265?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=81ddffe6beb24ecb)

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas; 2021* [acesso em 26 ago 2023]. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>

Kashino G, et al. Relief of oxidative stress by ascorbic acid delays cellular senescence of normal human and Werner syndrome fibroblast cells. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(4):438-443 [acesso em 27 out 2023]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584903003265?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=81ddffe6beb24ecb

Kitada K, et al. Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2014;28(5):604-611. ISSN 1056-8727

[acesso em 04 nov 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153757/>

Kudlova N, Sanctis JBD, Hajduch M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4168):1-26 [acesso em 20 ago 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9028163/>

Levy RB, et al. Ultra-processed food consumption and type 2 diabetes incidence: A prospective cohort study. *Clin Nutr.* 2021;40(5):3608-3614. ISSN 0261-5614 [acesso em 06 nov 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.018>

Manuel J, Gagnani A, Ferreira LM. Ácido ascórbico intracelular diminui a indução à senescência celular, mas não a apoptose em fibroblastos expostos a concentrações subtóxicas de H₂O₂. *Rev Bras Queimaduras.* 2012;11(2):56-62 [acesso em 18 out 2023]. Disponível em: <http://www.rbqueimaduras.com.br/details/102/pt-BR/acido-ascorbico-intracelular-diminui-a-inducao-a-senescencia-celular--mas-nao-a-apoptose-em-fibroblastos-expostos-a-concentracoes-subtoxicas-de-h2o2>

Makpol S, et al. Tocotrienol-Rich Fraction Prevents Cell Cycle Arrest and Elongates Telomere Length in Senescent Human Diploid Fibroblasts. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1-11 [acesso em 07 set 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3085479/>

Manela-Azulay M, et al. Vitamina C. *An Bras Dermatol.* 2003;78(3):265-274 [acesso em 09 set 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/hgLDMrqkx63MpNKC8XH5TzG/#>

Mantovani EP. O processo de envelhecimento e sua relação com a nutrição e a atividade física. In: Boccaletto EMA, Vilarta R, editores. *Diagnóstico da alimentação saudável e atividade física em escolas municipais de Vinhedo/SP. Vol. 1.* Campinas: IPÊ Editorial; 2007. p. 165-172.

McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77 [acesso em 12 set 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748990/>

Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira. Guia Alimentar para a População Brasileira. 2014 [acesso em 11 jun 2023]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/05/Guia-Alimentar-para-a-pop-brasiliera-Miolo-PDF-Internet.pdf>

Monacelli F, et al. Vitamin C, Aging and Alzheimer's Disease. *Nutrients.* 2017;9(670):1-26 [acesso em 19 ago 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537785/>

Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2003;2(7):1-10 [acesso em 14 out 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201008/>

Narasimhan A, et al. Role of Cellular Senescence in Type II Diabetes. *Endocrinology*. 2021;162(10) [acesso em 06 nov 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo/bgab136>

Nilson EAF, et al. Custos atribuíveis à obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. *Rev Panam Salud Publica*. 2020;44(32) [acesso em 15 jun 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7147115/>

Omidifar N, et al. Trends in Natural Nutrients for Oxidative Stress and Cell Senescence. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:1-7 [acesso em 12 ago 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8270688/>

Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(1):1-22 [acesso em 21 set 2023]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962203500056>.

Reiber GE, et al. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*. 1999;22(1):157-62 [acesso em 26 jun 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10333919/>

Roger L, Tomas F, Gire V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13173):1-42 [acesso em 13 jul 2023]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/13173>

Rubio-Tomás T, et al. Nutrition and cellular senescence in obesity-related disorders. *J Nutr Biochem*. 2022;99:1-15 [acesso em 01 ago 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34517097/>

Sartorelli DS, Franco LJ. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(1):29-36 [acesso em 14 ago 2023]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000700004>

Silva CRM, Naves MMV. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Rev Nutr*. 2001;14(2):135-143 [acesso em 24 out 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/mtBrFJpBmgbDLMbMz8Bwrhw/?format=pdf>

Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2010;28(10):469-472 [acesso em 20 ago 2023]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/251543314_Basic_physiology_of_the_skin