

PESQUISAS CIENTÍFICAS - AQUELAS QUE SÃO FRUTO DE PESQUISA EMPÍRICA DENTRO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO CIENTÍFICO. - TECNOLOGIAS, GESTÃO E POLÍTICAS PÚBLICAS - USO INTELIGENTE E INOVADOR DE CONHECIMENTOS E RECURSOS TECNOLÓGICOS PARA DESENVOLVER PRODUTOS E PROCESSOS SUSTENTÁVEIS, BUSCANDO PROMOVER A SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL E A PRESERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. O RECONHECIMENTO E VALORIZAÇÃO DA SABEDORIA ACUMULADA PELOS SISTEMAS BIOLÓGICOS E PELAS COMUNIDADES TRADICIONAIS, APLICADO NA GESTÃO DE PROJETOS, ORGANIZAÇÕES E EM POLÍTICAS PÚBLICAS, PARA O BENEFÍCIO DA SOCIEDADE, DESENVOLVENDO AÇÕES, PRODUTOS, MATERIAIS E SISTEMAS NA BUSCA DE SOLUÇÕES DE PROBLEMAS SOCIOAMBIENTAIS. EX: TECNOLOGIAS SOCIAIS, ECONOMIA CIRCULAR, TECNOLOGIAS VERDES, BIODESIGN, ARQUITETURA VERNACULAR, BIOMIMÉTICA, BIOPLÁSTICOS, BIOCOMBUSTÍVEIS, BIOFERTILIZANTES, SABERES TRADICIONAIS APLICADOS À CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS, ETC.

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA POR ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS IN VITRO: LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL (CACO-2) E OSTEOSARCOMA (MG-63) HUMANO.**

*Rosimara Couto Vasconcelos De Noronha (rosimaracvn@alu.unifase-rj.edu.br)*

*Suzana Ferreira Da Silva Menezes (suzanaprofessional@gmail.com)*

*Lia Igel Sodré (liaigelnutri@gmail.com)*

*Maria Eduarda Cordebello Gall (dudacorbello@gmail.com)*

*Thamires Silva (reisthamires457@gmail.com)*

*Helena Volker (hmvoliveira90@gmail.com)*

*Giovanna De Souza Ferreira (giovannasf@alu.unifase-rj.edu.br)*

*Priscila Grion De Miranda Borchio (priscilaborchio@unifase-rj.edu.br)*

*Carlos Eduardo De Faria Cardoso (caedufariac@gmail.com)*

*Cintia Ramos Pereira Azara (cintiaazara@prof.unifase-rj.edu.br)*

*Rosana Bizon Vieira Carias (rosanabizon@prof.unifase-rj.edu.br)*

Introdução: A senescência é um fenômeno celular que abrange a maioria dos sistemas orgânicos, sendo crucial no envelhecimento biológico. Está relacionado a eventos de interrupção permanente da capacidade de proliferação e divisão celular, sendo denominado senescência replicativa. Este processo tem um papel dual: contribui positivamente para processos de remodelamento tecidual, como observado na cicatrização de feridas, atua como uma resposta protetora ao estresse, além de ser um potente mecanismo antitumoral; e, por outro lado, pode gerar efeitos deletérios quando ocorre precocemente, desencadeado por estressores intrínsecos ou extrínsecos. Os danos celulares podem ser irreversíveis, onde as células mitoticamente competentes param de proliferar, potencializando a ocorrência de eventos ligados à oncogênese. Na senescência, tanto in vitro quanto in vivo, o declínio funcional é associado a alterações moleculares e morfológicas, como células planas e aumentadas, aumento da presença de vacúolos no citoplasma e secreção do fenótipo secretor associado à senescência (SASP). Estudos in vitro, os quais evidenciam a ocorrência do fenômeno de senescência, como os realizados no Laboratórios de Medicina Regenerativa (LMR) da UNIFASE, surgem como uma alternativa emergente ao uso de animais em pesquisas, alinhado com a International Foundation for Ethical Research (IFER), que apresenta o conceito dos “4 Rs” da ética em pesquisas: a replacement (substituição), reduction (redução), refinement (refinamento) e responsibility (responsabilidade). Os 4 Rs têm como objetivo a redução da quantidade de animais experimentais em estudos médicos e biológicos, promovendo a ética na pesquisa. Portanto, a adoção de modelos que busquem encontrar alternativas à senescência precoce para manutenção da saúde são essenciais, particularmente nos casos de induções a fatores estressores, como ocorre no estresse oxidativo. Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como um agente extrínseco de indução à

senescência celular, por estresse oxidativo in vitro, em células tumorais de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) e osteossarcoma (MG-63) humano e otimizar o modelo de ensaio que será utilizado na avaliação de agentes que interferem na atividade proliferativa celular pelo Grupo de Pesquisa de Compostos Bioativos Em Alimentos, da UNIFASE. Metodologia: As linhagens celulares Caco-2 e MG-63 foram cultivadas em meio de cultivo composto por Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) LOW glicose, L-glutamina e 20% de soro fetal bovino (FBS) para a Caco-2 e DMEM HIGH glicose, L-glutamina e 10% de SFB para MG-63, e incubadas sob atmosfera ideal: úmida e controlada, contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37°C. A indução à senescência por estresse oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada conforme os protocolos adaptados para microplacas de 96 poços e uso de controle. As linhagens foram expostas às concentrações de 1,64 µL/100µL diluindo 1:2 até 0,0004 µL/100 µL por 2 horas em incubadora a 37°C, sem CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução foi retirada e acrescentado meio padrão fresco, sendo as células incubadas por 48 horas em condições atmosféricas ideais. Ao final do período, um grupo da linhagem MG-63 foi novamente exposto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas mesmas condições anteriormente descritas. Para o teste de citotoxicidade, após 48 horas de cultivo pós exposição, a solução de Triton-X 1% foi utilizada para induzir a morte celular (controle positivo), com incubação de 20 minutos em condições ideais de cultivo. Em seguida, o meio foi removido e a solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) 1 mg/mL foi adicionada aos poços. Mais uma etapa de incubação foi realizada por 2 horas, a 37°C, sendo retirada a solução e adicionado o reagente Dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. Para leitura, utilizou-se feixe de absorbância de 570 nm em espectrofotômetro.

Discussão: O ensaio de MTT é utilizado para expressar a atividade metabólica celular, atuando como um indicador de viabilidade, proliferação e citotoxicidade. É um ensaio de base colorimétrica, fundamentado na redução do sal de tetrazólio amarelo (coloração original do reagente MTT) para cristais de formazan de coloração roxa, que ocorre prioritariamente em células metabolicamente ativas. Frequentemente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é usado para induzir senescência por estresse oxidativo in vitro, aumentando os íons superóxido e radicais livres, elevando os níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS), o que pode impactar negativamente a proliferação celular e causar danos ao DNA. Verificou-se que, na linhagem Caco-2, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou uma toxicidade significativa pós-exposição, resultando em mais de 50% de morte

celular em todas as concentrações testadas. Em contraste, nas células da linhagem MG63, apenas aquelas expostas uma única vez às concentrações mais baixas (0,0008 µL/100µL e 0,0004 µL/100µL) mantiveram a viabilidade suficiente ao final do experimento.

Conclusão: Neste estudo, o ensaio de MTT, amplamente utilizado na literatura científica para avaliação da potencial ação citotóxica de substâncias, foi combinado ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, por sua vez, é consolidado como um agente eficaz na senescência celular in vitro. Nossos resultados reforçam a importância de considerar as diferenças de sensibilidade na resposta ao estresse oxidativo entre tipos celulares distintos, como as encontradas nas células de linhagens tumorais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e de Osteossarcoma Humano (MG63). Este experimento demonstra a viabilidade do modelo adaptado na utilização dessas linhagens como referência para estudos futuros, servindo como ferramenta a ser validada e utilizada como uma alternativa ao uso de animais em experimentos.

Palavras-chave: cellular senescence; oxidative stress; hydrogen peroxide; in vitro; mtt assay; caco-2 cells; mg-63 cells.