



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 β -estradiol

Verónica Pereira Jacob

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Prof^a. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

Covilhã, Outubro de 2011

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e à minha irmã, por serem as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigado pela compreensão, paciência e por todo apoio que me deram ao longo da minha vida acadêmica.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de muitas pessoas às quais agradeço:

À minha orientadora, Professora Luiza Granadeiro, pela sua total disponibilidade, dedicação, paciência e partilha de conhecimentos científicos. Não tenho palavras para agradecer as horas que me recebeu, lendo e acompanhado o meu trabalho passo a passo, o meu sincero obrigado.

Ao Professor Samuel Silvestre, por tudo o que me ensinou e pelo tempo que dispensou a ajudar-me. Muito obrigado pelo seu apoio e palavras de incentivo.

À Ana Cristina Ramalhino, pela disponibilidade e prontidão na aquisição de conhecimentos e competências.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, carinho, orgulho e por fazerem de mim uma melhor pessoa.

À minha irmã, pela amizade, pela paciência e por me conseguir fazer sempre sorrir, mesmo nos dias mais difíceis.

À minha família, pela disponibilidade e atenção que me proporcionam, em particular à Catarina, por todas as palavras que me ajudaram a ultrapassar as adversidades que se impuseram neste percurso.

Aos meus amigos, colegas de curso e de laboratório pelas palavras sensatas que tiveram ao longo deste caminho

Resumo

A cultura de células apresenta nos dias que correm uma importância indubitável, tratando-se de uma ferramenta de estudo frequentemente utilizada em várias áreas de investigação das Ciências da Saúde.

Os fibroblastos compreendem uma população de células heterogénea e dinâmica, amplamente distribuída pelos tecidos conjuntivos dos vertebrados, onde desempenham funções fulcrais na regulação estrutural e fisiológica dos tecidos. Por serem parte integrante da pele humana, apresentarem características favoráveis ao estabelecimento de culturas e por expressarem receptores específicos para neurotransmissores e hormonas, particularmente, receptores de estrogénio, os fibroblastos da derme humana, da linha celular NHDF, constituem um possível modelo de estudo da resposta ao 17 β -estradiol (E2).

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo da influência das passagens celulares, de culturas de fibroblastos NHDF, na resposta ao E2. Simultaneamente, também foi averiguada a interferência de diferentes condições de cultura na proliferação celular estimulada por estrogénio. Este estudo foi realizado em passagens celulares contíguas de fibroblastos NHDF, que foram expostos ao E2 por períodos de incubação crescentes (0, 48, 96 e 144 horas), na presença de meios de cultura diferentes na sua suplementação, nomeadamente: meio de cultura suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS); meio de cultura sem FBS; e meio de cultura suplementado com 5% de FBS tratado com carvão activado. Para a quantificação da resposta dos fibroblastos ao E2 foi utilizado o ensaio de viabilidade celular baseado na redução do brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), juntamente com o ensaio de exclusão de *trypan blue*.

Os resultados obtidos confirmam a influência das condições de cultura e da passagem celular nos estudos de resposta dos fibroblastos NHDF ao E2. Apenas foi verificada reprodutibilidade entre a resposta de quatro passagens celulares contíguas, quando os fibroblastos foram incubados por um período de 48 horas em meio suplementado com FBS. Adicionalmente, também foi este o meio de cultura onde se verificou existir maior correspondência entre os valores de absorvência de MTT e o número de células contabilizado. Por outro lado, somente foi visível uma proliferação significativa ($P < 0,05$) dos fibroblastos em resposta à presença de E2 quando estes foram incubados em meio com FBS por 96 horas.

Uma vez que os melhores resultados foram obtidos nas culturas incubadas em meio com FBS, sugere-se que, através do ajuste do número de células com que se iniciam os estudos de resposta a estrogénios, poderá ser alcançado um equilíbrio entre a reprodutibilidade e sensibilidade demonstrada neste meio. Ainda assim, propõe-se que num procedimento ideal todas as experiências de um mesmo estudo deveriam ser efectuadas em células da mesma passagem.

Palavras-chave

Fibroblastos NHDF, 17 β -estradiol, passagem celular, ensaio de viabilidade MTT, FBS, FBS tratado com carvão activado

Abstract

Cell culture is of extreme importance nowadays, since it is a study tool often used in various areas of research in Health Sciences.

The fibroblasts cover a heterogeneous and dynamic population of cells, widely distributed in the connective tissues of vertebrates, where they have an important role in the structural and physiological regulation of the tissues. The fibroblasts are an integral part of the human skin, and present favorable characteristics to be cultured. Likewise, they express specific receptors for neurotransmitters and hormones, particularly the estrogen receptors. Thus, the human dermal fibroblasts of the NHDF cell line form a possible study model of response to 17 β -estradiol (E2).

The main objective of this work consisted in the study of the influence of cell passages of the NHDF fibroblast cultures, in response to E2. The interference of different culture conditions in cell proliferation, by estrogen stimulation, was also studied. This study was carried out on contiguous cell passages of NHDF fibroblasts, which were exposed to E2 with increasing incubation periods (0, 48, 96 and 144 hours), in the presence of different culture medium such as: (i) culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS); (ii) culture medium without FBS; and (iii) culture medium supplemented with 5% charcoal Stripped FBS. The response of the fibroblasts to E2 was quantified by the trypan blue exclusion assay and by cell viability analysis, which is based on the reduction of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT assay).

The results confirm the influence of culture conditions and cell passage on the study of the response of NHDF fibroblasts to E2.

The reproducibility between the response of four contiguous cell passages was verified, only when the fibroblasts were incubated for a period of 48 hours in the culture medium supplemented with FBS. In addition, it was also in this culture medium where there was a better correspondence between the absorbance values of MTT and the number of counted cells. On the other hand, there was a significant proliferation ($P < 0,05$) of fibroblasts in response to the presence of E2, when they were incubated in the culture medium with FBS for 96 hours.

Since the best results were obtained in the culture medium with FBS, these results suggest that, through the adjustment of the number of starting cells in the research studies of response to estrogens, a balance between the reproducibility and sensibility demonstrated in this medium may be achieved. Nevertheless, as a future prospective, the ideal procedure should have all the experiences of the same study carried out on the same cell passage.

Keywords

Fibroblasts NHDF, 17 β -estradiol, cell passage, MTT assay, FBS, Charcoal Stripped FBS

Índice

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos	v
Palavras-chave	vii
Keywords	ix
Introdução.....	1
1. Fibroblastos.....	2
1.1 Funções dos fibroblastos.....	2
1.2 Heterogeneidade dos fibroblastos da derme.....	4
1.3 Fibroblastos como modelo de estudo <i>in vitro</i>	5
2. Os fibroblastos como modelo de estudo da resposta dos indivíduos aos estrogénios	8
2.1 Biossíntese e metabolismo dos estrogénios	10
2.1.1 Biossíntese de estrogénios	10
2.1.2 Metabolismo do estrogénio	11
2.2 Receptores de estrogénio	13
2.3 Mecanismo de acção dos estrogénios.....	14
2.3.1 Mecanismos de acção genómicos do E2.....	14
2.3.2 Mecanismos de acção rápida do E2.....	16
3. Senescência em culturas de fibroblastos normais da derme humana	16
3.1.1 Fenótipo senescente dos fibroblastos.....	17
3.1.1.1 Alterações estruturais.....	17
3.1.1.2 Alterações fisiológicas.....	19
3.1.1.3 Alterações bioquímicas e moleculares	19
3.1.2 Biomarcadores da senescência	19
4. Interesse da utilização dos fibroblastos da derme como modelo de estudo dos efeitos do 17 β -estradiol	20
Objectivos.....	22
Materiais e métodos.....	23
1. Nota introdutória	23
1.1 Quantificação da resposta dos fibroblastos em cultura ao 17 β -estradiol através da redução do sal de tetrazólio MTT	23
1.2 Variabilidade entre os protocolos do ensaio de viabilidade MTT	24
2. Reagentes de cultura	25
2.1 Soro bovino fetal tratado com carvão activado	26
3. Cultura celular	26

4. Técnicas de cultura celular	26
4.1 Preparação e armazenamento dos fibroblastos em cultura	26
4.2 Subcultura de fibroblastos.....	27
5. Ensaio de proliferação celular na presença de 17 β -estradiol	27
5.1 Cultura de fibroblastos experimentais	27
5.2 Contagem do número de células	29
6. Análise estatística	30
Resultados e Discussão	32
1. Experiência modelo	32
2. Relação entre o ensaio de viabilidade MTT e o ensaio de exclusão <i>trypan blue</i>	34
2.1 Correspondência entre os valores de absorvência obtidos no ensaio MTT e o número de células contabilizado em diferentes tempos de exposição, nas diversas passagens celulares	34
2.1.1 Na presença de meio de cultura com FBS.....	34
2.1.2 Na presença de meio de cultura sem FBS	37
2.1.3 Na presença de meio de cultura com FBS tratado com carvão activado (meio CH) ...	39
3. Reprodutibilidade dos estudos de resposta ao 17 β -estradiol entre diferentes passagens celulares.....	42
3.1 Reprodutibilidade após 48 horas de exposição ao E2.....	42
3.2 Reprodutibilidade após 96 horas de exposição ao E2.....	44
4. Sensibilidade dos fibroblastos ao 17 β -estradiol.....	47
5. Limitações do estudo	48
Conclusões	49
Protocolo ideal	50
Bibliografia.....	51
Anexo	57

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação da pele humana adulta.

Figura 2 - Curva de crescimento celular.

Figura 3 - Receptores hormonais identificados em fibroblastos da derme humanos da pele.

Figura 4 - Resumo dos efeitos do estrogénio em diferentes órgãos do corpo humano.

Figura 5 - Estrutura e produção dos estrogénios endógenos.

Figura 6 - Metabolismo do 17 β -estradiol.

Figura 7 - Estrutura dos receptores de estrogénio clássicos.

Figura 8- Mecanismo de acção genómica clássico do E2.

Figura 9 - Mecanismo de acção genómico não-clássico do E2.

Figura 10 - Envelhecimento dos fibroblastos da derme *in vitro*.

Figura 11 - Receptores de estrogénio do tipo alfa [A] e beta [B] em fibroblastos da derme humana.

Figura 12 - Disposição dos meios de cultura nas placas *multiwells*.

Figura 13 - Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Figura 14 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Figura 15 - Razões de crescimento [144h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Figura 16- Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio sem FBS.

Figura 17 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio sem FBS.

Figura 18 - Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio CH.

Figura 19 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio CH.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estudos da resposta de fibroblastos humanos em cultura ao 17 β -estradiol.

Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultura testados.

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de *Pearson r* entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio FBS + E2, e as respectivas razões estatísticas.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de *Pearson r* entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio sem FBS + E2, e as respectivas razões estatísticas.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de *Pearson r* entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio CH + E2, e as respectivas razões estatísticas.

Tabela 6 - Valores de *t* aos Níveis de significância de 0,05 e 0,01.

Lista de Acrónimos

E2	17 β -Estradiol
FBS	Soro bovino fetal
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
CICS	Centro de investigação em Ciências da Saúde
ECM	Matriz extracelular
TDP	Tempo de duplicação da população
ER	Receptor de estrogénio
ERs	Receptores clássicos de estrogénio
CYPs	Enzimas do citocromo P450
3 β -HDS	3 β -Desidrogenase
17 β -HDS	17 β -Desidrogenase
2-OHE2	2-Hidroxiestradiol
4-OHE2	4-Hidroxiestradiol
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
GSTP	Glutathiona- <i>S</i> -transferase
ER α	Receptor de estrogénio α
ER β	Receptor de estrogénio β
GPGR	Receptor de estrogénio associado a proteína G
DBD	Domínio de ligação ao ADN
ERE	Elemento de resposta ao estrogénio
Hsps	Proteínas de choque térmico
LBD	Domínio de ligação ao ligando
AP-1	Proteína activadora-1
SP-1	Proteína estimuladora-1
MAPK	Proteína cinase activada por mitogénio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
SR	Senescência replicativa
SA- β -GAL	Senescência associada à β -galactosidase
PBS	Tampão fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblast</i>
1 ^a -2 ^a p	Fibroblastos da primeira para a segunda passagem
3 ^a -4 ^a p	Fibroblastos da terceira para a quarta passagem
4 ^a -5 ^a p	Fibroblastos da quarta para a quinta passagem
5 ^a -6 ^a p	Fibroblastos da quinta para a sexta passagem
6 ^a -7 ^a p	Fibroblastos da sexta para a sétima passagem

Introdução

As células em cultura têm vindo a destacar-se como um modelo de estudo muito útil em várias áreas de investigação das ciências da saúde. Particularmente, na fase pré-clínica, nos estudos de resposta a diferentes compostos endógenos e a xenobióticos, já há muito que se utiliza como ferramenta inicial o modelo de cultura celular.

Nos estudos realizados no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), pelo grupo que desenvolve trabalhos no âmbito da resposta celular a compostos esteróides, como é exemplo do 17 β -estradiol, os fibroblastos humanos em cultura constituem, entre outras linhas celulares, um modelo de estudo utilizado.

Actualmente, encontram-se largamente comercializadas linhas celulares de fibroblastos de origem humana. Estas, tratando-se de linhas celulares finitas, encontram-se sujeitas a fenómenos de envelhecimento contínuo.

Para além do envelhecimento celular, outras variáveis podem influenciar a resposta dos fibroblastos às hormonas esteróides, como são exemplos o meio de cultura utilizado e o período de exposição à hormona.

Uma das dificuldades nos ensaios efectuados em fibroblastos é, sem dúvida, a reprodutibilidade dos mesmos. Assim sendo, torna-se necessário estabelecer o intervalo de passagens celulares no qual os fenómenos de envelhecimento celular não interfiram com a reprodutibilidade destes. É, igualmente relevante, averiguar de que forma as condições de cultura influenciam a resposta dos fibroblastos e determinar quais as condições que permitem obter uma resposta mais reprodutível.

No sentido de melhor entender estas variáveis, surgiu a necessidade de realizar este trabalho que irá reflectir-se nos protocolos a ser utilizados por este grupo de investigação.

1. Fibroblastos

Os fibroblastos são células com origem na camada mesodermal e cuja denominação provém de uma das suas funções que consiste na produção de fibras colagénicas (fibro-blasto, formador de fibras) (Carrascal, 2001; Doljanski, 2004). Estas células encontram-se largamente distribuídas nos tecidos conjuntivos dos vertebrados e têm a capacidade de modular a sua actividade metabólica, a qual se reflecte na sua morfologia (Kanitakis, 2002).

De acordo com o grau de actividade, é feita a distinção geral entre os fibroblastos metabolicamente activos, simplesmente designados de fibroblastos, e os fibroblastos metabolicamente inactivos ou quiescentes, que são conhecidos como fibrócitos.

Os fibroblastos apresentam uma forma fusiforme com numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se estendem entre as fibras do tecido conjuntivo, possuem um núcleo oval com cromatina fina e nucléolo evidente, e no citoplasma apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos. Por sua vez, os fibrócitos possuem menores dimensões e caracterizam-se por possuírem um menor número de prolongamentos citoplasmáticos, assim como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi menos desenvolvidos (Carrascal, 2001; Kanitakis, 2002).

É importante notar que os fibroblastos e fibrócitos são dois estágios funcionais da mesma célula, e na presença de estímulos específicos, decorrentes dos processos de reparação dos tecidos, os fibrócitos podem reverter ao estado de fibroblastos e reactivar a sua capacidade de síntese (Darby *and* Hewitson, 2007).

1.1 Funções dos fibroblastos

Na biologia celular clássica, os fibroblastos eram frequentemente considerados como uma população de células relativamente inerte e desinteressante. Uma visão que foi radicalmente alterada, pois hoje são reconhecidos como um componente central da biologia tecidual (Sorrell, 2009), que desempenham funções importantes na regulação estrutural e fisiológica dos tecidos (Mine *et al.*, 2008).

Os fibroblastos compreendem uma população de células heterogénea e dinâmica que sintetiza e secreta um conjunto de moléculas precursoras da matriz extracelular (ECM), particularmente, da substância fundamental, colagénio, reticulina e elastina, que contribuem para a sustentação estrutural dos tecidos (Kanitakis, 2002; Sorrell, 2009).

Outras das funções dos fibroblastos estão relacionadas com a participação destas células em interacções parácrinas e autócrinas na pele, particularmente importantes em diferentes fases do processo de cicatrização de feridas (Darby *and* Hewitson, 2007 ; Werner *et al.*, 2007).

Os fibroblastos participam activamente na resposta inflamatória, interagindo com as células dendríticas e outras células do sistema imunitário. Nestas interacções, os fibroblastos respondem a múltiplos factores, tais como IL-1 e IL-6, pela modificação da própria produção e secreção de factores imunoreguladores (citocinas e quimiocinas inflamatórias), que integram vários aspectos da cicatrização, como são exemplos a diferenciação dos monócitos e a regulação da proliferação e migração das células epidermais (Sorrell, 2009).

Para além de colaborarem na inflamação, pela libertação de citocinas e factores de crescimento, os fibroblastos migram para o local da ferida e diferenciam-se num tipo celular especializado, mas efémero, que contém a isoforma α da actina do músculo liso, os miofibroblastos. Em resposta a factores derivados de monócitos/macrófagos, estas células produzem, na zona da ferida, uma matriz provisional enriquecida em fibronectina tipo fetal e ácido hialurónico e colaboram na contracção da ferida.

No final desta fase, os miofibroblastos desaparecem do local da ferida, aparentemente por apoptose, e são substituídos por fibroblastos activos que iniciam a formação da matriz colagenosa (Darby *and* Hewitson, 2007; Sorrell *et al.*, 2007).

Os fibroblastos também possuem um papel relevante na angiogénese, um processo dinâmico que ocorre tanto em condições fisiológicas (cicatrização de feridas e crescimento embrionário), como em condições patológicas (crescimento tumoral). Na presença de feridas e durante o crescimento tumoral, os fibroblastos são estimulados para produzir factores de crescimento angiogénicos, como são exemplos o factor de crescimento endotelial vascular, factor de crescimento de fibroblastos, factor de crescimento derivado das plaquetas e o factor transformador de crescimento β , que vão actuar sobre as células endoteliais vasculares, subsequentemente estimulando a sua proliferação, migração e diferenciação para formarem novos vasos sanguíneos (Newman *et al.*, 2011).

Adicionalmente, promovem a reepitelização por dupla sinalização parácrina, em que os queratinócitos, através libertação IL-1 derivada dos queratinócitos, induzem os fibroblastos a produzir e secretar factores de crescimento e citocinas, nomeadamente o factor de crescimento dos queratinócitos e IL-6, que por sua vez estimulam a proliferação celular dos queratinócitos (Sorrell, 2009; Werner *et al.*, 2007).

1.2 Heterogeneidade dos fibroblastos da derme

A pele, devido à sua acessibilidade, é um dos órgãos mais bem estudados no que diz respeito à diversidade dos fibroblastos. Contudo, outros órgãos e tecidos também já foram estudados neste sentido (Das *et al.*, 2002; Koumas *et al.*, 2002; Van Beurden *et al.*, 2003).

Em 1962, Castor *et al.* alertaram para a heterogeneidade dos fibroblastos *in vitro*, baseando-se nas diferenças metabólicas entre fibroblastos provenientes de diferentes tecidos (Castor *et al.*, 1962). Mais recentemente, estudos realizados por Chang *et al.* caracterizaram o perfil de expressão genética de fibroblastos provenientes de diferentes locais anatómicos, demonstrando a existência de padrões transcripcionais distintos e característicos, que se mantêm *in vitro*, após os fibroblastos serem isolados da influência de outros tipos de células. Adicionalmente, estes investigadores também demonstraram que esta diferenciação topográfica se mantêm ao longo das passagens celulares, isto é, que os fibroblastos apresentam memória posicional (Chang *et al.*, 2002).

Para além da heterogeneidade relativa ao posicionamento anatómico, os fibroblastos de um mesmo tecido não constituem uma população homogénea. Efectivamente, no que respeita aos fibroblastos da derme, estes podem ser fundamentalmente agrupados em duas subpopulações bem definidas de acordo com a sua localização na derme (figura 1), uma referente à derme papilar e outra à derme reticular. Estas duas subpopulações apresentam diferenças fenotípicas que se manifestam na produção e organização da ECM, na produção de factores de crescimento e citocinas, e na participação em respostas inflamatórias (Sorrell, 2009).

Como tal, é importante que os fibroblastos com origem em diferentes partes do corpo, e em diferentes camadas de um mesmo tecido sejam encarados como tipos celulares distintos (Sorrell, 2009; Chang *et al.*, 2002).

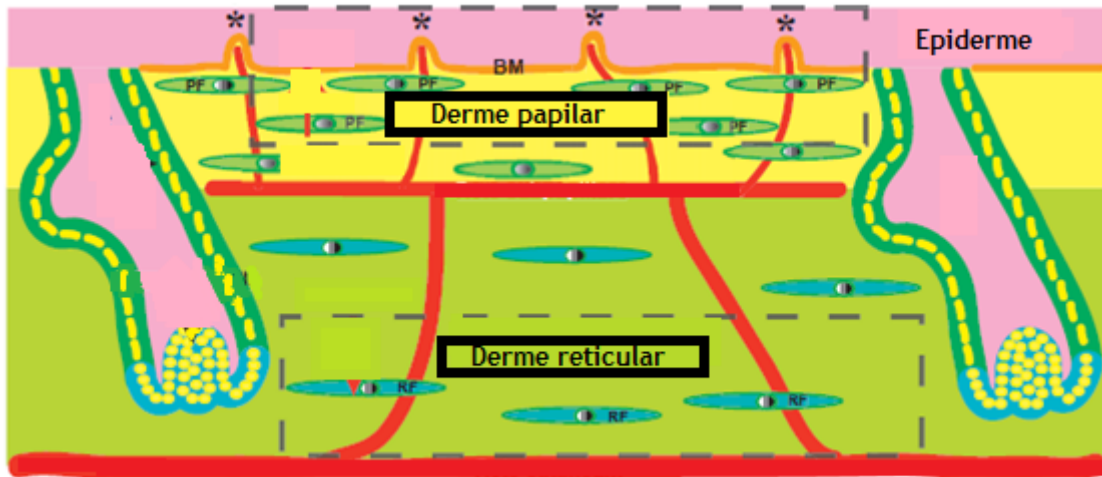


Figura 1 - Representação da pele humana adulta (adaptado de (Sorrell et al., 2007)). BM- Membrana basal; PF- Fibroblastos da derme papilar; RF- Fibroblastos da derme reticular.

1.3 Fibroblastos como modelo de estudo *in vitro*

Embora as primeiras culturas celulares tenham sido estabelecidas pela primeira vez, há cerca de 100 anos atrás, nos dias que correm constituem uma ferramenta frequentemente utilizada no âmbito da investigação (Cruz *et al*, 2009), nomeadamente em testes de toxicidade, na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, na engenharia genética e terapia génica. Além disto, as células em cultura têm sido utilizadas como modelo de estudo dos efeitos de compostos endógenos e xenobióticos sobre as células e no processo de envelhecimento (Ryan, 2008).

O interesse na utilização de culturas de fibroblastos advém em parte das características favoráveis destas células. Nomeadamente, a facilidade de obtenção de amostras por biopsia de pele das várias partes do corpo, que constituem a principal fonte de fibroblastos. E do facto de, após o isolamento e estabelecimento de culturas, os fibroblastos apresentarem uma proliferação rápida e contínua na presença de soro, comparativamente a outros tipos de células que necessitam de factores de crescimento adicionais (Takashima, 1998). Na verdade, o soro utilizado na suplementação do meio de cultura celular contém factores de crescimento, minerais, hormonas, lípidos, entre outros componentes que promovem a proliferação celular e a adesão das células ao substrato. Contudo para a manutenção de outros tipos de células em cultura, como é o exemplo dos queratinócitos, é necessário ainda acrescentar outros factores, nomeadamente o factor de crescimento epidermal e o factor de crescimento de queratinócitos (Freshney, 2005).

A experiência de cultura que tem vindo a ser adquirida com os fibroblastos desde o início do século XX, particularmente, a elucidação acerca do perfil mitótico e do tempo de ciclo celular destas células, contribuiu em muito para a utilização dos fibroblastos como modelo de estudo em vários trabalhos de investigação. (Takashima, 1998).

Relativamente ao perfil ou potencial mitótico dos fibroblastos, encontra-se descrito que após subcultura, as células progridem através de um padrão de crescimento característico que passa fundamentalmente por três fases (figura 2), a fase *lag*, a fase *log* ou exponencial e a fase *plateau* ou estacionária (Freshney, 2005).

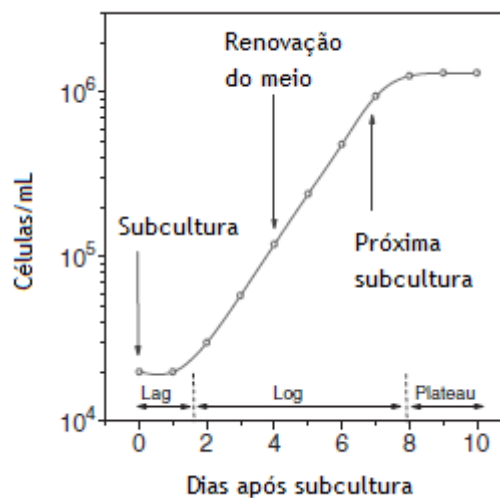


Figura 2 - Curva de crescimento celular (adaptado de (Freshney, 2005)).

A fase *lag* corresponde ao período de adaptação, no qual não se verifica *grande* variação no número de células. Nesta fase, que ocorre imediatamente após a subcultura, as células substituem os elementos da superfície celular e da ECM perdidos durante a tripsinização, aderem à superfície e propagam. Seguidamente decorre a fase *log*, caracterizada pelo aumento exponencial do número de células, que termina entre uma a duas duplicações de população, após ter sido alcançada a confluência. Portanto, no final desta fase a cultura torna-se confluenta, o que quer dizer que a toda superfície de crescimento disponível se encontra ocupada e que todas células estão em contacto com células vizinhas. Além disto, a taxa de crescimento celular é reduzida, e em alguns casos, a proliferação cessa completamente. Neste estadiio, a cultura entra em fase de *plateau* ou estacionária (Freshney, 2005).

Quanto ao tempo de ciclo celular, Bettuzzi *et al.* demonstraram que fibroblastos da derme humana, tornados quiescentes por ausência de soro, atingiam a fase S após 24 horas e a fase G2/M 36 horas após a re-adição de soro (Bettuzzi *et al.*, 1999). Note-se que, o tempo de ciclo

celular difere do tempo de duplicação da população (TDP), uma vez que o primeiro somente é referente às células que se encontram em divisão. Por outro lado, o TDP trata-se de um valor médio que se aplica a toda a população celular, abrangendo não apenas as células com capacidade proliferativa, mas também as que não possuem essa capacidade e as que se encontram mortas, cujas velocidades de divisão são zero (Freshney, 2005).

Efectivamente, todas as características anteriormente referidas contribuem para a atractividade de utilização destas células, contudo o principal interesse da utilização dos fibroblastos como modelo de estudo prende-se com o facto de estas células serem parte integrante da pele. E por sua vez a pele possui células que expressam receptores específicos para hormonas e neurotransmissores.

No caso dos fibroblastos da derme (figura 3), encontram-se identificados receptores de hormonas peptídicas e neurotransmissores, como são exemplos os receptores da hormona paratiróide/péptido relacionado com a hormona paratiróide, da hormona tireoestimulante, da hormona libertadora de corticotropina, de melacortina, da melatonina, da serotonina e hormona de crescimento. E também receptores de hormonas esteróides como é o caso dos receptores de androgénios, receptores de estrogénio tipo α e β , assim como receptores da hormona tiróide (Zouboulis, 2004).

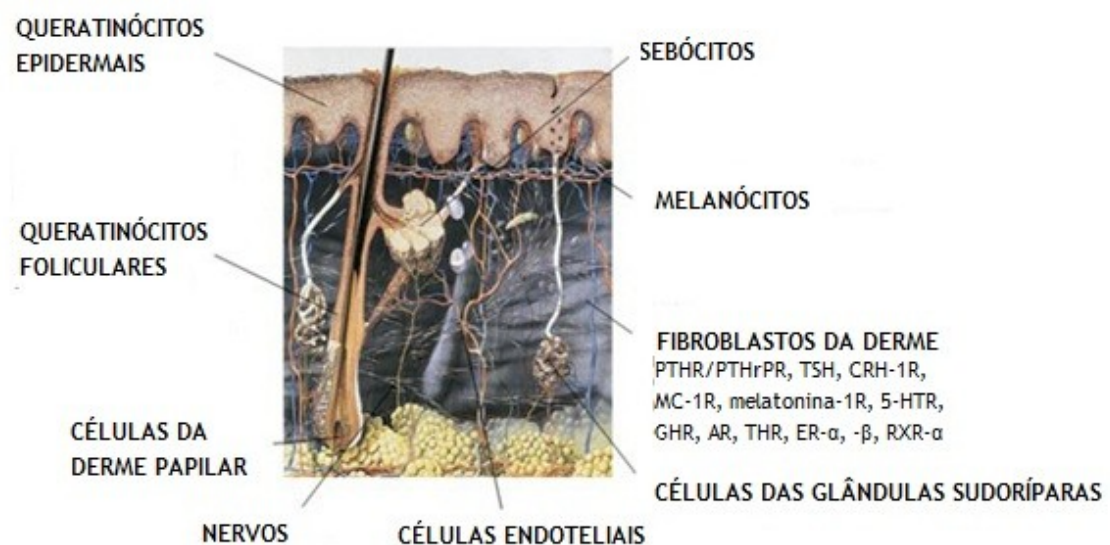


Figura 3 - Receptores hormonais identificados em fibroblastos da derme humanos da pele (adaptado de (Zouboulis,2004)). PTHR/PTHrPR, receptor da hormona paratiróide/péptido relacionado com a hormona paratiróide; TSH, receptor de hormona tireoestimulante; CRH-1R, receptor da hormona libertadora de corticotropina do tipo 1; MC -1R, receptor de melacortina do tipo 1; melatonina-1R, receptor de melatonina tipo 1; 5-HTR, receptores de serotonina; GHR, receptor da hormona de crescimento; AR, receptor de androgénios; ER - α , - β , receptores de estrogénio do tipo - α e - β ; RXR- α , receptores retinóides X do tipo α

Para além de possuir receptores de hormonas e neurotransmissores, a pele também é considerada um órgão endócrino onde ocorre a produção e conversão de hormonas que são libertadas na circulação sanguínea e têm um papel importante em diferentes funções do organismo humano (Zouboulis, 2004; Slominski *and* Wortsma, 2000; Gruber *et al.*, 2002).

2. Os fibroblastos como modelo de estudo da resposta dos indivíduos aos estrogénios

Os estrogénios são as hormonas predominantemente responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas, bem como pela regulação do ciclo reprodutivo (menstruação e gravidez) (Gruber *et al.*, 2002; Hall *and* Phillips, 2005). Nos homens, os estrogénios também parecem desempenhar um papel crítico na função reprodutiva normal, nomeadamente na espermatogénese e na espermiogénese (Carreau *and* Hess, 2010). Além disto, estas hormonas regulam a proliferação celular, diferenciação e função em tecidos reprodutivos e em tecidos não reprodutivos, de homens e mulheres, mediante interacção com receptores de estrogénio (Millas *and* Liquidato, 2009).

Como podemos ver na figura 4, além de promoverem o crescimento e diferenciação dos órgãos sexuais e do tecido mamário, os estrogénios aumentam os receptores hepáticos de lipoproteínas, o que resulta na diminuição das concentrações séricas das lipoproteínas de baixa densidade do colesterol (Owen *and* Abbey, 2004). No tracto gastrointestinal, parecem proteger contra o cancro do cólon, uma vez que a probabilidade de desenvolvimento deste tipo de cancro em mulheres a receber terapia de substituição hormonal parece ser inferior à das mulheres que não fazem o tratamento (Johnson *et al.*, 2009). Nos ossos, os estrogénios inibem a função dos osteoclastos e estimulam a actividade dos osteoblastos, pelo que diminuem a reabsorção óssea e ajudam a prevenir a osteoporose (DiSilvio *et al.*, 2006; Frenkel *et al.*, 2010). No sistema cardiovascular, apresentam efeitos vasoprotectivos, dado que aumentam a formação e libertação de óxido nítrico e prostaciclina nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular (Meyer *and* Barton, 2009; Keung *et al.*, 2011). Na pele, podem retardar ou prevenir os sinais do envelhecimento, uma vez que aumentam a produção de colagénio, reduzem a profundidade das rugas, e parecem ter um papel protector contra o fotoenvelhecimento induzido por radiação solar ultravioleta (Zouboulis *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010). No sistema nervoso central, reduzem as flutuações de humor em mulheres na perimenopausa (Gruber *et al.*, 2002) e parecem possuir um papel neuroprotectivo (Brann *et al.*, 2007). Adicionalmente, estas hormonas participam na regulação de vários processos relacionados com o controlo da homeostase da energia, nomeadamente no balanço energético, sensibilidade à insulina, função das células B-

pancreáticas, crescimento de adipócitos e na sua distribuição corporal (Ropero *et al.*, 2008), sendo actualmente reconhecido, como um importante regulador da homeostase da glucose e do metabolismo lipídico (Foryst-Ludwig *and* Kintscher, 2010).

Ainda que o estrogénio seja fundamental à regulação de muitos mecanismos fisiológicos, as suas acções nem sempre são benéficas para o organismo humano, sendo, igualmente, considerado um factor de risco para o desenvolvimento de neoplasias, particularmente na mama e no endométrio (Pearce *and* Jordan, 2004).

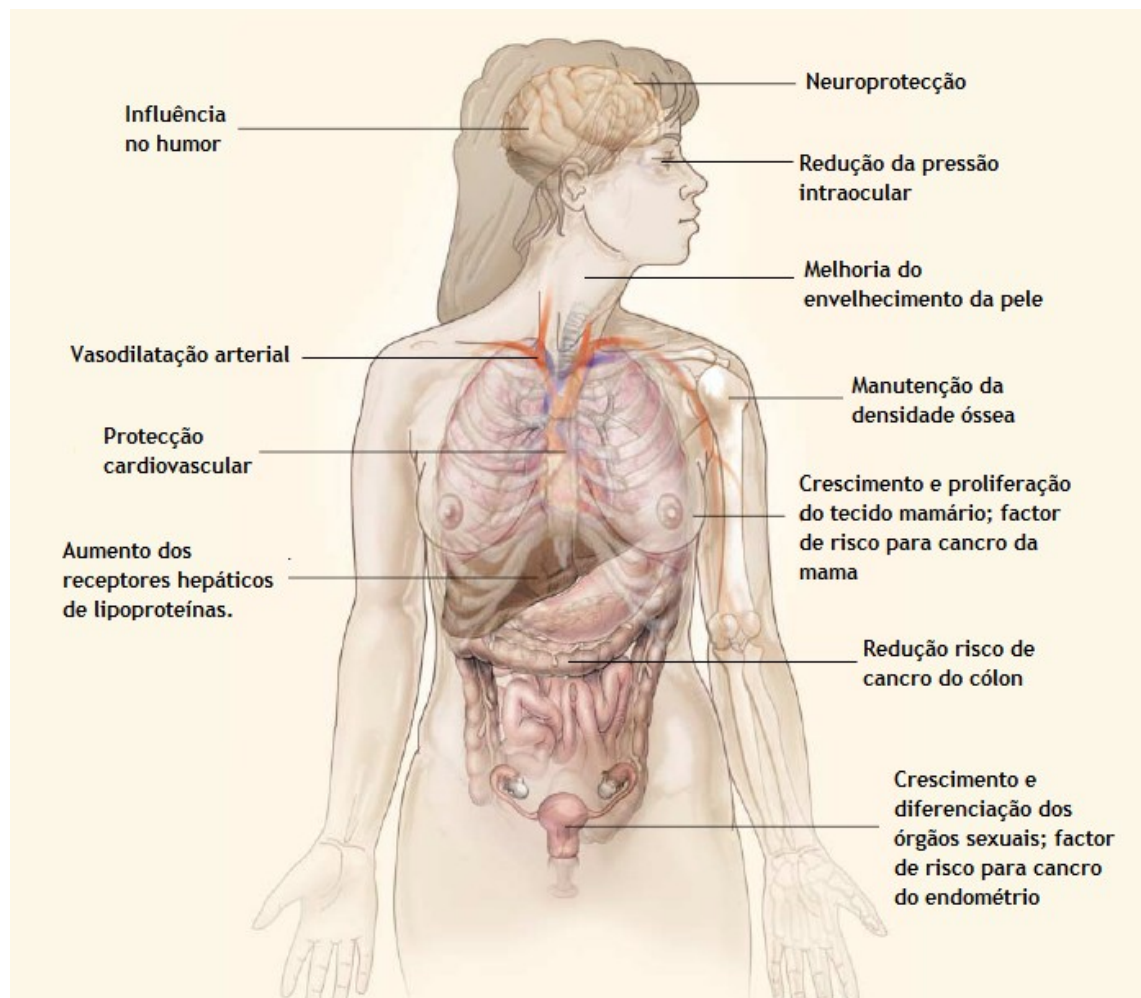


Figura 4 - Resumo dos efeitos do estrogénio em diferentes órgãos do corpo humano (adaptado de (Gruber *et al.*, 2002)).

2.1 Biossíntese e metabolismo dos estrogénios

Os estrogénios são hormonas caracterizadas pela presença de um anel aromático e podem existir no organismo sob a forma de estradiol, estrona e estriol, que variam nas suas potências individuais (Hall *and* Phillips, 2005).

A forma predominante no ser humano, e também a mais potente, é o 17 β -estradiol (E2). Os metabolitos do E2, estrona e estriol, são agonistas fracos dos receptores de estrogénio (ER) pelo que apresentam menor potência (Hall *and* Phillips, 2005; Millas *and* Liquidato, 2009).

Tal como acontece para todas as hormonas esteróides, também o estradiol é sintetizado a partir do colesterol (Payne *and* Hales, 2004). Após ligação aos receptores das lipoproteínas, o colesterol é transportado no sangue por ligação a proteínas específicas, as globulinas de ligação a hormonas sexuais, e também pela albumina sérica, para células esteroidogénicas onde é armazenado e, posteriormente, transportado para os locais de síntese de esteróides (Gruber *et al.*, 2002).

Nas mulheres não grávidas o principal local de produção de estrogénio são os ovários, nas grávidas a placenta produz a maioria do estradiol circulante. Por outro lado, nas mulheres na menopausa e nos homens, a produção de estrogénios ocorre em locais extragonadais, como são exemplos o tecido adiposo, a pele, os ossos e o cérebro, onde se expressa a aromatase, uma enzima responsável pela conversão de androgénios em estrogénios (Simpson *and* Davis, 2001).

2.1.1 Biossíntese de estrogénios

Nas células esteroidogénicas, a síntese de esteróides envolve uma série de reacções enzimáticas, que convertem o colesterol em androgénios e estrogénios (Gruber *et al.*, 2002). Estas reacções são mediadas por enzimas do citocromo P450 (CYPs), particularmente pelo CYP11A, CYP17 e CYP19, e por hidroxisteróides desidrogenases que incluem isoformas da 3 β -desidrogenase (3 β -HDS) e 17 β -desidrogenase (17 β -HDS).

Numa primeira fase, o colesterol é convertido a pregnenolona por acção da CYP11A. A partir da pregnenolona, ocorre a síntese de androstenediona por duas vias distintas. Uma das vias envolve a conversão da pregnenolona a progesterona pela 3 β -HDS, que por sua vez, por acção da CYP17 é convertida a 17 α -hidroprogesterona e, de seguida, a androstenediona. Pela outra via, a pregnenolona é convertida a 17 α -hidroxipregnenolona e, posteriormente, a dehidroepiandrosterona por acção da CYP17, que depois origina a androstenediona.

Uma vez sintetizada a androstenediona, a produção endógena de E2 pode dar-se (figura 5): (1) via conversão da androstenediona em testosterona pela 17 β -HDS3 e, posterior, aromatização através da CYP19 a 17 β -estradiol; e (2) via aromatização da androstenediona a estrona, seguidamente convertida a 17 β -estradiol por meio da 17 β -HDS1 (Payne *and* Hales, 2004).

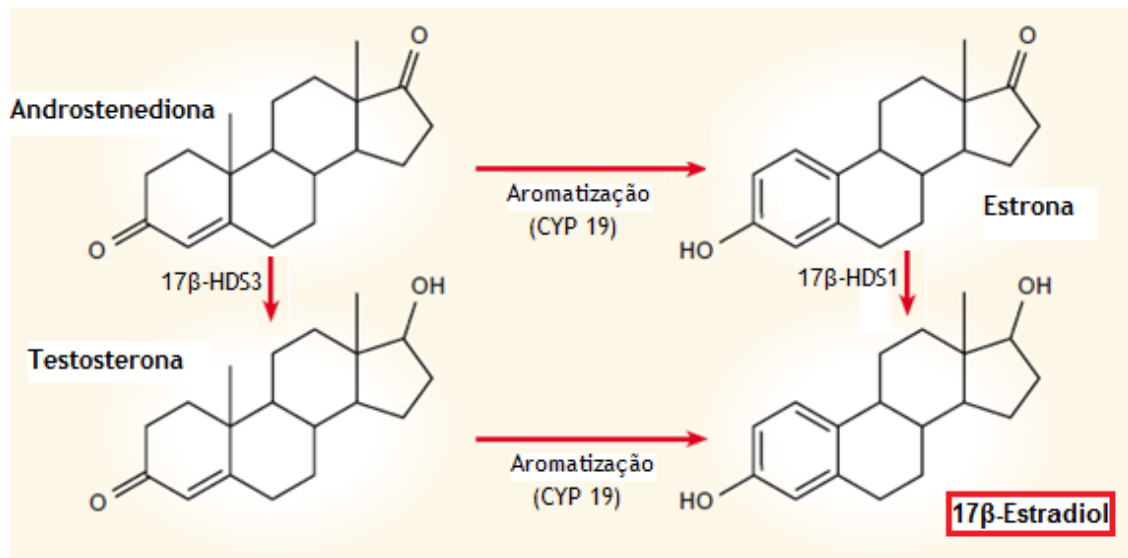


Figura 5 - Estrutura e produção dos estrogénios endógenos (adaptado de (Gruber *et al.*, 2002)).

2.1.2 Metabolismo do estrogénio

Os estrogénios são eliminados do organismo humano pela conversão a metabolitos estrogénicamente inactivos, que são excretados pelas fezes e urina.

O primeiro passo do metabolismo do E2 consiste na hidroxilação do anel fenólico por acção de isoformas específicas das CYPs, que geram um grande número de metabolitos hidroxilados (2-, 4-, 6 α -, 6 β -, 7 α -, 12 β -, 15 α -, 15 β -, 16 α - e 16 β - hidroxilados) já identificados *in vivo* e *in vitro* (Tsuchiya, 2005).

Uma vez que a maioria das CYPs são abundantemente expressas no fígado, o metabolismo do estradiol é maioritariamente hepático, onde aproximadamente 80 % do estradiol é convertido a 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) através das CYP1A2 e CYP3A4, e 20% em 4-hidroxiestradiol (4-OHE2) pela CYP1B1.

Adicionalmente, também pode decorrer a metabolização extra-hepática do E2, onde as principais isoformas do CYP envolvidas são o CYP1A1 que catalisa a hidroxilação do E2 em 2-OHE2, e o CYP1B1, altamente expresso nos tecidos alvo do estrogénio (mama, ovário e útero), que conduz à produção do metabolito 4-OHE2 (Tsuchiya, 2005).

Após hidroxilação (figura 6), os catecóis de estrogénio 2-OHE2 e 4-OHE2 podem ser metilados pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT) a metoxiestrogénios (2-MeOE2, 2-OH-3-MeOE2 e 4-MeOE2) ou oxidados pelas CYPs a semiquinonas (E2-2,3-SQ e E2-3,4-SQ), e seguidamente a quinonas (E2-2,3-Q e E2-3,4-Q). As quinonas são depois conjugadas pela glutationa-S-transferase P1 (GSTP1) a conjugados inertes, posteriormente excretados (Parl *et al.*, 2009).

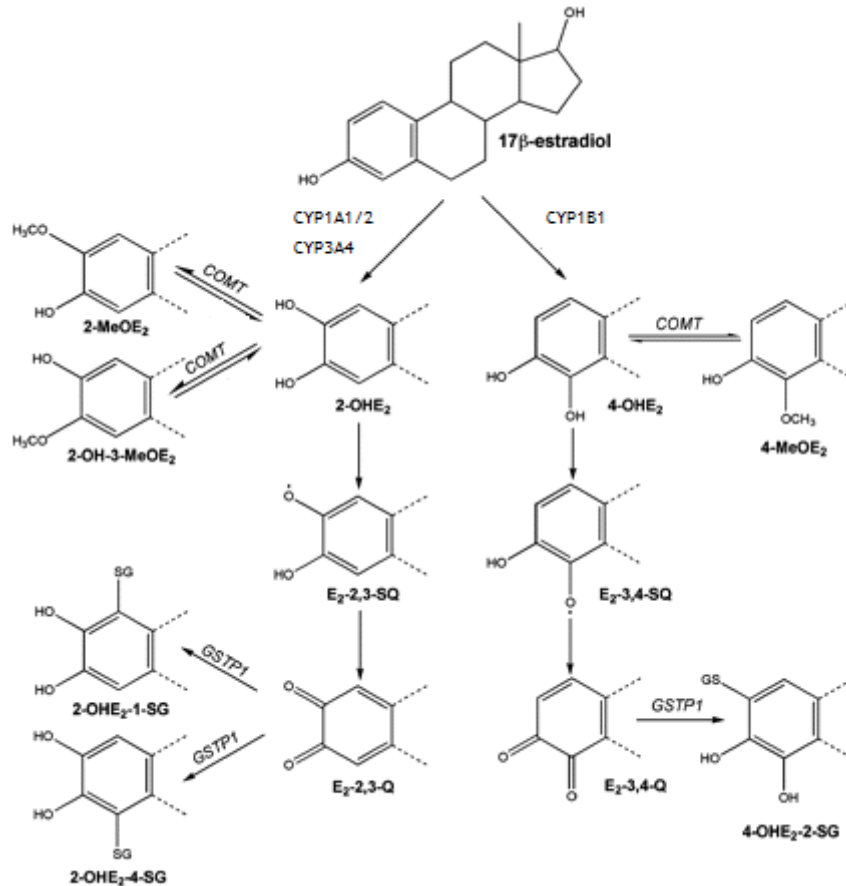


Figura 6 - Metabolismo do 17β-estradiol (adaptado de (Parl *et al.*, 2009)).

De uma forma geral, a 2-hidroxilação do estrogénio é considerada uma via metabólica “benigna”, contrariamente à 4-hidroxilação, que é considerada carcinogénica por conduzir à formação de quinonas electrofílicas, que podem formar aductos com o ADN e, por consequente provocar dano celular. Este mecanismo é apontado como causa subjacente à carcinogenicidade mediada por estrogénios (Parl *et al.*, 2009; Chandrasena *et al.*, 2008). Por outro lado, o metabolismo conjugativo dos catecóis e quinonas de estrogénio, mediado pela COMT e GST, são referidos como as principais vias de detoxificação (Chandrasena *et al.*, 2008).

2.2 Receptores de estrogénio

Até à data, foram identificadas três tipos de receptores de estrogénio, designadamente o receptor de estrogénio alfa (ER α), o receptor de estrogénio beta (ER β) e o receptor de estrogénio acoplado a proteína G (GPER) (Prossnitz *and* Barton 2011).

Os receptores clássicos de estrogénio (ERs), ER α e ER β , pertencem a uma superfamília de receptores nucleares que regulam o crescimento, diferenciação e homeostase em células eucariotas. Como uma classe, que além dos ERs também abrange os receptores das hormonas da tiróide, vitamina D3 e ácido retinóico, estes receptores são factores de transcrição cuja actividade é regulada alostericamente através da ligação de ligandos (Hanstein *et al.*, 2004). Destes dois receptores, o ER α foi o primeiro receptor de estrogénio (ER) a ser identificado e clonado (Greene *et al.*, 1986), enquanto o ER β apenas foi descrito pela primeira vez em 1996 (Mosselman *et al.*, 1996). Embora sejam codificados por genes localizados em diferentes cromossomas, os dois tipos de ERs apresentam um elevado grau de homologia tanto ao nível da sequência de aminoácidos que os constitui, como ao nível das suas estruturas tridimensionais (Acconcia *and* Marino, 20011).

Os ERs apresentam uma estrutura de receptores nucleares, sendo constituídos por seis domínios funcionais, representados na figura 7.

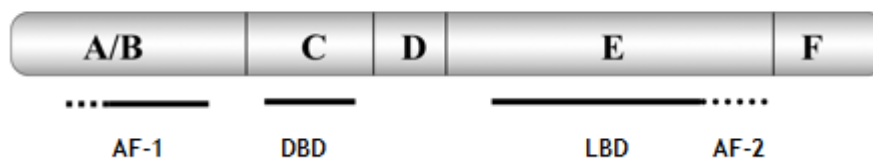


Figura 7 - Estrutura dos receptores de estrogénio clássicos (adaptado de (Hanstein *et al.*, 2004)).

Cada um dos domínios figurados desempenha uma função própria. Nomeadamente, o domínio A/B, que corresponde à porção N-terminal, está envolvido nas interações proteína-proteína e na activação da transcrição de genes; o domínio de ligação ao ADN (DBD) ou domínio C, controla a dimerização do receptor e a ligação ao ADN nos genes promotores que contém o elemento de resposta ao estrogénio (ERE); o domínio D que para além de contribuir para a dimerização do receptor, constitui o local de ligação às proteínas de choque térmico (Hsps); o domínio de ligação ao ligando (LBD) ou domínio E, liga ao E2 e coopera com o domínio A/B na sincronização da transcrição genética. Embora ainda permaneçam algumas dúvidas quanto à função da porção C-terminal do receptor, sabe-se que o domínio F também pode modular a actividade transcrricional do E2 (Hanstein *et al.*, 2004; Acconcia *and* Marino, 2011).

No que diz respeito à distribuição dos ERs pelos diferentes tecidos humanos, os vários estudos de investigação levados a cabo nos últimos anos indicam que, cada um dos subtipos de ERs apresenta padrão de disposição característico. Particularmente, os receptores ER β foram maioritariamente identificados em órgãos não envolvidos na reprodução, como são exemplos o sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imunológico, tracto urogenital, tracto gastrointestinal, rins e pulmões. Por outro lado, os receptores ER α foram principalmente identificados nos tecidos associados à reprodução, como a mama, útero e vagina (Millas *and* Liquidato, 2009).

Para além da interacção com os ERs, os efeitos do E2 também podem ser mediados por ligação e activação de receptores de estrogénio acoplados à proteína G (GPER), especificamente ao GPER30 (Prossnitz *and* Barton 2011).

2.3 Mecanismo de acção dos estrogénios

Desde a clonagem do primeiro ER que têm vindo a aumentar os esforços para perceber a complexidade dos mecanismos moleculares subjacentes às diversas acções do E2 e da multiplicidade de *ligandos* sintéticos sobre os ERs. Hoje sabe-se que, os efeitos fisiológicos do E2 resultam da combinação das suas acções sobre os receptores de estrogénio clássicos (ERs) e os GPER (Prossnitz *and* Barton 2011), que podem modificar a actividade transcricional celular (mecanismos genómicos) e promover eventos de sinalização rápida (mecanismos de acção rápida) (Keung *et al.*, 2011).

2.3.1 Mecanismos de acção genómicos do E2

Os ERs, quando no estado inactivo encontram-se associadas a Hsps, que funcionam como *chaperones* e estabilizam os receptores (Gruber *et al.*, 2002). Uma vez que o estrogénio difunde para a célula, este une-se ao domínio de ligação do receptor, induzindo uma modificação alostérica, que subsequentemente conduz à dissociação das Hsps.

De seguida, ocorre a dimerização do complexo receptor-hormona com outro receptor, e os dímeros ligam-se ao elemento de resposta ao estrogénio (ERE), uma sequência de ADN específica presente na região promotora dos genes directamente regulados por E2 (figura 8). Após ligação ao ERE, é iniciada a transcrição genética, que é regulada por co-factores proteicos, que podem facilitar (co-activadores) ou reprimir (co-repressores) a expressão genética (Osborne *and* Schiff 2005; Hanstein *et al.*, 2004).

A figura 8 ilustra este mecanismo de acção, designado de mecanismo genómico clássico, onde se pode ver a activação da transcrição na presença de co-activadores (A1B1, PCAP e CBP300).

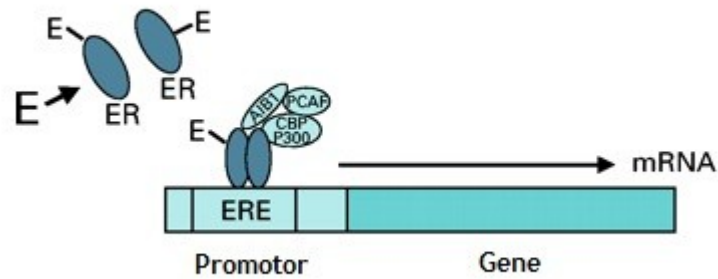


Figura 8- Mecanismo de acção genómica clássica do E2 (adaptado de (Osborne *and* Schiff, 2005)).

Além da interacção directa com os ERE, os ERs também podem regular e activar a transcrição de genes alvo que não possuem o ERE. Neste caso, após dimerização, o complexo receptor-hormona não funciona como factor de transcrição, mas interage com factores de transcrição ligados ao ADN (interacção proteína-proteína), nomeadamente com a proteína de especificidade 1 (Sp1) e com a proteína activadora (AP-1), e controla a transcrição genética (Osborne e Schiff 2005). Este mecanismo é usualmente designado de mecanismo genómico não clássico (figura 9).

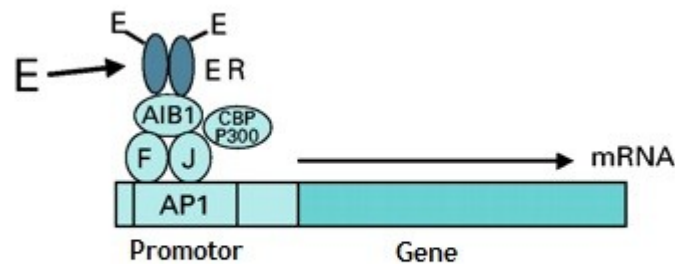


Figura 9 - Mecanismo de acção genómico não-clássico do E2 (adaptado de (Osborne *and* Schiff 2005)).

Estes dois mecanismos são responsáveis pela modulação da transcrição dos genes alvo do E2 e explicam as acções genómicas induzidas por esta hormona, cujos efeitos celulares somente se manifestam horas a dias após estimulação (Osborne *and* Schiff, 2005).

2.3.2 Mecanismos de acção rápida do E2

Os efeitos rápidos do E2 encontram-se descritos em vários tipos de células, incluindo nos neurónios, células pancreáticas, macrófagos e osteoblastos.

Estes efeitos podem resultar da interacção desta hormona com os ERs que localizados na membrana plasmática, no citoplasma e mitocôndrias das células alvo do estrogénio (Keung *et al.*, 2011). Desta interacção decorre a activação das cascatas de sinalização por proteína cinase activada por mitogénio (MAPK) e a sinalização por fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que subsequentemente activam outras vias citosólicas (Acconcia *and* Marino, 2011) e produzem os efeitos rápidos, não genómicos.

Por outro lado, também se encontra descrito que os efeitos rápidos do E2 podem ser mediados pela activação dos GPER30, localizados tanto intracelularmente como na membrana plasmática. A ligação do E2 à GPER30 conduz à activação da proteína G, que por sua vez pode activar múltiplos efectores, entre outros, a adenilciclase e a proteína tirosina cinase. Estes por sua vez estão envolvidos na sinalização dos eventos rápidos do E2, mas também podem, por intermédio da activação do receptor do factor de crescimento epidérmico, activar proteínas nucleares ou regular factores de transcrição (Prossnitz *et al.*, 2008).

3. Senescência em culturas de fibroblastos normais da derme humana

Há 50 anos atrás Leonard Hayflick e Paul Moorhead descreveram pela primeira vez o envelhecimento dos fibroblastos humanos em cultura. Estes investigadores verificaram que, após um número fixo de divisões celulares, os fibroblastos *in vitro* perdiam, irreversivelmente, a capacidade proliferativa. Um fenómeno celular que designaram de senescência replicativa (SR) (Hayflick *and* Moorhead, 1961).

Esta descoberta fomentou o estudo do envelhecimento celular noutros tipos de células, verificando-se que a SR não era exclusiva de fibroblastos humanos, e que também ocorria em células gliais, queratinócitos, células do músculo liso vascular, células endoteliais e em linfócitos de diversas espécies mamíferas (Cristofalo *et al.*, 2004). Além disto, este fenómeno também impulsionou a utilização de culturas de células somáticas normais, como modelo de estudo das modificações celulares e moleculares associadas com o desenvolvimento e envelhecimento (Phipps *et al.*, 2007).

Ainda que os estudos realizados no âmbito de perceber de que forma a SR observada *in vitro* se correlaciona com os mecanismos de senescência celular *in vivo*, datem há mais de 30 anos atrás, esta questão continua a ser alvo de bastante controvérsia. Por um lado, a evidência do decréscimo do potencial replicativo dos fibroblastos da derme em cultura, em função da idade do doador, aponta para uma relação directa entre a SR e a senescência celular *in vivo*. Contudo, não existem evidências que confirmem a relação inversa entre a idade do doador e a capacidade proliferativa das células. Adicionalmente, o facto de ter sido demonstrado que certos procedimentos e condições de cultura poderiam provocar senescência, independentemente do potencial proliferativo, veio aumentar, ainda mais, a polémica em torno utilização do modelo de cultura celular para o estudo do envelhecimento (Phipps *et al.*, 2007).

Após várias décadas de investigação, não se conseguiu estabelecer uma relação directa entre a SR e a senescência celular *in vivo*. Todavia, este facto não invalida a utilização das culturas celulares como ferramenta de estudo dos mecanismos de envelhecimento. De facto, os fibroblastos humanos em cultura mantém as características genéticas, metabólicas e os mecanismos de regulação fisiológicos, pelo que o recurso a culturas celulares permite estudar as modificações dos mecanismos que ocorrem, enquanto as células sofrem uma deterioração previsível e reprodutível num ambiente constante (Phipps *et al.*, 2007).

3.1 Sinais de senescência *in vitro*

As subculturas sucessivas dos fibroblastos da derme são acompanhadas por modificações evolutivas e cumulativas das células, que se prolongam até que estas percam a capacidade replicativa. Além destas modificações decorrentes do normal envelhecimento das células, o fenótipo senescente dos fibroblastos pode ser induzido prematuramente *in vitro* devido ao stress oxidativo gerado por radiação UV, peróxido de hidrogénio e transfecção de genes (Rattan, 2010; Kuilman *et al.*, 2010).

Estas alterações decorrentes do envelhecimento celular dizem respeito, não apenas ao fenótipo estrutural dos fibroblastos, mas também ao fisiológico, bioquímico e molecular (Rattan, 2010).

3.1.1 Fenótipo senescente dos fibroblastos

3.1.1.1 Alterações estruturais

Uma das modificações morfológicas mais pronunciadas, entre as primeiras e as últimas passagens dos fibroblastos em cultura, é o aumento progressivo do tamanho celular e a perda

do padrão morfológico homogêneo das culturas (Hwang *et al.*, 2009). Isto é, os fibroblastos deixam de ter a estrutura fusiforme característica e passam a apresentar uma forma achatada e irregular, pelo que deixam de se dispor paralelamente ao substrato de cultura (figura 10) (Rattan, 2010).

Outras modificações estruturais resultantes do envelhecimento celular incluem a rigidez do citoesqueleto e da membrana, o aumento do número de vacúolos, e citocinese incompleta que tem como consequência a multinucleação das células.

Adicionalmente, existem várias alterações ultra-estruturais identificadas com recurso a métodos microscópicos electrónicos. Estas alterações incluem a alteração da forma das mitocôndrias, aumento do nível de aberrações cromossómicas, condensação excessiva da cromatina, aumento da fragmentação nucleolar e do tamanho, e número de lisossomas (Rattan, 2010; Hwang *et al.*, 2006).

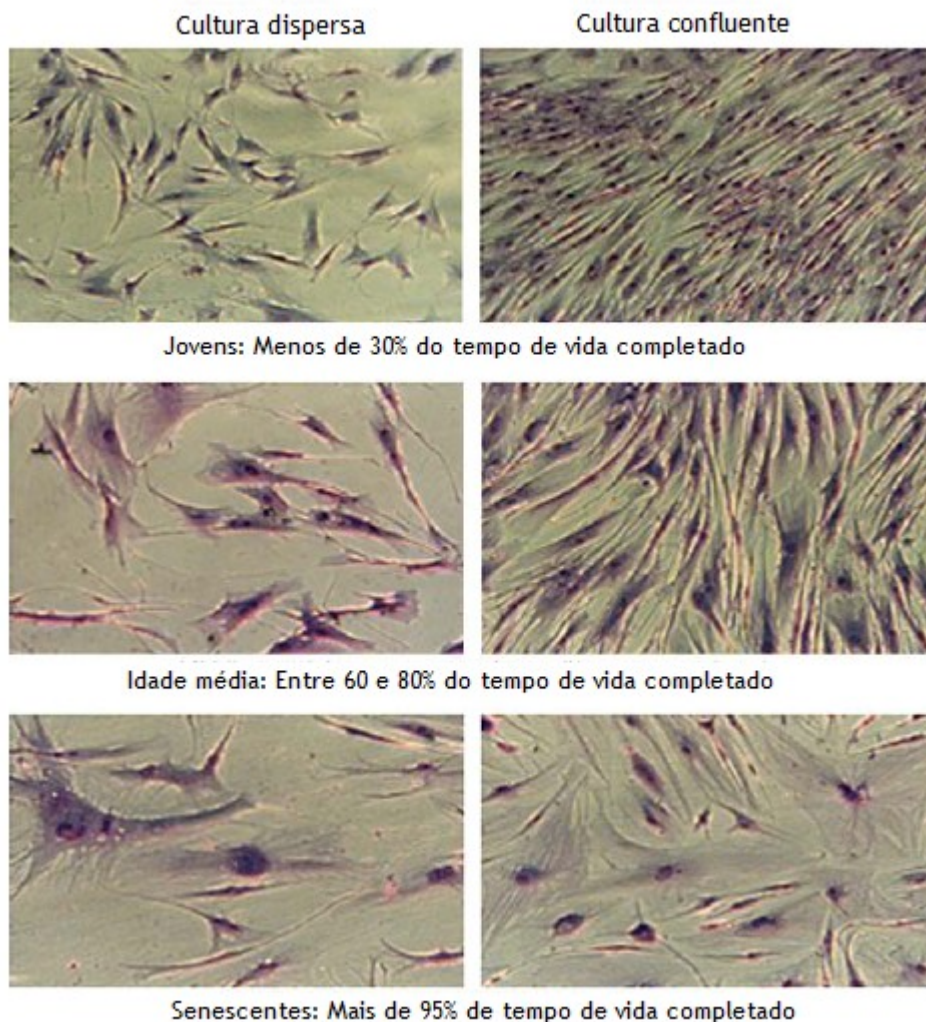


Figura 10 - Envelhecimento dos fibroblastos da derme *in vitro* (adaptado de (Rattan, 2010)).

3.1.1.2 Alterações fisiológicas

Com o envelhecimento, as células da pele tornam-se progressivamente menos activas, perdem a capacidade de manter várias funções fisiológicas, o que se traduz por exemplo no declínio da produção das proteínas da ECM e passam a ser mais susceptíveis a efeitos nocivos de toxinas, fármacos e radiações (Rattan, 2010; Boyle *et al.*, 2005).

A alteração da resposta das células durante do envelhecimento é uma das modificações mais significativas, o que pode resultar na redução da resposta a factores de crescimento e outros mitogénios. Segundo Phipps *et al.*, esta redução de resposta não se encontra directamente relacionada com o número e afinidade dos receptores, mas é consequência de uma transdução de sinal inapropriada (Phipps *et al.*, 2007). Efectivamente com a senescência verifica-se uma alteração do fluxo de cálcio e do potencial de membrana, diminuição da actividade dos canais iónicos, da respiração mitocondrial e produção de energia. (Phipps *et al.*, 2007; Rattan, 2010).

3.1.1.3 Alterações bioquímicas e moleculares

As alterações bioquímicas e moleculares decorrentes do envelhecimento dos fibroblastos estão na base das modificações estruturais e fisiológicas evidenciadas.

Uma das principais alterações a este nível é o bloqueio irreversível do ciclo celular em fase G1/G0. Outras alterações incluem o aumento dos níveis de mRNA de proteínas inibidoras do ciclo celular e inibidoras de proteases, redução do tamanho dos telómeros (Rattan, 2010), aumento das espécies reactivas de oxigénio, dos níveis de dano do ADN nuclear e mitocondrial, acompanhado pela diminuição da eficiência dos mecanismos de reparação do ADN (Boyle *et al.*, 2005).

3.1.2 Biomarcadores da senescência

Os mecanismos de senescência celular são acompanhados pelo surgimento de vários marcadores celulares, que são comumente utilizados para identificar células senescentes *in vitro* e *in vivo*. Estes biomarcadores podem reflectir a activação dos mecanismos que contribuem para a senescência celular, como é exemplo da indução das vias de supressão tumoral, ou somente acompanhar os mecanismos de senescência, como é o caso aumento da expressão do biomarcador da senescência associado à β -galactosidase (SA- β -GAL) (Kuilman *et al.*, 2010).

Actualmente encontram-se descritos vários marcadores da senescência celular, para além das modificações estruturais ou morfológicas, e que incluem entre outros a indução da actividade da SA- β -GAL, o encurtamento dos telómeros, a activação de cascatas de supressão tumoral e expressão de inibidores do ciclo celular. Contudo, uma vez que diferentes mecanismos

senescentes são caracterizados por diferentes biomarcadores, estes devem ser seleccionados de acordo com o fenómeno de senescência em estudo, nunca esquecendo que, isoladamente, nenhum biomarcador consegue identificar células senescentes *in vivo* e *in vitro* (Kuilman *et al.*, 2010).

Num estudo realizado por Mammone *et al.* em 2006, com o objectivo de averiguar se a SR de fibroblastos humanos da derme seria resultado processos apoptóticos, foram pesquisados biomarcadores característicos da apoptose em função do aumento do número de passagem celular. Particularmente, a fragmentação do ADN, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o aumento dos níveis de citocromo c citoplasmático e o aumento da actividade da cascata de caspases (caspase-3). Além destes, também foi feita análise do ciclo celular, da viabilidade e morte celular e a actividade da SA- β -GAL, que embora não sejam específicos do mecanismo de apoptose ajudaram a demonstrar que, as subculturas sucessivas de fibroblastos da derme induzem morte celular de natureza apoptótica (Mammone *et al.*, 2006).

4. Interesse da utilização dos fibroblastos da derme como modelo de estudo dos efeitos do 17 β -estradiol

Dada a complexidade dos mecanismos de acção dos estrogénios e ao seu papel relevante em vários mecanismos fisiológicos e patológicos do organismo humano, o interesse em torno desta hormona continua a ser uma constante nos dias que correm. Como tal, surge a necessidade de desenvolver um modelo de estudo viável para compreender estes mecanismos e tentar desenvolver estratégias para reverter os processos patológicos.

Os fibroblastos, como foi referido anteriormente, são células bem caracterizadas e cuja cultura celular apresenta uma série de vantagens sobre outros tipos celulares. Além disto, foi confirmado por Haczynski *et al.*, que os fibroblastos da derme são células alvo dos estrogénios, uma vez que expressam ambos os receptores ER- α e ER- β (Haczynski *et al.*, 2002). Adicionalmente, pelo *abstract* de artigo muito recente, parece ser feita referência ao GPER30 em fibroblastos da derme (Richardson *et al.*, 2011).

Previamente, também o nosso grupo de investigação estudou a existência ER- α e ER- β em fibroblastos da derme humana por microscopia de fluorescência (figura 11). E por estes motivos têm vindo a utilizar, entre outras, as culturas celulares de fibroblastos da derme como modelo de estudo da resposta dos indivíduos aos efeitos do E2.

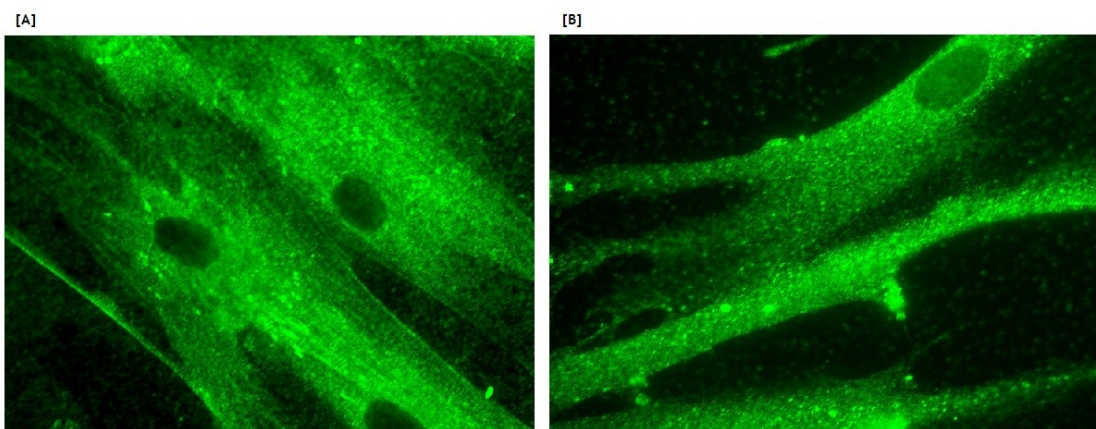


Figura 11 - Receptores de estrogénio do tipo alfa [A] e beta [B] em fibroblastos da derme humana (foto cedida por Breitenfeld L e Ramalinho AC).

Objectivos

O presente trabalho tem como principal objectivo estudar a influência das passagens celulares, de culturas de fibroblastos, na resposta ao 17 β -estradiol. Adicionalmente também se pretende estudar:

1. A correspondência entre as respostas do ensaio de viabilidade celular MTT e número de células contabilizado pelo ensaio de exclusão por *trypan blue*.
2. A reprodutibilidade dos resultados dos dois ensaios realizados entre as passagens celulares testadas em diferentes condições de cultura (tempo de exposição à hormona e meio de cultura).
3. A resposta dos fibroblastos ao E2 ao longo das passagens celulares e com a modificação das condições de cultura (tempo de exposição à hormona e meio de cultura).

Materiais e métodos

1. Nota introdutória

1.1 Quantificação da resposta dos fibroblastos em cultura ao 17 β -estradiol através da redução do sal de tetrazólio MTT

Em muitos trabalhos de investigação existe a necessidade de quantificar o efeito proliferativo e/ou citotóxico que compostos específicos podem exercer sobre as células em cultura.

Neste sentido podem ser usados diferentes métodos, como são exemplos os métodos baseados na contagem directa de células, na medição da actividade metabólica e do conteúdo de ADN celular (Wang *et al.*, 2010). No entanto, uma das metodologias mais, frequentemente, utilizadas neste tipo de trabalhos consiste na avaliação da viabilidade celular, através da redução de sais de tetrazólio, como é o caso do brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) ((Liu *et al.*, 2006; Krasna *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008).

O ensaio de determinação da viabilidade celular por MTT foi originalmente proposto por Mosmann em 1983, como um procedimento rápido, simples, preciso e económico para avaliação da citotoxicidade e da proliferação celular *in vitro* (Mosmann, 1983). Desde então, várias modificações foram introduzidas no procedimento, e hoje este ensaio é frequentemente utilizado em laboratórios de biologia celular de todo o mundo (van Meerloo *et al.*, 2011).

Este ensaio consiste numa reacção colorimétrica, resultante da redução do sal amarelo de tetrazólio MTT, fundamentalmente, pelas succinato-desidrogenases presentes nas mitocôndrias das células viáveis, o que conduz à formação de um produto púrpura designado formazano e que é quantificado espectrofotometricamente após solubilização por um solvente adequado (Wan *et al.*, 1994; Jaszczyszyn *and* Gasiorowski, 2008). A quantidade de cristais de formazano reflecte, na maioria das populações celulares, a actividade metabólica mitocondrial que, está relacionada com número de células viáveis presentes na cultura testada (Jaszczyszyn *and* Gasiorowski, 2008; van Meerloo *et al.*, 2011).

Uma vez que se trata de um ensaio custo-efectivo, com uma vasta aplicabilidade quer em culturas celulares primárias como em linhas celulares estabelecidas, a redução do MTT pelas células viáveis em cultura tem sido um dos métodos mais recomendados para o estudo do efeito citotóxico de xenobióticos, avaliação de taxas de proliferação e análise da actividade

celular (Jaszczyszyn *and* Gasiorowski, 2008; van Meerloo *et al.*, 2011). Apesar disto, este ensaio apresenta algumas limitações, particularmente, o facto de não conseguir distinguir claramente entre células quiescentes e células não viáveis ou mortas. Assim sendo, a avaliação da viabilidade celular não deve ser feita unicamente através deste ensaio, mas mediante a associação do ensaio MTT com outros métodos que quantifiquem o número de células ou de grupos celulares distintos, o que usualmente envolve a exaustiva contagem de células na câmara de *Neubauer*, ou o recurso a citometria de fluxo (Berridge *et al.* 2005).

1.2 Variabilidade entre os protocolos do ensaio de viabilidade MTT

Efectivamente, após ter sido evidenciada a utilidade do ensaio MTT por Mosmann, este começou a ser empregue em muitos laboratórios e várias modificações foram introduzidas. Estas modificações resultaram de estudos que evidenciaram que, diferentes parâmetros afectavam, substancialmente, a sensibilidade e performance da redução de MTT e, por consequente, a quantificação da viabilidade celular. Exemplificadamente, Twentyman e Luscombe demonstraram a superioridade do dimetilsulfóxido (DMSO) relativamente a outros solventes na dissolução dos cristais de formazano (Twentyman *and* Luscombe, 1987); Vistica *et al.* observaram que a redução do MTT era variável entre linhas celulares testadas e que a presença de factores metabólicos no meio de cultura, especificamente da D-glucose, influenciava a actividade específica do MTT (Vistica *et al.*, 1991); Wan *et al.* alertaram para o facto de a solução de formazano não ser estável a temperatura ambiente, e que o número de células testado é crucial para a reprodutibilidade dos resultados obtidos (Wan *et al.*, 1994).

Embora, ao longo dos anos, vários esforços tenham sido feitos no sentido de otimizar a técnica, continua a não existir uniformidade entre os protocolos aplicados nos ensaios de viabilidade de MTT, especificamente nos trabalhos associados ao estudo dos efeitos de hormonas esteróides sobre culturas de fibroblastos.

Para se ter uma maior percepção da variabilidade entre os protocolos utilizados em estudos de resposta, de fibroblastos humanos em cultura a estrogénios, foi efectuada uma pesquisa bibliográfica na base de dados pública *Pubmed* relativamente às condições de cultura (meio de cultura e tempo de exposição) e ao intervalo de passagens testadas. A tabela 1 apresenta de forma sucinta os dados mais relevantes, relativos a dois artigos científicos publicados, que avaliam os efeitos do 17 β -estradiol sobre fibroblastos humanos em cultura.

Tabela 1 - Estudos da resposta de fibroblastos humanos em cultura ao 17 β -estradiol.

Referência	Local anatómico de origem dos fibroblastos h	Intervalo de passagens celulares testadas	Condições de cultura prévias à exposição ao E2		Condições de cultura na presença de E2	
			Meio de cultura	Tempo (horas)	Meio de cultura	Tempo (horas)
Liu <i>et al.</i> , 2006	Ligamentos cardinais	2 ^a -4 ^a Passagens	sem FBS	24	2% CH	48
Ostad <i>et al.</i> , 2006	Gengiva	3 ^a -10 ^a Passagens	10% FBS	24	10% FBS	24

sem FBS- Meio de cultura sem soro bovino fetal; CH- Meio de cultura com soro bovino fetal tratado com carvão activado; FBS- Meio de cultura com soro bovino fetal.

2. Reagentes de cultura

- Meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), Sigma Aldrich (Portugal);
- HEPES, Sigma Aldrich (Portugal)
- L-Glutamina, Sigma Aldrich (Portugal)
- Piruvato de sódio, Sigma Aldrich (Portugal)
- Antibiótico Ab (solução de estreptomicina e penicilina)
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom (Portugal)
- Soro bovino fetal tratado com carvão activado
- Água Milli-Q, Millipore
- Tampão fosfato salino (PBS)
- 0,025 % Tripsina em PBS/EDTA, Sigma Aldrich (Portugal);
- 17 β -estradiol, Sigma Aldrich (Portugal)
- 0,4 % *Trypan blue*, Merk (Alemanha)
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), Sigma Aldrich (Portugal)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma Aldrich (Portugal)
- Tampão glicina *Sorenson* (solução de 0,1M glicina, 0,1M NaCl com pH ajustado a 10,5 com 0,1M NaHO)

2.1 Soro bovino fetal tratado com carvão activado

Procedeu-se ao tratamento do soro bovino fetal (FBS) com carvão activado, um procedimento que permite reduzir os níveis de hormonas esteróides presentes no FBS. Para tal, incubou-se 500mL de FBS com 8g de carvão activado durante 24 horas à temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 15 minutos a 4000g para separar o carvão activado do soro. Posteriormente, o sobrenadante foi esterilizado por passagem através de um filtro de acetato de celulose com poro de membrana de 0,22 μ m (Cepa *et al.*, 2008). O soro final foi dividido em alíquotas que foram armazenadas a -4°C.

3. Cultura celular

Os fibroblastos da derme humana, da linha celular NHDF (*Normal human dermal fibroblasts*, ATCC) foram mantidos em cultura numa incubadora (NuAire DHD AutoFlow 5510) a 37°C sob atmosfera húmida de 5% CO₂, em meio RPMI 1640 completo, isto é, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2nM L-glutamina, 10nM HEPES, 1nM piruvato de sódio e 1% de Antibiótico Ab (estreptomicina/penicilina). O meio de cultura foi mudado a cada dois a três dias, e quando se alcançava a confluência procedia-se à subcultura das células em novos frascos de cultura.

4. Técnicas de cultura celular

4.1 Preparação e armazenamento dos fibroblastos em cultura

As células utilizadas neste trabalho encontravam-se armazenadas em bancos de células preservados em azoto líquido (-180°C), na presença de DMSO, um reagente citoprotector que permite a sobrevivência dos fibroblastos por um período de tempo superior a três anos.

Às amostras, descongeladas à temperatura ambiente, adicionou-se cerca de 20 mL de meio de cultura RPMI completo, a 37°C. Após centrifugação a 1000 rpm durante 8 minutos, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em meio completo, de forma a remover todo o DMSO. No final, a ressuspensão celular foi colocada num frasco de cultura de 75 cm², adicionou-se meio RPMI completo (0,2mL/cm²) e o frasco foi colocado na incubadora.

Ao longo do trabalho, as células provenientes de culturas confluentes, de diferentes passagens, foram congeladas e armazenadas para experiências posteriores. Para tal, após tripsinização das culturas com tripsina (0,025%) a suspensão celular foi centrifugada a 1000

rpm durante 8 minutos. De seguida descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI completo com 5% de DMSO. A suspensão final foi dividida em alíquotas, introduzidas em recipientes apropriados, que foram colocados a -20°C durante 4 horas, depois mantidos a -80°C por 1 a 3 dias, e finalmente armazenados em azoto líquido a -180°C.

4.2 Subcultura de fibroblastos

Sempre que a cultura de fibroblastos se encontrava próxima da confluência procedia-se à tripsinização da mesma. Este procedimento iniciou-se com a remoção do meio e lavagem da cultura com tampão fosfato salino (PBS) (0,2mL/cm²), de seguida adicionou-se tripsina (0,13 mL/cm²) e aguardou-se entre 1 a 2 minutos até que a enzima actuasse. Após confirmação, ao microscópio, que os fibroblastos já se encontravam desagregados do frasco de cultura e das restantes células, adicionou-se meio RPMI completo (0,2mL/cm²) para neutralizar a enzima. A suspensão resultante foi então centrifugada por 8 minutos a 1000 rpm, e no final descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuscitadas em meio RPMI completo e contadas. Posteriormente, os fibroblastos foram colocados num novo frasco de cultura para propagação da linha celular, e em placas *multiwells* para a realização de uma nova experiência.

5. Ensaios de proliferação celular na presença de 17β-estradiol

5.1 Cultura de fibroblastos experimentais

A primeira passagem celular testada neste trabalho laboratorial foi designada como a primeira para a segunda passagem de NHDF.

Inicialmente foram estabelecidas culturas de fibroblastos em 8 placas *multiwells* de 24 pocetos na concentração de 1x10⁴ células/mL, que foram mantidas em meio RPMI completo por, aproximadamente, 48 horas até as células aderirem à superfície de cultura. Adicionalmente, também foi estabelecida uma cultura celular num frasco de 75 cm² para a manutenção e propagação dos fibroblastos.

Antes do início de cada experiência prepararam-se três meios de cultura diferentes na sua suplementação, que foram designados de meio sem FBS, meio FBS e meio CH, e cuja constituição se encontra descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Composição dos diferentes meios de cultura testados.

Meio sem FBS	Meio RPMI 1640 suplementado com 2nM L-glutamina, 10nM HEPES, 1nM piruvato de sódio e 1% de Antibiótico Ab.
Meio FBS (ou meio RPMI completo)	Meio RPMI 1640 suplementado com 2nM L-glutamina, 10nM HEPES, 1nM piruvato de sódio, 1% de Antibiótico Ab e 10% de FBS.
Meio CH	Meio RPMI 1640 suplementado com 2nM L-glutamina, 10nM HEPES, 1nM piruvato de sódio e 1% de Antibiótico Ab e 5% de FBS tratado com carvão activado.

Adicionalmente preparou-se uma “solução mãe” de estradiol com uma concentração de 10^{-2} M, sendo o 17 β -estradiol dissolvido em DMSO. Esta solução foi dividida em três alíquotas, duas das quais foram armazenadas a -4°C para serem utilizadas mais tarde na mesma experiência. De seguida, foram preparadas soluções intermédias de estradiol, de concentrações 10^{-3} e 10^{-5} M, por diluição da “solução mãe” em meio de cultura sem FBS.

A partir da solução intermédia de 10^{-5} M os três meios de cultura foram suplementados com 40nM de E2.

No início da experiência foi removido e descartado o meio completo, presente em cada um dos pocetos das 8 placas, e as culturas celulares foram lavadas com PBS. De seguida foi adicionado, de igual forma para todas as placas, os três meios suplementados com E2 e os respectivos meios controlo, em triplicado, de acordo com a figura 12.

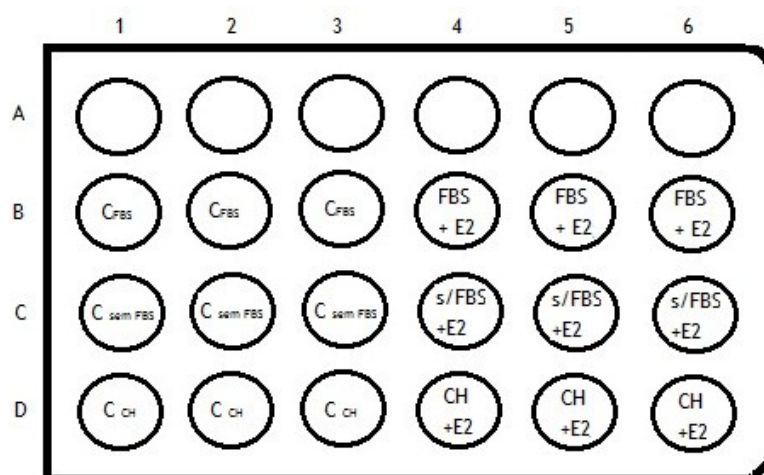


Figura 12 - Disposição dos meios de cultura nas placas *multiwells*. (C_{FBS} - Controlo FBS; C_{sem FBS} - Controlo sem FBS; C_{CH} - Controlo CH; FBS + E2 - meio FBS com 40 nM E2; sem FBS + E2 - meio sem FBS com 40 nM E2; CH + E2 - meio CH com 40 nM E2.)

Das 8 placas iniciais, 6 placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂ e em 2 placas, escolhidas aleatoriamente, foram realizados os ensaios de proliferação que corresponderam ao tempo de exposição 0 horas. Numa das placas foi contabilizado o número de células em cada um dos pocetos, e na outra placa foi realizado o ensaio de viabilidade MTT. No final as placas testadas foram descartadas.

Após 48 horas de incubação, outras 2 placas foram testadas e o mesmo procedimento foi aplicado para os períodos de incubação de 96 e 144 horas.

De 72 em 72 horas os meios controlo e os meios com E2 foram renovados, sempre de acordo com a figura 12. Quando todas as placas foram testadas dava-se por terminada a experiência.

5.2 Contagem do número de células

Para cada período de exposição ao E2 (0, 48, 96 e 144 horas) foi efectuada a contagem de células existentes em cada um dos pocetos de uma placa *multiwells*, através do ensaio de exclusão de *trypan blue* com recurso a uma câmara de *Neubauer*. A contagem foi feita em triplicado para cada um dos diferentes meios, com e sem E2.

Após aspirar e descartar o meio, adicionaram-se 200 µL de tripsina aos pocetos e aguardou-se, aproximadamente, um minuto acompanhando-se a reacção enzimática ao microscópio. Quando a maioria das células já se encontravam desagregadas do fundo dos pocetos, pipetaram-se os 200µL de suspensão, que foram colocados em *eppendorfs* devidamente identificados e contendo 250µL de meio RPMI completo para neutralizar a tripsina.

De forma a garantir que todas as células tinham sido contabilizadas, voltou-se a adicionar tripsina aos pocetos, repetindo-se o procedimento anterior. De seguida os *eppendorfs* foram centrifugados, numa microcentrífuga por 8 minutos a 1000 rpm, e placa de cultura foi descartada. No final da centrifugação aspirou-se, cuidadosamente, o sobrenadante dos *eppendorfs* e colocou-se, em cada um destes, 200 µL de meio RPMI completo para ressuspender o *pellet*.

Para a contagem das células foram pipetados 10µL da ressuspensão celular para um *eppendorf*, ao qual se adicionou 10µL de *trypan blue* (0,4%). Posteriormente, os 20µL pipetados foram introduzidos na câmara de *Neubauer*, observada ao microscópio onde foi realizada a contagem.

Para calcular a concentração celular *c* (número células/mL) calculou-se a média dos quadrantes respectivos a cada câmara de contagem e foi aplicada a expressão (1).

$$c = \frac{\text{média dos quadrantes} \times 2 \times 1000\mu\text{L}}{200\mu\text{L}} \quad (1)$$

5.3 Ensaio de viabilidade celular MTT

Simultaneamente à contagem de células, para cada período de exposição, foi preparada uma solução de MTT com uma concentração de 1mg/mL em PBS. Posteriormente foram removidos e descartados os meios de cultura, adicionou-se 500µL da solução MTT em cada poceto e os fibroblastos foram incubados durante 4 horas numa atmosfera de 37°C com 5% CO₂ ao abrigo da luz.

Passadas 4 horas, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 200µL de DMSO juntamente com 25µL de tampão glicina *Sorenson*. De seguida, o conteúdo dos pocetos foi transferido para uma microplaca de 96 pocetos que se introduziu no leitor espectrofotométrico de microplacas (Biochrom Anthos 2020), onde foi determinada a densidade óptica dos pocetos a um comprimento de onda 570 nm. No final do procedimento descartaram-se as placas.

6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados pela média ± desvio padrão. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa *Microsoft Office Excel 2007*®, para calcular o teste *t-Student* emparelhado e heterocedástico. Os valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Adicionalmente também se estudou a relação existente entre os resultados do ensaio MTT e o número de células contabilizado. Para tal, calculou-se o coeficiente de correlação *r* de *Pearson* de acordo com a expressão (2). Onde N é o número de pares das observações, X corresponde ao número de células contabilizado nas várias experiências realizadas, em diferentes passagens mantidas no mesmo meio de cultura, e Y aos valores de leitura de MTT correspondentes.

$$r = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]} \quad (2)$$

Para se testar a significância do *r* de *Pearson*, foi calculada a razão estatística (*t* calculado) com N-2 graus de liberdade (gl) de acordo com a expressão (3), seleccionando-se um nível de significância de 0,05, e sendo o N igual ao número de pares de observações.

$$t = \frac{r\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (3)$$

Após consulta da tabela 6 em anexo foi feita a comparação entre o t calculado e o t tabelado, e sempre que o valor do t calculado foi igual ou superior ao t tabelado (t calculado $\geq t$ tabelado) verificou-se haver uma correlação significativa ao nível de significância de 0,05 , com (N-2) graus de liberdade.

Resultados e Discussão

O estudo da resposta ao 17 β -estradiol foi realizado em passagens celulares contíguas da linha celular comercial NHDF. Estabeleceu-se que a passagem celular testada na primeira experiência deste trabalho laboratorial seria designada como a primeira para a segunda passagem de NHDF (1^a-2^ap). Seguidamente, a segunda experiência foi realizada em fibroblastos da terceira para a quarta passagem (3^a-4^ap), a terceira experiência em fibroblastos da quarta para a quinta passagem (4^a-5^ap), a quarta experiência em fibroblastos da quinta para a sexta passagem (5^a-6^ap) e a quinta experiência em fibroblastos da sexta para a sétima passagem (6^a-7^ap).

1. Experiência modelo

Para cada experiência ou passagem celular foram efectuados, simultaneamente, o ensaio de viabilidade MTT e o ensaio de exclusão *trypan blue*, após os fibroblastos terem sido expostos a 40nM de E2, por um período de incubação de 0 horas, 48 horas, 96 horas e 144 horas, na presença de três meios de cultura diferentes na sua suplementação, o meio FBS (FBS+E2), meio sem FBS (sem FBS+E2) e meio CH (CH+E2).

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e na presença de controlos, que corresponderam aos fibroblastos nos diferentes meios de cultura a ser testados, na ausência de E2 (controlo FBS, controlo sem FBS e controlo CH).

Os gráficos 1 e 2 apresentam os resultados do ensaio MTT e do ensaio de exclusão *trypan blue* para os fibroblastos da 1^a-2^a passagem, e pretendem exemplificar o tipo de resultados que foram obtidos em todas as experiências realizadas.

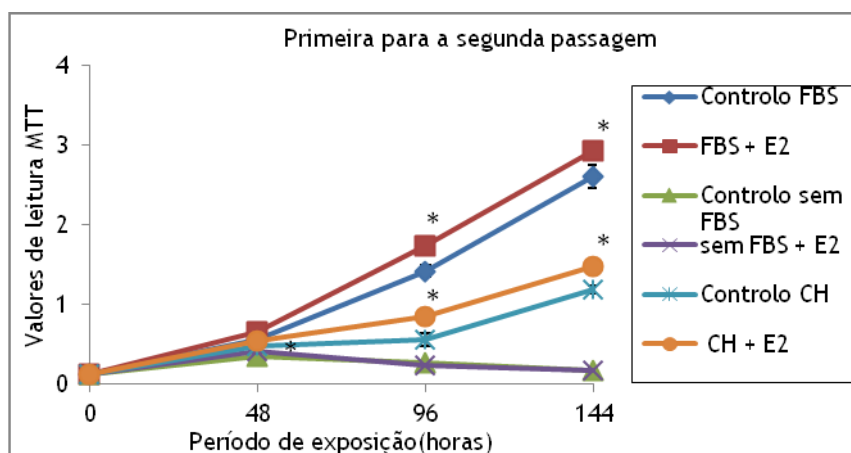


Gráfico 1 - Valores de leitura MTT dos fibroblastos da 1^a-2^ap expostos ao E2 por tempos de incubação crescentes, em diferentes meios de cultura. A diferença estatística relativa ao controlo é representada por * (P < 0,05).

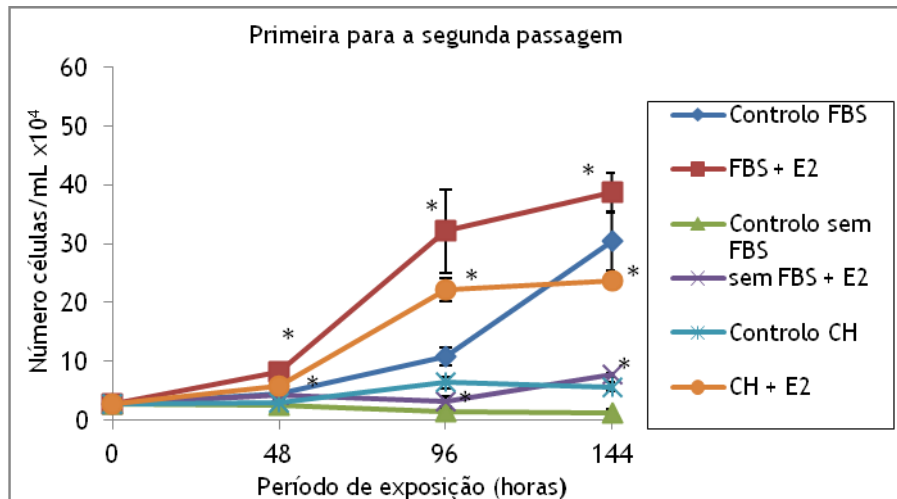


Gráfico 2 - Número de células das culturas da 1ª-2ªp expostas ao E2 por tempos de incubação crescentes, em diferentes meios de cultura. A diferença estatística relativa ao controlo é representada por * ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos são apresentados como a média \pm desvio-padrão de três leituras de MTT (gráfico 1) ou de três contagens de células (gráfico 2), para cada um dos tempos de exposição. Sempre que se verifica diferença significativa ($P < 0,05$) entre o meio com E2 e o respectivo meio controlo esta é assinalada graficamente.

No período de 0 horas de exposição, isto é, no momento imediatamente antes de ser iniciada cada experiência, foi realizado o ensaio MTT e contabilizado o número de células em seis pocetos escolhidos aleatoriamente. O valor médio \pm desvio-padrão obtido foi adoptado como valor absoluto às 0 horas, para todos os meios com E2 e meios controlo, testados na mesma experiência ou passagem celular.

Pela experiência modelo podemos verificar que, a resposta dos fibroblastos ao E2 depende do meio de cultura e do tempo de exposição à hormona. Com efeito, é visível que a maior proliferação celular ocorreu em meio com FBS e a menor em meio sem FBS. Além disto, a resposta ao E2 foi aumentando com o tempo de exposição à hormona, nos meios FBS e CH. No caso do meio sem FBS, os valores de leitura MTT (gráfico 1) indicam que a proliferação celular neste meio começa a diminuir após 48 horas de incubação, o que é consistente com os efeitos da privação do soro, porém pelo gráfico 2 vemos que o número de células na presença de meio sem FBS+ E2 aumenta com o tempo. Esta observação alerta para as discrepâncias entre os valores de leitura MTT e o número de células contabilizado.

2. Relação entre o ensaio de viabilidade MTT e o ensaio de exclusão *trypan blue*

Após terem sido analisados os resultados dos ensaios efectuados, verificou-se que média dos valores de leitura de MTT e do número de células contabilizado, no período de exposição de 0 horas, foi variável entre as cinco experiências realizadas. E, como o principal objectivo do trabalho implica a comparação entre os resultados obtidos nas diferentes passagens celulares, optou-se por se apresentarem os resultados sob a forma de proporções ou razões de crescimento entre os períodos de exposição de 48 horas e 0 horas [48h/0h], 96 horas e 0 horas [96h/0h] e 144 horas e 0 horas [144h/0h] (exemplo figuras 13, 14 e 15).

O desvio-padrão associado às razões calculou-se de acordo com a expressão (4), onde Q representa o quociente entre os valores médios X_2 e X_1 , e σ_2 e σ_1 os respectivos desvios-padrão associados.

$$\sigma_{\text{Quociente}_{2,1}} = Q \cdot \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{X_1^2} + \frac{\sigma_2^2}{X_2^2}} \quad (4)$$

2.1 Correspondência entre os valores de absorvência obtidos no ensaio MTT e o número de células contabilizado em diferentes tempos de exposição, nas diversas passagens celulares

2.1.1 Na presença de meio de cultura com FBS

As figuras 13, 14 e 15 representam graficamente as razões de crescimento, após 48 horas ([48h/0h]), 96 horas ([96h/0h]) e 144 horas ([144h/0h]), dos valores de leitura de MTT [A] e do número de células contabilizado [B] nas diversas passagens celulares incubadas com E2 (FBS + E2) e em meio controlo sem E2 (controlo FBS). Sempre que se verifica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento do meio FBS + E2 e do respectivo meio controlo, esta é assinalada graficamente por *.

Após 48 horas de incubação, como é visível na figura 13 [A], através do ensaio MTT não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, entre as razões de crescimento dos fibroblastos incubados em meio controlo FBS e em meio FBS + E2, em nenhuma das passagens testadas, apesar dos resultados da 1^a-2^ap e 6^a-7^ap apresentarem um desvio-padrão elevado. Relativamente ao número de células, a figura 13 [B] mostra que, à excepção da 1^a-2^ap ($P < 0,05$), também não existiram diferenças significativas.

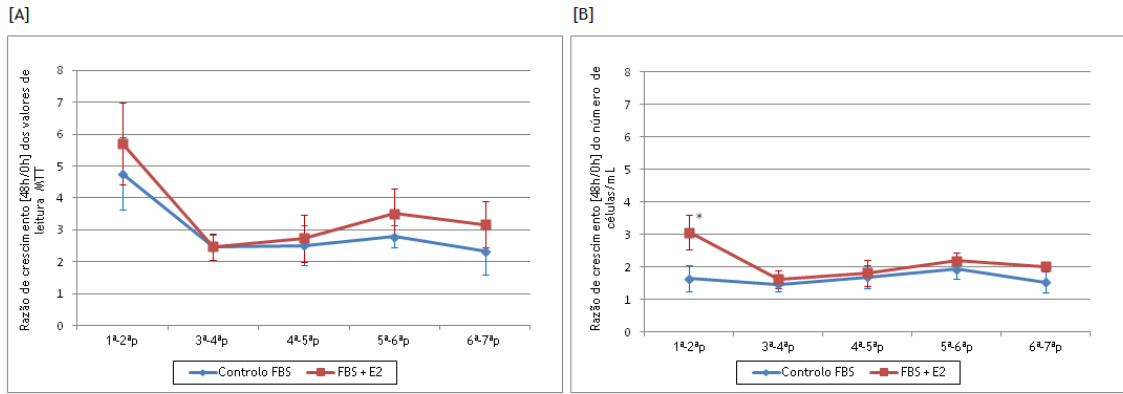


Figura 13 - Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Pelo valor do coeficiente de *Pearson* (tabela 3) verifica-se que, quando os fibroblastos foram expostos ao E2 por 48 horas em meio FBS, as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT e do número de células contabilizado se encontram fortemente associadas ($r=0,997$), e que a correlação entre os dois ensaios realizados foi significativa ($\alpha=0,05$; $gl=3$).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de *Pearson* r entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio FBS + E2, e as respectivas razões estatísticas. O t tabelado ($\alpha=0,05$; $gl=3$) é de 3,182.

Tempo de exposição ao E2	Valor r	t calculado
48 horas	0,997	3,835 ($\geq t$ tabelado)
96 horas	0,879	3,198 ($\geq t$ tabelado)
144 horas	0,675	1,586 ($< t$ tabelado)

Quando o período de exposição foi de 96 horas (figura 14) verificou-se que, em ambos os ensaios realizados, houve um aumento significativo ($P<0,05$) das razões de crescimento dos fibroblastos incubados em meio FBS + E2 relativamente ao controlo FBS, para todas as passagens testadas.

Através do coeficiente r ($r=0,879$) constata-se que, após 96 horas de exposição ao E2 em meio FBS, houve correspondência significativa ($\alpha=0,05$; $gl=3$) entre as razões de crescimento dos dois ensaios, e que esta correlação, embora elevada, foi inferior à verificada às 48 horas.

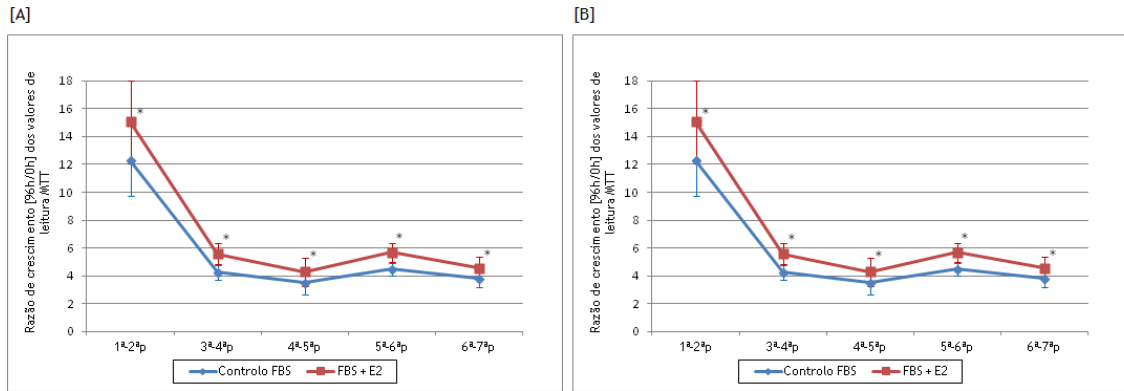


Figura 14 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Após 144 horas de incubação, como se pode observar pela figura 15, as passagens celulares testadas em meio FBS + E2 continuaram a mostrar uma proliferação significativa ($P < 0,05$) comparativamente ao meio controlo FBS, em ambos os ensaios efectuados. Na 6^a-7^a passagem apenas houve proliferação significativa ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento do número de células.

Por análise da tabela 3 verifica-se que o valor r ($r = 0,675$) não foi estatisticamente significativo (t calculado $< t$ tabelado). Como tal, após 144 horas de exposição ao E2 não existiu correspondência significativa, entre as razões de crescimento dos valores de leitura MTT e do número de células contabilizado.

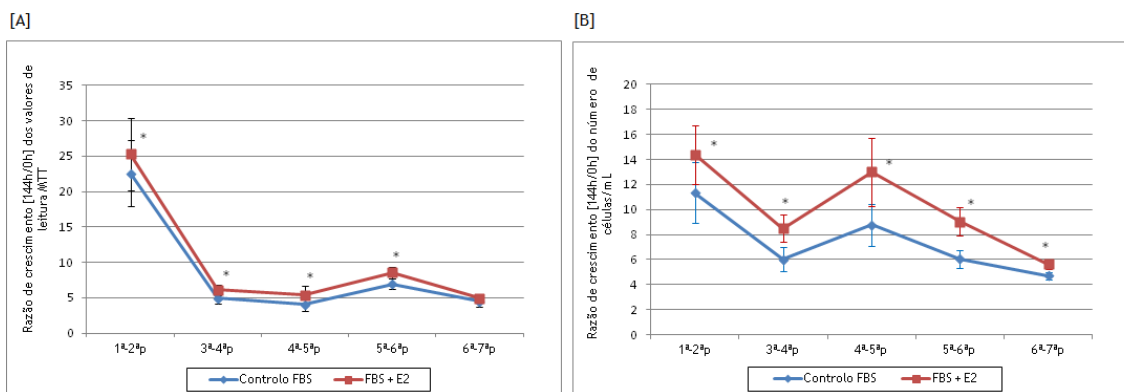


Figura 15 - Razões de crescimento [144h/0h] dos ensaios realizados em meio FBS.

Pelo que foi dado a analisar no ponto 2.1.1 pode afirmar-se que, as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT e do número de células contabilizado, nas culturas incubadas em meio FBS com E2 se encontram significativamente correlacionadas ($\alpha = 0,05$; $gl = 3$) após 48 e 96 horas. Além disto, pelos valores de r é visível que esta correlação foi maior entre os ensaios realizados às 48 horas.

Relativamente às culturas de fibroblastos, testadas após 144 horas de exposição ao E2, verificou-se que não existiu uma correlação significativa entre os dois ensaios efectuados. Esta falta de correspondência pode ser justificada, por um lado, pelo facto de no ensaio MTT terem sido alcançados valores de absorvência muito elevados, o que obrigou a diluir as amostras, aumentando deste modo o erro de leitura. E por outro lado, pelo facto de o número de células contabilizado estar associado a elevados desvios-padrão pois, com o aumento do número de células, aumenta também a susceptibilidade a erros técnicos de contagem. Adicionalmente, a falta de correlação entre os ensaios pode ser devida ao facto de as culturas mantidas nos pocetos por 144 horas, se encontrarem próximas da confluência. Dado a limitação do espaço disponível, o ciclo celular dos fibroblastos é alterado, a actividade metabólica diminui e, subsequentemente, a razão de crescimento do número de células contabilizado deixa de corresponder à actividade metabólica mitocondrial dos fibroblastos (Freshney, 2005; Berridge *et al.* 2005).

Por estas razões optou-se por não se incluir os gráficos relativos às 144 horas de incubação na sequência da apresentação dos resultados.

2.1.2 Na presença de meio de cultura sem FBS

As figuras 16 e 17 representam graficamente as razões de crescimento, após 48 horas ([48h/0h]) e 96 horas ([96h/0h]) dos valores de leitura de MTT [A] e do número de células contabilizado [B] das passagens celulares incubadas com E2 (sem FBS + E2) e em meio controlo (controlo sem FBS). Sempre que se verifica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento do meio sem FBS + E2 e do respectivo meio controlo, esta é assinalada graficamente por *.

Por observação da figura 16 constata-se que, às 48 horas de incubação, na 1^a-2^a passagem ocorreu um aumento significativo ($P < 0,05$) das razões de crescimento dos valores de leitura de MTT dos fibroblastos em meio sem FBS + E2 comparativamente ao controlo sem FBS. No entanto, nas restantes passagens celulares não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as razões de crescimento dos fibroblastos incubados em meio com E2 e as razões do meio controlo, independentemente do ensaio efectuado.

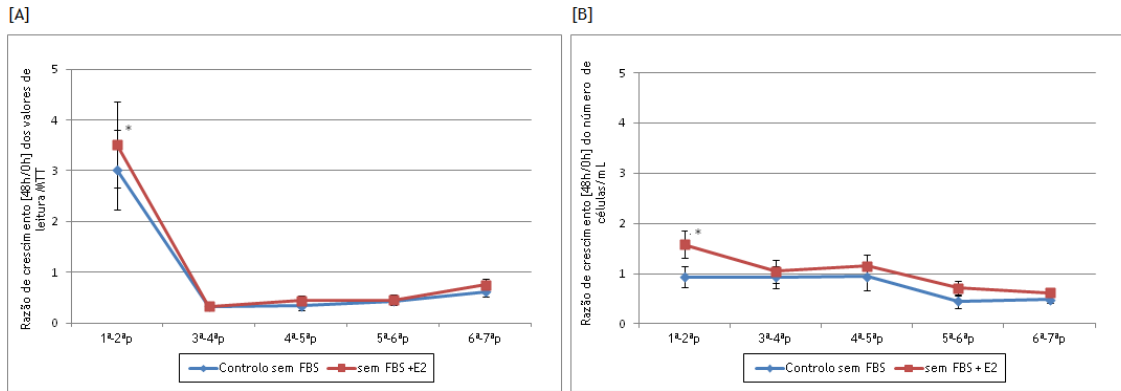


Figura 16- Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio sem FBS.

Relativamente à correspondência entre os dois ensaios, por análise da tabela 4 verifica-se que, nestas condições de cultura, não existiu uma correlação significativa entre as razões de crescimento dos valores de leitura MTT e do número de células contabilizado.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de *Pearson r* entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio sem FBS + E2, e as respectivas razões estatísticas. O *t* tabelado ($\alpha=0,05$; $gl=3$) é de 3,182.

Tempo de exposição ao E2	Valor <i>r</i>	<i>t</i> calculado
48 horas	0,759	2,019 (< <i>t</i> tabelado)
96 horas	0,582	1,242 (< <i>t</i> tabelado)

Quando o período de exposição foi de 96 horas (figura 17) constatou-se que, à excepção da 1ª-2ªp, não existiu diferença significativa entre as razões de crescimento dos fibroblastos incubados em meio sem FBS + E2 e em meio controlo sem FBS, tanto dos valores de leitura MTT como do número de células. Mais uma vez, a 1ª-2ª passagem foi excepção pois, como podemos ver pela figura 3.5 [B], a razão de crescimento do número de células em meio sem FBS + E2 foi significativamente superior ($P<0,05$) à razão do respectivo controlo sem FBS. Adicionalmente, pelo coeficiente *r* (tabela 4) verifica-se que também não existe correlação significativa (tabela 4) entre as razões de crescimento dos dois ensaios realizados após 96 horas.

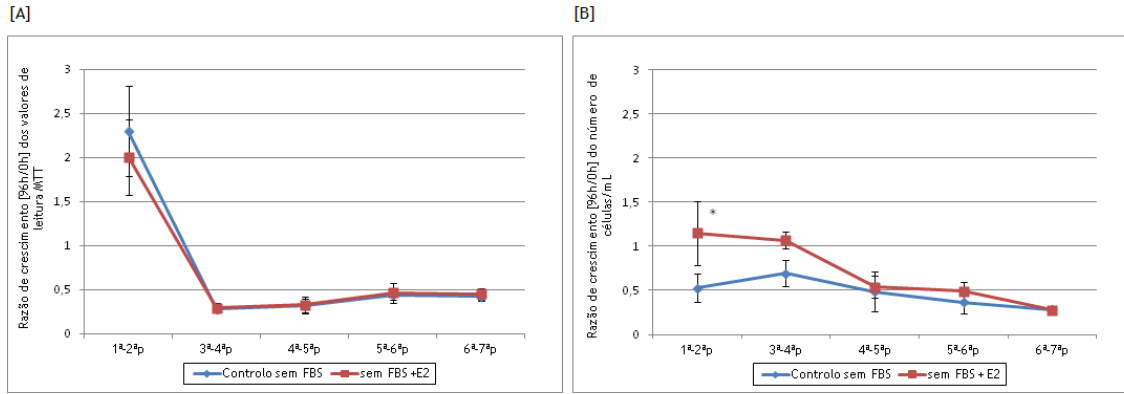


Figura 17 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio sem FBS.

Os resultados analisados no ponto 2.1.2 mostram que quando fibroblastos de diferentes passagens foram incubados com E2 em meio sem FBS, não se verificou haver uma correlação significativa entre as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT e do número de células contabilizado, independentemente do tempo de exposição ser de 48 ou 96 horas.

Esta falta de correlação deve-se, principalmente, ao facto da privação de soro tornar os fibroblastos quiescentes (Bettuzi *et al.*, 1999). Com efeito, neste estado os fibroblastos apresentam uma actividade metabólica reduzida, que se reflecte na diminuição da redução mitocondrial do MTT, mas não no número de células contabilizadas como viáveis no ensaio de exclusão *trypan blue* (Berridge *et al.*, 2005).

2.1.3 Na presença de meio de cultura com FBS tratado com carvão activado (meio CH)

As figuras 18 e 19 representam graficamente as razões de crescimento, após 48 horas ([48h/0h]) e 96 horas ([96h/0h]) dos valores de leitura de MTT [A] e do número de células contabilizado [B] das passagens celulares incubadas com E2 (CH + E2) e em meio controlo (controlo CH). Sempre que se verifica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento do meio CH + E2 e do respectivo meio controlo, esta é assinalada graficamente por *.

Como se pode observar pela figura 18 [A], após 48 horas de incubação não existiram diferenças significativas, entre as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT dos fibroblastos incubados em meio CH + E2 e em meio controlo CH, em nenhuma das passagens estudadas. Todavia, pela figura 18 [B] verifica-se que, para a 1^a-2^ap, 5^a-6^ap e 6^a-7^ap, as razões de crescimento do número de células em meio CH + E2 foram significativamente superiores ($P < 0,05$) às razões dos respectivos controlos CH.

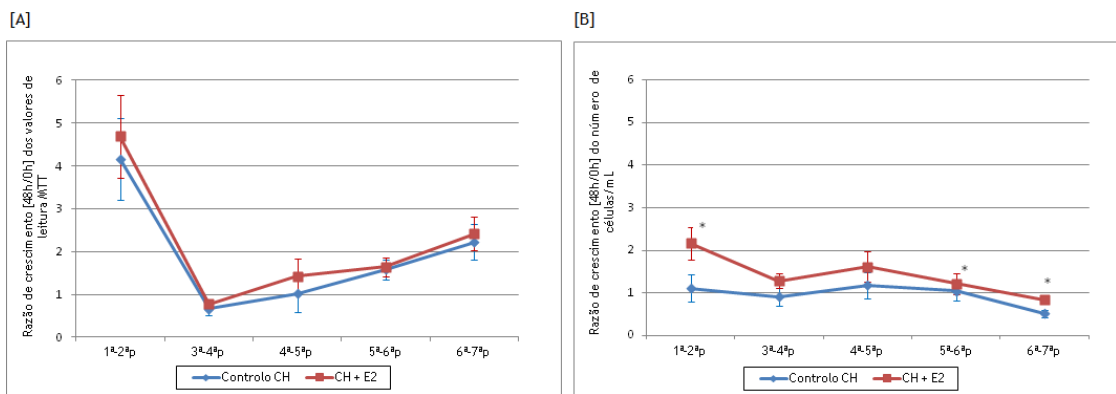


Figura 18 - Razões de crescimento [48h/0h] dos ensaios realizados em meio CH.

A aparente falta de correspondência que é visível na figura 18 confirma-se através da análise da tabela 5, segundo a qual não existe correlação significativa entre as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT e do número de células contabilizado, após 48 horas de exposição ao E2.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de *Pearson r* entre as razões de crescimento dos valores de MTT e do número de células contabilizado em meio CH + E2, e as respectivas razões estatísticas. O *t* tabelado ($\alpha=0,05$; $gl=3$) é de 3,182.

Tempo de exposição ao E2	Valor <i>r</i>	<i>t</i> calculado
48 horas	0,630	0,397 (< <i>t</i> tabelado)
96 horas	0,906	3,68 (\geq <i>t</i> tabelado)

Quando o período de incubação foi de 96 horas, a figura 19 [A] mostra que para a 1^a-2^ap, 3^a-4^ap e 6^a-7^ap as razões de crescimento dos valores de leitura MTT foram significativamente superiores ($P<0,05$) às razões do controlo CH. Porém através da figura 19 [B], relativa ao número de células contabilizado, é visível que somente na 1^a-2^ap e 4^a-5^ap as razões de crescimento do número de células em meio CH + E2 foram significativamente superiores ($P<0,05$) às razões do controlo CH.

Ainda assim, o coeficiente *Pearson* (tabela 5) diz-nos que, após 96 horas, as razões de crescimento dos valores de leitura MTT e do número de células contabilizado se encontram significativamente relacionados.

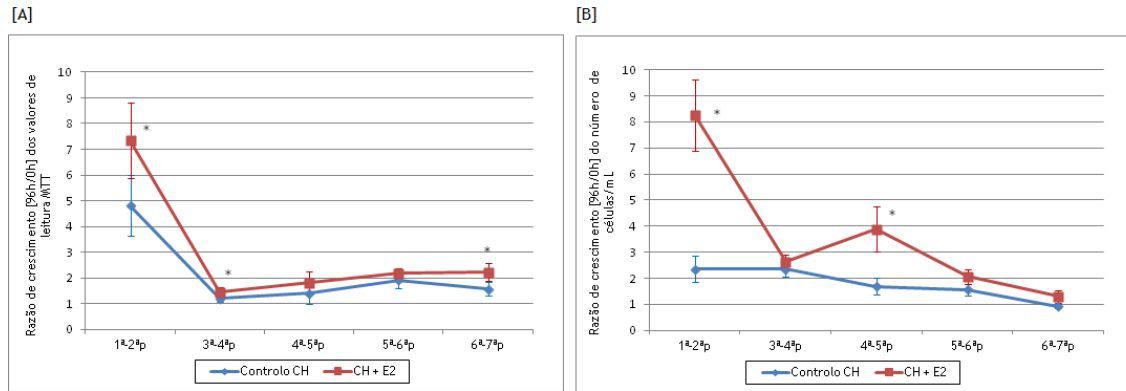


Figura 19 - Razões de crescimento [96h/0h] dos ensaios realizados em meio CH.

Para a discussão dos resultados apresentados no ponto 2.1.3, note-se que já se encontra descrito que o tratamento do FBS com carvão activado, realizado com intuito de remover os esteróides presentes no FBS, não é um processo selectivo e que remove, igualmente, outros componentes necessários ao crescimento normal das células *in vitro* (Esfahani *et al.*, 2010).

Efectivamente a ausência de correspondência entre as razões dos valores de leitura MTT e do número de células contabilizado às 48 horas, pode ser justificada pela privação de factores de crescimento (Esfahani *et al.*, 2010), que se reflecte no metabolismo dos fibroblastos, mas não no número de células contabilizado. Embora, também não se possa por de parte a hipótese de erro técnico associado à contagem do número de células.

A existência de correlação às 96 horas poderia fazer-nos supor que, após este período de exposição, o efeito da presença de E2 poderia ser superior à privação de alguns factores de crescimento removidos pelo carvão activado. Todavia, uma vez que não existe bibliografia que suporte esta hipótese, e dado a grande variabilidade entre as respostas das culturas incubadas neste meio, a existência de correlação não parece ter significado.

Adicionalmente é importante notar, que após análise dos resultados de 2.1.2, 2.1.2 e 2.1.3 se verificou que os fibroblastos da 1ª-2ª passagem apresentaram razões de crescimento, que foram sempre superiores à das restantes passagens, em todos os meios e períodos de incubação testados.

Na verdade, a primeira experiência foi iniciada (tempo 0 horas) com um número de células inferior às restantes experiências. E dado que, as condições de cultura foram idênticas para todas as passagens, supõe-se que a superioridade das razões de crescimento nesta passagem tenha sido consequência da acção do E2 sobre um menor número de células num maior espaço de cultura disponível.

3. Reprodutibilidade dos estudos de resposta ao 17 β -estradiol entre diferentes passagens celulares

Nos trabalhos de investigação que utilizam células em cultura como modelo de estudo é, geralmente, referido o intervalo de passagens nas quais são realizados os ensaios. Este intervalo é muito variável entre os estudos publicados, por exemplo Liu *et al.* referem usar fibroblastos entre a segunda e a quarta passagem (Liu *et al.*, 2006), Ostad *et al.* entre a terceira e a décima passagem (Ostad *et al.*, 2006) e Yilmaz *et al.* entre a terceira e a quinta passagem (Yilmaz *et al.*, 2006).

Por norma, quando o objectivo dos trabalhos não passa pelo estudo dos fenómenos de senescência celular são, preferencialmente, utilizadas as primeiras passagens das linhas celulares em questão, se estas forem comerciais, porém não é dada relevância à amplitude do intervalo de passagens testadas.

No sentido de se averiguar a reprodutibilidade entre a resposta de diferentes passagens ao E2, quando estas foram testadas pelo mesmo ensaio e nas mesmas condições de cultura, foi aplicado o teste de *t-student*. Note-se que, apenas vão ser considerados os resultados após 48 e 96 horas de exposição ao E2, no intervalo de passagem que vai da 3^a-4^apassagem à 6^a-7^apassagem.

3.1 Reprodutibilidade após 48 horas de exposição ao E2

Através dos gráficos 3, 4 e 5 podemos observar as razões de crescimento [48h/0h] dos fibroblastos das diferentes passagens incubadas com E2 por 48 horas, nos meios de cultura indicados.

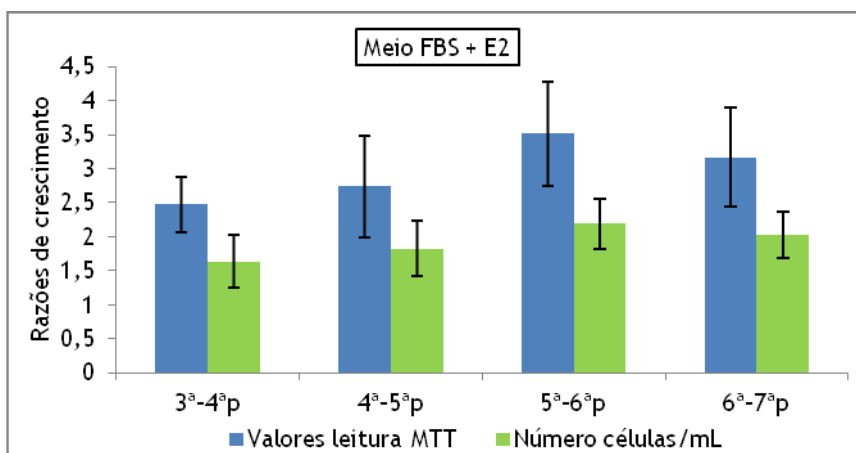


Gráfico 3 - Razões de aumento [48h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio FBS + E2.

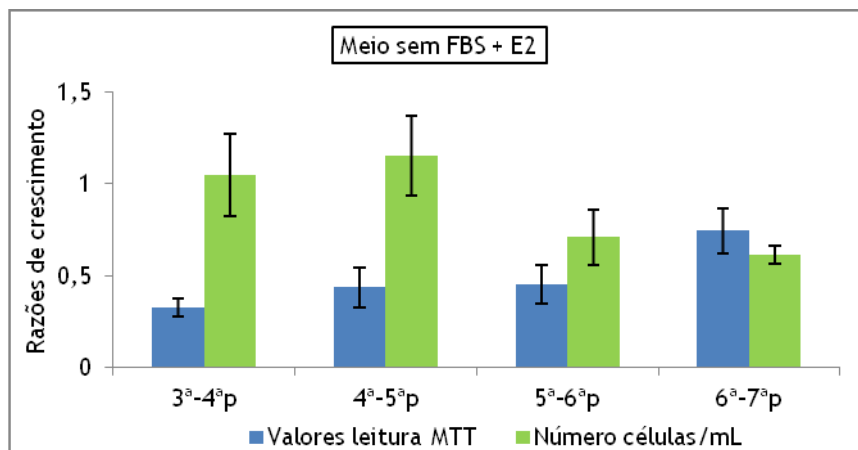


Gráfico 4 - Razões de aumento [48h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio sem FBS + E2.

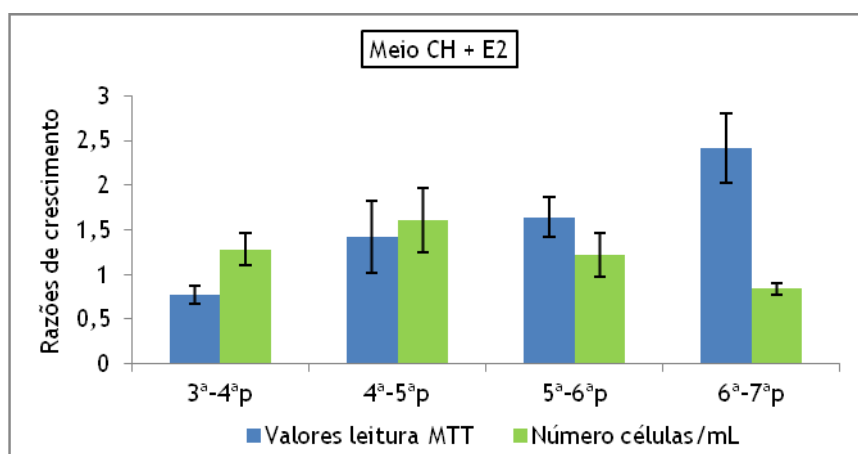


Gráfico 5 - Razões de aumento [48h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio CH + E2.

Após ter sido efectuada a comparação estatística entre as razões de aumento dos valores de leitura de MTT, e entre as razões de crescimento do número de células contabilizado das quatro passagens celulares, verificou-se que, quando os fibroblastos foram incubados em meio FBS + E2 (gráfico 10) não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT das diferentes passagens. Igualmente, não foram verificadas diferenças significativas entre as razões de crescimento do número de células contabilizado.

Quando foram comparadas as razões de crescimento das passagens incubadas em meio sem FBS + E2 (gráfico 11), constatou-se que nestas condições existiram diferenças significativas ($P < 0,05$), tanto entre as razões de crescimento dos valores de leitura de MTT, como entre as razões de crescimento do número de células contabilizado nas diferentes passagens.

Por fim, quando foram comparadas as razões de crescimento das passagens celulares incubadas em meio CH + E2 (gráfico 12), também se verificou que existiram variações

significativas ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento dos valores de MTT e entre as razões de crescimento do número de células das quatro passagens estudadas.

Portanto, após 48 horas de exposição ao E2, somente se verificou reprodutibilidade entre a resposta dos fibroblastos de quatro passagens celulares contíguas, quando estes foram incubados em meio de cultura suplementado com FBS.

3.2 Reprodutibilidade após 96 horas de exposição ao E2

Os gráficos que se seguem dizem respeito às razões de crescimento [96h/0h] dos fibroblastos das diferentes passagens incubadas com E2 por 96 horas, nos meios de cultura indicados.

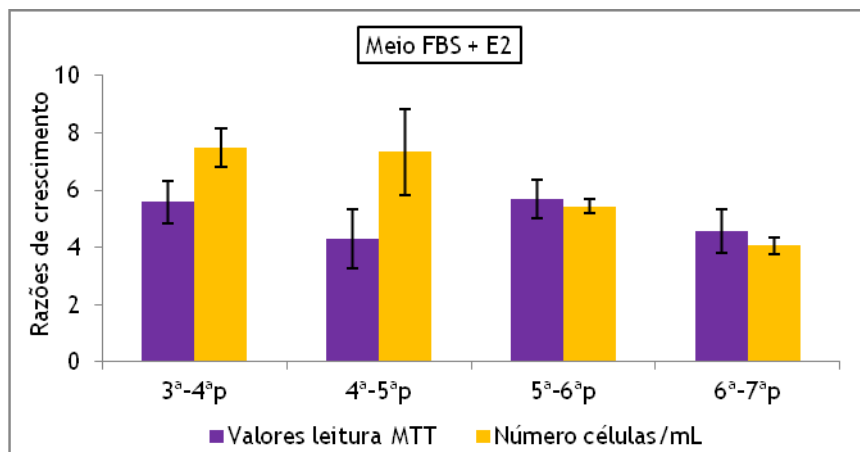


Gráfico 6 - Razões de aumento [96h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio FBS + E2.

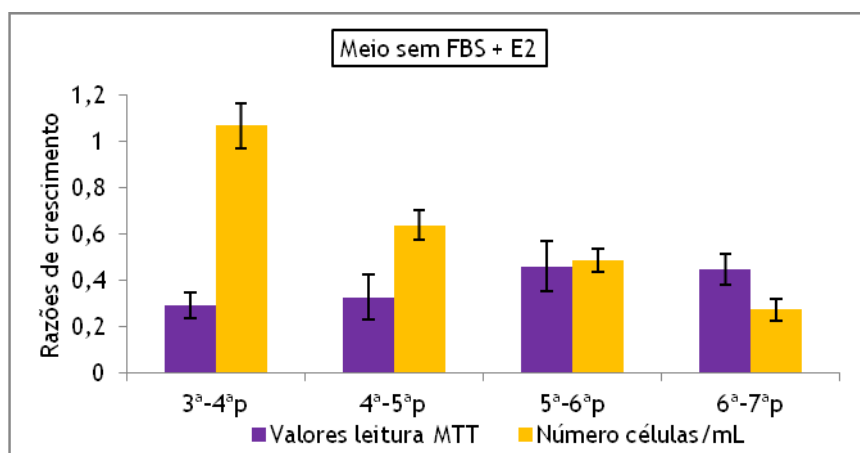


Gráfico 7 - Razões de aumento [96h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio sem FBS + E2.

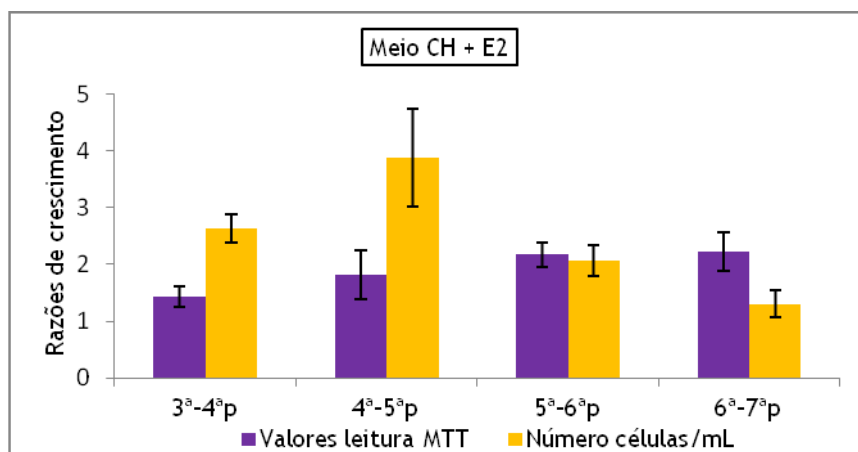


Gráfico 8 - Razões de aumento [96h/0h] dos valores de leitura MTT e do crescimento do número de células contabilizado, em meio CH + E2.

Quando o período de exposição à hormona aumentou para 96 horas, por comparação das razões de crescimento constatou-se que, nas passagens celulares incubadas em meio FBS + E2 (gráfico 6) existiram diferenças significativas ($P < 0,05$) tanto entre as razões de crescimento dos valores de leitura MTT, como entre as razões de crescimento do número de células. Portanto, com o aumento do tempo de incubação de 48 para 96 horas deixou de haver reprodutibilidade entre as quatro passagens testadas em meio FBS + E2.

Relativamente às passagens celulares incubadas em meio sem FBS + E2 (gráfico 7) e em meio CH + E2 (gráfico 8), quando o período de incubação foi de 96 horas, continuou a verificar-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as razões de crescimento das diferentes passagens. Ou seja, nestes meios de cultura também não existiu reprodutibilidade entre os ensaios realizados nas diferentes passagens.

Note-se ainda, que após 96 horas de incubação em meio sem FBS + E2, o decréscimo das razões de crescimento do número de células contabilizado com a passagem celular, visível no gráfico 7, foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$). Quer isto dizer que, a razão de crescimento da 3ª-4ªp foi significativamente superior ($P < 0,05$) à razão da 4ª-5ªp, que por sua vez foi significativamente superior ($P < 0,05$) à razão da 5ª-6ªp, que foi significativamente superior ($P < 0,05$) à razão da 6ª-7ªp.

Esta observação juntamente com o facto de, nos outros dois meios de cultura, a razão de crescimento do número de células contabilizado na primeira passagem testada também ter sido significativamente superior ($P < 0,05$) à razão da última passagem testada, faz-nos levantar a hipótese que ao longo do tempo de cultura, as passagens reflectem uma alteração celular, eventualmente associada a processos de senescência.

Com efeito, a diminuição do potencial proliferativo dos fibroblastos em cultura pode ser explicado pelo desenvolvimento de fenótipo senescente prematuro, induzido por várias condições inerentes à própria cultura (Phipps *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2010). Relativamente a este assunto, um estudo realizado por Boyle *et al.* em fibroblastos da derme humana, demonstrou que a presença de soro no meio de cultura pode ajudar a prevenir, a senescência induzida por radiação UV. Estes investigadores demonstraram que, na presença de soro, os sistemas de reparação de ADN dos fibroblastos parecem ser mais eficientes do quando na ausência de soro (Boyle *et al.*, 2005).

Por outro lado, não se sabe ao certo o verdadeiro número de subculturas que as células já tinham sofrido previamente à realização deste trabalho, pelo que também podem estar envolvidos outros mecanismos de senescência celular (Kuilman *et al.*, 2010).

Pelo que foi dado a analisar no ponto 3 pode afirmar-se que, somente se verificou reprodutibilidade entre as razões de crescimento das quatro passagens celulares expostas ao E2, quando estas foram incubadas em meio FBS por 48 horas. Ou seja, apenas nestas condições a resposta dos fibroblastos a uma mesma concentração de E2 foi igual entre as passagens do intervalo estudado. Portanto, a reprodutibilidade entre a resposta de quatro passagens celulares parece depender das condições de cultura, nomeadamente da suplementação do meio de cultura e do tempo de incubação.

Embora neste trabalho se tenha verificado, que não existiram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as respostas ao E2 de quatro passagens celulares diferentes, mantidas em meio de cultura com FBS, esta não é uma prática muito concensual entre os investigadores.

Na verdade, já há muito que se encontra descrita a influência das hormonas esteróides, naturalmente presentes no FBS, nos resultados de estudos que envolvam os efeitos de hormonas sobre células em cultura (Milo *et al.*, 1976; Ruedl *et al.*, 1990; Germain and Harbrioux 1993;). Por outro lado, é bem conhecida a variabilidade qualitativa e quantitativa existente entre lotes de FBS, o que pode comprometer a reprodutibilidade dos estudos (van der Valk *et al.*, 2004).

Por estes motivos, e na tentativa de determinar os efeitos de uma concentração exacta de E2 sobre o crescimento celular, também se encontram descritas metodologias nas quais os fibroblastos são incubados em meio sem FBS por algum tempo, para eliminar os efeitos do soro e, posteriormente, são incubados com E2 em meio suplementado com FBS tratado com carvão activado (Liu *et al.*, 2005). Todavia, segundo um estudo publicado em 2010, dado que o tratamento do FBS com carvão activado não remove apenas as hormonas esteróides, mas também outros componentes essenciais ao crescimento *in vitro* das células, e que a constituição do soro de origem fetal é significativamente diferente da constituição do soro humano, nenhuma destas condições representa o impacto das hormonas no corpo humano. (Esfahani *et al.*, 2010).

Nesta linha de pensamento, e tendo em conta a variabilidade entre passagens e a consequente inexistência de reprodutibilidade verificada nos meios CH e sem FBS, parece-nos que, se for garantida a suplementação do meio de cultura com FBS de um mesmo lote, e se os estudos de viabilidade celular forem realizados num intervalo de quatro passagens celulares contíguas é possível reduzir a variabilidade dos resultados entre passagens, o que se encontra de acordo com a metodologia utilizada por Ostad *et al.* (Ostad *et al.*, 2006).

4. Sensibilidade dos fibroblastos ao 17 β -estradiol

Como foi evidenciado pelas figuras 13, 16 e 18, quando o ensaio MTT e a contagem de células foram efectuadas após 48 horas de incubação, com uma ou outra excepção, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre a resposta dos fibroblastos incubados em meio controlo e em meio com E2. Estes resultados indicam que a exposição dos fibroblastos por 48 horas a 40nM de E2, não teve efeito significativo na proliferação destas células, independentemente do meio de cultura utilizado.

Quando o período de exposição ao E2 aumentou para 96 horas, nos ensaios realizados em meio com FBS (figura 14) constatou-se que, para todas as passagens estudadas, as razões de crescimento do meio FBS + E2 foram significativamente superiores ($P < 0,05$) às razões de crescimento do meio controlo FBS, nos dois ensaios realizados. Por outras palavras, após 96 horas de incubação, os fibroblastos em meio FBS mostraram uma proliferação significativa ($P < 0,05$) na presença de 40 nM E2.

Relativamente aos ensaios realizados em meio sem FBS (figura 17), à semelhança do que se verificou às 48 horas, continuou a não existir diferenças significativas entre as razões de crescimento na presença de E2 e as razões de crescimento do meio controlo. Como tal, constata-se que os fibroblastos incubados em meio sem FBS não demonstraram uma resposta significativa ao E2, independentemente do período de exposição.

No caso dos ensaios realizados em meio CH (figura 19), verificou-se que, em algumas passagens, existiram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o meio controlo e o meio com E2. Todavia, exceptuando a 1^a-2^a passagem, é visível que as passagens que apresentaram diferenças significativas no ensaio MTT (1^a-2^ap, 3^a-4^ap e 6^a-7^ap) não foram as mesmas que no ensaio de exclusão *trypan blue* (1^a-2^ap e 4^a-5^ap). Estes resultados corroboram com a grande variabilidade entre a resposta das diferentes passagens incubadas neste meio.

Portanto, pelos resultados analisados anteriormente, verificamos que a resposta dos fibroblastos ao E2 é dependente do meio de cultura utilizado e do tempo de incubação.

Relativamente à influência exercida pelo meio de cultura, foi visível que o efeito da privação de soro impediu a resposta ao E2 e que, por isso, não se verificaram diferenças significativas entre a resposta dos fibroblastos na presença e ausência de hormona.

Quanto às culturas incubadas em meio CH, embora em algumas passagens se tenha verificado proliferação significativa ($P < 0,05$) em resposta ao E2, os resultados não foram reprodutíveis no intervalo de passagens estudado.

Por outro lado, todas as passagens incubadas com E2 em meio FBS demonstraram uma proliferação significativa ($P < 0,05$) após 96 horas de incubação. Todavia, pelo conhecimento do tempo de ciclo celular dos fibroblastos da derme humana seria de esperar que os efeitos decorrentes da presença do 40 nM de E2 fossem observados logo após 48 horas de exposição (Betuzzi *et al.*, 1999).

Ora, como foi referido anteriormente, não se sabe ao certo o verdadeiro número de subculturas que as células já tinham sofrido previamente à realização deste trabalho. Como tal, o facto de a resposta ao E2 apenas ter sido significativa após 96 horas poderá estar, eventualmente, associado à alteração de resposta que caracteriza o fenótipo senescente (Phipps *et al.*, 2007).

Por outro lado, observamos que a primeira experiência realizada (1^a-2^ap), devido a erro técnico de contagem, foi iniciada com um número de células inicial (valor absoluto às 0 horas) inferior ao das posteriores experiências e que, provavelmente, por este motivo apresentaram razões de crescimento, nas diferentes condições de culturas, que foram superiores às razões de crescimento das posteriores passagens. Além disto, em algumas condições esta passagem mostrou uma proliferação significativa ($P < 0,05$) na presença de E2, logo às 48 horas. Por isto, pensa-se que o maior número de células inicial das restantes passagens pode, também, ter sido um factor limitante da proliferação.

5. Limitações do estudo

Existem algumas limitações inerentes aos estudos de envelhecimento realizados *in vitro*. Na verdade, estes estudos são bastante morosos e não podem ser repetidos, a não ser que a cada subcultura sejam armazenadas em azoto líquido alíquotas correspondentes às passagens celulares testadas. Ainda assim, terá sempre de se ter em conta o stress provocado pelos processos de congelamento, descongelamento e tripsinização associada.

Conclusões

Através do estudo da resposta de culturas de fibroblastos NHDF ao 17 β -estradiol pode concluir-se o seguinte:

- A reprodutibilidade entre a resposta de quatro passagens celulares contíguas de NHDF apenas foi verificada, quando as culturas foram incubadas em meio suplementado com FBS e expostas ao E2 por 48 horas.
- A relação entre os valores de absorvência de MTT e número de células contabilizado só foi assegurada quando os fibroblastos foram incubados em meio suplementado com FBS nos períodos de 48 e 96 horas.
- A resposta dos fibroblastos ao E2 somente se mostrou significativa após 96 horas de incubação em meio suplementado com FBS.

Protocolo ideal

As condições experimentais ideais para a utilização dos fibroblastos NHDF em cultura, como modelo de estudo da resposta a estrogénios devem respeitar os seguintes parâmetros:

- ✓ De forma a garantir a reprodutibilidade dos ensaios, assim como a correspondência entre valores de absorvência de MTT e número de células, as culturas devem ser sempre incubadas em meio suplementado com FBS.
- ✓ Uma vez que para além da reprodutibilidade, a sensibilidade aos estrogénios também é um factor fundamental, deve ser estabelecido um equilíbrio entre a reprodutibilidade e a sensibilidade. Para tal, se o tempo de incubação escolhido for de 96 horas a falta de reprodutibilidade deve ser compensada com a realização de um maior número de estudos. Por outro lado, se os ensaios forem iniciados com um menor número de células pode conseguir-se um aumento de sensibilidade às 48 horas, garantindo-se assim a reprodutibilidade.
- ✓ De forma a reduzir a variabilidade entre a resposta de diferentes passagens o ideal seria que todas as experiências de um mesmo ensaio fossem realizadas na mesma passagem celular.

Bibliografía

- Acconcia F, Marino M. The Effects of 17 β -estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Frontiers in physiology*. 2011; 2:30.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005; 11:127-52.
- Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrard M, Corti A. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS letters*. 1999 Mar 5; 446(1):18-22
- Boyle J, Kill IR, Parris CN. Heterogeneity of dimer excision in young and senescent human dermal fibroblasts. *Aging cell*. 2005 Oct; 4(5):247-55.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007 May; 72(5):381-405.
- Carrascal E. *Histología Humana I: Citología, Embriología e Histología general*. Salamanca: Librería Cervantes; 2001. Capítulo 32, El tejido conectivo II. Células: Tipos. El fibroblasto; p.301-305
- Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2010 May 27; 365(1546):1517-35.
- Castor CW, Prince RK, Dorstewitz EL. Characteristics of human "fibroblasts" cultivated in vitro from different anatomical sites. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1962 Sep; 11:703-13.
- Cepa M, Correia-da-Silva G, da Silva EJ, Roleira FM, Borges M, Teixeira NA. New steroidal aromatase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. *BMC cell biology*. 2008 Jul 24; 9:41.
- Chandrasena RE, Edirisinghe PD, Bolton JL, Thatcher GR. Problematic detoxification of estrogen quinones by NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferase. *Chemical research in toxicology*. 2008 Jul; 21(7):1324-9.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct 1; 99(20):12877-12882
- Chang KC, Wang Y, Oh IG, Jenkins S, Freedman LP, Thompson CC, Chung JH, Nagpal S. Estrogen receptor beta is a novel therapeutic target for photoaging. *Molecular pharmacology*. 2010 May; 77(5):744-50.
- Cho HR, Ryou JH, Lee JW, Lee MH. The effects of placental extract on fibroblast proliferation. *Journal of cosmetic science*. 2008 May-Jun; 59(3):195-202.
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Ageing research reviews*. 2004 Oct-Nov; 125(10-11):827-48.

- Cruz M, Enes M, Pereira M, Dourado M, Sarmiento Ribeiro AB. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. *Revista portuguesa de pneumologia*. 2009 Jul-Aug; 15(4):669-82.
- Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International review of cell and molecular biology*. 2007;257:143-79.
- Das M, Dempsey EC, Reeves JT, Stenmark KR. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2002 May; 282(5):L976-86.
- DiSilvio L, Jameson J, Gamie Z, Giannoudis PV, Tsiridis E. In vitro evaluation of the direct effect of estradiol on human osteoblasts (HOB) and human mesenchymal stem cells (h- MSCs). *Injury*. 2006 Sep; 37 Suppl 3:S33-42.
- Doljanski F. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. *Perspectives in biology and medicine*. 2004; 47(3):339-56
- Esfahani A, Kendall CW, Bashyam B, Archer MC, Jenkins DJ. The effect of physiological concentrations of sex hormones, insulin, and glucagon on growth of breast and prostate cells supplemented with unmodified human serum. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 2010 Dec; 46(10):856-62.
- Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010 Oct; 122(1-3):74-81.
- Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *Journal of cellular physiology*. 2010 Aug; 224(2):305-10.
- Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2005. Chapter 9, 10, 13, 21 e 22.
- Germain P, Harbrioux G. Modulation of the estradiol-17 beta mitogenic effect on human breast cancer MCF-7 cells by serum albumin in defined medium. *Anticancer research*. 1993 Sep-Oct; 13(5A):1581-5.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986 Mar 7; 231 (4742):1150-1154
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*. 2002 Jan 31; 346(5): 340-352.
- Haczynski J, Tarkowski R, Jarzabek K, Slomczynska M, Wolczynski S, Magoffin DA, Jakowicki JA, Jakimiuk AJ. Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor alpha and beta. *International journal of molecular medicine*. 2002 Aug; 10(2):149-53.
- Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005 Oct; 53(4):555-68.

- Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. 2004 Mar; 150(3):243-55.
- Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science*. 1979 May 4; 204(4392):526-7.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961 Dec; 25:585-621.
- Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cellular and molecular life sciences*. 2009 Aug; 66(15):2503-24.
- Jaszczyszyn A, Gasiorowski K. Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing. *Advances in clinical and experimental medicine*. 2008; 17(5): 525-529
- Johnson JR, Lacey JV, Lazovich D, Geller MA, Schairer C, Schatzkin A, Flood A. Menopausal hormone therapy and risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009 Jan; 18(1):196-203.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology: EJD*. 2002 Jul-Aug; 12(4):390-9.
- Keung W, Chan ML, Ho EY, Vanhoutte PM, Man RY. Non-genomic activation of adenylyl cyclase and protein kinase G by 17 β -estradiol in vascular smooth muscle of the rat superior mesenteric artery. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2011 Nov; 64(5):509-16.
- Koumas L, Smith TJ, Phipps RP. Fibroblast subsets in the human orbit: Thy-1+ and Thy-1- subpopulations exhibit distinct phenotypes. *European journal of immunology*. 2002 Feb; 32(2):477-85.
- Krasna M, Domanović D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*. 2007 Sep; 16(3):105-10.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes & development*. 2010 Nov 15; 24(22):2463-79.
- Liu YM, Choy KW, Lui WT, Pang MW, Wong YF, Yip SK. 17 β -estradiol suppresses proliferation of fibroblasts derived from cardinal ligaments in patients with or without pelvic organ prolapse. *Human reproduction*. 2006 Jan; 21(1):303-8
- Mammone T, Gan D, Foyouzi-Youssefi R. Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell biology international*. 2006 Nov; 30(11):903-9.
- Meyer MR, Barton M. ER α , ER β , and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2009; 83(4):605-610.
- Millas I, Liquidato BM. Estrogen receptors alpha and beta in non-target organs for hormone action: review of the literature. *Brazilian journal of morphological sciences*. 2009; 26: 193-197

- Milo GE, Malarkey WB, Powell JE, Blakeslee JR, Yohn DS. Effects of steroid hormones in fetal bovine serum on plating and cloning of human cells in vitro. *In vitro*. 1976 Jan; 12(1):23-30.
- Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One*. 2008; 3 (12):e4066. Epub 2008 Dec 30
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16; 65(1-2):55-63.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation of European Biochemical Societies*. 1996 Aug 19; 392(1):49-53.
- Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CC. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *International review of cell and molecular biology*. 2011 Aug 24; 22(20):3791-3800.
- Osborne CK Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005 Mar 10; 23(8):1616-22.
- Ostad S. N., Motahary P., Beshkar M., Ghahremani M.H. 17 β -estradiol and progesterone upregulate cyclooxygenase-2 expression in the human gingival fibroblasts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 14(4) : 190-196
- Owen AJ, Roach PD, Abbey M. Regulation of low-density lipoprotein receptor activity by estrogens and phytoestrogens in a HepG2 cell model. *Annals of nutrition & metabolism*. 2004; 48(4):269-75.
- Parl FF, Egan KM, Li C, Croke PS. Estrogen exposure, metabolism, and enzyme variants in a model for breast cancer risk prediction. *Cancer informatics*. 2009 May 5; 7:109-21.
- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 2004 Dec; 25(6):947-70.
- Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004 Apr; 50(1):3-22.
- Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO. Aging cell culture: methods and observations. *Methods in molecular biology*. 2007; 371:9-19.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual review of physiology*. 2008; 70:165-90.
- Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011 Aug 16. doi: 10.1038/nrendo.2011.122. [Epub ahead of print]

- Rattan SIS. Aging of skin cells in vitro. In: Farage MA, Maibach HI, Howard I and Miller KW, editors. Textbook of Aging Skin. pp. 487-492, 2009, Springer, New York, 2010.
- Richardson TE, Yang SH, Wen Y, Simpkins JW. Estrogen protection in Friedreich's ataxia skin fibroblasts. *Endocrinology*. 2011 Jul; 152(7):2742-9. [Abstract]
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*. 2008 Oct; 73(9-10):874-9.
- Ruedl C, Cappelletti V, Coradini D, Granata G, Di Fronzo G. Influence of culture conditions on the estrogenic cell growth stimulation of human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1990 Oct; 37(2):195-200.
- Ryan J. Introduction to animal cell culture. Technical bulletin. Corning life sciences. 2008 [Online] [Citação: 2 Setembro de 2011.] http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf
- Simpson ER, Davis SR. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology*. 2001 Nov; 142(11):4589-94.
- Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine reviews*. 2000 Oct; 21(5):457-87
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell and tissue research*. 2007 Mar; 327(3):499-510.
- Sorrell JM, Caplan AL. Fibroblasts - a diverse population at the center of it all. *International review of cell and molecular biology*. 2009; 276:161-241
- Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. In: Bonifacino JS et al, editors. *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998 , pp. 2.1.1-2.1.12.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer letters*. 2005 Sep 28; 227(2): 115-24
- Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British journal of cancer*. 1987 Sep; 56(3):279-85.
- van Beurden HE, Snoek PA, Von den Hoff JW, Torensma R, Kuijpers-Jagtman AM. Fibroblast subpopulations in intra-oral wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2003 Jan-Feb; 11(1):55-63.
- van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. 2004 Feb; 18(1):1-12.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular medicine*. 2004; 88:165-9.

- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*. 1991 May 15; 51(10):2515-20.
- Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1994 (5): 154-159.
- Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PloS one*. 2010 Apr 16; 5(4):e10202.
- Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology*. 2007 May; 127(5):998-1008.
- Yilmaz B, Avcı ÇB, Gündüz C. Effect of heparin on human skin fibroblasts proliferation in vitro. *Ege Tip Dergisi*. 2006; 45(3): 175-178
- Zouboulis CC. The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones: international journal of endocrinology and metabolism*. 2004 Jan-Mar; 3(1):9-26
- Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Hormone and metabolic research. Horm Metab Res*. 2007 Feb; 39(2):85-95.

Anexo

Tabela 6 - Valores de t aos Níveis de significância de 0,05 e 0,01.

gl	0,05	0,01
1	12,706	63,657
2	4,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
11	2,201	3,106
12	2,179	3,055
13	2,160	3,012
14	2,145	2,977
15	2,131	2,947
16	2,120	2,921
17	2,110	2,898
18	2,101	2,878
19	2,093	2,861
20	2,086	2,845
120	1,980	2,617
∞	1,960	2,576

