



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**O impacto do zinco no processo de cicatrização e
envelhecimento da pele**

Andreea Cociorva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora
Deborah Mary Power e sob a coorientação da Professora Doutora
Rute Castelo Félix

2024



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**O impacto do zinco no processo de cicatrização e
envelhecimento da pele**

Andreea Cociorva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora
Deborah Power e sob a coorientação da Professora Doutora Rute
Félix

2024

O impacto do zinco no processo de cicatrização e envelhecimento da pele

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências bibliográficas apresentada.

Universidade do Algarve, fevereiro de 2024

(Andreea Cociorva)

© Copyright: Andreea Cociorva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Science is not limited to laboratories and equations; it is a way of seeing and understanding the world, and its wonders are accessible to all."

- Rachel Carson

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."

— Marie Curie

Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado contou com incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata. As contribuições de diversas pessoas, cada uma à sua maneira, foram essenciais para tornar este projeto possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha estimada orientadora, a Professora Doutora Deborah Power, pela oportunidade única que me concedeu ao liderar este projeto, pelo seu apoio e disponibilidade contínua. A sua confiança, opiniões construtivas, bem como a colaboração na resolução de problemas que surgiram ao longo deste trabalho, tornaram esta jornada de pesquisa ainda mais marcante. Agradeço também pela abordagem direta, precisa e científica com que conduziu todas as nossas reuniões, o que facilitou significativamente o processo de orientação e contribuiu para um ambiente de eficiente e produtivo.

Agradeço, de igual forma, à Professora Doutora Rute Félix por me acolher no seu grupo de investigação, por me ter ensinado todos os procedimentos, pela paciência demonstrada ao responder às minhas dúvidas, e pela orientação que contribuiu significativamente para o aprimoramento do meu trabalho. O meu reconhecimento especial vai para a sua capacidade constante de manter o ânimo e impedir que a desmotivação se instalasse, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente à Aliana Vairinhos, pela troca de impressões, relativamente aos ensaios, que me foram extremamente valiosas. Além disso, agradeço pela motivação e apoio com que me auxiliou ao longo do desenvolvimento do meu trabalho laboratorial.

A todos os docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, pelos conhecimentos e competências que transmitiram ao longo destes cinco anos, que foram, sem dúvida, fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa.

À Ana Catarina, Beatriz Barreto, Inês Costa, Laura Veríssimo, Rafaela Ribeiro e Rita Santos, minhas amigas de sempre, agradeço as longas conversas, os telefonemas e preocupação, assim como o apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de curso, em especial à Ana Gonçalves, Afonso Jacinto, Catarina Lebre, Cheila Pereira, David Dias, Filipa Barradas, Jéssica Gaspar, João Gonçalves e Laura Vicente, com quem partilhei o meu percurso académico.

À “família” do Hospital Lusíadas no Porto, em especial à Dr.^a Ana Araújo pela receção, disponibilidade, e por nos ter feito sentir verdadeiramente parte da equipa em tão pouco tempo. À equipa da Farmácia dos Clérigos pela oportunidade e pela experiência adquirida durante este período. Não poderia deixar de mencionar os meus colegas de estágio Eduardo Filipe e Ema Rocha, tive a maior sorte do mundo por ter tido pessoas tão fantásticas a trabalhar comigo neste último capítulo do curso.

A todos os que, mesmo não tendo sido explicitamente referidos, mas fizeram diretamente ou indiretamente parte do meu percurso académico, o meu sincero agradecimento!

Por último, dirijo um agradecimento à minha família, que apesar de longe, sempre me motivou, em especial os meus pais, por serem desde sempre modelos de coragem, pelo apoio incondicional, incentivo e amizade demonstrados. *Lor le dedic această lucrare, un sprijin fără de care nu aş fi reuşit!*

Resumo

A luta contra o envelhecimento é um grande desafio no século XXI, especialmente na sua ação sobre a pele. A mudança nas propriedades biomecânicas das células cutâneas, particularmente dos fibroblastos dérmicos, está relacionada à perda de tecido cutâneo, causando rugas e outros sinais visíveis. Durante o envelhecimento, a derme sofre uma redução na produção de colagênio e elastina, levando a uma diminuição na produção da matriz extracelular e na eficiência dos fibroblastos.

A pele envelhecida possui menos miofibroblastos ativos, reduzindo a sua capacidade de remodelação da matriz extracelular. Isso resulta numa cicatrização menos eficiente, podendo até levar ao aparecimento de patologias da pele mais graves. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos é necessária para desenvolver produtos eficazes que reduzam os sinais visíveis do envelhecimento.

O zinco desempenha um papel crucial na cicatrização, uma vez que, os seus iões são essenciais para a homeostasia da pele e têm efeitos benéficos na cicatrização de tecidos danificados, devido ao seu papel em vários processos metabólicos e na regulação de enzimas envolvidas na reparação do ADN e na matriz extracelular.

O presente trabalho consistirá em duas partes distintas: na primeira, uma pesquisa bibliográfica para resumir o estado da arte sobre o zinco, as suas propriedades e aplicações como um potencial agente de antienvelhecimento, bem como a sua importância no processo de cicatrização. A segunda parte será focada em ensaios laboratoriais *in vitro*, utilizando uma linha celular de fibroblastos BJ-5ta para investigar o papel do zinco nesse processo.

A discussão final abordará as minhas conclusões da pesquisa bibliográfica e dos resultados laboratoriais, incluindo as técnicas usadas, plano experimental, ensaios e análise dos dados, sempre alinhados com os objetivos estabelecidos.

Palavras-chave: *pele, envelhecimento, células BJ-5ta, cicatrização, zinco, técnicas laboratoriais.*

Abstract

The battle against ageing is a major challenge in the 21st century, especially in its relation to the skin. The change in the biomechanical properties of skin cells, particularly dermal fibroblasts, is related to the loss of skin tissue, causes wrinkles and other visible signs of aging. During aging, there is a reduction in extracellular matrix production reflected in less collagen and elastin in the dermis, due to the diminished function of fibroblasts.

Furthermore, aging skin has fewer activated myofibroblasts, which means there is a reduced ability to remodel the extracellular matrix. This results in less efficient healing and may even lead to the development of more serious skin pathologies. Therefore, a better understanding of the mechanisms involved in skin-related processes is necessary to develop effective derma cosmeceuticals that ensure skin health and reduce visible signs of aging.

Zinc plays a crucial role in wound healing, since its ions are essential for maintaining skin homeostasis and have beneficial effects on the healing of damaged tissues, due to their role in various metabolic processes and in the regulation of enzymes involved in DNA repair and the extracellular matrix.

This thesis project consists of two distinct parts: first, a literature review to summarize the state of the art about zinc, its properties, its applications for skin pathologies and its potential as an anti-aging agent.

The second part of the thesis focusses on *in vitro* laboratory trials, and assesses the effect of zinc on, BJ-5ta, a fibroblast cell line derived from skin. The final discussion presents my conclusions about the use of zinc as an anti-aging agent based on the literature review and the laboratory results obtained, including the techniques used, experimental plan, tests, and data analysis.

Keywords: *skin, aging, BJ-5ta cells, wound healing, zinc, laboratory techniques.*

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Foco do estudo	1
1.2. Estrutura e funções da pele	3
1.2.1. Fibroblastos	5
1.3. O processo de envelhecimento dermatológico	6
1.3.1. Envelhecimento intrínseco	8
1.3.2. Envelhecimento extrínseco	9
1.4. O processo de cicatrização	12
1.4.1. Fase de coagulação, vascular ou hemóstase	12
1.4.2. Fase inflamatória	14
1.4.3. Fase proliferativa ou de reparação	15
1.4.4. Fase de remodelação ou maturação	17
1.4.5. A importância dos fibroblastos na cicatrização e as alterações com o envelhecimento	18
1.5. Doenças concomitantes	21
1.6. Tratamentos para o envelhecimento da pele	23
1.6.1. Tratamentos e substâncias de uso tópico	27
1.7. A importância do zinco	29

1.7.1. O potencial terapêutico do zinco	32
1.8. Modelos de cicatrização da pele	34
2. OBJETIVO	37
3. METODOLOGIA	38
3.1. Cultura celular	39
3.1.1. Caracterização da cultura celular	40
3.2. Expansão e manutenção da cultura celular	41
3.3. Contagem de células	43
3.3.1. Câmara de <i>Neubauer</i>	43
3.3.2. ImageJ	44
3.4. Preparação das diluições seriadas	45
3.5. Ensaio de MTT	46
3.6. Ensaio de proliferação	49
3.7. Ensaio de migração	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Ensaio de MTT (viabilidade celular)	52
4.2. Ensaio de proliferação	56
4.3. Ensaio de migração	60
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Índice de figuras

Figura 1. Esquema das camadas da pele.....	5
Figura 2. Fisiopatologia do processo de cicatrização	20
Figura 3. Modelos animais e humanos de cicatrização da pele mais relevantes atualmente.....	35
Figura 4. Modelos de cicatrização <i>in vitro</i>	36
Figura 5. Fluxograma-resumo dos diversos métodos utilizados ao longo do trabalho ..	39
Figura 6. Imagem microscópica das células BJ-5ta	40
Figura 7. Esquema representativo das diversas técnicas utilizadas ao longo do trabalho para realizar a passagem das células.....	42
Figura 8. Representação da contagem com a câmara de <i>Neubauer</i>	44
Figura 9. Representação da preparação de diluições seriadas a partir de uma solução stock de zinco.	46
Figura 10. Esquema do ensaio de MTT.....	48
Figura 11. Esquema do ensaio de proliferação	49
Figura 12. Representação das linhas auxiliares marcadas para a realização da ferida ...	50
Figura 13. Esquema do ensaio de migração	51
Figura 14. Viabilidade das células BJ-5ta expostas a uma gama de concentrações de zinco.	52
Figura 15. Viabilidade das células BJ-5ta expostas a uma gama de concentrações de zinco	53
Figura 16. Proliferação das células BJ-5ta com diferentes concentrações de zinco.....	57
Figura 17. Fotografias da recuperação na região horizontal da ferida na presença e ausência de zinco.	61

Figura 18. Fotografias da recuperação na região vertical da ferida na presença e ausência de zinco	61
Figura 19. Fotografias da recuperação na região horizontal da ferida na presença e ausência de zinco	63
Figura 20. Fotografias da recuperação na região vertical da ferida na presença e ausência de zinco	64
Figura 21. Evolução da cicatrização da ferida com diferentes concentrações de zinco .	66

Índice de tabelas

Tabela 1. Resumo das principais alterações morfológicas e funcionais durante o processo de envelhecimento da pele.....	7
Tabela 2. Patologias da pele associadas à idade	22
Tabela 3. Estratégias dermatológicas de antienvhecimento	23
Tabela 4. Substâncias ativas comuns utilizadas em produtos cosmecêuticos	28
Tabela 5. Utilizações terapêuticas do zinco	32

Lista de abreviaturas

- **ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- **ARN** – Ácido ribonucleico
- **ATCC** – American Type Culture Collection
- **CO₂** – Dióxido de carbono
- **DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- **EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **EGF** – Fator de crescimento epidérmico
- **FBS** – Soro bovino fetal
- **FGF** – Fator de crescimento fibroblástico
- **HDFs** – Fibroblastos dérmicos humanos
- **HGFs** – Fibroblastos gengivais humanos
- **HIFU** – Ultrassom focalizado de alta intensidade
- **IGF-1** – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- **IL** – Interleucinas
- **IPL** – Luz intensa pulsada
- **IV** – Infravermelho
- **KGF** – Fator de crescimento dos queratinócitos
- **MEC** – Matriz extracelular
- **MMPs** – Metaloproteinases da matriz
- **MOF** – Estrutura metalorgânica
- **MSCs** – Células-tronco mesenquimais

- **MT** – Metalotioneína
- **MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio
- **NGF** – Fator de crescimento nervoso
- **PBS** – Solução tampão fosfato-salina
- **PDGF** – Fator de crescimento derivado das plaquetas
- **PRP** – Plasma rico em plaquetas
- **RF** – Radiofrequência
- **ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- **SASPs** – Secreções das células senescentes
- **TGF- β** – Fator de crescimento transformador- β
- **TIMPs** – Inibidores tecidulares das metaloproteinases
- **TRH** – Terapia de substituição hormonal
- **UVA** – Ultravioleta A
- **UVB** – Ultravioleta B
- **UV** – Ultravioleta
- **VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular
- **ZIP** – Transportadores de influxo de zinco
- **ZnCl₂** – Cloreto de zinco
- **ZnGluc** – Gluconato de zinco
- **ZnO** – Óxido de zinco
- **ZnSO₄** – Sulfato de zinco
- **ZnT** – Transportadores de efluxo de zinco

1. INTRODUÇÃO

1.1. Foco do estudo

No século XXI, o combate ao envelhecimento da pele surgiu como um desafio preponderante, visto que a nível mundial o índice de envelhecimento da população com idade ≥ 65 anos em 2020 era de 9,3%, podendo aumentar para 18% em 2060 e 23% em 2100.^[1]

O envelhecimento da pele é um processo complexo influenciado por vários fatores físicos, biológicos e bioquímicos que têm um impacto negativo na estrutura e função da pele.^[2] Estas alterações englobam o desgaste da epiderme, a redução da renovação celular, o enfraquecimento dérmico e a perda de tecido adiposo subcutâneo e de massa muscular, conduzindo coletivamente à flacidez da pele e às rugas. Além disso, as alterações da pele relacionadas com o envelhecimento podem resultar numa cicatrização pouco eficiente, e, conseqüentemente, promover a manifestação de patologias cutâneas correlacionadas. Esta questão sublinha a necessidade do desenvolvimento de estratégias de antienvelhecimento eficazes, que podem envolver intervenções que visem mecanismos celulares e extracelulares para restaurar parcialmente a integridade funcional da pele envelhecida.^[2,3]

A pele, embora seja extremamente resistente, sofre alterações inevitáveis associadas à idade, que se tornam cada vez mais relevantes com o aumento da esperança média de vida.^[4] Estas alterações intrínsecas, associadas a fatores externos como a exposição ao sol, comprometem a funcionalidade da pele, e podem mesmo levar a uma morbidade significativa nos indivíduos idosos.^[5]

Além disso, o impacto dos problemas relacionados com a cicatrização impõe custos financeiros substanciais, que são amplificados pelo envelhecimento da população e pela prevalência de doenças concomitantes. Assim, à medida que a população idosa aumenta, as intervenções dermatológicas médicas e cosméticas, bem como a necessidade de investigação nesta área, serão fundamentais para prevenir os problemas da pele, e desta forma melhorar a sua qualidade de vida de um modo geral.^[6,7]

Esta preocupação é de extrema importância para os laboratórios de cosmética devido ao vasto mercado que representa, como tal os avanços nas inovações e tecnologias na área da saúde promoveram uma interligação entre o domínio dos medicamentos e dos cosméticos. Esta integração tem como objetivo criar produtos multifacetados, eficazes e seguros, reforçando ao mesmo tempo a necessidade de criação de métodos que proporcionem uma percepção mais clara dos efeitos pretendidos por parte destes produtos.

[2]

Perante o exposto, a presente tese incorpora também uma componente prática que permite complementar o enquadramento teórico. A investigação laboratorial envolveu o desenvolvimento de vários tipos de ensaios que testaram o efeito do zinco nos fibroblastos da pele, em específico nas células BJ-5ta, assim, para além de contribuir para a ampliação do conhecimento científico, a realização dos ensaios laboratoriais proporcionou uma oportunidade única de aprofundar a minha compreensão dos conceitos teóricos ao aplicá-los em um contexto prático.

Inicialmente, elaborou-se um ensaio de citotoxicidade, de modo a testar a concentração de zinco que seria mais adequada para utilizar nas células em causa, seguidamente, com base nos resultados deste ensaio foi possível avançar para a próxima fase da experiência.

Na segunda etapa da componente prática, realizaram-se ensaios de proliferação e migração, que foram fundamentais para melhor analisar o comportamento das células BJ-5ta na presença das diferentes concentrações de zinco, e comparar os seus efeitos com aqueles observados no grupo de controlo. Assim, foi possível obter conclusões sobre o impacto deste microelemento nas células, nomeadamente, na taxa de aumento do número de fibroblastos, e a sua influência na migração celular.

Ao integrar tanto os conhecimentos teóricos como os resultados experimentais, esta pesquisa fornece uma compreensão abrangente da relação entre o envelhecimento, a saúde da pele e as potenciais aplicações terapêuticas do zinco.

1.2. Estrutura e funções da pele

A pele faz parte do sistema tegumentar e é o maior órgão do nosso corpo ^[8], sendo uma estrutura extremamente versátil que compreende três camadas representadas e descritas na **figura 1**, nomeadamente, a epiderme, a derme e a hipoderme (ou camada subcutânea), que têm várias funções primárias, incluindo proteção, regulação térmica, secreção, excreção, sensação e absorção.^[8,9,13] A pele tem cerca de 1,8 m² de extensão, sendo a principal barreira protetora contra diversos agentes patogénicos, e contribuindo para manter a homeostase do nosso organismo, por isso esta pode ser utilizada como modelo para refletir o bem-estar geral.^[9,10]

A epiderme é a camada mais externa da pele, e funciona como uma barreira física, impedindo a perda de água do organismo, e protegendo-o da entrada de substâncias exógenas.^[9] Esta fina camada, com cerca de 0,1 mm de espessura, é composta por quatro ou cinco subcamadas de células epiteliais, dependendo da localização no corpo: o *stratum basale*, o *spinsum*, o *granulosum*, o *lucidum* e o *corneum*.^[8,9]

Os queratinócitos constituem a maioria das células epidérmicas, e desempenham um papel importante, proporcionando uma barreira impermeável ao ambiente externo e limitando a perda excessiva de água do organismo.^[8]

Além disso, os melanócitos e células de Langerhans também estão presentes.^[11] Os melanócitos desempenham um papel importante na proteção contra a radiação ultravioleta (UV) através da produção de melanina. As células de Langerhans são as únicas células especializadas na apresentação de antígenos presentes na epiderme. É importante referir que a epiderme não possui a sua própria rede de vasos sanguíneos, sendo nutrida pelos vasos sanguíneos subjacentes.^[8,9]

A derme está inserida entre a epiderme e o tecido subcutâneo, e é fundamental para a integridade e função da pele.^[8] Esta camada mais espessa, que pode ter até 3-4 mm de espessura, tem um conteúdo celular inferior ao da epiderme, e é constituída por duas camadas de tecido conjuntivo que formam uma rede interligada de fibras de elastina e colagénio produzidas pelos fibroblastos. Adicionalmente, a derme contém outras estruturas, tais como vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, glândulas sudoríparas e folículos capilares.^[8,9]

Os fibroblastos são as células principais da derme que sintetizam os componentes da matriz extracelular (MEC), estes por sua vez conferem à pele estrutura, força e flexibilidade. Para além disso, estas células são também necessárias para o desenvolvimento e manutenção dos folículos capilares. [9] A derme é densamente vascularizada, e as suas propriedades funcionais são críticas para a saúde e função da pele. [8]

A camada mais profunda da pele é a hipoderme, também conhecida por camada subcutânea. [8] Esta camada está localizada abaixo da derme e é composta principalmente por tecido conjuntivo que, consoante o local, forma camadas móveis ou grandes bolsas de tecido adiposo, podendo funcionar como um modo de armazenamento de gordura, isolamento e amortecimento para o tegumento. [9,12]

Os principais tipos de células na hipoderme são os fibroblastos, células adiposas e macrófagos. [9] A hipoderme tem um papel importante na homeostasia adiposa e é particularmente rica em recetores acoplados à proteína G, que regulam a lipólise, e a secreção da adiponectina e da leptina. [12] Além disso, esta camada serve para conectar a pele ao tecido fibroso subjacente dos ossos e músculos, desempenhando um papel importante na estrutura e função da pele. [9,12]

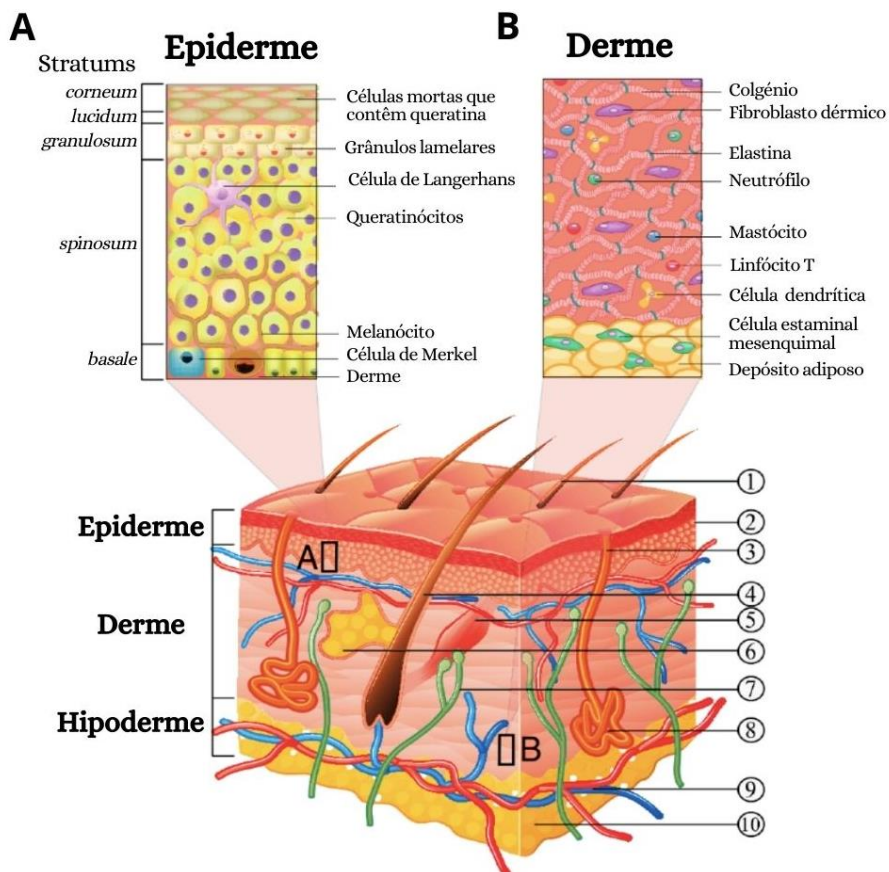


Figura 1. Esquema das camadas da pele. As indicações na imagem apontam para: (1) fio de cabelo; (2) *stratum corneum*; (3) poro sudorífero; (4) folículo piloso; (5) músculo eretor do pelo; (6) glândula sebácea; (7) nervo; (8) glândula sudorípara écrina; (9) plexos vasculares cutâneos; (10) depósito adiposo. As secções (A) e (B) destacam uma estrutura pormenorizada da epiderme e da derme, respetivamente. Adaptado de: Gaur et al. (2017) [14]

1.2.1. Fibroblastos

Os fibroblastos são células essenciais nos tecidos conjuntivos, visto que sintetizam e preservam a função da MEC, garantindo a integridade estrutural de vários tecidos do organismo.^[15] Têm uma forma alongada e fusiforme, e sendo o principal componente do tecido conjuntivo para além de se encontrarem na pele, estão em praticamente todos os tecidos e órgãos do organismo, e apesar da sua omnipresença, são um tipo de célula heterogéneo, o que dificulta a total compreensão das suas funções.^[16-18]

Desde o desenvolvimento embrionário até ao envelhecimento, estas células trabalham principalmente para produzir, manter e remodelar os estromas do tecido conjuntivo, que interagem com os outros tecidos circundantes, incluindo o epitélio.^[17] Além disso, os fibroblastos desempenham um papel importante na cicatrização, na remodelação de tecidos, e na inflamação, visto que interagem com as células do sistema imunitário, e regulam os neuropeptídeos nos locais das feridas.^[15,17]

De um modo geral estas células fornecem informações tanto sobre o processo de envelhecimento dos órgãos, como do próprio indivíduo, para além do seu envolvimento na manutenção e reparação dos tecidos. Apesar da sua diversidade, os fibroblastos são um componente celular importante e dinâmica da biologia dos tecidos.^[17]

1.3. O processo de envelhecimento dermatológico

O envelhecimento da pele é um processo complexo e multifatorial, sendo caracterizado por uma regeneração mais lenta e eventual erosão da sua estrutura e funcionalidade.^[14,19] A pele, sendo o maior órgão do corpo, sofre uma série de alterações com a idade que estão sumarizadas na **tabela 1**, afetando as suas funções, aparência e a qualidade de vida do indivíduo no geral.^[20]

Medir o envelhecimento com precisão é desafiador devido à sua natureza multifacetada e à variabilidade individual, muitas vezes não relacionada com a idade cronológica, no entanto, compreender a fisiopatologia inerente ao envelhecimento da pele é crucial para que este processo ocorra de uma forma saudável.^[21,23] Para responder às necessidades dermatológicas da população, é fundamental compreender as alterações estruturais e funcionais que ocorrem na pele ao longo do tempo, tanto intrínseca como extrinsecamente.^[20,22]

O envelhecimento da pele é um processo em que a degradação do seu estado se deve aos efeitos sinérgicos do envelhecimento cronológico, do fotoenvelhecimento, da deficiência hormonal e dos fatores ambientais.^[22] O aspeto da pele envelhecida resulta de uma combinação de fatores genéticos (intrínsecos) e de influências externas (extrínsecas), nomeadamente a exposição solar e o tabagismo. Enquanto o envelhecimento intrínseco segue um curso previsível, o impacto dos fatores ambientais varia e não é inevitável para todos. Estes fatores contribuem para alterações nas células da pele e nos componentes da matriz extracelular, afetando a força, a elasticidade e a hidratação da pele.^[23,24]

As variáveis intrínsecas, incluindo as alterações estruturais e hormonais, resultam numa diminuição da síntese de colagénio e do suporte vascular.^[22] Este processo de envelhecimento interno provoca o enfraquecimento da pele, a sua flacidez e a formação de rugas, principalmente nas camadas de células basais.^[21]

Os fatores extrínsecos, como a radiação UV (UVA e UVB) e os poluentes ambientais, aceleram o envelhecimento da pele, sendo por isso fundamental proteger a pele das influências ambientais, especialmente da radiação UV.^[19,22]

Tabela 1. Resumo das principais alterações morfológicas e funcionais durante o processo de envelhecimento da pele. Adaptado de Elsner et al. (2011) e Fenske & Lober (1986).^[21,25]

Sintomas	Causas
Diminuição da espessura da epiderme	Aumento da vulnerabilidade e fragilidade da pele
Atrofia do <i>stratum spinosum</i>	
Aumento da heterogeneidade do tamanho das células basais	
Reposição lenta de líquidos	Função de barreira alterada
Diminuição do número de melanócitos, e da sua heterogeneidade	Canície, hipomelanose gutata idiopática, lentigines solares
Diminuição do número de células de Langerhans	Diminuição da função imunitária da pele
Enfraquecimento da junção dermo-epidérmica	Diminuição da área de contacto superficial
Diminuição da espessura da derme	Redução da firmeza e da elasticidade
Diminuição do número de fibroblastos	
Diminuição do número de mastócitos	
Redução e desintegração das fibras elásticas e do colagénio	Sensibilização às forças de tensão, formação de linhas finas
Redução da microvascularização cutânea	Redução da reatividade vascular cutânea, desequilíbrio da termorregulação e fornecimento de nutrientes
Diminuição da atividade mitótica, e prolongamento da duração do ciclo celular, bem como do tempo de migração	Diminuição da descamação, atraso na cicatrização
Atrofia da matriz extracelular (MEC)	Redução da firmeza e da elasticidade

1.3.1. Envelhecimento intrínseco

O envelhecimento intrínseco da pele é um processo complexo impulsionado por fatores genéticos, metabólicos e hormonais, que levam a alterações estruturais e funcionais na pele. Os mecanismos fundamentais deste processo não são totalmente conhecidos, no entanto, as principais teorias propostas incluem a senescência celular, o encurtamento dos telômeros, o stress oxidativo, e as influências hormonais. [21-23]

Senescência celular

A senescência celular é caracterizada pela diminuição da capacidade de replicação celular e pelo encurtamento dos telômeros, desempenhando um papel crucial no envelhecimento intrínseco da pele. Os telômeros protegem a estabilidade dos cromossomas, mas sofrem um encurtamento progressivo durante a divisão celular até atingirem um comprimento crítico, desencadeando a paragem do ciclo celular e a senescência. [26,27] Vários fatores de stress, incluindo a disfunção dos telômeros, a ativação de oncogenes, alterações na estrutura da cromatina, stress epigenético e stress oxidativo, podem também desencadear a senescência. A acumulação de células senescentes nos tecidos envelhecidos sublinha o seu papel no comprometimento de processos fisiológicos como a regeneração, contribuindo para o envelhecimento do organismo e para as doenças relacionadas com a idade. [26-28]

A senescência celular nos fibroblastos dérmicos influencia significativamente o envelhecimento da pele ao induzir um declínio na capacidade proliferativa e a paragem do ciclo celular, principalmente na fase G0/G1. Os genes reguladores associados à progressão do ciclo celular são regulados negativamente, enquanto os inibidores das proteínas quinases dependentes da ciclina são regulados positivamente, promovendo ainda mais a paragem do ciclo celular. [29,30]

Stress Oxidativo

O envelhecimento intrínseco da pele é afetado por diversos fatores, entre os quais se destaca o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O stress oxidativo surge da acumulação dessas ROS, sendo as mitocôndrias as principais fontes endógenas desse fenómeno.^[27] A acumulação de ROS leva a danos oxidativos nos componentes celulares, incluindo ADN, lípidos e proteínas, perturbando a homeostase celular e as vias de sinalização. Estes danos oxidativos contribuem para a degradação do colagénio dérmico e das fibras elásticas através da regulação positiva das metaloproteinases da matriz (MMPs), perpetuando um ciclo de danos e envelhecimento dos tecidos.^[26,27,31]

Fatores hormonais

As alterações hormonais, nomeadamente a diminuição dos níveis de estrogénio e testosterona, exacerbam o envelhecimento da pele, especialmente em mulheres na menopausa, resultando em secura, rugas, degradação do colagénio e perda de elasticidade. A terapia de substituição hormonal (TRH), especialmente com estrogénio, pode atenuar esses efeitos, possivelmente influenciando a produção de antioxidantes na pele.^[27,32]

A transição para a menopausa resulta em modificações endocrinológicas que levam à diminuição dos folículos ovarianos e à redução na síntese de estradiol, causando alterações como sangramento irregular e atrofia urogenital. Essas mudanças hormonais contribuem para a diminuição da deposição de colagénio, resultando em rugas e fragilidade na pele, aumentando a suscetibilidade a danos e infeções.^[27,32,33]

1.3.2. Envelhecimento extrínseco

O envelhecimento extrínseco, muitas vezes designado por fotoenvelhecimento, resulta principalmente de fatores externos, nomeadamente da exposição contínua à radiação UV.^[35] Embora os raios UV sejam responsáveis por aproximadamente 80% do envelhecimento facial, é importante salientar que este processo

não é exclusivamente desencadeado pela exposição solar, já que outros elementos ambientais, como o tabagismo, a poluição, a radiação infravermelha e os hábitos de vida, também desempenham um papel significativo na aceleração do envelhecimento da pele. [24,34,35]

Radiação solar

A exposição excessiva à radiação UV, predominantemente da exposição solar, constitui um fator extrínseco significativo que contribui para o envelhecimento da pele. Ao contrário do envelhecimento intrínseco, que se caracteriza pelo afinamento da pele, a exposição à radiação UV resulta num espessamento da epiderme, sobretudo no estrato córneo, devido à falha na degradação dos corneócitos. [24,32]

A radiação UV também interfere na produção de colagénio, especialmente do tipo VII, essencial para a ancoragem das fibrilhas na junção dermo-epidérmica. A degradação do colagénio, principalmente do tipo I, facilitada por várias proteases, incluindo as MMPs, contribui adicionalmente para o aparecimento de rugas na pele fotoenvelhecida. Outro aspeto distintivo da pele fotoenvelhecida é a elastose solar, caracterizada pela acumulação de tecido elástico anormal nas camadas profundas da derme. [34-36]

Além disso, a exposição aos raios UV leva à disfunção endotelial, resultando numa diminuição da função microvascular, caracterizada por uma capacidade angiogénica reduzida, uma expressão anómala de moléculas de adesão e uma função vasodilatadora comprometida. Estas alterações multifacetadas sublinham a interação complexa de fatores extrínsecos no processo de envelhecimento da pele, fornecendo perspectivas valiosas para potenciais alvos terapêuticos. [24,34,35]

Do ponto de vista clínico, o fotoenvelhecimento manifesta-se através de rugas, flacidez e um aspeto semelhante a couro, principalmente devido a alterações estruturais no tecido conjuntivo dérmico. [36]

Tabagismo

O tabagismo está fortemente associado ao envelhecimento prematuro da pele, muitas vezes caracterizado por um distinto "rosto de fumador", marcado por um tom de pele acinzentado e linhas pronunciadas à volta dos olhos e da boca. [35]

Estudos *in vitro* elucidaram ainda mais os potenciais mecanismos que associam tabagismo ao envelhecimento da pele. Estes estudos demonstraram que o fumo do tabaco reduz a produção de procolagénio dos tipos I e III, enquanto induz a expressão de MMP-1 e MMP-3, perturbando assim a regulação da matriz extracelular nos fibroblastos da pele. [32,35]

Para além disso, o tabagismo diminui o fluxo sanguíneo capilar para a pele, levando à privação de oxigénio e nutrientes e consequentes danos nas fibras de colagénio e elastina. Os efeitos vasoconstritores da nicotina agravam ainda mais as rugas e a aspereza da pele, tornando-o um importante fator de risco para o envelhecimento prematuro e o cancro da pele. [32,35,36]

Outros fatores

Os fatores extrínsecos, incluindo a poluição, a radiação infravermelha (IV) e as escolhas de estilo de vida, contribuem significativamente para o envelhecimento da pele.

A poluição, particularmente a poluição por partículas finas e o ozono, acelera o envelhecimento da pele ao induzir o stress oxidativo e ao esgotar os antioxidantes. A exposição prolongada à radiação infravermelha eleva a temperatura da pele, ativando enzimas que degradam o colagénio e as fibras elásticas, provocando rugas e elastose solar. [34,36]

Tanto a poluição do ar exterior como a do ar interior, especialmente a proveniente do trânsito e da combustão de combustíveis fósseis, exacerbam as manifestações de envelhecimento da pele, como as manchas pigmentadas e as rugas. [34]

Além disso, as condições ambientais, como a temperatura e a humidade, bem como os hábitos de vida, nomeadamente a alimentação e a posição de dormir, influenciam

a integridade e o envelhecimento da pele. ^[32] Reconhecer e tratar estes fatores extrínsecos é crucial para manter a saúde da pele e retardar o processo de envelhecimento.

1.4. O processo de cicatrização

A cicatrização é um processo complexo, provocado por uma resposta imunitária inata ^[7], que envolve quatro fases distintas: a hemóstase, que começa imediatamente após a lesão; a fase inflamatória, que se inicia pouco tempo depois; a fase proliferativa, que começa passado alguns dias e engloba os principais processos da cicatrização; e a fase de maturação, que marca a formação de tecido cicatricial, que pode prolongar-se até um ano ou mais. ^[7,37,38] Interações coordenadas entre sistemas imunológicos e biológicos conduzem este processo, com diferentes tipos de células que aparecerem no leito da ferida nas várias fases, assegurando uma sequência de eventos organizada e precisa, tal como pode ser observado na **figura 2**. ^[37,47]

Essencialmente, a cicatrização é um processo fisiológico altamente harmonioso que tem como objetivo restaurar a integridade da pele após traumas, cortes ou lesões. ^[37,39] As citocinas desempenham papéis fundamentais em várias etapas, incluindo o estímulo da produção de componentes da membrana basal, a prevenção da desidratação, o reforço da inflamação e a aceleração da formação de tecido de granulação. Isso demonstra a complexidade do processo de cicatrização bem como os seus efeitos estéticos e funcionais. ^[9,39]

1.4.1. Fase de coagulação, vascular ou hemóstase

Na fase inicial da cicatrização, conhecida por hemóstase, decorre uma série de eventos altamente regulados, que se sucedem segundos a minutos após a lesão. ^[38] Esta fase é crítica para dois objetivos principais: parar a hemorragia excessiva e estabelecer as bases para os processos de cicatrização seguintes. ^[37]

Inicialmente há uma formação de coágulos e ativação de plaquetas, nesta fase os vasos sanguíneos contraem-se para reduzir a perda de sangue após uma lesão. As plaquetas, que são constituintes essenciais do sangue, ligam-se à camada subendotelial exposta e são ativadas.^[38] Seguidamente, as plaquetas ativadas reúnem-se no local da lesão e formam um coágulo inicial, este coágulo é constituído por várias proteínas diferentes, incluindo fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondinas.^[35,38] O coágulo sanguíneo não só previne a hemorragia, como também atua na forma de uma matriz provisória. Esta estrutura promove a migração de diversas células essenciais nas fases posteriores da cicatrização de feridas.^[40]

Posteriormente ocorre uma libertação dos fatores de crescimento, visto que as plaquetas contêm grânulos α cheios de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), o fator de crescimento epidérmico e os fatores de crescimento semelhantes à insulina.^[7,37,39] Estes fatores de crescimento são essenciais para iniciar e atrair células cruciais envolvidas nas fases posteriores da cicatrização, tais como neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.^[38]

De seguida, substâncias químicas vasoativas, como as catecolaminas e a serotonina, atuam em recetores específicos no endotélio dos vasos sanguíneos.^[38] Em alguns locais, este mecanismo induz vasoconstrição, enquanto noutros provoca vasodilatação. A vasodilatação permite que células vitais como os leucócitos, os glóbulos vermelhos e as proteínas plasmáticas entrem na zona da ferida. A vasoconstrição inicial é seguida pela vasodilatação, que é auxiliada por trombócitos que se infiltram na matriz provisória da ferida.^[38,40] A vermelhidão local (hiperemia) e o edema da ferida resultam da transição da vasoconstrição para a vasodilatação.^[40]

A hemóstase está intrinsecamente relacionada com o início do processo inflamatório. As plaquetas e os leucócitos segregam citocinas e fatores de crescimento, que promovem a inflamação.^[38,40] As interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) estão entre as substâncias químicas envolvidas na fase inflamatória, na síntese de colagénio, na angiogénese, na transformação dos fibroblastos e na reepitelização.^[39,40]

1.4.2. Fase inflamatória

A fase inflamatória é uma etapa crucial caracterizada pela secreção sequencial de células imunitárias, cada uma desempenhando um papel específico no processo de cicatrização. Esta fase serve para eliminar os agentes patogênicos e o tecido danificado, enquanto promove a reparação da lesão. [7,41]

Durante a fase inflamatória inicial, os neutrófilos são as primeiras células imunitárias a chegar ao local da ferida, normalmente dentro de 24 horas. [7,41] A sua principal função é a fagocitose, que envolve a ingestão e digestão de bactérias, partículas estranhas e detritos. Vários agentes quimiotáticos, incluindo TGF- β , componentes do complemento (C3a e C5a) e produtos bacterianos, atraem os neutrófilos para a ferida. [37,41] Os neutrófilos aderem às células endoteliais e migram para a ferida, onde libertam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio para destruir os agentes patogênicos. É importante salientar que, quando todas as bactérias contaminadas são eliminadas, a atividade dos neutrófilos se altera gradualmente após a lesão, isto significa que o excesso de neutrófilos deve ser removido da ferida para que a cicatrização avance para a fase seguinte. [37,38] Isto é conseguido através de apoptose e extrusão, o que evita danos nos tecidos e inflamação excessiva.

Na fase inflamatória tardia, que ocorre aproximadamente 48 a 72 horas após a lesão, os macrófagos tornam-se importantes, pois são formados a partir de monócitos do sangue e sofrem alterações fenotípicas ao chegarem à ferida, transformando-se em macrófagos teciduais. [37,38] Várias substâncias quimiotáticas, como os fatores de coagulação, os componentes do complemento e as citocinas, como o PDGF, o TGF- β e o leucotrieno B₄, atraem os macrófagos para o local da ferida. [37,41] Os macrófagos têm um tempo de vida mais longo do que os neutrófilos e continuam a efetuar a fagocitose, estes têm um papel regulador importante, especialmente nas fases finais da resposta inflamatória. Os macrófagos não só eliminam os resíduos, as células mortas e os neutrófilos perdidos, como também segregam citocinas e fatores de crescimento importantes, que recrutam e ativam outras células envolvidas no processo de reparação, nomeadamente os fibroblastos e as células endoteliais. [7,38,41] Os macrófagos M1 e M2 são os dois principais tipos de macrófagos. Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e dominam a fase inflamatória inicial, por sua vez os macrófagos M2 promovem a

regeneração dos tecidos estimulando os queratinócitos, a angiogênese e a síntese da matriz extracelular, dominando as fases posteriores da reparação. [7,39,40]

Os linfócitos são as últimas células imunitárias a entrar na ferida, normalmente após mais de três dias. O seu papel específico na cicatrização de feridas ainda não está totalmente definido. [7,38] No entanto, pensa-se que os linfócitos podem influenciar o processo de cicatrização através de interações intercelulares com macrófagos, plaquetas, queratinócitos e fibroblastos, ou através da libertação de citocinas que desempenham um papel na remodelação dos tecidos. [7]

A fase inflamatória também inclui alterações ao nível dos vasos sanguíneos, incluindo vasoconstrição e vasodilatação, que contribuem para a manutenção da integridade vascular e para a formação de uma matriz temporária para a migração celular, que promove a regeneração dos tecidos e a migração de células para o local da ferida, permitindo que a pele retome a sua função de barreira protetora. [38,40,41]

1.4.3. Fase proliferativa ou de reparação

A fase proliferativa é caracterizada por uma série de processos inter-relacionados que trabalham em conjunto para reconstruir o tecido lesionado. Este período começa logo após a lesão e dura cerca de duas semanas. [37,41] Um dos principais objetivos durante esta fase é a reepitelização, que envolve a proliferação e migração de queratinócitos. [7,41] As células estaminais epidérmicas e as que residem nos folículos pilosos contribuem para este processo, com o objetivo de restaurar a camada epitelial protetora sobre a ferida. [37,41]

Os fibroblastos são outro elemento fundamental na cicatrização, pelo que também se tornam muito ativos durante esta fase, e proliferam em resposta a fatores de crescimento como o TGF- β e o PDGF, que são libertados pelas células inflamatórias e pelas plaquetas. Os fibroblastos não só se multiplicam como também sintetizam componentes cruciais para a MEC, incluindo colagénio, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que por sua vez fornecem suporte estrutural para a reparação dos tecidos e migração celular. [7,37,40] O colagénio é um componente essencial para a integridade dos tecidos, inicialmente, o colagénio de tipo III é o mais predominante no

tecido de granulação, mas a sua composição muda ao longo do tempo, e à medida que a cicatrização vai progredindo. [37,40]

Durante esta fase também ocorre a angiogénese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos, é um processo fundamental durante esta fase, sendo estimulada por vários fatores de crescimento, como o VEGF e o PDGF. [37,38] Os novos vasos capilares estendem-se para o coágulo da ferida, estabelecendo uma rede microvascular que fornece oxigénio e nutrientes às células lesionadas. [38]

Os fibroblastos também se podem diferenciar em miofibroblastos, células com propriedades contrácteis, estes, por sua vez, contribuem para a contração da ferida, um evento crucial no processo de cicatrização que ajuda a unir os bordos da ferida, uma vez cumprido o seu papel, alguns fibroblastos sofrem apoptose e são eliminados. [7,40]

Simultaneamente, a epitelização continua à medida que as células epiteliais migram a partir dos bordos da ferida, esta migração é facilitada por vias de sinalização específicas, fatores de crescimento como o EGF, o KGF, o IGF-1 e o NGF, e pela libertação de lípidos e ativação de cinases associadas à membrana. [39,40]

A remodelação vascular ocorre para restabelecer a rede vascular da pele. Fatores de crescimento como o VEGF e o PDGF iniciam este processo. [39,41] As células endoteliais desempenham um papel vital ao proliferarem, migrarem e formarem novos vasos sanguíneos. As células perivasculares, como os pericitos, são recrutadas para estabilizar estes vasos. [41]

O tecido de granulação, que é um tecido de transição, substitui a matriz provisória (constituída por fibrina e fibronectina), este é composto por uma população densa de fibroblastos, granulócitos, macrófagos e capilares sanguíneos. [37,38,41] Os fibroblastos do tecido de granulação são responsáveis pela produção de colagénio e de outros componentes da MEC, o que contribui para a migração celular e a cicatrização dos tecidos. [37,41]

Além disso, o sistema imunitário ajuda a regular o processo de cicatrização. Os linfócitos B e T estão envolvidos, com várias citocinas e fatores de crescimento que influenciam os mecanismos celulares, como a migração, a proliferação e a diferenciação. [41]

1.4.4. Fase de remodelação ou maturação

A fase de remodelação é a fase final do processo de cicatrização, sendo fundamental para restabelecer a funcionalidade dos tecidos. ^[42] Esta fase, que normalmente começa por volta do oitavo dia após a lesão, pode durar até um ano ou mais, visto que envolve uma série de processos complexos. ^[7,37]

Durante esta fase final, a MEC sofre uma renovação constante. ^[7] O colagénio tipo III torna-se menos abundante e é progressivamente substituído pelo colagénio tipo I, que é mais resistente. ^[7,40,41] Esta transição leva à formação de agregados de colagénio maiores, com cross-links intermoleculares, o que resulta numa maior resistência à tração. No entanto, mesmo com estas alterações, a capacidade de resistência do tecido recuperado não ultrapassa normalmente 80% da resistência da pele saudável. ^[37,42]

Para além das modificações no colagénio, existem outros eventos que caracterizam esta fase, nomeadamente as células inflamatórias que saem gradualmente do local da lesão, ao passo que os fibroblastos continuam a desempenhar o seu papel crucial na síntese de agregados de colagénio e na promoção de novos cross-links. ^[37,41] Estes fibroblastos ajudam a manter a produção de novo epitélio e a formação de tecido de cicatrização. ^[37]

A maturação da matriz é um componente essencial durante esta fase, com o aumento do diâmetro dos agregados de colagénio e, simultaneamente, a degradação do ácido hialurónico e da fibronectina. ^[41] Consequentemente, a resistência à tração da ferida aumenta progressivamente, embora nunca atinja totalmente a resistência original do tecido. ^[41,43]

As MMPs, produzidas por várias células na lesão, participam na degradação do colagénio. A atividade destas enzimas é cuidadosamente regulada, sendo que os inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs) aumentam ao longo do tempo para promover a acumulação de nova matriz. ^[25,43]

O processo de encerramento completo da ferida, que se inicia durante a fase proliferativa, continua durante a remodelação. Os fibroblastos interagem com a matriz extracelular, levando a uma redução do tamanho do tecido conjuntivo subjacente. Este

fenómeno, por sua vez, aproxima as extremidades da ferida. ^[42] Vários fatores de crescimento, incluindo o PDGF, o TGF- β e o FGF, desempenham papéis essenciais na regulação deste processo. ^[37,42]

À medida que a ferida cicatriza, a densidade de fibroblastos e macrófagos diminui devido à apoptose. Paralelamente, o crescimento de vasos capilares é interrompido, o fluxo sanguíneo para a área diminui, e a atividade metabólica no local da lesão é reduzida, acabando por parar. ^[40,41]

O resultado da fase de remodelação é uma cicatriz totalmente madura, caracterizada por uma diminuição da densidade das células e dos vasos sanguíneos e por uma elevada resistência à tração. ^[37]

1.4.5. A importância dos fibroblastos na cicatrização e as alterações com o envelhecimento

Os fibroblastos são células altamente ativas e dinâmicas que desempenham uma variedade de papéis no desenvolvimento do organismo, na sua homeostasia e na resposta a lesões. ^[44,47] São essenciais na formação e manutenção da estrutura de diferentes órgãos, incluindo da pele. ^[47]

Quando a pele sofre uma lesão, a primeira linha de defesa do organismo consiste em iniciar o processo de cicatrização, que requer a intervenção de vários tipos de células. ^[45] Nas etapas iniciais da cicatrização, os fibroblastos são fundamentais, já que são as principais células responsáveis por sintetizar e depositar a nova matriz extracelular, que é crucial para reconstituir a estrutura da pele, para além disso, são essenciais na formação do tecido de granulação. ^[45,46]

Por sua vez, um subgrupo de fibroblastos, diferenciam-se em miofibroblastos, devido à exposição à tensão mecânica, e a citocinas como o TGF- β . Estes miofibroblastos são responsáveis pelo encerramento total da ferida após a lesão, uma vez que são capazes de exercer forças contrácteis significativas. ^[2,47] Assim, os fibroblastos, através da interação com outros tipos de células, são essenciais para conseguir o encerramento e o revestimento no local da lesão, servindo não só como sinalizadores, mas também como participantes ativos neste processo coordenado. ^[47,48] No entanto, as vias de sinalização

específicas e a coordenação temporal envolvidas nas interações entre macrófagos, células inflamatórias e fibroblastos não são ainda totalmente compreendidas. [47,48]

Durante as fases mais tardias da cicatrização, especificamente na fase de remodelação, os fibroblastos continuam a desempenhar um papel fulcral. Estabelecem *cross-links* e transformam a MEC inicialmente depositada, substituindo o colagénio tipo III por colagénio tipo I e modificando estruturalmente o tecido de granulação. [47,48] Esta modificação estrutural leva ao fortalecimento e à rigidez da MEC ao longo do tempo, resultando na formação da cicatriz madura. [2,47]

Os fibroblastos são fundamentais para a cicatrização e para a manutenção da estrutura da pele, contudo, as suas funções podem ser afetadas pelo envelhecimento, levando a alterações nas propriedades mecânicas e na saúde geral da pele. [2] Uma das alterações mais conhecidas na derme durante o envelhecimento é a diminuição das fibras de colagénio e elastina. Esta diminuição leva a uma perda global da produção de MEC e

a uma diminuição do número de fibroblastos dérmicos, bem como a um declínio da sua eficiência. [2,48]

Na pele envelhecida, as funções celulares dos fibroblastos são prejudicadas, o que leva a uma diminuição da renovação da MEC e, conseqüentemente, a um comprometimento do fecho da ferida. Além disso, estes fibroblastos envelhecidos podem tornar-se senescentes, um estado caracterizado pela paragem irreversível do ciclo celular. [48] Os fibroblastos senescentes apresentam alterações na síntese e secreção de proteínas, lípidos, metabolitos e ácidos nucleicos específicos. Para além disso, verifica-se uma redução das capacidades biomecânicas dos fibroblastos, o que pode ter um impacto adicional na cicatrização e na reparação de tecidos. [2,48]

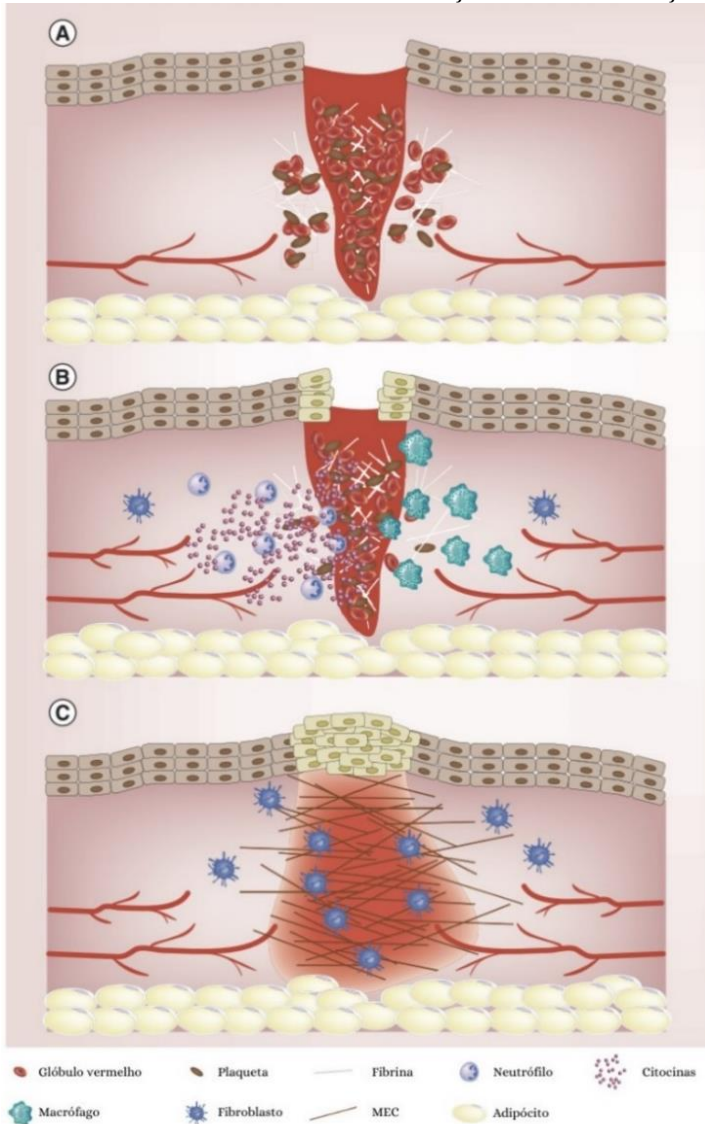


Figura 2. Fisiopatologia do processo de cicatrização.

(A) Durante as primeiras fases da cicatrização, as plaquetas param a hemorragia ao depositarem fibrina no local da ferida. (B) Nas fases seguintes, as células do sistema imunitário, tais como os neutrófilos e os macrófagos, eliminam o tecido morto, enquanto se formam novos vasos sanguíneos. Os fibroblastos preparam-se para a formação de uma cicatriz e os queratinócitos migram para cobrir a ferida. (C) Finalmente, durante a fase de remodelação, os queratinócitos selam a ferida e os fibroblastos depositam nova matriz extracelular, acabando por formar a cicatriz. Os vasos sanguíneos em excesso são removidos e inicia-se a regeneração do nervo. Adaptado de: desJardins-Park et al. (2018). [49]

tecido morto, enquanto se formam novos vasos sanguíneos. Os fibroblastos preparam-se para a formação de uma cicatriz e os queratinócitos migram para cobrir a ferida. (C) Finalmente, durante a fase de remodelação, os queratinócitos selam a ferida e os fibroblastos depositam nova matriz extracelular, acabando por formar a cicatriz. Os vasos sanguíneos em excesso são removidos e inicia-se a regeneração do nervo. Adaptado de: desJardins-Park et al. (2018). [49]

1.5. Doenças concomitantes

A pele fornece os primeiros sinais evidentes de envelhecimento, e representa um espelho da saúde humana, uma vez que pode ser utilizada como modelo para prever doenças sistêmicas e os seus resultados. [50,51] As alterações e a deterioração da funcionalidade da pele começam muito cedo, logo a partir da idade adulta, e com o avançar da idade, a pele torna-se estruturalmente atrófica e, funcionalmente, a sua função de barreira e a sua capacidade de reparação diminuem, isto torna-a suscetível a infeções, secura e prurido. [51,52] Para além disso, outro grande fator que tem um efeito negativo na qualidade de vida, nas interações sociais e na autoestima do indivíduo, é a própria “aparência envelhecida” que surge com a idade. [52]

Fatores intrínsecos, como os fatores genéticos, e fatores extrínsecos, como a radiação UV, a poluição e o tabagismo, contribuem para o envelhecimento da pele, para além disso fatores psicológicos, o stress e a falta de sono também aceleram o processo. [2,53]

O envelhecimento aumenta a probabilidade de desenvolver uma variedade de doenças dermatológicas. Por sua vez, estas doenças crónicas da pele têm um efeito direto na capacidade funcional e psicossocial geral, no bem-estar e na saúde. [52,54]

Os idosos correm um maior risco de desenvolver feridas crónicas, como úlceras venosas, de pressão ou do pé diabético, devido a deficiências de mobilidade e doenças relacionadas com a idade. As feridas crónicas provocam dor, diminuição da mobilidade, isolamento social e impactos emocionais negativos. [52,54,55]

O "aspeto envelhecido" afeta negativamente a autoestima e as interações sociais. As perceções de uma aparência envelhecida são influenciadas por fatores culturais, sendo a juventude altamente valorizada. A aparência envelhecida pode contribuir para o "envelhecimento" nos cuidados de saúde. [52,55]

A pele seca é uma das doenças mais prevalentes nos idosos em todo o mundo. As manifestações graves de pele seca levam à privação do sono, por outro lado, o prurido e o coçar constante provocam efeitos mais graves, incluindo fissuras, hemorragias e infeções, diminuindo substancialmente a qualidade de vida global. [55]

A população idosa enfrenta uma incidência crescente de doenças de pele associadas à idade sumarizadas na **tabela 2**, estas têm impacto na saúde e no bem-estar geral. Os efeitos cumulativos de fatores ambientais como a radiação UV e IV manifestam-se em várias lesões cutâneas, desde pré-malignas a malignas, e alterações cutâneas benignas.^[2,54] À medida que a população idosa aumenta, a melhoria da saúde da pele será cada vez mais valorizada, uma vez que promove diretamente um envelhecimento saudável e ativo.^[55]

Tabela 2. Patologias da pele associadas à idade. Adaptado de: Makrantonaki e Zouboulis (2008).^[54]

Lesões cutâneas comuns (por exemplo, pele seca, telangiectasias, púrpura senil, sardas, lentigos, hipomelanose gutata, mília coloidal, líquen escleroso e atrófico)

Tumores benignos (por exemplo, ceratoses seborreicas, angiomas-cereja)

Tumores pré-malignos (por exemplo, queratose actínica, doença de Bowen)

Tumores malignos (por exemplo, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular, melanoma maligno, linfomas cutâneos, angiossarcoma, carcinoma de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinomas sebáceos e metástases cutâneas)

Doenças infecciosas (por exemplo, dermatofitoses, celulite infecciosa, herpes zóster)

Dermatoses bolhosas (por exemplo, penfigoide bolhoso)

Líquen simples crônico

Prurido

Úlceras de pressão, úlceras dos membros inferiores

Vulvodínia, glossodínia, balanite xerótica

1.6. Tratamentos para o envelhecimento da pele

Atualmente a população deixou de encarar o envelhecimento como um declínio inevitável, e mudou o foco para a manutenção da saúde e a participação numa vida ativa, de forma a conseguir um envelhecimento mais saudável. ^[55] Um aspeto fulcral deste paradigma é o desejo de minimizar os sinais visíveis de envelhecimento. ^[55,56] Trata-se de combater ou prevenir doenças cutâneas, nomeadamente o cancro da pele, e retardar o envelhecimento cutâneo através de uma abordagem multifacetada que engloba terapias locais e sistémicas, dispositivos médicos e até mesmo procedimentos invasivos. ^[50,56] Estas estratégias e terapêuticas podem ser classificadas em três categorias principais: tratamentos tópicos, tratamentos sistémicos e procedimentos invasivos ^[2], que estão resumidos na **tabela 3**. Quando se seleciona a estratégia de antienvelhecimento mais adequada, é importante ter em conta fatores específicos como a idade, o tipo de pele e a saúde do indivíduo em geral. ^[32,56]

Tabela 3. Estratégias dermatológicas de antienvelhecimento. Adaptado de: Chaudhary et al. (2019) e Ganceviciene et al. (2012). ^[22,57]

Estratégia	
Prevenção dos fatores exógenos, correção dos hábitos e do estilo de vida	Tabagismo Poluição Radiação UV Stress Nutrição, restrição alimentar e suplementação alimentar Atividade física Controlo da saúde em geral
Cuidado cosmetológico	Rotina diária de cuidados da pele Proteção solar correta
Medicamentos de uso tópico ou substâncias tópicas	Antioxidantes Reguladores celulares

Procedimentos invasivos	<i>Peelings</i> químicos Dispositivos de luz visível -Luz intensa pulsada (IPL) -Foto-rejuvenescimento com laser ablativo e não ablativo -Radiofrequência (RF) Bioestimulação e injeções de rejuvenescimento Prevenção de rugas dinâmicas Correção de rugas estáticas e anatômicas Restauração (redistribuição) da gordura e perda de volume, reforço e contorno da pele
Tratamentos sistêmicos	Terapia de reposição hormonal Antioxidantes

Uma barreira cutânea saudável e funcional é essencial para garantir a proteção contra a desidratação, os microrganismos, os alergénios, os irritantes, as espécies reativas de oxigénio e a radiação. ^[21,56] O regime diário de cuidados da pele contribui para a regeneração, elasticidade e suavidade da pele, influenciando temporariamente o seu estado. No entanto, o objetivo principal é evitar a degradação do colagénio e da elastina, evitando assim a formação de rugas. ^[21,53]

Outro cuidado cosmetológico fundamental é a proteção contra a radiação ultravioleta. Os filtros UV, tanto inorgânicos como orgânicos, são utilizados para reduzir a exposição à radiação UV, habitualmente é utilizada uma combinação destes filtros nos protetores solares para proporcionar uma proteção abrangente. ^[56,58] Os filtros inorgânicos, como o óxido de zinco e o dióxido de titânio, protegem eficazmente contra a radiação UVB e UVA. Os filtros químicos, como o etilhexil metoxicinamato e o butil metoxidibenzoilmetano, são utilizados para absorver e transformar os fotões UV em calor. ^[21] A utilização de protetor solar e vestuário adequado são essenciais para contrariar os efeitos do fotoenvelhecimento. ^[56]

Tratamentos tópicos (locais): Os tratamentos tópicos são aplicados diretamente na pele e podem ser classificados em dois tipos principais: antioxidantes e reguladores celulares.

[2]

Antioxidantes: Estes incluem as vitaminas C, B3, E, e os polifenóis. Os antioxidantes podem melhorar a elasticidade e reduzir problemas como eritema e distúrbios de pigmentação. Também diminuem a produção de MMPs que degradam o colagénio. [3,53,56]

Reguladores celulares: A vitamina A (retinol) e os seus derivados, como o retinaldeído e a tretinoína, estimulam a síntese de colagénio e de fibras elásticas, atuam tal como antioxidantes e reduzem a produção de MMPs. [56,57]

A combinação de antioxidantes com protetores solares e retinoides aumenta a proteção da pele, particularmente no tratamento do fotoenvelhecimento, causado pela radiação UV e pelos fotodanos ao nível do ADN. [57] Os cremes anti-envelhecimento incorporam frequentemente antioxidantes e reguladores celulares. Os antioxidantes reduzem a degradação do colagénio, minimizando os radicais livres, enquanto os reguladores celulares estimulam a produção de colagénio. [56,58]

Tratamentos invasivos: Os procedimentos invasivos combatem os sinais de envelhecimento, especialmente em áreas foto expostas como o rosto. Estes procedimentos tratam a flacidez da pele, a perda de volume e as alterações na qualidade da pele. [2]

Facelifts: O lifting facial, muitas vezes combinado com a blefaroplastia, pode tratar a flacidez da pele levantando e removendo o excesso de volume. [2]

Enxertos de gordura/Lipolifting: Para regiões com lipoatrofia, os enxertos de gordura podem restaurar o volume, particularmente nas dobras nasolabiais e na região malar. [2]

Dermoabrasão e laserterapia: A dermoabrasão química e os tratamentos a laser podem melhorar a qualidade da pele através da ablação e da renovação da superfície da pele. Os lasers fracionados são normalmente utilizados para o rejuvenescimento da pele, promovendo a produção de colagénio e a contração dos tecidos. [2,56,58] Os dispositivos de HIFU (ultrassom focalizado de alta intensidade), e de radiofrequência (RF) estimulam a neocolagénese, reduzem a flacidez e as rímulas da pele. Os lasers fracionados não ablativos estão a tornar-se cada vez mais procurados devido à redução do tempo de recuperação e do risco de eventos adversos. [56,58]

Medicamentos injetáveis: Os preenchimentos com ácido hialurónico, podem atenuar temporariamente as rugas e as rímulas, enquanto a toxina botulínica (Botox) reduz as rugas dinâmicas causadas por uma atividade muscular excessiva. [2,56]

Plasma rico em plaquetas (PRP): As injeções de PRP têm sido exploradas pelo seu potencial no rejuvenescimento da pele, mas é necessária mais investigação para comprovar os seus efeitos nos fibroblastos e na textura da pele. [2,56]

Tratamentos sistémicos: Os tratamentos sistémicos procuram combater o envelhecimento de dentro para fora, e incluem: antioxidantes, e tratamentos hormonais. [2] Torna-se relevante referir que a associação de tratamentos tópicos com tratamentos sistémicos incide na saúde da pele tanto do ponto de vista interno como externo. Assim, a utilização sinérgica de nutrientes específicos, como as vitaminas A, E e C, juntamente com minerais essenciais como o zinco, o cobre e o selénio, reforça as defesas antioxidantes da pele. [59]

Antioxidantes: Os antioxidantes administrados por via oral, como a vitamina C, E, a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a coenzima Q10 neutralizam as espécies reativas de oxigénio, reduzindo a degradação do colagénio. [2,57]

No entanto, estes suplementos devem ser tomados com precaução, uma vez que a ingestão excessiva de β -caroteno, vitaminas A e E pode provocar efeitos adversos, especialmente em indivíduos com uma boa nutrição, como tal deve ser feita uma avaliação individual antes de iniciar este tipo de tratamento. [53]

Tratamentos hormonais: A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) tem vindo a ganhar relevância, particularmente em indivíduos na pós-menopausa. [56] O estradiol, quando aplicado topicamente, aumenta a espessura da pele, a proliferação de queratinócitos e melhora a hidratação e a textura da pele. O creme de progesterona aumenta a elasticidade da pele, reduz as rugas e aumenta a firmeza da pele. [56,57] A desidroepiandrosterona, é um androgénio eficaz na inversão da deterioração das funções da pele associada à idade, aumentando a expressão do colagénio e inibindo as MMPs induzidas pelos raios UV. [56,57] No entanto, é essencial notar que a TRH pode aumentar o risco de cancro da mama, logo este tipo de tratamento requer uma análise cuidadosa. [57]

Tendo em conta as mudanças demográficas mundiais, a medicina preventiva e o acompanhamento da saúde da população estão a tornar-se cada vez mais importantes, tendo em vista não só prolongar, mas também melhorar a qualidade de vida. [21] As táticas antienvelhecimento estão a evoluir rapidamente, apostando cada vez mais em novos tratamentos para ajudar as pessoas a envelhecer de forma saudável. Um exemplo

interessante é o aparecimento da senoterapia, uma nova e promissora abordagem para combater o envelhecimento da pele, em particular, os fármacos senolíticos, que eliminam seletivamente as células senescentes, e os fármacos senomórficos, que inibem os efeitos nocivos das secreções das células senescentes (SASPs).^[3,58] Estes desenvolvimentos podem oferecer novas opções terapêuticas, mas é necessária mais investigação para melhorar a sua especificidade, seletividade e eficácia.^[58]

1.6.1. Tratamentos e substâncias de uso tópico

Dado o tema em estudo, surge uma especial importância em abordar de uma forma mais aprofundada os tratamentos e substâncias de uso tópico. Entre as estratégias apresentadas para combater o envelhecimento da pele, observa-se uma preferência crescente por alternativas mais económicas e menos invasivas, esta tendência deu origem à emergência dos "cosmecêuticos", uma categoria de produtos de cuidados da pele com substâncias biologicamente ativas.^[61-63] O aparecimento dos cosmecêuticos alinha-se perfeitamente com os conhecimentos atuais sobre a anatomia e a fisiologia da pele, refletindo o pressuposto de que quase todas as substâncias aplicadas na pele podem penetrar e provocar alterações na sua estrutura.^[64,65]

Estes produtos são formulações de aplicação tópica, e funcionam na interface entre os cosméticos e os fármacos, visto que incorporam substâncias ativas elaboradas para influenciar as funções biológicas da pele.^[61,62] De um modo geral, funcionam estimulando ativamente a produção colagénio, atenuando o impacto dos radicais livres e preservando a estrutura da queratina, sumariamente contribuem para uma pele mais saudável e resistente.^[65] O cosmecêutico ideal deve apresentar resultados imediatos e duradouros, com poucos efeitos secundários, bons fatores de conformidade, como uma textura favorável, controlo da pigmentação e fácil aplicabilidade.^[62]

Embora não existam evidências definitivas que demonstrem a eliminação completa dos sinais associados ao envelhecimento da pele através de substâncias ou tratamentos tópicos, existem produtos que reduzem ou retardam visivelmente estas manifestações.^[66] No panorama atual, as preparações cosmecêuticas apresentam uma

vasta gama de moléculas com eficácia cientificamente comprovada, que estão apresentadas na **tabela 4**.

Tabela 4. Substâncias ativas comuns utilizadas em produtos cosmeceuticos.
Adaptado de: Draelos, Z. D., Dover, J. S., & Alam, M. (2014).^[61]

Categoria	Substâncias ativas	
<u>Vitaminas</u>	- Vitamina A (ácido retinóico) - Vitamina B - Vitamina B3 (niacinamida) - Pró-vitamina B5 (pantenol) - Beta-caroteno - Vitamina C (ácido L-ascórbico) - Vitamina E (alfa-tocoferol)	- Retinaldeído - Retinol - Acetato de retinol - Ésteres de retinol - Palmitato de retinol - Propionato de retinol
<u>Vitaminas sintéticas</u>	- Adapaleno - Tazaroteno - Tretinoína	
<u>Minerais</u>	- Cobre - Selénio - Zinco	
<u>Antioxidantes</u>	- Ácido alfa-lipóico (ALA) - Catalase - Dimetilaminoetanol (DMAE)	- Glutationa - Idebenona - Coenzima Q10 (ubiquinona)
<u>Hidroxiácidos</u>	- Alfa-hidroxiácidos (ácidos glicólico, láctico e málico) - Beta-hidroxiácidos (ácido salicílico) - Di-hidroxiacetona - Ácido 4-hidroxi-retinóico	- Lanolina - 4-oxo-ácido retinóico - Polihidroxiácidos (gluconolactona, ácido lactobiónico)
<u>Lípidos</u>	- Glucosilceramida	- <i>Ginkgo biloba</i>
<u>Glicosaminoglicanos</u>	- Ácido hialurónico	
<u>Produtos botânicos</u>	- Alantoína - Aloé vera - Arnica - Bisabolol - Camomila - Capsaicina	- Hamamélis - Lavanda - Papaia - Salgueiro-branco - Soja

	<ul style="list-style-type: none"> - Ceramidas - Chás (branco, preto, verde) - Cinamato - <i>Ginseng</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Sylimarín (Cardo Mariano) - Óleo da árvore do chá - Uva-ursina
<u>Hidratantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Acilceramida - Ácido linoleico - Colesterol 	<ul style="list-style-type: none"> - Esqualeno - PCA de sódio - Petrolatum
<u>Agentes despigmentantes</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido azelaico - Ácido kójico - Hidroquinona 	
<u>Filtros solares</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Antralinato - Ácido <i>p</i>-aminobenzoico - Padimato A - Padimato O 	

1.7. A importância do zinco

O zinco é um elemento químico que se encontra inserido na classe dos metais de transição, e como um dos microelementos mais abundantes no corpo humano, a sua importância é evidente em vários processos fisiológicos. ^[67,71,72] Sendo um ião catalisador estrutural e regulador, o zinco desempenha um papel essencial na atividade biológica de várias enzimas, proteínas e fatores de transcrição, por sua vez estas funções enzimáticas e de sinalização estendem-se a atividades como a proliferação celular e a estabilidade do genoma. ^[67,68,71] Assim, este microelemento influencia várias vias metabólicas e é responsável pelo bom funcionamento do organismo como um todo. ^[71,72]

Aproximadamente 6% da concentração total de zinco no corpo humano encontra-se na pele, tendo um papel central na manutenção e reparação dos tecidos cutâneos. ^[72,76,78] Este microelemento contribui para a estabilidade da pele, através do reforço da membrana celular e do suporte de várias metaloenzimas, como as metaloproteínas da matriz. ^[67,71] Por outro lado, níveis adequados de zinco são cruciais para a sobrevivência e proliferação dos queratinócitos e para manter uma pele saudável. Verificou-se também

que o zinco é benéfico em várias doenças dermatológicas, desde infecções a dermatoses inflamatórias e distúrbios pigmentares. [70,72,75]

O controlo da homeostase intracelular do zinco é um processo complexo que envolve proteínas especializadas, designadas por metalotioneínas (MT). Estas proteínas funcionam como agentes de armazenamento e transporte do zinco, e também desempenham um papel fundamental na epiderme e nos tecidos dérmicos. A sinalização intracelular do zinco é coordenada por duas famílias de proteínas: os transportadores de efluxo de zinco (ZnT) e os transportadores de influxo de zinco (ZIP). [68,71,76] As proteínas ZnT exportam zinco dos compartimentos celulares, enquanto as proteínas ZIP importam zinco para o interior da célula. A regulação destes transportadores influencia a distribuição espaço-temporal do zinco. [68,76]

O zinco também desempenha um papel fundamental no processo de cicatrização, garantindo que os tecidos danificados sejam restaurados de forma eficiente. A sua contribuição na cicatrização desenrola-se em várias fases, cada uma com funções específicas. [69,70]

Em primeiro lugar, na fase de hemóstase, o zinco aumenta a atividade e a agregação das plaquetas, facilitando a formação de coágulos e fortalecendo o tampão da ferida. Passando à fase de inflamação, destaca-se a sua influência na resposta imunitária, visto que os marcadores inflamatórios, as citocinas e os níveis de stress oxidativo são todos modulados pelo zinco, e a sua insuficiência pode mesmo levar a um aumento da inflamação, prejudicando a capacidade do sistema imunitário de responder eficazmente às lesões. [69,72-74] O seu papel também se estende aos neutrófilos e fagócitos, visto que quando o zinco está em falta, a sua função pode ficar comprometida. [69,75]

Por fim, este desempenha um papel importante na fase final da cicatrização, visto que influencia a deposição da matriz extracelular, aumenta a atividade dos fibroblastos e facilita a migração das células epiteliais. [69,72,73] Também é essencial ao nível das metaloproteinases da matriz dependentes de zinco, que são fundamentais na fase de remodelação, e o zinco garante o seu funcionamento eficaz. O seu papel como cofator essencial para a sinalização SMAD é crucial para a formação do tecido de granulação. [69]

Dada a grande variedade de processos em que o zinco está envolvido, naturalmente desempenha um papel fulcral em vários aspetos do envelhecimento e das

doenças que surgem com a idade. [68,79] Um dos papéis significativos do zinco no envelhecimento é o seu impacto na imunosenescência, que se caracteriza por uma regulação anormal das respostas imunitárias. A deficiência de zinco pode contribuir para a imunosenescência, resultando num baixo estado inflamatório, o que aumenta a suscetibilidade a infeções, e reduz a eficácia das vacinas. [68,80] Durante o processo de envelhecimento, a homeostasia do zinco pode ser perturbada, isto leva à redução da sua disponibilidade intracelular, afetando a funcionalidade das células imunitárias e aumentando o risco de doenças relacionadas com a idade. [80]

O papel diversificado do zinco e os seus efeitos benéficos para a saúde em geral, resultaram na sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicação tópica e, posteriormente, em produtos cosméticos. [72] A resposta da pele às aplicações tópicas de zinco está bem documentada, bem com os seus atributos anti-inflamatórios, antimicrobianos, e antioxidantes, tornando-o, assim, numa excelente opção para inúmeras doenças dermatológicas. [70,72,74]

A pele sendo um órgão facilmente acessível, serve como um modelo valioso para compreender o processo de envelhecimento nos seres humanos. [56] Os sinais característicos do envelhecimento da pele, como as rugas e a flacidez, resultam principalmente de alterações substanciais na estrutura dérmica, e de uma redução na síntese de colagénio por parte dos fibroblastos. [54,80]

Na prática clínica, destaca-se a importância de compreender os desejos dos doentes, e a sua orientação para formas de tratamento que correspondam às suas expectativas, tendo em conta vários fatores como a idade, procedimentos anteriores, tipo de pele e estilo de vida, uma vez que estes desempenham um papel fundamental na obtenção dos resultados desejados. [54,56]

Em resposta ao conceito da saúde e da aparência da pele como uma das componentes integrais do bem-estar geral, foi desenvolvida nos últimos anos uma série de estratégias de antienvelhecimento, que incluem medidas preventivas, intervenções cosmetológicas, tratamentos tópicos e sistémicos e procedimentos invasivos. [56] Entre estas estratégias, surge um foco no papel dos fibroblastos, dada a sua capacidade de influenciar uma vasta gama de processos celulares e tecidulares, o que sublinha a importância do estudo destas células no contexto do envelhecimento cutâneo. [47,56]

O zinco, por sua vez, apresenta um papel fundamental no corpo humano, sendo um constituinte vital de muitas enzimas, com impacto em vários processos metabólicos, e contribuindo para o funcionamento correto dos tecidos e órgãos. [72] As suas propriedades protetoras contra os radicais livres e a radiação UV, bem como o seu papel na regulação da queratinização e da proliferação de fibroblastos, fazem dele um potencial candidato no campo das terapêuticas dermatológicas. [69,72,73] O zinco aplicado topicamente tem demonstrado eficácia na cicatrização de feridas, na regulação do sebo e como agente antisséptico e antibacteriano, sendo por isso alvo de investigação e desenvolvimento contínuos. [72,74]

O modo de ação de muitos produtos antienvhecimento permanece pouco claro, e uma forma de comprovar a sua eficácia é através de testes *in vitro*, dada a crescente preocupação com o bem-estar animal, que levou ao desenvolvimento deste tipo de modelos para a investigação científica. [22,82]

1.7.1. O potencial terapêutico do zinco

O zinco tanto na forma elementar como na forma de sal, tem sido utilizado terapêuticamente durante séculos, a sua aplicação tópica, através de formulações como o óxido de zinco e a piritionato de zinco, oferece fotoproteção e benefícios anti-inflamatórios, tornando-o valioso no tratamento de várias patologias da pele tal como é possível verificar na **tabela 5**. Estas patologias vão desde infeções como verrugas a dermatoses inflamatórias como a acne vulgar, bem como distúrbios pigmentares como o melasma e neoplasias como o carcinoma basocelular. [75-77]

Tabela 5. Utilizações terapêuticas do zinco. Adaptado de: Gupta et al. (2014) e Al-Khafaji et al. (2022). [75,76]

Patologia	Via de administração
Verrugas	Tópica, oral
Leishmaniose cutânea	Oral, intralesional
Lepra ou hanseníase	Oral
Herpes genital	Tópica
Dermatofitoses	Tópica

Bromidrose	Tópica
Pitiríase versicolor	Tópica
Acne vulgar	Tópica, oral
Rosácea	Oral
Hidradenite supurativa	Oral
Psoríase e artrite psoriática	Tópica, oral
Eczema	Tópica
Úlceras	Tópica, oral
Doença de Behçet e aftas orais	Oral
Alopécia areata	Oral
Líquen plano oral	Tópica
Xeroderma pigmentoso	Tópica
Queratoses actínicas	Tópica
Carcinoma basocelular	Intralesional
Vitiligo	Oral
Melasma	Tópica
Queloides	Tópica
Anti-envelhecimento	Tópica

Apesar do zinco oral ser utilizado no tratamento de síndromes de deficiência de zinco, o recente reconhecimento da sua importância como micronutriente para o crescimento infantil sublinha o seu significado mais amplo. As funções fisiológicas do zinco, incluindo o apoio imunitário, a cicatrização de feridas e a proteção UV, derivam do seu papel no metabolismo e no desenvolvimento ósseo. [77] Apesar de os produtos cosméticos que contêm zinco possam oferecer alguns benefícios, a sua eficácia é limitada devido à fraca absorção cutânea do zinco. Apesar desta limitação, a investigação em curso continua a descobrir as funcionalidades específicas de diferentes compostos de zinco, enriquecendo a nossa compreensão do seu potencial terapêutico na prática dermatológica. [75,77]

1.8. Modelos de cicatrização da pele

A elaboração e otimização de formulações com ação tópica exigem modelos da pele bem desenvolvidos. Estes modelos servem como ferramentas essenciais para identificar e avaliar as propriedades das formulações, pois permitem determinar as principais características que influenciam a absorção do fármaco, e posteriormente facilitam a otimização da formulação. [83,84]

Na **figura 3** são apresentados os modelos de cicatrização da pele mais utilizados atualmente, incluindo modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. [85] Nas experiências desenvolvidas para este trabalho foram utilizados modelos *in vitro*, que estão a revolucionar o processo de desenvolvimento e as estratégias de formulação de novos produtos cosméticos, sendo uma opção mais segura, e adequada à legislação, visto que muitos destes modelos surgem como uma alternativa promissora aos modelos animais. [86]

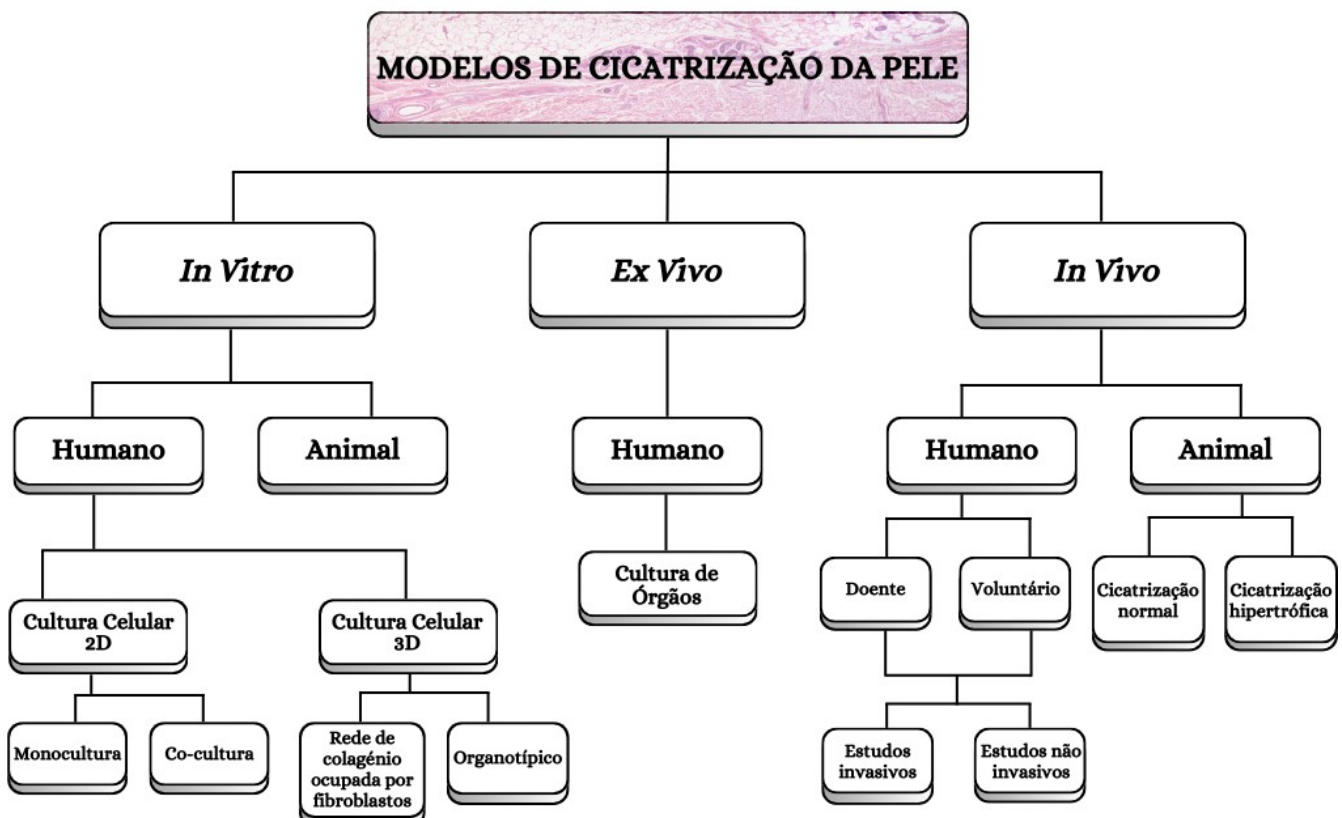


Figura 3. Modelos animais e humanos de cicatrização da pele mais relevantes atualmente. Adaptado de: Neves et al. (2022).^[85]

Com o decorrer dos anos, têm-se desenvolvido modelos experimentais que vão desde *in vitro* e *ex vivo* até aos modelos de cicatrização *in vivo*, com incorporação de pele de origem animal e humana.^[86] A utilização de modelos animais foi, durante muito tempo, a principal abordagem no desenvolvimento de ensaios pré-clínicos de novos fármacos, bem como na otimização de formulações destinados ao uso tópico. As recentes alterações regulamentares na classe dos cosméticos mudaram o foco para modelos *in vitro*, particularmente no que diz respeito aos estudos de penetração, permeabilidade e irritabilidade da pele.^[83,84,86]

Os modelos de cicatrização da pele variam em termos de complexidade, sendo os ensaios com uma cultura celular em monocamada 2D os mais comuns, nestes modelos a monocamada confluenta é "ferida" pela remoção forçada de uma secção de células, enquanto a restante monocamada "cura" através de uma coordenação entre a migração, disseminação e proliferação celular. Embora sejam económicos e simples de manter, os sistemas 2D não têm a capacidade de imitar as estruturas e interações da pele num contexto 3D.^[87-89] Por outro lado, as amostras de pele *ex vivo* permitem uma representação mais próxima dos constituintes da pele, mas são limitadas pelas restrições e variabilidade dos doadores. O desenvolvimento dos sistemas de cultura 3D *in vitro*, que incorporam componentes imunitários, ganharam interesse por permitirem recriar as características fisiológicas da pele, incluindo a função de barreira, a estrutura 3D e as reações imunitárias, num único sistema.^[85-89]

Os modelos experimentais, como a cultura organotípica *in vitro* e a cultura de órgãos *ex vivo*, melhoraram a compreensão relativamente ao processo de cicatrização, e demonstraram ser eficazes na simulação da formação e tratamento de diferentes tipos de cicatrizes. Por sua vez, os modelos *in vivo* permitiram a investigação dos mecanismos moleculares, celulares e estruturais envolvidos na cicatrização, utilizando amostras tanto humanas como animais.^[85,86,89]

Dada a temática da presente tese vamos focar a atenção nos modelos de cultura de células 2D, e tal como mencionado anteriormente são os mais simples e mais frequentemente utilizados, estes apresentam duas abordagens principais representadas na

figura 4: as monoculturas de fibroblastos derivados da pele, e as co-culturas que associam esses fibroblastos com outros tipos de células, como queratinócitos ou células imunitárias. Estes modelos têm como objetivo investigar os mecanismos celulares que regulam a cicatrização com o auxílio dos fibroblastos, e avaliar o efeito dos agentes terapêuticos. [85]

Estes modelos constituem uma ferramenta essencial numa fase inicial do desenvolvimento de fármacos, apresentando vantagens significativas, nomeadamente a reprodutibilidade, o baixo custo e a facilidade de manipulação, o que permite uma avaliação rápida e uma otimização mais eficaz das formulações destinadas à pele. [90-92]

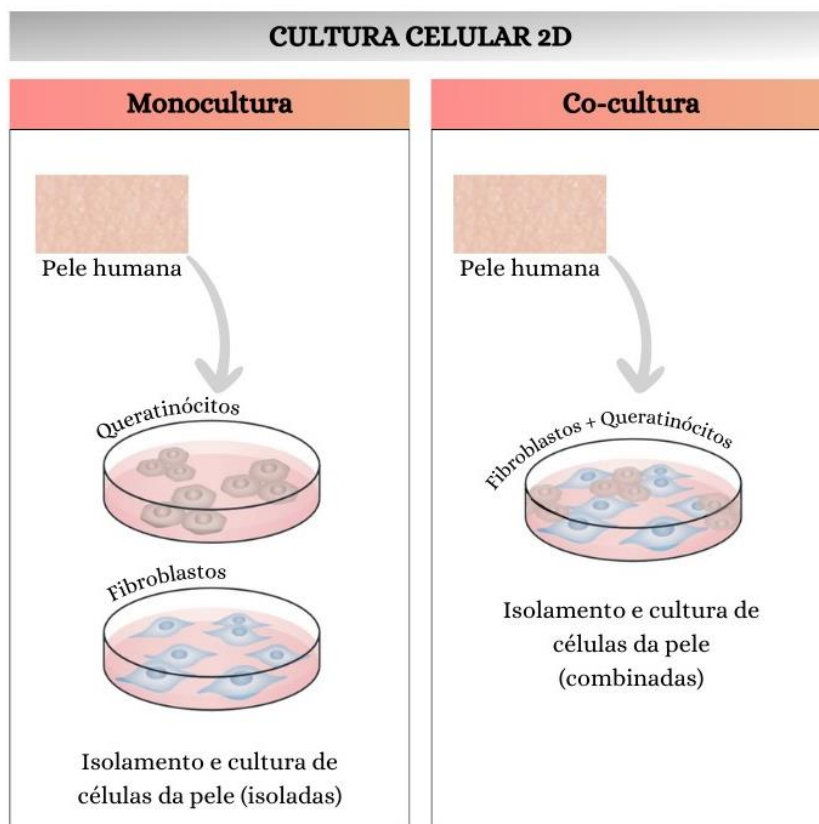


Figura 4. Modelos de cicatrização *in vitro*. Representam uma monocultura (células isoladas), e uma co-cultura (células combinadas), distribuídas numa monocamada de fibroblastos e queratinócitos derivados da pele humana. Adaptado de: Neves et al. (2022). [85]

2. OBJETIVO

Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do zinco no comportamento celular, usando como modelo uma linha celular de fibroblastos da pele humana (BJ-5ta), de forma a avaliar o potencial deste microelemento como um agente de antienvhecimento. Portanto, pretende-se fazer uma revisão e identificação do estado da arte sobre as aplicações do zinco no tratamento da pele e na sua cicatrização, bem como a aquisição de conhecimento sobre técnicas laboratoriais na área de cultura de tecidos, os quais foram posteriormente utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental.

Objetivos Específicos

No contexto do trabalho laboratorial, os objetivos específicos incluem o desenvolvimento da cultura celular, a preparação de diferentes concentrações de zinco (0,1 μM ; 1,0 μM ; 10 μM), e a avaliação do efeito deste composto em diversos ensaios celulares, tais como o ensaio de MTT, o ensaio de proliferação e o ensaio de migração. Em conjunto, estes ensaios irão contribuir para uma melhor compreensão do papel do zinco e o seu efeito nos fibroblastos da pele, especialmente no que se refere às suas potenciais aplicações terapêuticas.

3. METODOLOGIA

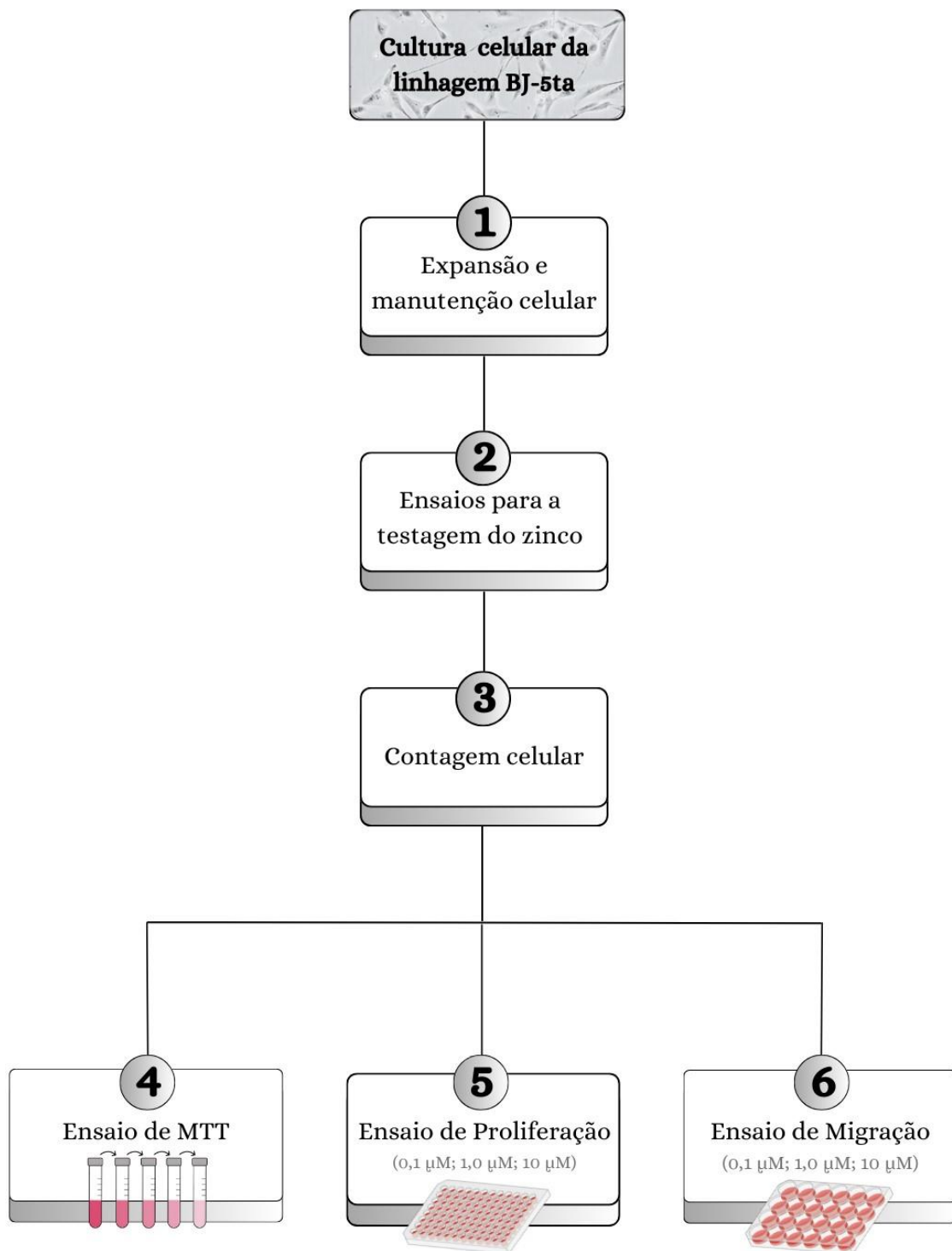


Figura 5. Fluxograma-resumo dos diversos métodos utilizados ao longo do trabalho.

Depois de ser realizada a cultura das células selecionadas, (1) foram utilizados diversos métodos para o crescimento e manutenção das mesmas. Posto isso, (2) procedeu-se à realização dos ensaios que permitiram testar as diferentes propriedades do zinco. (3) A contagem celular foi realizada no início de cada ensaio, de modo a garantir a concentração desejada de células em cada poço. Após a preparação de diluições seriadas a partir de uma solução stock de zinco, (4) foram realizados três ensaios de citotoxicidade (MTT), que avaliaram a viabilidade das células, para além disso os seus resultados permitiram selecionar as concentrações de zinco a utilizar nos ensaios seguintes. (5) Seguidamente, foram realizados dois ensaios de proliferação, que tiveram como objetivo avaliar a atividade metabólica da cultura de células após serem expostas às diferentes concentrações da substância em estudo. (6) Por fim, foram realizados três ensaios de migração ou “*wound healing*”, que permitiram avaliar o comportamento celular, e o impacto que as diferentes concentrações de zinco teve na migração das células durante a cicatrização.

3.1. Cultura celular

Neste trabalho foi utilizada a linha celular BJ-5ta, esta é constituída por fibroblastos humanos do prepúcio de recém-nascido, imortalizados com hTERT (transcriptase reversa da telomerase humana), e foi adquirida pelo laboratório à American Type Culture Collection (ATCC®) [93]. Ao longo do trabalho foram postos em prática diversos métodos tais como a reposição de meio, e a passagem de células, de forma a manter a qualidade e a quantidade de células necessárias. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/ Medium 199 (M199)) (4:1), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 unid + 100 mg) /100 mL, 1% de anfotericina B 250 µ/mL e 1% de higromicina B 0,01 mg/mL). Durante o desenvolvimento do trabalho estas células foram incubadas nas condições ideais de 37°C e 5% de CO₂.

3.1.1. Caracterização da cultura celular

As células BJ-5ta são uma linhagem de fibroblastos imortalizadas com hTERT (transcriptase reversa da telomerase, subunidade da enzima telomerase que apresenta dependência pelo ARN), derivadas do prepúcio do humano. [93,108] Estas células foram obtidas através da transfecção da linha celular de fibroblastos do prepúcio BJ, com o plasmídeo pGRN145 de expressão de hTERT. [108]

Quando observada ao microscópio, esta linha celular apresenta características tipicamente encontradas nos fibroblastos, nomeadamente a sua morfologia fusiforme, e uma boa capacidade de aderência à superfície da cultura, tal como pode ser observado na **figura 6**. Para além disso, estas células são capazes de pelo menos 10 duplicações da população, sendo por isso, amplamente utilizadas como modelo *in vitro* para aplicações de cicatrização de feridas, engenharia de tecidos, entre outros. [93]

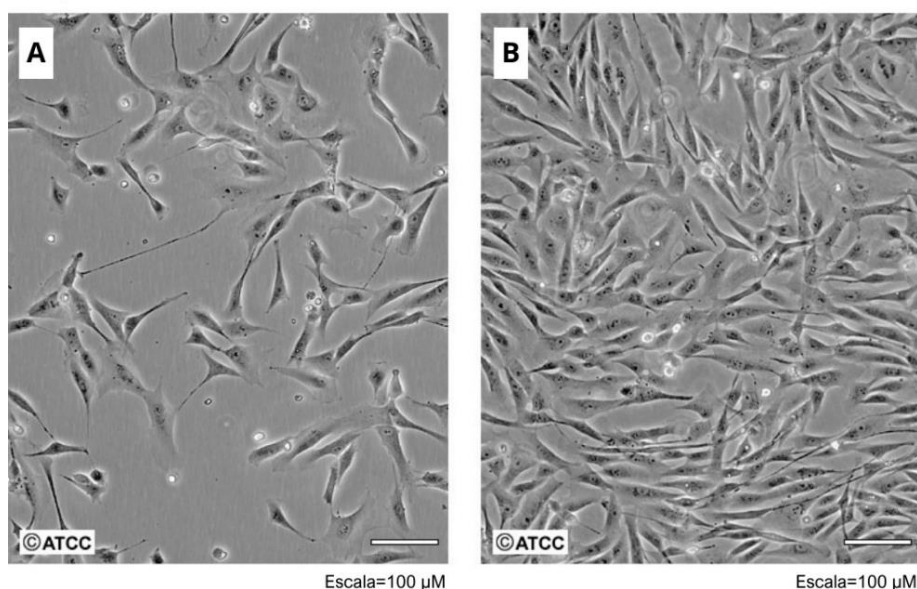


Figura 6. Imagem microscópica das células BJ-5ta. (A) Imagem das células com uma densidade menor. (B) Imagem das células com uma densidade maior. Adaptada de: *BJ-5ta - CRL-4001 | ATCC (n.d).* [93]

3.2. Expansão e manutenção da cultura celular

Ao longo do estudo foram utilizadas diversas técnicas para garantir que as células se mantivessem em meios, e em números apropriados, visto que a limitação de nutrientes, a acumulação de metabólitos tóxicos, ou a falta de superfície podem interromper o seu crescimento, e até mesmo levar à perda da sua viabilidade. Durante a realização do trabalho pode ser necessária uma densidade celular mais elevada, e como tal, pode ser necessário efetuar a reposição de meio, ou a passagem das células para novos frascos tal como indicado na **figura 7**.

- Reposição de meio:

O meio de cultura antigo foi aspirado, e seguidamente a placa foi lavada com tampão fosfato salino (PBS 1x), sendo substituído por novo meio previamente aquecido, de forma a evitar o choque térmico das células. Este processo foi repetido a cada 48 horas para garantir o fornecimento adequado de nutrientes às células e a manutenção do pH, necessários para o crescimento e divisão celular.

- Tripsinização e passagem de células:

Antes de realizar qualquer procedimento, foi necessário observar ao microscópio as placas das culturas celulares, e quando estas atingiram cerca de 70 a 80% de confluência procedeu-se à passagem das células. Para efetuar subculturas, foi necessário proceder à tripsinização, que consiste na desagregação enzimática das células através da ação da tripsina, este passo é essencial para libertar as células aderentes do frasco. Iniciou-se este processo aspirando o meio do frasco de cultura. Seguidamente, lavou-se o frasco com tampão fosfato (PBS 1x), com agitação suave, e aspirou-se. Adicionou-se lentamente a Tripsina/EDTA (1x) ao frasco com agitação suave, de forma que chegasse a todas as células. O frasco foi incubado a 37°C e 5% de CO₂ durante 5 a 7 minutos.

Após o período de incubação verificou-se ao microscópio se as células estavam completamente soltas, e adicionou-se, então, novo meio de cultura para neutralização da tripsina. As células foram ressuspensas com o auxílio de uma pipeta, e um movimento

“*up and down*”, e colocou-se a nova solução de células em dois frascos onde se adicionou novo meio de cultura completo. Este procedimento repetiu-se antes de cada ensaio descrito ao longo do trabalho. Todas as etapas que envolviam manipulação das células, foram efetuadas no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical, tomando sempre precauções rigorosas para esterilizar e desinfetar tanto antes como após cada passo do processo.

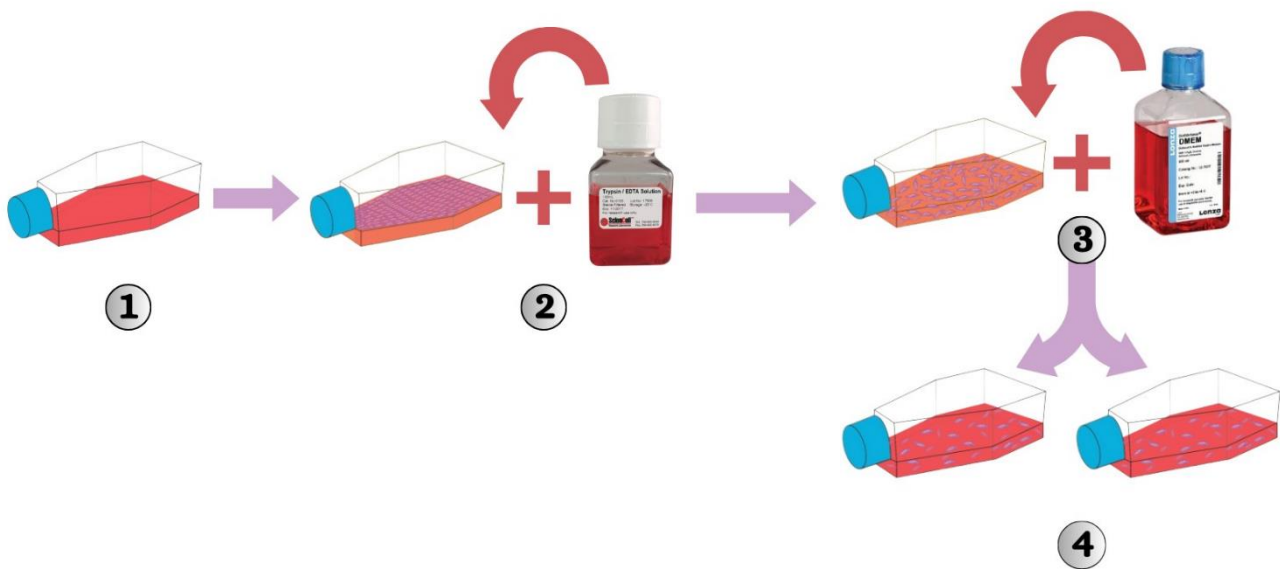


Figura 7. Esquema representativo das diversas técnicas utilizadas ao longo do trabalho para realizar a passagem das células. (1) Inicialmente é realizada a incubação das células em condições ideais. Quando a cultura de células atinge o estado máximo de confluência, pode ser necessário efetuar uma ou mais passagens. (2) Adiciona-se tripsina ao frasco de modo a libertar as células aderentes, e coloca-se a incubar durante 5 a 7 minutos. (3) Com o processo de tripsinização concluído, é necessário ressuspender as células, para isso pipetam-se 3 mL de novo meio de cultura completo, previamente aquecido, para o frasco com um movimento “*up and down*”. (4) Por fim, divide-se a nova solução de células em dois frascos, e seguidamente adiciona-se 3,5 mL de novo meio em cada uma das subculturas.

3.3. Contagem de células

No presente estudo, a contagem de células foi realizada através de dois métodos diferentes, dependendo do objetivo pretendido:

- 1) Utilizando a câmara de *Neubauer*;
- 2) Corando os núcleos das células com DAPI, e posteriormente utilizando o programa ImageJ para a efetuar a contagem.

3.3.1. Câmara de *Neubauer*

Realizou-se a contagem de células com o objetivo de calcular o volume de células a ser adicionado a um novo frasco ou a uma placa, visando alcançar uma concentração de $1,0 \times 10^5$ cél/mL. Essa concentração foi previamente otimizada em ambiente laboratorial para padronizar a quantidade de células a ser usada em vários ensaios, garantindo uniformidade em todos os poços. Neste caso como as células não estão em grande número não é necessário fazer uma diluição. Após a homogeneização, foram pipetados 10 μ L da suspensão em cada um dos quadrantes da câmara de *Neubauer*, também conhecida como hemocitómetro. A câmara de *Neubauer* é uma lâmina de vidro espessa com dois quadrados marcados no centro, onde a solução celular a ser contada é depositada. Para assegurar a precisão da contagem, é fundamental realizar cuidados de limpeza na câmara e na lamela antes de cada utilização do hemocitómetro, garantindo a ausência de material particulado que possa interferir na contagem.

Utilizando um microscópio ótico invertido Olympus® CKX41 com uma objetiva de 10x, procedeu-se à contagem das células nos oito quadrantes tal como indicado na **figura 8**.

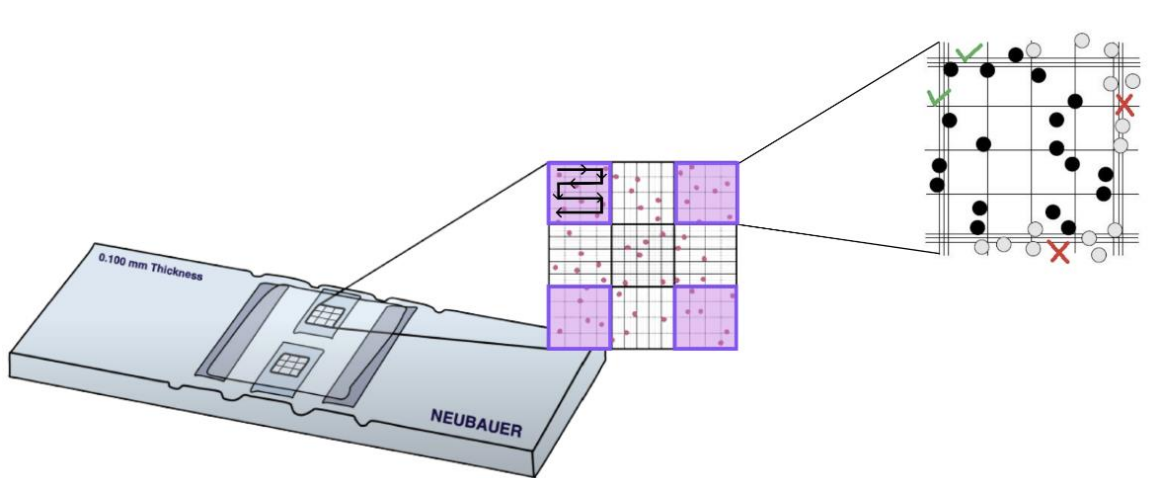


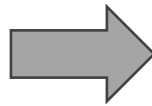
Figura 8. Representação da contagem com a câmara de *Neubauer*. Adaptada de: Team (2019) e Bastidas (n.d.). [94,95]

A média do número de células em cada quadrante foi calculada, bem como a concentração total de células, conforme indicado na **equação 1**:

$$(Eq. 1) \text{ Concentração} = \text{Média dos 4 quadrantes} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \text{ cél/mL}$$

Com a concentração obtida calculou-se o volume de células necessário para perfazer a solução desejada, a partir das **equações 2 e 3**:

$$(Eq. 2) C_i \times V_i = C_f \times V_f$$



$$(Eq. 3) V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

3.3.2. ImageJ

Este método de contagem foi utilizado no ensaio de proliferação, visando quantificar o número de células expostas ao zinco ao longo de vários dias. O propósito

deste ensaio consistiu em investigar o impacto do zinco na proliferação das células BJ-5ta, ocorrendo uma avaliação diária de forma a monitorizar os efeitos do composto na taxa de proliferação ao longo do tempo.

Neste ensaio, as células foram contadas no programa ImageJ, para tal as imagens foram divididas em quadrados de $6,52 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ e foram contabilizados 12 quadrados no total. Após a contagem, a partir da **equação 4**, foi possível extrapolar o número de células e obter um gráfico de proliferação das células BJ-5ta sob a influência de diferentes concentrações de zinco.

$$(Eq. 4) \frac{0,32 \times n^{\circ} \text{ de células contadas}}{0,078}$$

Na equação acima os 0,32 cm representam a área do poço em cm^2 . A área da grelha tem $1,9 \times 10^{-1} \text{ cm}^2$ e contém cerca de 60 quadrados, dos quais apenas 12 foram contados e que apresentam uma área de $0,078 \text{ cm}^2$ no ImageJ.

3.4. Preparação das diluições seriadas

Antes de avançar para qualquer um dos ensaios foi necessário preparar diluições seriadas de cinco concentrações diferentes. Inicialmente preparou-se a solução stock, dissolvendo $6,8 \times 10^{-3} \text{ g}$ de ZnCl_2 ($M=136,30 \text{ g/mol}$), em 5 mL de água, para obter uma concentração de $10000 \mu\text{M}$. Seguidamente foi possível elaborar as seguintes diluições tal como indicado na **figura 9**, utilizando as equações 2 e 3, apresentadas anteriormente.

A diluição em série é uma técnica que envolve uma sequência de diluições progressivas, a partir de uma solução stock, reduzindo gradualmente a sua concentração, sendo que cada diluição utiliza o material da etapa anterior como base. As diluições seriadas são normalmente utilizadas para determinar a concentração desejada de uma substância. ^[96]

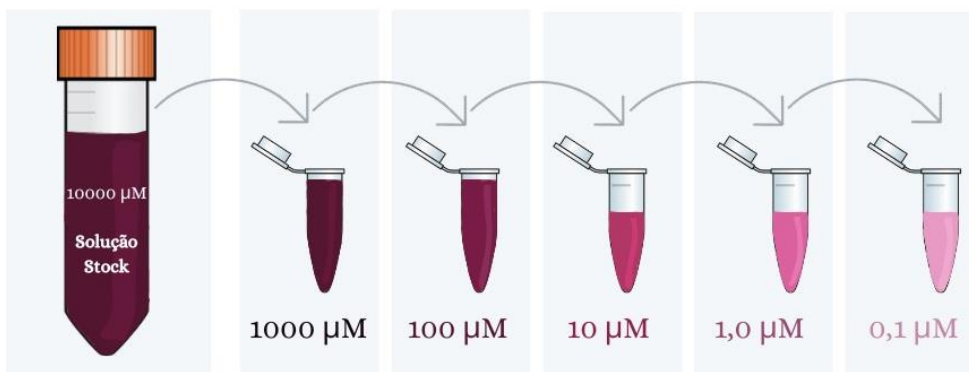


Figura 9. Representação da preparação de diluições seriadas a partir de uma solução stock de zinco. A primeira diluição de 1000 µM, resulta da junção de 150 µL da solução stock com 1350 µL de meio; a segunda diluição de 100 µM, resulta da junção de 150 µL da primeira diluição com 1350 µL de meio; foi acrescentada também uma terceira diluição de 50 µM que não está representada na figura, de forma a abranger uma gama maior de concentrações, e esta resulta da junção de 500 µL da segunda diluição com 500 µL de meio; a quarta diluição de 1,0 µM, resulta da junção de 200 µL da terceira diluição com 800 µL de meio; por fim a quinta diluição de 0,1 µM, resulta da junção de 200 µL da quarta diluição com 800 µL de meio.

3.5. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio] é um ensaio colorimétrico de citotoxicidade^[97], e foi utilizado para selecionar as concentrações mais adequadas de zinco para utilizar nos ensaios seguintes.

Funciona com base no princípio de que a atividade mitocondrial está diretamente associada com o número de células viáveis. Este ensaio é realizado na ausência de luz, e envolve a redução do MTT, que é um sal amarelo solúvel em água, a cristais de formazan que exibem uma coloração azul-escura.^[97-99] As alterações na concentração de formazan estão diretamente correlacionadas com alterações no número de células viáveis, detetadas através de análise espectrofotométrica, após a sua solubilização em DMSO(Dimetilsulfóxido).^[98]

O ensaio tem como objetivo estimar a viabilidade celular sem a necessidade de realizar uma contagem das células, normalmente utilizada na avaliação dos efeitos citotóxicos de várias substâncias em diferentes concentrações. A concentração dos cristais de formazan formados, resultantes da redução do MTT, é medida pela densidade ótica em comprimentos de onda específicos (normalmente 540 e 720 nm).^[97,99] Um aumento ou diminuição do número de células viáveis é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, que se reflete na concentração de formazan e, subsequentemente, nos valores de densidade ótica obtidos durante a análise espectrofotométrica.^[97-99]

Para realizar este ensaio, utilizou-se uma placa de 96 poços e foram testadas cinco concentrações de zinco: 1000 μM ; 100 μM ; 50 μM ; 10 μM ; 1,0 μM ; 0,1 μM . Cada concentração foi testada em quadruplicados, bem como um controlo positivo (constituído somente por células), e um controlo negativo (constituído somente por meio DMEM:M199), e preencheram-se os poços da placa de acordo com a **figura 10**.

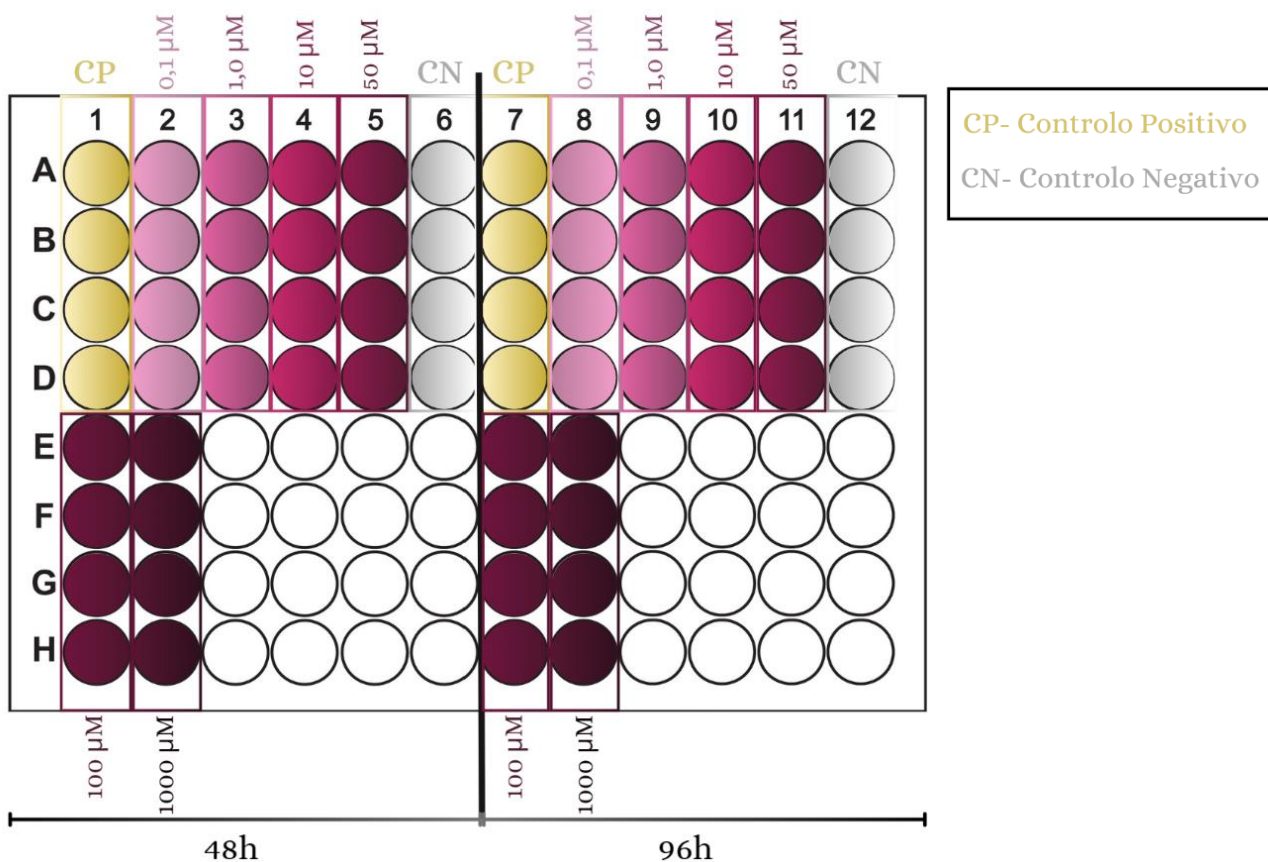


Figura 10. Esquema do ensaio de MTT- Representação da aplicação das amostras na placa. A placa está dividida em duas partes iguais, cada uma com o tempo de incubação correspondente. Cada poço está com uma cor distinta, representante da sua composição, os poços brancos estão vazios.

Iniciou-se por pré-aquecer a 37°C todos os reagentes que iríamos utilizar ao longo do protocolo: PBS (1x), Tripsina/EDTA (1x), e meio de cultura DMEM:M199 para BJ-5Ta completo.

Preparou-se a partir de um frasco de cultura uma suspensão de células, no controlo positivo e nas diferentes concentrações de composto, colocaram-se 100 µL de suspensão de células. Para o controlo negativo, utilizaram-se 100 µL de meio de cultura. Incubou-se a placa durante 24 horas. Concluída a incubação, substituiu-se o meio às células aderentes, utilizando as soluções preparadas anteriormente suplementadas com as diferentes concentrações de zinco e deixou-se incubar por mais 48h e 96h nas condições ótimas.

Passadas as 48h e as 96h, substituiu-se o meio de cultura dos poços por meio DMEM:M199 novo e acrescentaram-se 10 µL a cada poço de uma solução composta por 1 ml de PBS + 5 mg de MTT. Após 4 horas de incubação a 37°C, descartaram-se 85 µL da solução presente em cada poço e adicionaram-se 50 µL de DMSO, pipetando 'up and down' de modo a solubilizar os cristais de formazan. Após 10 minutos de agitação, fez-se a leitura das absorvâncias no espectrofotómetro (Tecan® Infinite M200) a um comprimento de onda de 540 nm.

A viabilidade celular de cada concentração do composto, calculou-se da através da **equação 5**:

$$(Eq. 5) Viabilidade(\%) = \frac{Média\ das\ absorvâncias\ do\ ensaio}{Média\ das\ absorvâncias\ do\ controlo\ positivo} \times 100$$

A absorvância de cada poço foi corrigida por subtração do controlo negativo de forma a eliminar o *background*. A viabilidade para cada concentração foi obtida através do cálculo da média das viabilidades dos quadruplicados.

3.6. Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação é fundamental para analisar os efeitos do composto em estudo na proliferação e viabilidade celular. [100,101]

Para avaliar a atividade biológica do zinco e o seu efeito na proliferação das células BJ-5ta foram testadas três concentrações de zinco, aquelas que mostraram ser mais eficazes no ensaio de MTT inicial (10 μM ; 1,0 μM ; 0,1 μM) tal como se pode verificar na **figura 11**. De forma a testar o efeito das três concentrações, foram distribuídas 20 000 células em cada poço. Sumariamente, utilizou-se uma placa de 96 poços previamente semeada com células (20 000 células/poço), adicionou-se 100 μL da respetiva concentração de zinco e 100 μL meio DMEM:M199 nos poços de controlo, seguidamente incubou-se na estufa. Ao fim de 24, 48, e 72 horas fixaram-se as células com etanol a 70%. A fixação foi realizada após a lavagem dos poços com PBS (1x), descartou-se e adicionou-se o etanol, incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Entretanto preparou-se uma solução de DAPI (1:1000) com PBS (1x), numa concentração 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Decorrido o tempo de incubação, descartou-se o álcool e aplicaram-se 40 μL da solução DAPI (1:1000) a cada poço e incubou-se mais 10 minutos no escuro, foram realizadas duas lavagens consecutivas com PBS (1x), e procedeu-se aos registos fotográficos.

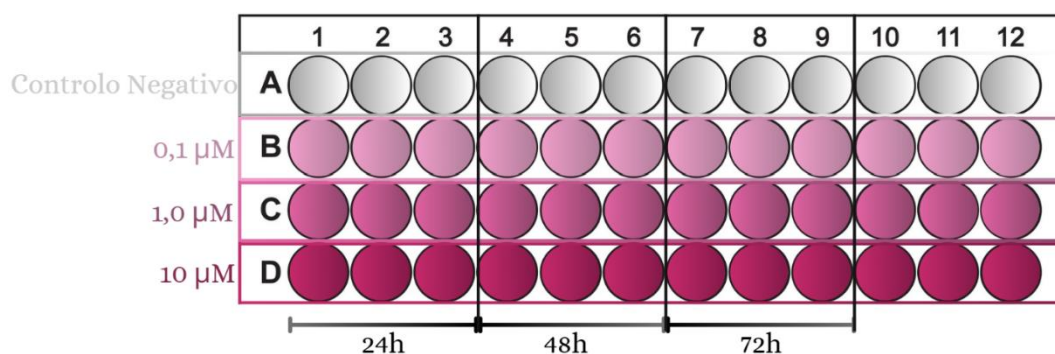


Figura 11. Esquema do ensaio de proliferação. Representação da aplicação das amostras na placa. Na primeira fila foi adicionado apenas meio, nas três filas seguintes foram adicionadas as respetivas concentrações de zinco (0,1 μM ; 1,0 μM ; 10 μM).

3.7. Ensaio de migração

A cicatrização de feridas implica a proliferação e migração celular no leito da ferida, sendo essa atividade biológica um ponto crítico deste processo. Analisar a migração celular *in vitro* é muito útil para compreender os mecanismos que integram a cicatrização. [102,105] Além disso, os testes *in vitro* são habitualmente utilizados na investigação científica, devido a razões éticas e à sua eficácia na identificação de substâncias ativas. [105]

O ensaio de “*wound healing*” é uma técnica bastante utilizada, simples e consistente para avaliar parâmetros da migração celular, como a rapidez, persistência e direcionalidade. As células são cultivadas até formarem uma camada confluenta, e então é criada uma “ferida” propositada ao fazer um arranhão com a ponta de uma pipeta, incentivando as células na borda da ferida a moverem-se em direção ao espaço criado. [102-105] Este ensaio foi realizado para avaliar o papel do zinco na migração celular.

Utilizou-se uma placa de 24 poços com triplicados dos poços de controlo e das três concentrações de zinco (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM), na parte exterior da placa, marcou-se uma linha vertical e outra horizontal para auxiliar a realização da ferida tal como pode ser observado na **figura 12**. Na placa semearam-se cem mil células em cada poço, incubou-se a 37°C com 5% de CO_2 , até obter uma monocamada confluenta, e com a ponta de uma micropipeta de 10 μL realizaram-se as feridas, de forma linear. Realizaram-se três ensaios, o primeiro com registo fotográfico às 0h, 7h, e 24 h após a ferida, o segundo com registo fotográfico às 0h, 6h, 24h e 48h após a ferida, e o terceiro registo fotográfico às 0h, 24h e 48h após a ferida.

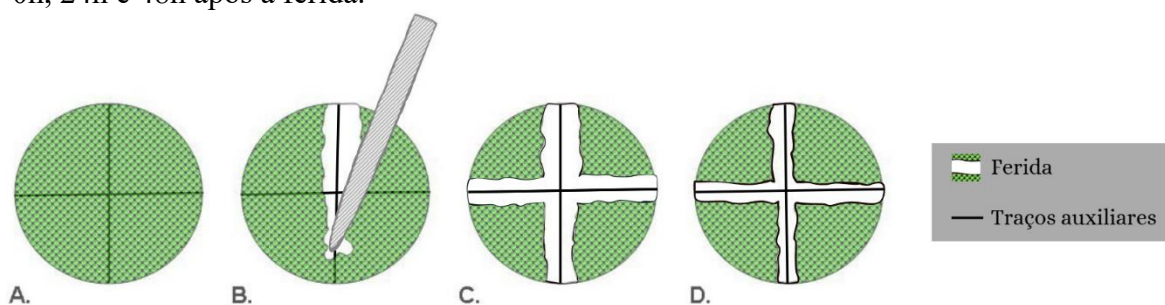


Figura 12. Representação das linhas auxiliares marcadas para a realização da ferida.

A ferida foi realizada com a ajuda da ponta de uma micropipeta de 10 μL , no espaço indicado pelos traços auxiliares. Adaptada de: Hulkower e Herber (2011). [106]

Aspirou-se o meio de todos os poços de forma a remover os restos celulares. Em seguida, lavou-se duas vezes cada poço com 300µL de PBS de cada vez, e adicionou-se 1mL do respetivo constituinte a cada poço, no controlo somente meio DMEM:M199, e as três concentrações de zinco (0,1 µM; 1 µM; 10 µM) nos poços seguintes tal como esquematizado na **figura 13**.

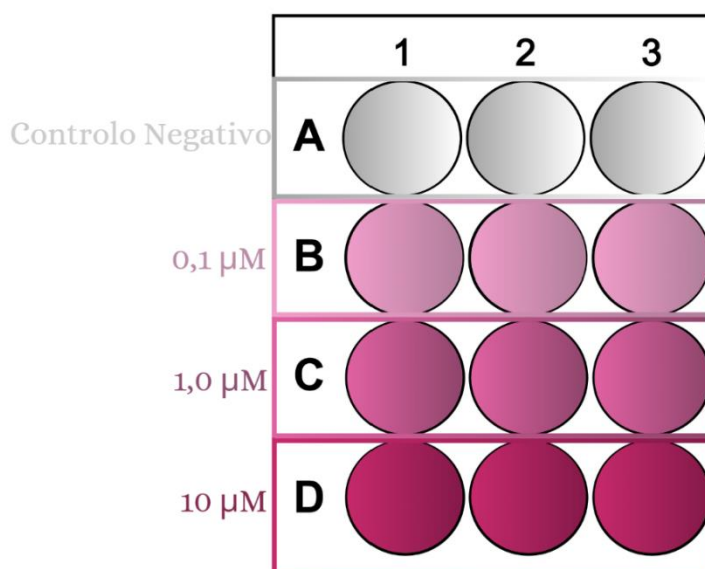


Figura 13. Esquema do ensaio de migração. Representação da aplicação das amostras na placa. Na primeira fila foi adicionado apenas meio, nas três filas seguintes foram adicionadas as respetivas concentrações de zinco (0,1 µM; 1,0 µM; 10 µM).

Realizaram-se registos fotográficos utilizando a máquina fotográfica digital Visicam®. Posteriormente os registos obtidos foram verificados e tratados através do *software* ImageJ®, em que foi inserido o *pugin* desenvolvido por Suarez-Arnedo et al. (2020)^[107], e por sua vez, com esses resultados foi calculada a percentagem da ferida aberta correspondente a cada concentração de zinco, utilizando a **equação 6**:

$$(Eq. 6) \text{ Área da ferida}(\%) = \frac{\text{Área da ferida no início}}{\text{Área da ferida no final}} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de MTT (viabilidade celular)

De modo a verificar a viabilidade das células BJ-5ta em diferentes concentrações de zinco foi utilizado o ensaio de MTT, através da medição da absorvância a 540nm. Ao longo do trabalho laboratorial foram realizados três ensaios de MTT, e através dos valores das absorvâncias obtidos às 48 e às 96 horas, foram elaborados os gráficos apresentados nas **figuras 14 e 15**, que relacionam a viabilidade celular com a concentração de zinco. Neste ensaio a absorvância máxima do controlo é de 100%, ou seja, as células BJ-5ta sem zinco, que funcionam como controlo positivo, representam 100% de viabilidade celular. Os dados do ensaio MTT foram também submetidos à análise estatística utilizando o teste *one-way* ANOVA, realizado no programa *GraphPad Prism* versão 10. Os resultados revelaram um *P-value* inferior a 0,0001, o que sugere a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

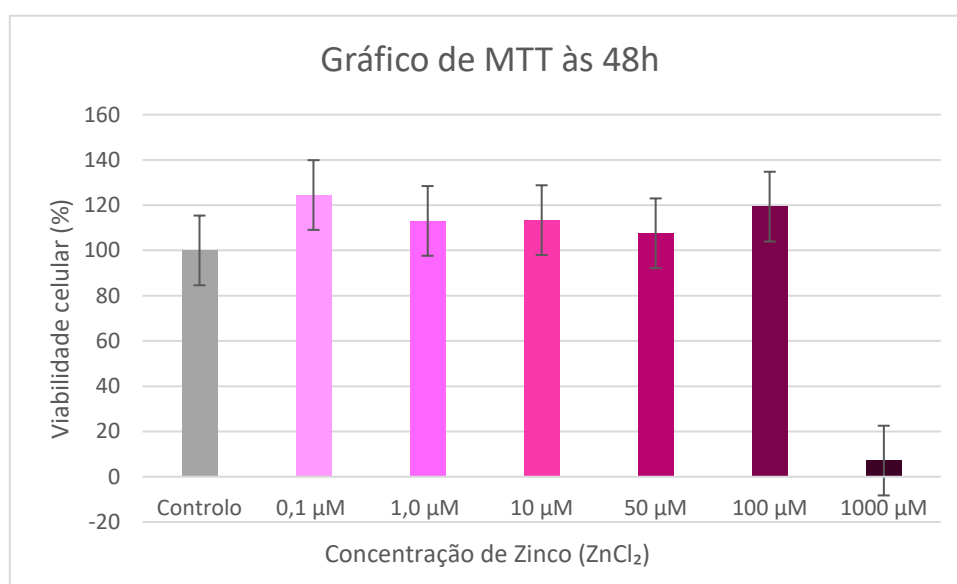


Figura 14. Viabilidade das células BJ-5ta expostas a uma gama de concentrações de zinco (0,1 a 1000 μM), determinada por ensaio colorimétrico de MTT após 48 horas. Ensaio realizado em quadruplicado, e resultados apresentados em média ± desvio-padrão (*P-value* < 0,0001 e $R^2 = 0,8859$). O eixo *xx* contém as diferentes concentrações de zinco (μM) em estudo, e o eixo *yy* representa a viabilidade celular (%) das células BJ-5ta, para

cada uma das diferentes concentrações. O controlo é apresentado a cinzento. As concentrações compreendidas entre 0,1 e 100 μM parecem aumentar a viabilidade, enquanto a concentração de 1000 μM diminui drasticamente a viabilidade celular.

Tal como se pode observar no gráfico apresentado na **figura 14** com os ensaios realizados, não parece haver citotoxicidade para as concentrações de zinco entre 0,1 μM e 100 μM , uma vez que a viabilidade celular não é inferior à do controlo, correspondente a 100% da viabilidade celular. Efetivamente, a concentração de 0,1 μM destacou-se por aumentar a viabilidade celular até 124%, já no caso da concentração mais alta testada (1000 μM) verifica-se uma diminuição acentuada da viabilidade celular.

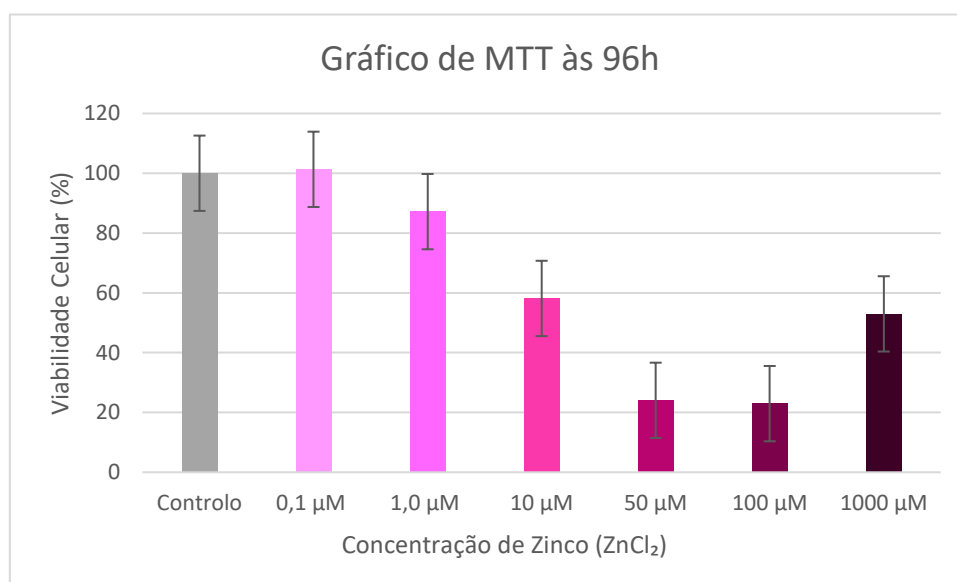


Figura 15. Viabilidade das células BJ-5ta expostas a uma gama de concentrações de zinco (0,1 a 1000 μM), determinada por ensaio colorimétrico de MTT após 96 horas. Ensaio realizado em quadruplicado, e resultados apresentados em média \pm desvio-padrão (P -value=0,0281 e $R^2 = 0,8073$). O eixo xx contém as diferentes concentrações de zinco (μM) em estudo, e o eixo yy representa a viabilidade celular (%) das células BJ-5ta, para cada uma das diferentes concentrações. O controlo é apresentado a cinzento. A concentração de 0,1 μM parece ser a única que apresenta uma viabilidade ligeiramente superior à do controlo, por outro lado, as restantes concentrações revelaram induzir citotoxicidade, sendo que as concentrações de 1,0 e 10 μM são as que apresentam uma

citotoxicidade inferior, quando comparadas às concentrações compreendidas entre 50 e 1000 μM .

Por sua vez, no gráfico apresentado na **figura 15**, a única concentração que não parece apresentar citotoxicidade é a de 0,1 μM , as restantes concentrações revelaram induzir citotoxicidade celular, mas a diferentes níveis, sendo que as concentrações de 1,0 e 10 μM apresentam 87% e 58% de viabilidade celular, no entanto não se revelam tão tóxicas como as restantes concentrações mais elevadas de zinco. Os resultados do ensaio acima também foram submetidos à análise estatística, sendo que esta análise obteve um *P-value* de 0,0281. Este valor indica uma significância estatística, e reforça a relevância das variações observadas nos resultados do ensaio MTT às 96 horas.

A concentração ideal de zinco a utilizar neste ensaio varia consoante o tipo de célula, e o objetivo específico da investigação.

Um estudo realizado por Fenyvesi et al. (2019), numa linhagem celular de queratinócitos (HaCaT), verificou que as concentrações que aumentaram a viabilidade celular foram entre 0,1 e 10 μM de sulfato de zinco (ZnSO_4). No entanto, foi observado que concentrações mais altas de 40 e 60 μM de sulfato de zinco diminuíram significativamente a viabilidade celular.^[109] Salesa et al. (2021) testou os efeitos do cloreto de zinco (ZnCl_2) na mesma linhagem celular, e obteve resultados semelhantes, concluiu que a concentração ótima de zinco para a viabilidade celular parece estar entre 1,0 e 10 μM , sendo que as concentrações fora deste intervalo podem ser tóxicas para as células.^[110] Também foi comprovado por J Stork et al. (2010), que a administração de cloreto de zinco (ZnCl_2) juntamente com o ionóforo piritiona, na cultura de queratinócitos (HEKa), causou redução na viabilidade celular de forma dependente tanto da concentração de zinco quanto do tempo de exposição.^[111]

Com base nos resultados obtidos por S. et al. (2017), em que foi analisada a citotoxicidade das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), comprovou-se que os seus efeitos foram altamente dependentes da concentração, tempo de exposição e tipo de células envolvidas. Tal como apresentado na maior parte da literatura analisada, verifica-se uma redução da viabilidade celular em altas concentrações, no entanto, em

baixas concentrações, essas mesmas nanopartículas melhoraram a viabilidade celular em todas as linhas celulares testadas. [112]

Por sua vez, quando se observa o efeito do zinco nos fibroblastos, este também parece ser dependente da concentração. Segundo Richard et al. (1993), quando os fibroblastos da pele em cultura foram sobrecarregados com zinco, foi observado um ligeiro efeito citotóxico. No entanto, em concentrações mais baixas, verificou-se que o zinco pode atuar como estabilizador ao ligar-se a grupos tiol, e pode ter um efeito protetor contra os radicais livres. De um modo geral, o efeito do zinco nos fibroblastos parece ser complexo e também pode depender da concentração e do contexto da exposição. [113]

Um outro estudo realizado em células semelhantes a linfoblastos, observou que concentrações elevadas de zinco tinham efeitos prejudiciais na viabilidade e proliferação celular, levando à morte das células. Estes resultados sugerem que o zinco tem uma citotoxicidade dependente da concentração, sendo que as concentrações baixas não têm efeitos nas células, mas as concentrações elevadas causam uma diminuição da viabilidade e da proliferação. [114]

Assim, com base na literatura indicada e nos resultados obtidos, a concentração ótima para manter ou aumentar a viabilidade celular nos ensaios de MTT pode depender de vários fatores, e de um modo geral, esta varia consoante a linha celular específica e as condições experimentais.

No entanto, apesar dos diferentes objetivos, linhagens celulares, e tipos de zinco utilizados nos estudos analisados, na sua globalidade parece haver uma conformidade na ideia de que o efeito do zinco depende da sua concentração e do tempo de exposição. Na maioria dos resultados apresentados, as concentrações de zinco acima de 100 μM revelaram-se tóxicas para diversas linhagens celulares, enquanto as concentrações mais baixas parecem manter ou até aumentar a viabilidade celular.

No que diz respeito aos resultados obtidos pelos ensaios de MTT da presente tese, estes estão de acordo com o que é apresentado na literatura. Tal como se pode verificar nas **figuras 14**, o zinco não é tóxico para as células BJ-5ta em concentrações mais baixas, no entanto para concentrações mais elevadas ($>100 \mu\text{M}$), este diminui a viabilidade celular a partir das 48h. Por outro lado, quando se verificam os resultados

obtidos às 96h, apresentados na **figura 15**, todas as concentrações de zinco, exceto a de 0,1 μM , diminuem a viabilidade celular. Neste caso é necessário ter em consideração as condições de cultura adversas, visto que após 96h a probabilidade de existir um pH alterado ou diminuição de nutrientes essenciais é maior, o que pode afetar a precisão e a fiabilidade dos resultados do ensaio MTT. ^[115] Por conseguinte, teria sido mais vantajoso executar o ensaio num período de incubação menor, de forma a não estar tão suscetível a esta limitação.

Não obstante, as concentrações de cloreto de zinco (ZnCl_2) selecionadas para serem utilizadas nos ensaios seguintes, foram 0,1 μM , 1,0 μM e 10 μM . Por outro lado, a abordagem estatística fortalece a confiabilidade das conclusões obtidas e destaca a relevância das diferenças observadas entre os grupos em estudo.

4.2. Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação foi realizado em duas fases, numa primeira fase foram selecionadas as concentrações de zinco que se mostraram mais favoráveis a partir do ensaio de MTT, e numa segunda fase onde foi analisado o comportamento proliferativo das células com as três concentrações selecionadas inicialmente (10 μM ; 1,0 μM ; 0,1 μM).

Este ensaio é elaborado com a contra-coloração com DAPI, e após ser realizada a observação e contagem nos tempos estipulados das células BJ-5ta com zinco a diferentes concentrações, obteve-se um gráfico de proliferação, representado na **figura 16**. Os dados do ensaio de proliferação foram também submetidos à análise estatística, desta vez utilizando o teste *two-way* ANOVA, realizado no programa *GraphPad Prism* versão 10.

Os resultados revelaram que as modificações observadas não alcançam significância estatística, uma vez que o *P-value* é não significativo (*P-value* = 0,9975). Além da avaliação global, a análise estatística também envolveu um teste *Tukey* de comparações múltiplas, que corroborou a ausência de alterações significativas. Segundo os resultados deste teste, existem alterações mínimas na proliferação das concentrações de zinco quando comparadas com o controlo, o que sugere que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (*P-value* > 0,9999).

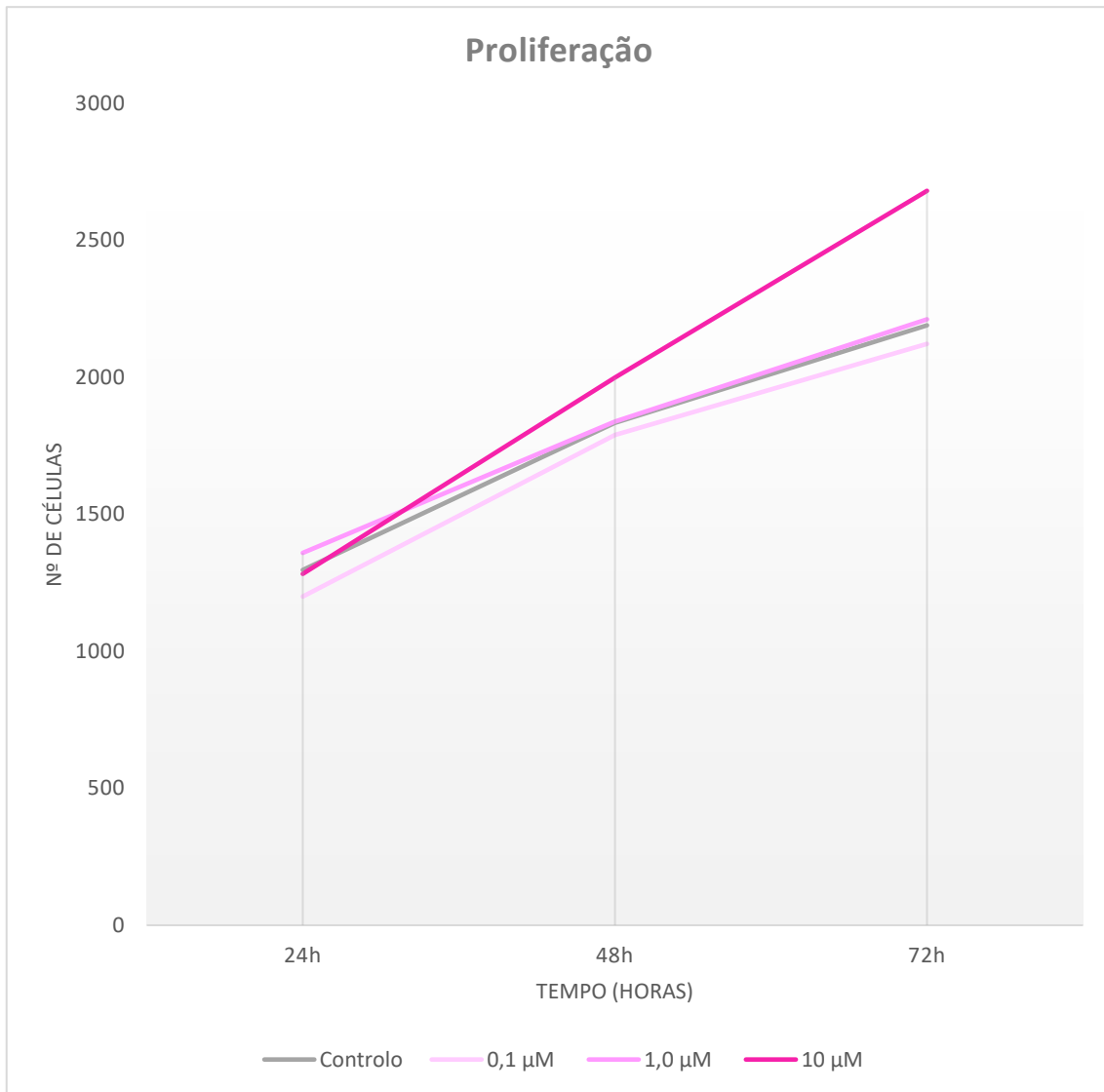


Figura 16. Proliferação das células BJ-5ta com diferentes concentrações de zinco. Ensaio em triplicado, e resultados apresentados em média dos dois ensaios de proliferação realizados. O eixo xx representa o tempo de exposição ao zinco, e o eixo yy representa o número de células BJ-5ta. O controlo é apresentado a cinzento. A concentração de 10 μM parece apresentar os melhores resultados ao longo do tempo, no que diz respeito ao comportamento proliferativo das células. O controlo e as restantes concentrações parecem ter um comportamento semelhante, e a diferença entre o número de células é muito ligeira.

Através da análise da **figura 16** é possível observar que até às 48 horas, as duas concentrações mais baixas de zinco não afetaram significativamente a proliferação das células BJ-5ta, quando comparadas com o controlo. No entanto, a concentração de 10 μM destaca-se por apresentar uma taxa de proliferação visivelmente superior aos restantes resultados apresentados, tendo-se registado um aumento de aproximadamente 56%. A partir das 48 às 72 horas, as células com a concentração mais elevada de zinco, continuam a proliferar a um ritmo superior às restantes concentrações e ao controlo, apresentando um aumento de 34%. Os restantes resultados não apresentam grandes diferenças entre si, a concentração de 1,0 μM teve um aumento de 20%, que é ligeiramente superior ao aumento de 19% registado no controlo, por sua vez a concentração de 0,1 μM apresentou um aumento de 18%, tendo sido o menor aumento registado às 72h. De um modo geral, o efeito do zinco mostra-se favorável na proliferação das células BJ-5ta, principalmente na concentração de 10 μM .

O zinco desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular, mantendo a integridade do genoma e contribuindo para a homeostase dos tecidos. ^[116] Além disso, participa em processos como a síntese e reparação do ADN, bem como na progressão do ciclo celular, sendo vital para a saúde de um modo geral. ^[117,118]

No que diz respeito à sua importância para a saúde da pele, este microelemento tem um papel fundamental no sistema de defesa antioxidante, visto que ajuda a neutralizar os radicais livres nocivos e a proteger as células da pele contra os danos oxidativos. ^[119,120] Também está envolvido na formação e manutenção da barreira cutânea, pois contribui para a produção de proteínas e lípidos presentes na sua constituição. Por outro lado, o seu envolvimento na síntese de colagénio e elastina, apresenta potencial para prevenir o envelhecimento precoce da pele, já que estas são proteínas essenciais para manter a elasticidade e a firmeza. ^[119,121]

No contexto da cicatrização de feridas, o zinco é essencial, visto que promove a proliferação celular, a síntese de colagénio e a função imunitária. Portanto, o zinco pode promover a proliferação de células, como é o caso dos fibroblastos, que são importantes para a reparação e regeneração da pele danificada. ^[117,119,121]

Segundo o estudo realizado por Tyszka-Czochara et al. (2014) o zinco apresenta um efeito positivo na proliferação celular. Os respectivos resultados demonstraram que o zinco aumenta a viabilidade e a proliferação dos fibroblastos da pele, especificamente a uma concentração de 16 μM . Isso indica que o zinco tem um efeito estimulante na taxa de divisão e no crescimento celular. ^[122]

Salesa et al. (2021) explora os efeitos do cloreto de zinco (ZnCl_2) numa linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT). O estudo descobriu que concentrações de 1 ou 5 μM de ZnCl_2 não afetaram a proliferação celular, e não se registaram efeitos citotóxicos em concentrações de até 10 μM após 24 horas. ^[110]

Com base nos resultados de Julian-Dario Rembe et al. (2020), o zinco parece ter um papel benéfico na proliferação. O estudo mostrou que diferentes derivados de zinco, como o gluconato de zinco (ZnGluc) e o sulfato de zinco (ZnSO_4), têm efeitos significativos na proliferação celular em microambientes *in vitro* carentes de nutrientes. Além disso, o estudo também sugere que o ZnGluc tem o efeito mais pronunciado na indução da proliferação em fibroblastos humanos e queratinócitos. ^[123]

Um outro estudo realizado por Wang, Luo, et al. (2021), indica que o zinco tem um impacto positivo na promoção do desenvolvimento de tecido conjuntivo, tal como observado pelo seu efeito no aumento da taxa de proliferação dos fibroblastos gengivais humanos (HGFs) e na regulação da matriz extracelular. ^[117]

Hashemi et al. (2023) verificou que um creme composto por nanopartículas de óxido de zinco e extrato de calêndula, promoveu a cicatrização dos tecidos ao aumentar a proliferação e a viabilidade dos fibroblastos na área afetada. Neste caso, a concentração ótima para a proliferação celular foi de 100 μM . ^[124] No entanto, um outro estudo realizado por Chen et al. (2021) obteve resultados contrários, já que neste caso as nanopartículas de óxido de zinco não tiveram um efeito positivo na proliferação celular. A baixas concentrações, as nanopartículas não afetaram a viabilidade ou a proliferação celular, mas a concentrações elevadas, estas inibiram significativamente a proliferação celular nos fibroblastos gengivais humanos (HGF-1). ^[125] Estes estudos comprovam que o tipo de célula, e o objetivo têm uma grande influência nos resultados, no caso das células BJ-5ta, estas apresentam um comportamento que se encontra em concordância com a

maior parte dos resultados obtidos na literatura, nomeadamente o efeito positivo que o zinco tem na proliferação celular, particularmente, a concentração de 10 μM .

4.3. Ensaio de migração

O ensaio de migração também foi realizado de acordo com os resultados obtidos no ensaio de MTT. As **figuras 17 e 18**, mostram, através de imagens obtidas por microscopia ótica, a recuperação da ferida em duas regiões distintas, ao longo do primeiro ensaio. Estão representados o controlo, meio com concentração de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM de zinco nos às 0, 6 e 24 horas.

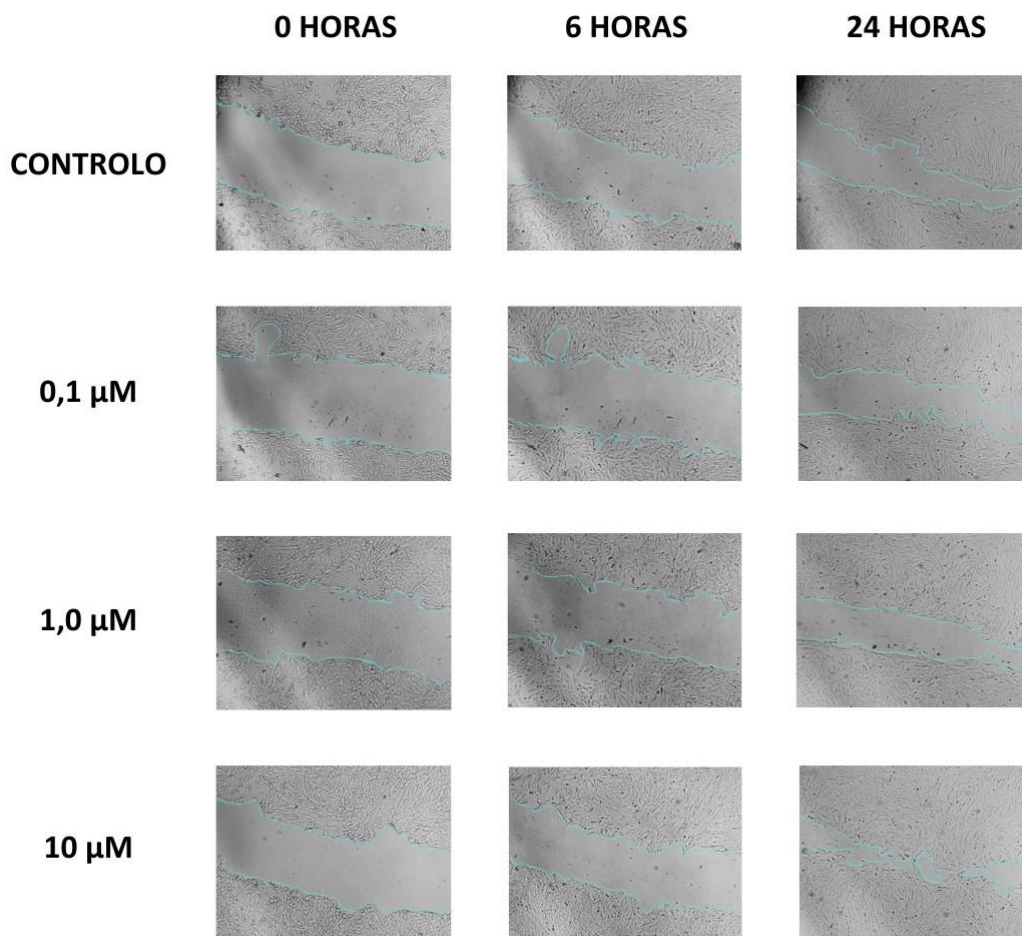


Figura 17. Fotografias da recuperação na região horizontal da ferida na presença e ausência de zinco. Registos fotográficos do controlo, meio com concentração de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , captados às 0, 6 e 24 horas com o microscópio ótico invertido Leica DM II combinado com a câmara Visicam PRO 20C, numa ampliação de 4x.

As fotografias não mostram diferenças significativas para o controlo e as concentrações de 0,1 e 1 μM . No entanto, para a concentração de 10 μM , é possível observar um maior encerramento da ferida às 24h em comparação com o controlo e com as restantes concentrações.

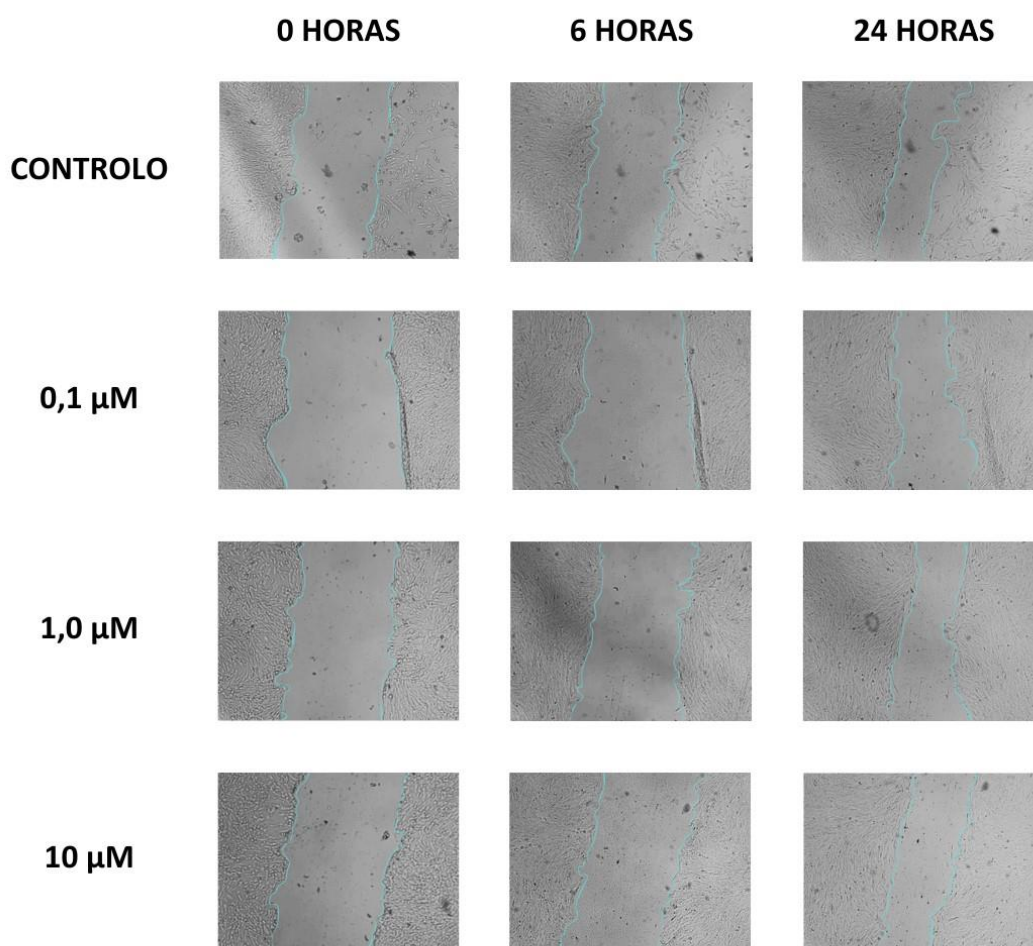


Figura 18. Fotografias da recuperação na região vertical da ferida na presença e ausência de zinco. Registos fotográficos do controlo, meio com concentração de 0,1 μM ,

1 μM e 10 μM , captados às 0, 6 e 24 horas com o microscópio ótico invertido Leica DM IL combinado com a câmara Visicam PRO 20C, numa ampliação de 4x.

Os registos fotográficos da região vertical da ferida não captam diferenças tão visíveis entre as diferentes concentrações e o controlo, em comparação com as imagens da região horizontal, visto que a ferida parece cicatrizar a um ritmo semelhante em todos os meios. Na revisão bibliográfica conduzida, não foram mencionadas referências específicas quanto ao tempo de cicatrização das células BJ-5ta, no contexto exato do presente estudo. Portanto, no escopo do ensaio inicial de migração celular, foram estabelecidos os tempos de 0, 6 e 24 horas. No entanto, a análise das **figuras 17 e 18** revelam que a ferida não está completamente cicatrizada no período determinado. Tendo isso em consideração, foi realizado um segundo ensaio, no qual foi introduzido um novo intervalo temporal, de 48 horas, a fim de documentar de maneira abrangente o processo de cicatrização.

No segundo ensaio, observou-se uma convergência de resultados com o primeiro, indicando consistência nos efeitos observados até então. Contudo, a análise do segundo ensaio proporcionou novos dados, particularmente em relação aos tempos apropriados para avaliação do terceiro e último ensaio. É relevante destacar que, às 6 horas, não foram identificadas diferenças significativas no processo de cicatrização entre os ensaios iniciais. Assim, no terceiro ensaio, a realização dos registos fotográficos foi otimizada, concentrando-se nos momentos críticos de 0, 24 e 48 horas, tal como pode ser verificado nas **figuras 19 e 20**.

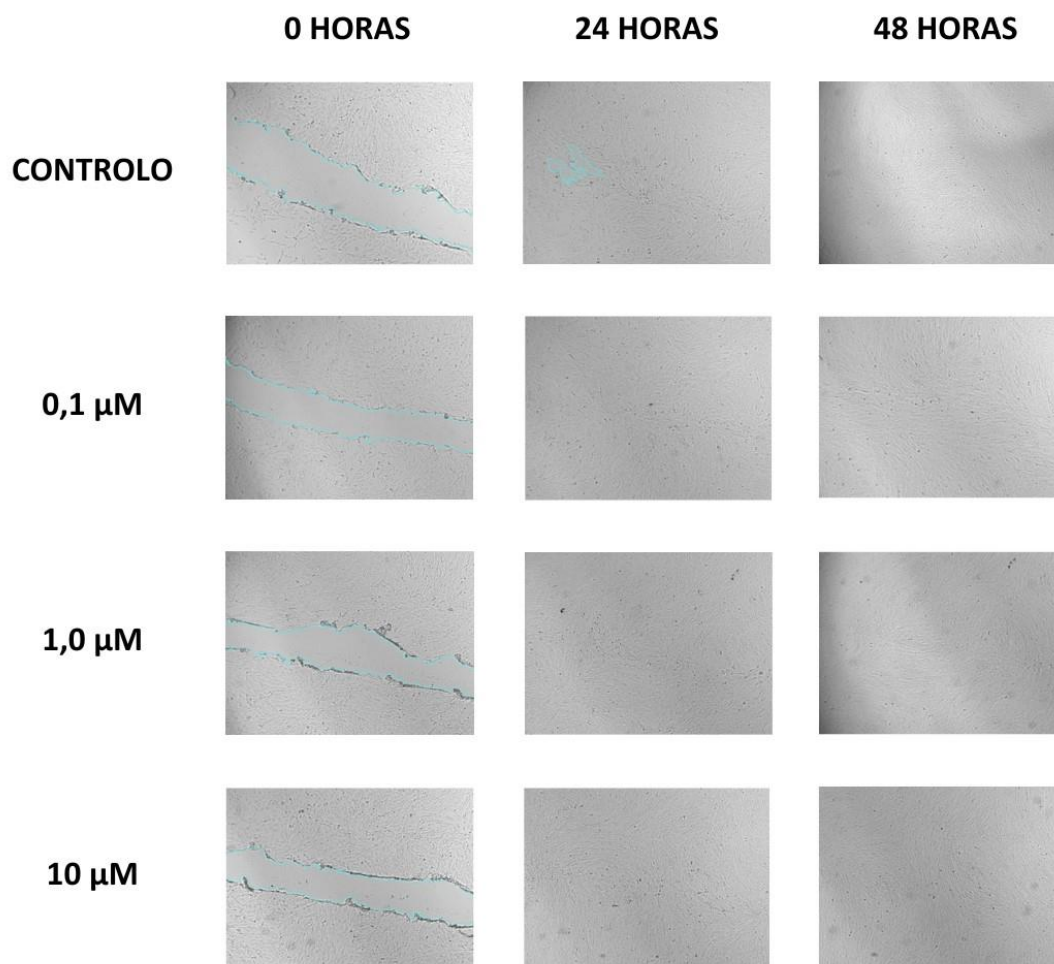


Figura 19. Fotografias da recuperação na região horizontal da ferida na presença e ausência de zinco. Registos fotográficos do controlo, meio com concentração de 0,1 μM, 1 μM e 10 μM, captados às 0, 24 e 48 horas com o microscópio ótico invertido Leica DM IL combinado com a câmara Visicam PRO 20C, numa ampliação de 4x.

Nas fotografias registadas no terceiro ensaio, observa-se o encerramento total da ferida, tal ocorreu às 24 horas em todas as concentrações de zinco, enquanto no controlo

esse efeito foi observado apenas às 48 horas. No decorrer deste último ensaio, embora tenha sido observado o encerramento da ferida, não foi possível identificar uma evolução progressiva da cicatrização, o que dificultou a distinção clara dos efeitos do zinco entre as diferentes concentrações em estudo. Essa limitação sugere a realização de um novo ensaio, incorporando registos fotográficos adicionais às 12 e 36 horas. Através desta abordagem será possível uma compreensão mais aprofundada do impacto do zinco na cicatrização das células BJ-5ta, fornecendo dados mais concretos e contribuindo para uma interpretação mais robusta dos resultados.

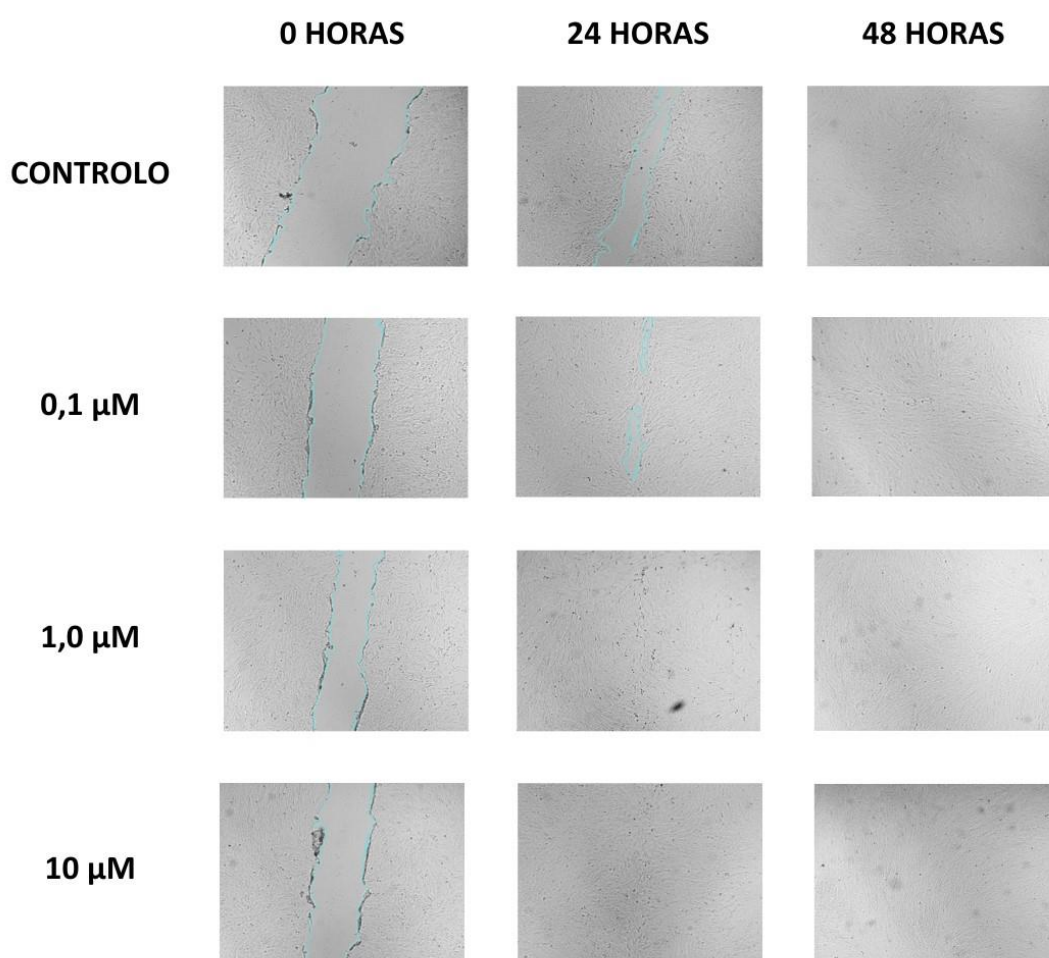


Figura 20. Fotografias da recuperação na região vertical da ferida na presença e ausência de zinco. Registos fotográficos do controlo, meio com concentração de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , captados às 0, 24 e 48 horas com o microscópio ótico invertido Leica DM IL combinado com a câmara Visicam PRO 20C, numa ampliação de 4x.

Na figura apresentada acima, observa-se, novamente, o encerramento completo da ferida, no entanto, esse efeito ocorre apenas às 48 horas tanto para o controle quanto para a concentração de 0,1 μM . Contudo, a concentração de 0,1 μM revela-se mais eficaz na cicatrização, uma vez que, o encerramento da ferida parece mais rápido em comparação com o controle. Por sua vez, as concentrações de 1,0 μM e 10 μM apresentam um encerramento da ferida às 24 horas, corroborando as observações previamente registradas.

Na **figura 21**, observa-se o gráfico da recuperação da ferida ao longo do tempo através da percentagem de ferida aberta, referente aos três ensaios de migração realizados.

À semelhança do que foi feito no ensaio de proliferação, os dados do ensaio de migração também foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste *two-way* ANOVA, realizado no programa *GraphPad Prism* versão 10.

Os dados analisados no primeiro ensaio de migração não alcançam significância estatística em nenhuma das marcas temporais estabelecidas, uma vez que o *P-value* foi não significativo (*P-value*=0,5965). O mesmo resultado foi comprovado no teste *Tukey* de comparações múltiplas, já que nenhuma das concentrações de zinco quando comparadas com o controle, obteve diferenças estatisticamente significativas.

Por outro lado, no segundo ensaio de migração os resultados sugerem a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados, já que foi obtido um *P-value* de 0,0454. No teste *Tukey* de comparações múltiplas, só a concentração de 10 μM apresentou alterações significativas quando comparadas com o controle às 24 horas, tendo obtido um *P-value* =0,0177.

Por fim, no último ensaio de migração os resultados não apresentam significância estatística (*P-value*=0,1020). Apesar de não ter obtido resultados estatisticamente significantes na avaliação global, no teste *Tukey* de comparações múltiplas, as concentrações de 1,0 μM e 10 μM apresentaram alterações significativas quando comparadas com o controle às 24 horas, tendo obtido um *P-value* =0,0045 e *P-value* =0,0342, respectivamente.

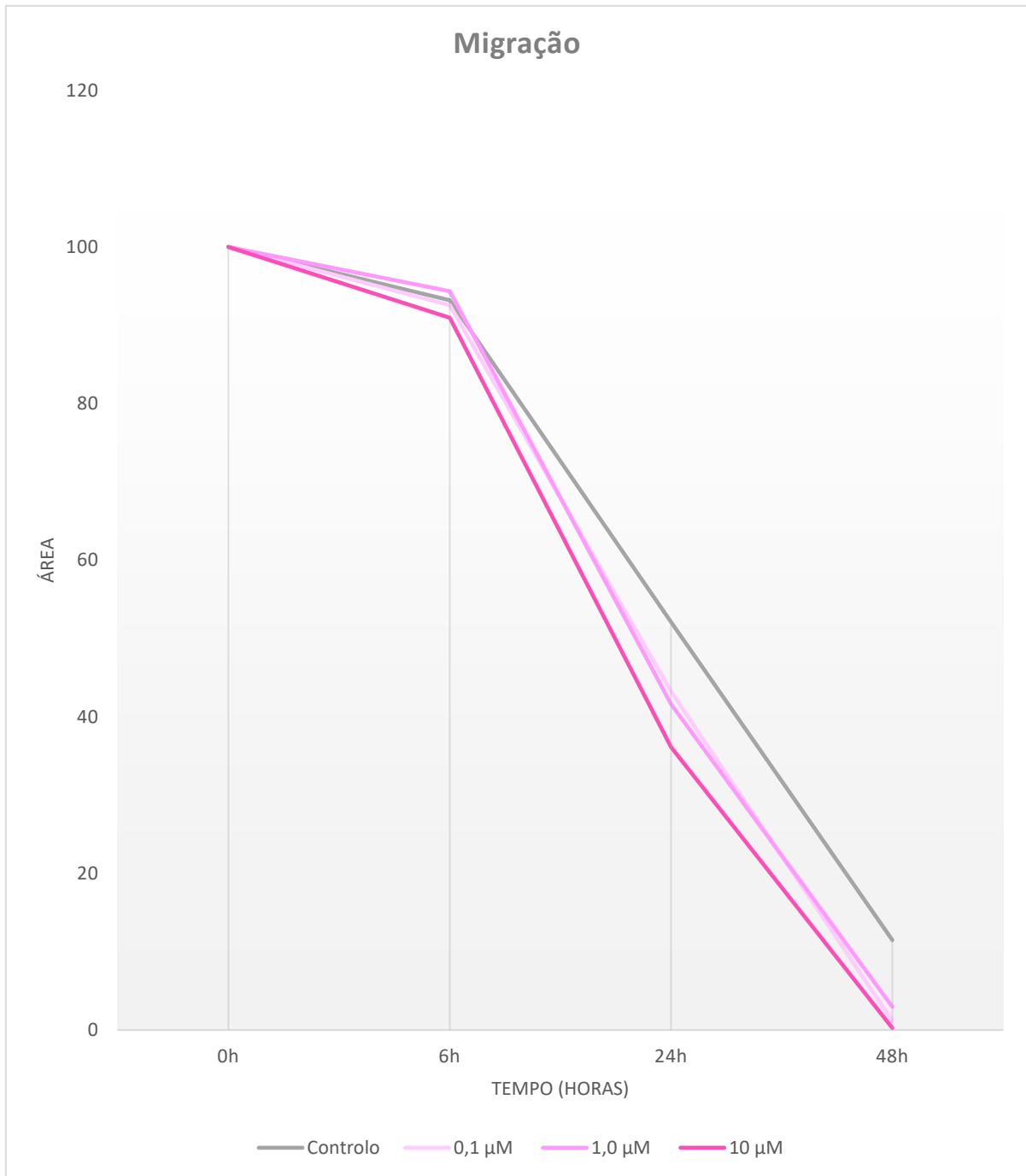


Figura 21. Evolução da cicatrização da ferida com diferentes concentrações de zinco.

Ensaio em triplicado, e resultados apresentados em média dos três ensaios de migração realizados. Percentagem de ferida aberta em função do tempo em horas, para as células não expostas e em meio de cultura com 0,1 μM, 1 μM ou 10 μM de zinco. O eixo dos *xx* representa o tempo (horas) de exposição ao zinco, e o eixo dos *yy* representa a percentagem de ferida aberta. O controlo é apresentado a cinzento e apresenta a maior

percentagem de ferida aberta após 48 horas. As concentrações de zinco em estudo parecem ter um comportamento semelhante, mas a concentração de 10 μM destaca-se por apresentar a cicatrização mais eficaz.

A partir da análise do gráfico acima, é evidente que as variações da área no controlo e nas restantes concentrações de zinco são semelhantes nas primeiras 6 horas, sendo que as curvas do gráfico são praticamente sobreponíveis nesse período. Contudo, entre as 6 e as 24 horas, bem como entre as 24 e as 48 horas, é claramente visível um aprimoramento no encerramento da ferida na presença de zinco.

Por outro lado, é interessante observar que, embora as concentrações mais baixas de zinco tenham demonstrado menos toxicidade para as células BJ-5ta no ensaio de MTT, essas mesmas concentrações parecem ser ligeiramente menos eficazes na cicatrização quando comparadas com a concentração de 10 μM . Assim, tal como no ensaio de proliferação, também no ensaio de migração a concentração de 10 μM destacou-se das demais, apresentando uma área de ferida menor em intervalos de tempo equivalentes.

Tanto a proliferação quanto a migração são componentes essenciais do processo de cicatrização. Constatou-se no ponto 4.2. que o zinco tem um papel crítico na promoção da proliferação, mas para além disso, este também possui propriedades que podem influenciar a migração celular, e estas serão discutidas de seguida, com base na literatura e nos resultados da presente experiência.

O zinco é amplamente utilizado tanto oralmente quanto topicamente para promover a cicatrização, já que este atua na regulação do *stress* oxidativo, na reparação de membranas celulares, na reepitelização de tecidos, na angiogénese e na formação de cicatrizes, isto torna-o num elemento importante para facilitar a regeneração e reparação da pele. ^[126,127] Vários ensaios clínicos relatam os benefícios do zinco na cicatrização, indicando a sua potencial utilidade como um agente terapêutico para a melhoria da saúde da pele. ^[127,128]

O potencial terapêutico deste microelemento deve-se ao seu papel em vários processos fisiológicos, tendo isto em consideração, estudos demonstraram que a própria

deficiência de zinco no organismo pode levar a atrasos no processo de cicatrização, e outras anomalias dermatológicas. [126,129,130]

Assim, dadas todas as suas propriedades, o zinco tem sido avaliado pelo seu potencial como tratamento alternativo para o antienvhecimento. Para além de ser um componente de numerosas metaloenzimas e fatores de transcrição, essenciais para a regulação do metabolismo dos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, o zinco pode inibir a atividade de algumas MMPs, ajudando assim a manter a integridade da matriz extracelular, e prevenindo a degradação do colagénio e da elastina, que podem levar ao envelhecimento da pele. [79,121,131,133] Por outro lado, a sua capacidade antioxidante, e preventiva dos danos UV, quando conjugada com o seu efeito na função de barreira da pele, realça a sua utilidade na prevenção do envelhecimento da pele. [121,131]

Focando novamente no efeito do zinco na migração, um estudo realizado por Gundogdu et al. (2019), utilizou diferentes concentrações de zinco (25-200 μM) numa linhagem de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), e à semelhança dos dois ensaios anteriores (pontos 4.1 e 4.2), foi demonstrado que o zinco tem um efeito dependente da dose na migração dos fibroblastos, com doses mais baixas a estimular a migração celular, e doses mais elevadas a ter um efeito prejudicial na viabilidade celular e na cicatrização. [126]

Iqra Sahibdad et al. (2023) investigou o efeito do zinco nas células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas do cordão umbilical humano (hUC). Os resultados confirmaram que o zinco aumentou a adesão celular, migração e potencial de auto-renovação das MSCs, e para além de não ter efeito tóxico nas células, também promoveu a cicatrização. Assim, estes dados destacam o papel essencial do zinco no crescimento e desenvolvimento celular.

Tal como nos estudos mencionados anteriormente, Yang et al. (2023) também demonstrou que o zinco promove a migração celular. Mais concretamente, refere que o zinco não só aumenta a migração de fibroblastos da pele humana (HSF), e de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), como também promove a transformação de HSFs em miofibroblastos e acelera a produção e remodelação da matriz extracelular. [130]

Chen et al. (2022) desenvolveu e caracterizou uma estrutura metalorgânica (MOF) à base de zinco, denominada Zn-BTC, cujo objetivo era promover a cicatrização de feridas. Os autores prepararam Zn-BTC que liberta lentamente íons de zinco (Zn^{2+}), e demonstraram ter efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios favoráveis. A nível celular, o Zn-BTC apresentou uma baixa toxicidade para os fibroblastos e aumentou a proliferação e a migração celular. [134]

Por sua vez, Tenaud et al. (2000) investigou o efeito do zinco, do cobre e do manganésio na migração dos queratinócitos. No ensaio “*scratch assay*” realizado *in vitro*, verificou-se que o zinco tem um efeito estimulante na migração dos queratinócitos em comparação com o controlo. Os investigadores descobriram que estes oligoelementos não só estimulam a migração dos queratinócitos, como também modulam a expressão de integrinas, que desempenham um papel na migração celular. [136]

Um outro estudo realizado por Tandon et al. (2014), utilizou micropartículas galvânicas de zinco -cobre, e observou que a presença destas micropartículas aumentava a migração dos fibroblastos. O zinco em conjunto com o cobre, gerou uma estimulação elétrica de baixo nível que resultou num potencial elétrico e num aumento da produção de ROS. Isto, por sua vez, estimulou a migração de fibroblastos, o que comprova, mais uma vez, a sua importância na cicatrização. [137]

Lin et al. (2017) explora a relação entre a deficiência de zinco e o atraso na cicatrização. Para além do zinco mostrar ser benéfico na migração celular durante o processo de cicatrização, também são realçadas as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que são fatores importantes no processo de envelhecimento. [135]

Foi ainda descoberto que o zinco tem propriedades antiandrogénicas, modula a atividade da 5α -redutase e inibe a lisil oxidase, todos estes fatores podem ter um impacto na migração celular e na reparação dos tecidos, portanto o seu uso pode ser benéfico em condições dermatológicas. [133] Um estudo de Mahoney et al. (2009) descobriu que um creme composto por 0,1% de malonato de cobre-zinco regenerava significativamente as fibras elásticas na derme papilar, levando à redução das rugas em pacientes com pele fotoenvelhecida. Assim, a conjugação das propriedades fotoprotetoras e regenerativas do zinco, tornam-no uma alternativa promissora para tratamentos antienvelhecimento. [79]

Por conseguinte, com base nos dados disponíveis na literatura, e nos resultados obtidos ao decorrer dos três ensaios, a presença de zinco pode ser benéfica para a migração das células BJ-5ta, contribuindo para uma cicatrização mais eficiente da ferida, sendo importante referir que a concentração de 10 μ M demonstrou ser mais eficaz ao longo dos ensaios. No entanto, para uma melhor diferenciação entre concentrações de zinco em estudo, é fundamental considerar a necessidade de replicar os ensaios, e realizar registos fotográficos a outros intervalos temporais.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O zinco tem sido utilizado terapeuticamente durante séculos, como tal efetuaram-se vários ensaios de forma a verificar o seu potencial como um agente antienvhecimento e de modo a fazer uma caracterização mais aprofundada do comportamento das células BJ-5ta na presença deste elemento.

Diante do exposto, pode afirmar-se que, com esta linhagem de fibroblastos, o zinco demonstra capacidade de promover tanto a proliferação quanto a migração celular, proporcionando, assim, uma aceleração no processo de recuperação cutânea. Essas conclusões são apoiadas pela revisão da literatura, corroborando a eficácia do zinco com base nas informações recolhidas.

É importante ressaltar que a resposta ao zinco é dependente da sua concentração, sendo que a concentração de 10 μM destacou-se como a mais favorável em relação às restantes e ao grupo de controlo, conforme evidenciado tanto no ensaio de proliferação quanto no ensaio de migração. No entanto, embora a concentração de 10 μM tenha demonstrado os melhores resultados em termos de benefício clínico, é essencial considerar a toxicidade associada a cada concentração para garantir a segurança e eficácia do tratamento. Nesse contexto, no ensaio de citotoxicidade, a concentração de 0,1 μM destacou-se como sendo a menos tóxica para as células BJ-5ta, sugerindo que, apesar de uma menor eficácia em termos de benefício clínico, essa concentração pode ser mais segura e adequada para uso terapêutico a longo prazo, assim, este cenário enfatiza a complexidade da avaliação de fármacos, onde o benefício clínico pode superar os riscos associados a determinadas concentrações, requerendo uma análise cuidadosa para determinar a concentração mais adequada para o uso terapêutico. Para além disso, foram obtidas conclusões a nível dos tempos a utilizar no ensaio de migração, já que os três ensaios efetuados teriam usufruído de registos fotográficos às 12 e às 36 horas, registos esses que dado a limitações temporais não foram realizados.

É fundamental reconhecer que tanto no processo de cicatrização quanto no envelhecimento, a complexidade da pele transcende os fibroblastos da derme. Uma

variedade de células cutâneas, mediadores químicos e celulares, desempenham papéis essenciais em ambos os processos. Nesse sentido, a influência do zinco não pode ser simplificada apenas em termos de migração e proliferação celular. No entanto, estes modelos não deixam de representar uma parte fundamental da fase inicial nas investigações, com potencial para reduzir estudos em animais, para além de serem mais acessíveis e económicos. Esta abordagem pode ajudar a identificar candidatos promissores para estudos mais avançados, como estudos de explante de pele *ex vivo* e, eventualmente, ensaios em animais. Contudo, é essencial reconhecer as limitações dos estudos *in vitro* em relação à natureza complexa da pele e a necessidade de complementar esses estudos com abordagens mais abrangentes e translacionais.

As dificuldades na prevenção do envelhecimento representam uma preocupação crescente, que tem vindo a ganhar importância para a sociedade não só a nível estético, mas também pelos potenciais riscos que acarreta. A influência do zinco neste contexto ainda não é totalmente elucidada, pelo que há uma necessidade de desenvolver pesquisas mais aprofundadas nesta área, considerando os potenciais riscos associados às estratégias de anti-envelhecimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] United Nations. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results | Population Division*. Wwww.un.org. <https://www.un.org/development/desa/pd/content/World-Population-Prospects-2022>
- [2] Boismal, F., Serror, K., Dobos, G., Zuelgaray, E., Bensussan, A., & Michel, L. (2020). Vieillissement cutané - Physiopathologie et thérapies innovantes. *Médecine/Sciences*, 36(12), 1163–1172. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020232>
- [3] Rorteau, J., Chevalier, F. P., Fromy, B., & Lamartine, J. (2020). Vieillissement et intégrité de la peau. *Médecine/Sciences*, 36(12), 1155–1162. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020223>
- [4] Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care*, 2(1), 5–10. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0356>
- [5] Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008a). Functional and physiological characteristics of the aging skin. *Aging Clinical and Experimental Research*, 20(3), 195–200. <https://doi.org/10.1007/bf03324769>
- [6] Fayne, R. A., Borda, L. G., Egger, A. N., & Tomic- Canic, M. (2019). The Potential Impact of Social Genomics on Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 9(6). <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1095>
- [7] Sgonc, R., & Gruber, J. (2013). Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. *Gerontology*, 59(2), 159–164. <https://doi.org/10.1159/000342344>
- [8] Ho, C. Y., & Dreesen, O. (2021). Faces of cellular senescence in skin aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 198, 111525. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111525>
- [9] Zou, M.-L., Teng, Y.-Y., Wu, J.-J., Liu, S.-Y., Tang, X.-Y., Jia, Y., Chen, Z.-H., Zhang, K.-W., Sun, Z.-L., Li, X., Ye, J.-X., Xu, R.-S., & Yuan, F.-L. (2021). Fibroblasts:

Heterogeneous Cells With Potential in Regenerative Therapy for Scarless Wound Healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.713605>

[20] Sanchez, M. M., Thamidul Islam Tonmoy, B Hyle Park, & Morgan, J. (2022). Development of a Vascularized Human Skin Equivalent with Hypodermis for Photoaging Studies. *12(12)*, 1828–1828. <https://doi.org/10.3390/biom12121828>

[21]Elsner, P., Fluhr, J. W., Gehring, W., Kerscher, M. J., Krutmann, J., Lademann, J., Makrantonaki, E., Wilhelm, K.-P., & Zouboulis, C. C. (2011). Anti-Aging Data and Support Claims - Consensus Statement. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9, S1–S32. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0379.2011.07746.x>

[22] Chaudhary, M., Khan, A., & Gupta, M. (2019). Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Current Alzheimer Research*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>

[23] Strnadova, K., Sandera, V., Dvorankova, B., Kodet, O., Duskova, M., Smetana, K., & Lacina, L. (2019). Skin aging: the dermal perspective. *Clinics in Dermatology*, 37(4), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.04.005>

[24] Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging. *Cell Transplantation*, 27(5), 729–738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>

[25] Fenske, N. A., & Lober, C. W. (1986). Structural and functional changes of normal aging skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15(4), 571–585. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(86\)70208-9](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(86)70208-9)

[26] Gu, Y., Han, J., Jiang, C., & Zhang, Y. (2020). Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Research Reviews*, 59, 101036. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>

[27] Mokos, Z. B., Ćurković, D., Kostović, K., & Čeović, R. (2018). Facial changes in the mature patient. *Clinics in Dermatology*, 36(2), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.10.006>

[28] Wang, A. S., & Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Frontiers in Genetics*, 9(247). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>

- [29] Hwang, K.-A., Yi, B.-R., & Choi, K.-C. (2011b). Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Laboratory Animal Research*, 27(1), 1. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.1.1>
- [30] Buckingham, E. M., & Klingelutz, A. J. (2011b). The role of telomeres in the ageing of human skin. *Experimental Dermatology*, 20(4), 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01242.x>
- [31] Poljšak, B., Dahmane, R. G., & Godić, A. (2012b). Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 21(2), 33–36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23000938/>
- [32] Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008c). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x>
- [33] Calleja-Agius, J., Brincat, M., & Borg, M. (2013b). Skin connective tissue and ageing. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 27(5), 727–740. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.06.004>
- [34] Landau, M. (2007b). Exogenous factors in skin aging. *Current Problems in Dermatology*, 35, 1–13. <https://doi.org/10.1159/000106405>
- [35] Kim, M., & Park, H. J. (2016b). Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. *Molecular Mechanisms of the Aging Process and Rejuvenation*. <https://doi.org/10.5772/62983>
- [36] Beylot, C. (2019b). Vieillissement cutané – Vieillissement facial global: orientation thérapeutique. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 146(1), 41–74. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2018.10.015>
- [37] Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- [38] Gantwerker, E. A., & Hom, D. B. (2011). Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(3), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.06.009>

- [39] Pazyar, N., Yaghoobi, R., Rafiee, E., Mehrabian, A., & Feily, A. (2014). Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(6), 303–310. <https://doi.org/10.1159/000357477>
- [40] Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012b). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- [41] Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- [42] Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2016). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58(1-2), 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>
- [43] Khalid, K. A., Nawi, A. F. M., Zulkifli, N., Barkat, Md. A., & Hadi, H. (2022). Aging and Wound Healing of the Skin: A Review of Clinical and Pathophysiological Hallmarks. *ProQuest*, 12(12), 2142. <https://doi.org/10.3390/life12122142>
- [44] Driskell, R. R., & Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.001>
- [45] Woodley, D. T. (2017). Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis. *Dermatologic Clinics*, 35(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004>
- [46] Chiquet, M., Katsaros, C., & Kleetsas, D. (2015). Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontology 2000*, 68(1), 21–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12076>
- [47] Talbott, H. E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2022). Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell*, 29(8), 1161–1180. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006>
- [48] Gruber, F., Kremslehner, C., Eckhart, L., & Tschachler, E. (2020). Cell aging and cellular senescence in skin aging — Recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. *Experimental Gerontology*, 130, 110780. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110780>

- [49] desJardins-Park, H. E., Foster, D. S., & Longaker, M. T. (2018b). Fibroblasts and wound healing: an update. *Regenerative Medicine*, 13(5), 491–495. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0073>
- [50] Makrantonaki, E., Steinhagen-Thiessen, E., Nieczaj, R., Zouboulis, C. C., & Eckardt, R. (2016). Prevalence of skin diseases in hospitalized geriatric patients. *Zeitschrift Für Gerontologie Und Geriatrie*, 50(6), 524–531. <https://doi.org/10.1007/s00391-016-1084-3>
- [51] Chaudhary, M., Khan, A., & Gupta, M. (2019b). Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Current Alzheimer Research*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>
- [52] Jindal, R., Kandwal, M., Chauhan, P., & Roy, S. (2020). Skin diseases in geriatrics and their effect on the quality of life: A hospital-based observational study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(3), 1453. https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_1188_19
- [53] Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2007). Characteristics and Pathomechanisms of Endogenously Aged Skin. *Dermatology*, 214(4), 352–360. <https://doi.org/10.1159/000100890>
- [54] Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2008b). Skin alterations and diseases in advanced age. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5(2), e153–e162. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2008.05.008>
- [55] Blume-Peytavi, U., Kottner, J., Sterry, W., Hodin, M. W., Griffiths, T. W., Watson, R. E. B., Hay, R. J., & Griffiths, C. E. M. (2016). Age-Associated Skin Conditions and Diseases: Current Perspectives and Future Options. *The Gerontologist*, 56(Suppl 2), S230–S242. <https://doi.org/10.1093/geront/gnw003>
- [56] Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012b). Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 308–319. <https://doi.org/10.4161/derm.22804>
- [57] Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012c). Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 308–319. <https://doi.org/10.4161/derm.22804>

- [58] Zhang, S., & Duan, E. (2018b). Fighting against Skin Aging. *Cell Transplantation*, 27(5), 729–738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
- [59] Shin, S. H., Lee, Y. H., Rho, N.-K., & Park, K. Y. (2023). Skin aging from mechanisms to interventions: focusing on dermal aging. *Frontiers in Physiology*, 14, 1195272. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1195272>
- [60] MARA, G., & LAINA RAFAELA WENCESLAU. (2023). Effective Topical and Oral Treatments for Skin Aging: Review. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 5(3), 780–797. <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n3p780-797>
- [61] Draelos, Z. D., Dover, J. S., & Alam, M. (2014). *Cosmeceuticals e-book: Procedures in cosmetic dermatology series*. Elsevier.
- [62] Puizina-Ivić, N., Mirić, L., Carija, A., Karlica, D., & Marasović, D. (2010). Modern approach to topical treatment of aging skin. *Collegium Antropologicum*, 34(3), 1145–1153. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20977120>
- [63] Pandey, A., Jatana, G. K., & Sonthalia, S. (2021b). *Cosmeceuticals*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334943/>
- [64] Manela-Azulay, M., & Bagatin, E. (2009b). Cosmeceuticals vitamins. *Clinics in Dermatology*, 27(5), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.010>
- [65] Singhal Mukul, Khanna Surabhi, & Nasa Atul. (2011b). COSMECEUTICALS FOR THE SKIN: AN OVERVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(2).
- [66] Abdul Kader Mohiuddin. (2019a). Skin Aging & Modern Edge Anti-Aging Strategies. *International Journal of Dermatology and Skin Care*. <https://doi.org/10.36811/ijdsc.2019.110002>
- [67] Lansdown, A. B. G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., & Ågren, M. S. (2007). Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*, 15(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2006.00179.x>
- [68] Cabrera, Á. J. R. (2015). Zinc, aging, and immunosenescence: an overview. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, 5(1), 25592. <https://doi.org/10.3402/pba.v5.25592>

- [69] Lin, P.-H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, P., Steinberg, S., & Ma, J. (2017b). Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, *10*(1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu10010016>
- [70] Schwartz, J. R., Marsh, R. G., & Draelos, Z. D. (2006b). Zinc and Skin Health: Overview of Physiology and Pharmacology. *Dermatologic Surgery*, *31*, 837–847. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31729>
- [71] Ogawa, Y., Kawamura, T., & Shimada, S. (2016). Zinc and skin biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *611*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.003>
- [72] Frydrych, A., Jacek Arct, & Krzysztof Kasiura. (2004). ZINC: A CRITICAL IMPORTANCE ELEMENT IN COSMETOLOGY. *Journal of Applied Cosmetology*, *22*(1), 1–13.
- [73] Takino, Y., Okura, F., Kitazawa, M., Iwasaki, K., & Tagami, H. (2011). Zinc 1-pyrrolidone carboxylate inhibits the UVA-induced production of matrix metalloproteinase-1 by in vitro cultured skin fibroblasts, whereas it enhances their collagen synthesis. *International Journal of Cosmetic Science*, *34*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00676.x>
- [74] Kogan S, Sood A, Garnick MS. (2017). Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds*. *29*(4),102-106.
- [75] Gupta, M., Mahajan, V. K., Mehta, K. S., & Chauhan, P. S. (2014b). Zinc Therapy in Dermatology: a Review. *Dermatology Research and Practice*, *2014*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/709152>
- [76] Al-Khafaji, Z., Brito, S., & Bin, B.-H. (2022b). Zinc and Zinc Transporters in Dermatology. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 16165. <https://doi.org/10.3390/ijms232416165>
- [77] Abendrot, M., & Kalinowska-Lis, U. (2018b). Zinc-containing compounds for personal care applications. *International Journal of Cosmetic Science*, *40*(4), 319–327. <https://doi.org/10.1111/ics.12463>
- [78] Vollmer, D., West, V., & Lephart, E. (2018). Enhancing Skin Health: By Oral Administration of Natural Compounds and Minerals with Implications to the Dermal Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 3059. <https://doi.org/10.3390/ijms19103059>

- [79] Mahoney, M. G., Brennan, D., Starcher, B., Faryniarz, J., Ramirez, J., Parr, L., & Uitto, J. (2009b). Extracellular matrix in cutaneous ageing: the effects of 0.1% copper-zinc malonate-containing cream on elastin biosynthesis. *Experimental Dermatology*, 18(3), 205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00783.x>
- [80] Fabris, N., & Mocchegiani, E. (1995). Zinc, human diseases and aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, 7(2), 77–93. <https://doi.org/10.1007/bf03324297>
- [81] Kim, H., Park, S.-Y., Moon, S., Lee, J., & Kim, S. (2018). Autophagy in Human Skin Fibroblasts: Impact of Age. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2254. <https://doi.org/10.3390/ijms19082254>
- [82] Loiodice, S., Nogueira da Costa, A., & Atienzar, F. (2017). Current trends in in silico, in vitro toxicology, and safety biomarkers in early drug development. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2), 113–121. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1400044>
- [83] Semlin, L., Schäfer-Korting, M., Borelli, C., & Korting, H. C. (2011b). In vitro models for human skin disease. *Drug Discovery Today*, 16(3-4), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.12.001>
- [84] Eide Flaten, G., Palac, Z., Engesland, A., Filipovic Greic, J., Vanic, Z., & Škalko-Basnet, N. (2015). In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>
- [85] Neves, L. M. G., Wilgus, T. A., & Bayat, A. (2022). In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Approaches for Investigation of Skin Scarring: Human and Animal Models. *Advances in Wound Care*, 12(2). <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0139>
- [86] Flaire, E., Nachat-Kappes, R., Laporte, C., Harmand, M., Simon, M., & Poinot, C. (2022). Alternative *in vitro* models used in the main safety tests of cosmetic products and new challenges. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(6). <https://doi.org/10.1111/ics.12803>
- [87] Danilenko, D. M., Phillips, G. D. L., & Diaz, D. (2016). *In Vitro* Skin Models and Their Predictability in Defining Normal and Disease Biology, Pharmacology, and Toxicity. *Toxicologic Pathology*, 44(4), 555–563. <https://doi.org/10.1177/0192623316632074>

- [88] Moon, S., Kim, D. H., & Shin, J. U. (2021). In Vitro Models Mimicking Immune Response in the Skin. *Yonsei Medical Journal*, 62(11), 969. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.969>
- [89] Naves, Lucas B., Dhand, C., Almeida, L., Rajamani, L., & Ramakrishna, S. (2016). In vitro skin models and tissue engineering protocols for skin graft applications. *Essays in Biochemistry*, 60(4), 357–369. <https://doi.org/10.1042/ebc20160043>
- [90] Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- [91] In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. (2015). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>
- [92] Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- [93] *BJ-5TA - CRL-4001 | ATCC*. (n.d.). https://www.atcc.org/products/crl-4001?geo_country=pt
- [94] Team, E. (2019, January 28). *Manual Cell Counting With Neubauer Chamber | LaboratoryInfo.com*. LaboratoryInfo.com. <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>
- [95] Bastidas, O. (n.d.). *Technical Note -Neubauer Chamber Cell Counting*. <https://mural.uv.es/basgaros/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>
- [96] Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014). Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>
- [97] Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT Assay. *CSH Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

- [98] Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- [99] Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Methods in molecular biology* (pp. 237–245). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- [100] Browning, A. P., McCue, S. W., & Simpson, M. J. (2017). A Bayesian computational approach to explore the optimal duration of a cell proliferation assay. *Bulletin of Mathematical Biology*, 79(8), 1888–1906. <https://doi.org/10.1007/s11538-017-0311-4>
- [101] Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- [102] Radstake, W. E., Gautam, K., Van Rompay, C., Vermeesen, R., Tabury, K., Verslegers, M., Baatout, S., & Baselet, B. (2023). Comparison of in vitro scratch wound assay experimental procedures. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 33, 101423. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101423>
- [103] Jonkman, J., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E. B., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>
- [104] Cory, G. O. (2011). Scratch-Wound Assay. In *Methods in molecular biology* (pp. 25–30). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_2
- [105] Martinotti, S., & Ranzato, E. (2019). Scratch wound healing assay. In *Methods in molecular biology* (pp. 225–229). https://doi.org/10.1007/7651_2019_259
- [106] Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>
- [107] Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of

in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, 15(7), e0232565.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>

[108] Bodnar, A. G. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, 279(5349), 349–352.
<https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>

[109] Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Sipos, A., & Takacs, P. (2019). Biocompatibility and zinc release testing of a zinc-containing vaginal gel. *Menopause*, 27(2), 143–149. <https://doi.org/10.1097/gme.0000000000001435>

[110] Salesa, B., Roser, & Ángel Serrano-Aroca. (2021). Zinc Chloride: Time-Dependent Cytotoxicity, Proliferation and Promotion of Glycoprotein Synthesis and Antioxidant Gene Expression in Human Keratinocytes. *Biology*, 10(11), 1072–1072.
<https://doi.org/10.3390/biology10111072>

[111] J Stork, C., M Martorano, L., & V Li, Y. (2010). UVB radiation induces an increase in intracellular zinc in human epidermal keratinocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(4). https://doi.org/10.3892/ijmm_00000486

[112] S., S., K., V., S., P., N., R., & K., K. (2017). In vitro cytotoxicity of zinc oxide, iron oxide and copper nanopowders prepared by green synthesis. *Toxicology Reports*, 4, 427–430. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.07.005>

[113] Richard, M.-J., Guiraud, P., Leccia, M.-T., Beani, J.-C., & Favier, A. (1993). Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress. *Biological Trace Element Research*, 37(2-3), 187–199.
<https://doi.org/10.1007/bf02783794>

[114] Rafiee Mehr Hassan. (2011). EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF ZINC ON RAJI CELL-LINE BY MTT ASSAY. *Iranian Journal of Toxicology*, 4(411), 390–396.

[115] van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>

- [116] Lo, M. N., Damon, L. J., Wei Tay, J., Jia, S., & Palmer, A. E. (2020). Single cell analysis reveals multiple requirements for zinc in the mammalian cell cycle. *ELife*, 9, e51107. <https://doi.org/10.7554/eLife.51107>
- [117] Wang, L., Luo, Q., Zhang, X., Qiu, J., Shi, Q., & Liu, X. (2021). Co-implantation of magnesium and zinc ions into titanium regulates the behaviors of human gingival fibroblasts. *Bioactive Materials*, 6(1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.07.012>
- [118] MacDonald, R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of Nutrition*, 130(5S Suppl), 1500S8S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>
- [119] de Oliveira, K. de J. F., Donangelo, C. M., de Oliveira, A. V., da Silveira, C. L. P., & Koury, J. C. (2009). Effect of zinc supplementation on the antioxidant, copper, and iron status of physically active adolescents. *Cell Biochemistry and Function*, 27(3), 162–166. <https://doi.org/10.1002/cbf.1550>
- [120] Rostan, E. F., DeBuys, H. V., Madey, D. L., & Pinnell, S. R. (2002). Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *International Journal of Dermatology*, 41(9), 606–611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01567.x>
- [121] Суходуб, Л. Б., Mariia Kumeda, Суходуб, Л. Б., Volodymyr Bielai, & Mykola Serhiiiovych Lyndin. (2023). Metal ions doping effect on the physicochemical, antimicrobial, and wound healing profiles of alginate-based composite. *Carbohydrate Polymers*, 304, 120486–120486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120486>
- [122] Tyszka-Czochara, M., Paśko, P., Reczyński, W., Szłósarczyk, M., Bystrowska, B., & Opoka, W. (2014). Zinc and Propolis Reduces Cytotoxicity and Proliferation in Skin Fibroblast Cell Culture: Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Propolis. *Biological Trace Element Research*, 160(1), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0019-3>
- [123] Julian-Dario Rembe, Julia Katharina Boehm, Fromm-Dornieden, C., Hauer, N., & Ewa Klara Stuermer. (2020). Comprehensive Analysis of Zinc Derivatives Pro-proliferative, Anti-Apoptotic and Antimicrobial Effect on Human Fibroblasts and Keratinocytes in a Simulated, Nutrient-deficient Environment In Vitro. *PubMed*, 9(2), 165–178. <https://doi.org/10.22088/ijmcm.bums.9.2.165>

- [124] Hashemi, S., Amir Pakdin, Mohammadi, A., Abdolkhalegh Keshavarzi, Mortazavi, M., & Parisa Sanati. (2023). Study the Effect of *Calendula officinalis* Extract Loaded on Zinc Oxide Nanoparticle Cream in Burn Wound Healing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(51), 59269–59279. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c17350>
- [125] Chen, F.-C., Huang, C.-M., Yu, X. Z., & Chen, Y.-Y. (2021). Effect of nano zinc oxide on proliferation and toxicity of human gingival cells. *Human & Experimental Toxicology*, 40(12_suppl), S804–S813. <https://doi.org/10.1177/096032712111058063>
- [126] Gundogdu, G., Gundogdu, K., Nalci, K. A., Demirkaya, A. K., Yılmaz Tascı, S., Demirkaya Miloglu, F., Senol, O., & Hacimuftuoglu, A. (2019). The Effect of Parietin Isolated From *Rheum ribes* L on In Vitro Wound Model Using Human Dermal Fibroblast Cells. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 18(1), 56–64. <https://doi.org/10.1177/1534734618819660>
- [127] Walter J. Pories, Henzel, J., Rob, C., & Strain, W. (1967). ACCELERATION OF WOUND HEALING IN MAN WITH ZINC SULPHATE GIVEN BY MOUTH. 289(7482), 121–124. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(67\)91031-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(67)91031-8)
- [128] Ågren, M. S., Ostenfeld, U., Kallehave, F., Gong, Y., Raffn, K., Crawford, M. E., Kiss, K., Friis-Møller, A., Gluud, C., & Jorgensen, L. N. (2006). A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial evaluating topical zinc oxide for acute open wounds following pilonidal disease excision. *Wound Repair and Regeneration*, 14(5), 526–535. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00159.x>
- [129] Schwartz, J. R., Marsh, R. G., & Draelos, Z. D. (2006). Zinc and Skin Health: Overview of Physiology and Pharmacology. *Dermatologic Surgery*, 31, 837–847. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31729>
- [130] Yang, F., Xue, Y., Wang, F., Guo, D., He, Y., Zhao, X., Yan, F., Xu, Y., Xia, D., & Liu, Y. (2023). Sustained release of magnesium and zinc ions synergistically accelerates wound healing. *Bioactive Materials*, 26, 88–101. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.019>
- [131] Tandon, N., Cimetta, E., Villasante, A., Kupferstein, N., Southall, M. D., Fassih, A., Xie, J., Sun, Y., & Vunjak-Novakovic, G. (2014). Galvanic microparticles increase migration of human dermal fibroblasts in a wound-healing model via reactive oxygen

species pathway. *Experimental Cell Research*, 320(1), 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.09.016>

[132] Iqra Sahibdad, Khalid, S., G. Rasul Chaudhry, Salim, A., Begum, S., & Khan, I. (2023). Zinc enhances the cell adhesion, migration, and self-renewal potential of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 15(7), 751–767. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v15.i7.751>

[133] Gupta, M., Mahajan, V. K., Mehta, K. S., & Chauhan, P. S. (2014). Zinc Therapy in Dermatology: a Review. *Dermatology Research and Practice*, 2014(1), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/709152>

[134] Chen, Y., Cai, J., Liu, D., Liu, S., Lei, D., Zheng, L., Wei, Q., & Gao, M. (2022). Zinc-based metal organic framework with antibacterial and anti-inflammatory properties for promoting wound healing. *Regenerative Biomaterials*, 9. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac019>

[135] Lin, P.-H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, P., Steinberg, S., & Ma, J. (2017). Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu10010016>

[136] Tenaud, I., Leroy, S., Chebassier, N., & Dreno, B. (2000). Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Experimental Dermatology*, 9(6), 407–416. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009006407.x>

[137] Tandon, N., Cimetta, E., Villasante, A., Kupferstein, N., Southall, M. D., Fassih, A., Xie, J., Sun, Y., & Vunjak-Novakovic, G. (2014). Galvanic microparticles increase migration of human dermal fibroblasts in a wound-healing model via reactive oxygen species pathway. *Experimental Cell Research*, 320(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.09.016>

