

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS PASSO FUNDO

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

VINÍCIUS PIERDONÁ

**DETERMINAÇÃO DE DESFECHOS E VIAS MOLECULARES E CELULARES
ASSOCIADAS À SENESCÊNCIA INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO EM
CÉLULAS AMNIÓTICAS**

PASSO FUNDO/RS

2026

VINÍCIUS PIERDONÁ

**DETERMINAÇÃO DE DESFECHOS E VIAS MOLECULARES E CELULARES
ASSOCIADAS À SENESCÊNCIA INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO EM
CÉLULAS AMNIÓTICAS**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado como
requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em
Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul,
campus Passo Fundo/RS.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Jossimara Polettini

**PASSO FUNDO/RS
2026**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Lima, Vinícius Pierdoná
Determinação de desfechos e vias moleculares e
celulares associadas à senescência induzida por fumaça
de cigarro em células amnióticas / Vinícius Pierdoná
Lima. -- 2026.
54 f.

Orientador: Doutora Jossimara Polettini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2026.

1. Senescência. 2. Obstetrícia. 3. Fumaça de Cigarro.
I. Polettini, Jossimara, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

VINÍCIUS PIERDONÁ

**DETERMINAÇÃO DE DESFECHOS E VIAS MOLECULARES E CELULARES
ASSOCIADAS À SENESCÊNCIA INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO EM
CÉLULAS AMNIÓTICAS**

Trabalho de Curso apresentado no Curso de Medicina da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus
Passo Fundo - RS, como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Medicina.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca em 16/06/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini – UFFS
Orientadora

Prof. Dr. Lucas Kich Grun – HCPA
Avaliador

Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani – UFFS
Avaliador

*Às mulheres que me fazem um homem melhor,
minha companheira, minha filha, minha mãe e minha irmã,
meu eterno amor.*

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho é fruto da colaboração de um número imenso de pessoas, a quem devo profundos agradecimentos. Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer as mulheres da minha vida, minha mãe, Eliana Maria Pierdoná, minha irmã, Juliana Pierdoná Lima, minha companheira, Patrícia Lavandoski e minha filha Teodora Lavandoski Pierdoná. Tive a sorte de crescer cercado de mulheres brilhantes e sei que minhas melhores partes são fruto disso.

Preciso agradecer também minha orientadora, Jossimara Poletini, que tem sido um exemplo de competência e humanidade nesse período de retorno à graduação. É sempre uma surpresa muito grata encontrar pessoas que conseguem tão bem equilibrar essas duas características que, por vezes, podem parecer contraditórias.

Agradeço também aos amigos e colegas, novos e antigos, por tolerarem meu humor cinza e minha presença nem sempre muito fácil. Especialmente, agradeço ao Lucas e a Juliete, que tão gentilmente aceitaram fazer parte da nossa família. Eles são daquele tipo raro de pessoa que têm a habilidade inata de transformar o mundo ao seu redor mais bonito. É um prazer muito grande dividir esse tempo com vocês. Aproveito também para agradecer aos meus sempre fieis mosqueteiros Guilherme, Vinícius e Matheus.

Por fim, agradeço à banca, por ter tomado o tempo de ler e contribuir com esse trabalho, e todas as instituições que fizeram sua conclusão possível.

APRESENTAÇÃO

Trata-se de um Trabalho de Curso de Graduação, elaborado pelo acadêmico Vinícius Pierdoná Lima, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo, RS, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini. Está em conformidade com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e com o Regulamento de TC do Curso, sendo composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico, tendo sido desenvolvido ao longo de três semestres do curso de Medicina da UFFS. Esse trabalho objetiva investigar os efeitos do estresse oxidativo promovido pela fumaça de cigarro na ativação de vias moleculares e celulares relacionadas à senescência em células epiteliais amnióticas imortalizadas de humanos. O primeiro capítulo consiste no projeto de pesquisa, desenvolvido no componente curricular de Trabalho de Curso I, no primeiro semestre de 2025. O segundo capítulo consiste no relatório de Pesquisa, compreendendo o desenvolvimento dos experimentos ocorridos durante o segundo semestre de 2025. Por fim, o terceiro capítulo traz o artigo científico, seus resultados e discussão, desenvolvido durante o componente curricular de Trabalho de Curso III. Consta, pois, de um estudo, quantitativo e experimental, desenvolvido em parceria com Laboratório de Imunologia da Relação Materno-Fetal, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

A exposição gestacional à fumaça de cigarro está associada a diversos desfechos adversos, como malformações fetais e parto prematuro. No entanto, os mecanismos moleculares que explicam esses efeitos ainda não são totalmente compreendidos. A senescência celular tem sido apontada como um possível fator na perda da homeostase dos tecidos gestacionais, afetando a função placentária e comprometendo a manutenção da gestação. O desequilíbrio redox surge como um elo comum entre estressores oxidativos e a indução de senescência celular, podendo representar um mecanismo-chave nessa interação. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos do estresse oxidativo na ativação de vias moleculares e celulares relacionadas à senescência em células placentárias de humanos. Para tanto, o estudo adota uma abordagem quantitativa e experimental, estruturada em duas fases complementares. Inicialmente, realiza-se uma simulação computacional *in silico* por meio de redes lógicas assíncronas, com o intuito de prever alterações moleculares associadas à exposição, corroborada pela análise de transcriptoma de células placentárias de gestantes expostas ou não à fumaça de cigarro. Essa abordagem integrada visa ampliar a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos nos efeitos da fumaça de cigarro sobre o ambiente gestacional, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas. Verificou-se, por meio de modelagem computacional e validação por transcriptoma, a ativação da via p53, associada a dano ao DNA e apoptose, em resposta à exposição à fumaça de cigarro. Dessa forma, esse trabalho fornece evidências de que a fumaça de cigarro induz senescência a células placentárias extraembrionárias através de um programa composto por dano oxidativo a macromoléculas, resposta de dano ao DNA, ativação da via de p53 e apoptose.

Palavras-chave: Senescência Celular; Estresse Oxidativo; Envelhecimento; Âmnio

RESUMO NA LÍNGUA INGLESA

Gestational exposure to cigarette smoke is associated with several adverse outcomes, including fetal malformations and preterm birth. However, the molecular mechanisms underlying these effects remain incompletely understood. Cellular senescence has been proposed as a potential contributor to the loss of homeostasis in gestational tissues, affecting placental function and compromising pregnancy maintenance. Redox imbalance emerges as a common link between oxidative stressors and the induction of cellular senescence and may represent a key mechanism in this interaction. In this context, the present study aimed to investigate the effects of oxidative stress on the activation of molecular and cellular pathways related to senescence in human placental cells. To this end, we adopted an integrated approach comprising two complementary phases. First, an *in silico* computational simulation was performed using asynchronous logical networks to predict exposure-associated molecular alterations. These findings were then compared with transcriptomic data from placental tissue of pregnant women exposed or not exposed to cigarette smoke. This integrated strategy aimed to broaden the understanding of the cellular mechanisms involved in the effects of cigarette smoke on the gestational environment, contributing to the identification of potential preventive and therapeutic targets. Through computational modeling and transcriptomic validation, activation of the p53 pathway, associated with DNA damage and apoptosis, was observed in response to cigarette smoke exposure. Thus, this study provides evidence that cigarette smoke may induce senescence in extraembryonic placental cells through a program involving oxidative macromolecular damage, DNA damage response, p53 pathway activation, and apoptosis.

Keywords: Cellular Senescence; Oxidative Stress; Aging; Amnion

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	DESENVOLVIMENTO	14
2.1	PROJETO DE PESQUISA	14
2.1.1	Tema.....	14
2.1.2	Problemas	14
2.1.3	Hipóteses	14
2.1.4	Objetivos	15
2.1.4.1	Objetivo Geral	15
2.1.4.2	Objetivos Específicos	15
2.1.5	Justificativa.....	15
2.1.6	Referencial teórico	16
2.1.6.1	Senescência celular: Conceitos e mecanismos.....	16
2.1.6.2	Aspectos moleculares e celulares da senescência	17
2.1.6.3	Estresse oxidativo e dano ao DNA na senescência	18
2.1.6.4	Fumaça de cigarro como agente pró-senescência	20
2.1.6.5	Senescência no desenvolvimento embriológico.....	21
2.1.7	Metodologia.....	22
2.1.7.1	Tipo de estudo	22
2.1.7.2	Local e período de realização	22
2.1.7.3	Modelo Experimental e Estratégia de Amostragem.....	23
2.1.7.4	Análise <i>in silico</i> de Ativação Diferencial.....	23
2.1.7.5	Cultura Celular e Estímulo com Extrato de Fumaça de Cigarro	24

2.1.7.6	Análise de Expressão Gênica por qPCR	25
2.1.7.7	Variáveis, instrumentos e coleta de dados.....	25
2.1.7.8	Processamento, controle de qualidade e análise dos dados.....	26
2.1.7.9	Aspectos éticos	26
2.1.8	Recursos	27
2.1.9	Cronograma	27
2.1.10	Referências	28
2.2	RELATÓRIO DE PESQUISA.....	34
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	37
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MÉTODOS.....	39
3.2.1	Análise <i>in silico</i> de Ativação Diferencial.....	39
3.2.2	Análise de enriquecimento funcional por <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>	39
3.2.3	Validação externa em transcriptoma placentário humano	40
3.2.4	Análise de enriquecimento funcional no transcriptoma placentário GSE18044.....	40
3.2.5	Análise Estatística	41
3.3	RESULTADOS	41
3.4	DISCUSSÃO.....	47
3.5	CONCLUSÃO.....	49
3.6	REFERENCIAS	49
4	CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS	54

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, em termos moleculares, a gestação cursa com um aumento fisiológico na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que se dá devido ao correspondente aumento da demanda metabólica e intensa atividade celular placentária. Quando essa produção ultrapassa a capacidade dos sistemas antioxidantes de neutralizá-las, instala-se um quadro de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode desencadear uma série de efeitos nocivos aos tecidos maternos e fetais, favorecendo o surgimento de complicações gestacionais, como pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino e parto prematuro (Dutta et al., 2015; Ibrahim et al., 2024; Menon et al., 2013; Poletti; Da Silva, 2020).

A exposição à fumaça de cigarro é um potente e bem conhecido estressor oxidativo e, durante a gestação, está associada a uma série de desfechos negativos no desenvolvimento embrionário e fetal, incluindo restrição do crescimento intrauterino (Bernstein et al., 2005; Lewandowska et al., 2020), baixo peso ao nascer, parto prematuro (Soneji; Beltrán-Sánchez, 2019) e malformações (Cevik et al., 2023; Malik et al., 2008). Apesar de amplamente documentados, os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos ainda não são completamente compreendidos, especialmente no que diz respeito ao impacto direto sobre células do ambiente intrauterino. Neste contexto, a senescência celular — um estado de parada do ciclo celular associado a alterações morfológicas e funcionais — surge como um possível mecanismo de resposta celular frente a insultos ambientais como a fumaça de cigarro.

A senescência celular no ambiente gestacional tem ganhado atenção como um possível fator de comprometimento do desenvolvimento fetal. Estudos recentes sugerem que a ativação precoce de vias de senescência em tecidos gestacionais pode interferir na função placentária (Biron-Shental et al., 2010) e no crescimento fetal (Heazell et al., 2011; Miranda et al., 2014). Além disso, há evidências de que insultos ambientais como poluição (Bové et al., 2019; Carvalho et al., 2016; Van den Hooven et al., 2012), dieta materna desequilibrada (Francis et al., 2022) e exposição ao tabaco (Von Chamier et al., 2021) podem induzir a formação de um microambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo em células intrauterinas, podendo afetar diretamente o desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, o estudo da senescência em células amnióticas pode oferecer perspectivas importantes sobre os mecanismos de programação fetal adversa.

Um dos principais mecanismos moleculares envolvidos na indução da senescência celular pela fumaça de cigarro é o estresse oxidativo (Nyunoya et al., 2006). A fumaça contém uma

mistura complexa de compostos pró-oxidantes que geram ROS dentro das células, levando à oxidação de proteínas, lipídios e, principalmente, ao dano ao DNA (La Maestra et al., 2011; La Maestra; De Flora; Micale, 2015). A atividade genotóxica desses compostos leva a respostas de reparo de dano ao DNA e parada do ciclo celular, mediada por vias como a da p53/p21, que, quando persistente, culmina na ativação do programa de senescência (Herbig et al., 2004).

A presente pesquisa propõe a utilização de um modelo computacional baseado em redes lógicas para a análise das dinâmicas moleculares e celulares evocadas frente estímulos miméticos aos da fumaça de cigarro. A partir da análise *in silico*, espera-se identificar as potenciais vias de sinalização associadas à senescência celular deflagrada pela fumaça de cigarro em células amnióticas e, posteriormente, validar *in vitro* os principais marcadores moleculares identificados. Essa abordagem integrada visa ampliar o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nos efeitos do estresse oxidativo sobre o ambiente gestacional e contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 Tema

Determinação das vias moleculares associadas à senescência em células amnióticas expostas a fumaça de cigarro.

2.1.2 Problemas

Quais vias de sinalização e marcadores moleculares associados à senescência celular são ativados em células amnióticas expostas ao estresse oxidativo?

Qual o papel do estresse oxidativo e do dano ao DNA na indução de senescência celular por fumaça de cigarro em células amnióticas?

Os marcadores de senescência previstos por simulação computacional são confirmados experimentalmente em células amnióticas expostas à fumaça de cigarro?

De que forma a exposição à fumaça de cigarro pode alterar o perfil molecular de células amnióticas e comprometer processos gestacionais por meio da senescência celular?

2.1.3 Hipóteses

A exposição ao estresse oxidativo ativará vias clássicas de senescência celular em células amnióticas, como as vias p53/p21 e p16^{INK4a}/Rb, acompanhada pelo aumento de marcadores como SA-β-gal, γ-H2AX e secreção de fatores pró-inflamatórios do SASP.

O estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro levará a danos persistentes no DNA, especialmente quebras de fita dupla, ativando vias de resposta ao dano genético, que culminarão na indução da senescência celular.

Os marcadores moleculares de senescência celular previstos pelo modelo computacional baseado em redes lógicas serão confirmados nos ensaios *in vitro*.

A exposição à fumaça de cigarro alterará o perfil transcricional de células amnióticas, promovendo um estado senescente, afetando negativamente processos gestacionais como a troca de nutrientes e a sinalização fetal-materna.

2.1.4 Objetivos

2.1.4.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do estresse oxidativo na ativação de vias moleculares e celulares relacionadas à senescência em células epiteliais amnióticas imortalizadas de humanos.

2.1.4.2 Objetivos Específicos

Determinar, em modelo computacional, o perfil de expressão gênica de células expostas à fumaça de cigarro em comparação a um grupo controle.

Avaliar o perfil de expressão gênica em linhagem de células amnióticas expostas à fumaça de cigarro em comparação a um grupo controle.

Identificar a ativação de marcadores moleculares associados às vias de estresse oxidativo, dano ao DNA em resposta à exposição.

Correlacionar a expressão dos marcadores com possíveis alterações morfológicas e funcionais nas células.

2.1.5 Justificativa

A exposição materna ao estresse oxidativo durante a gestação é um fator de risco amplamente reconhecido para complicações obstétricas e alterações no desenvolvimento fetal. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que mediam esses efeitos ainda não foram completamente elucidados. A identificação desses mecanismos é fundamental para compreender os desfechos adversos associados ao tabagismo gestacional e propor estratégias de prevenção mais eficazes. A senescência celular, por sua vez, desponta como um potencial elo entre a exposição a agentes tóxicos ambientais e a disfunção tecidual durante a gestação.

Nesse contexto, o uso de células amnióticas como modelo representa uma oportunidade relevante para avaliar o estresse oxidativo, através da estimulação com fumaça de cigarro sobre o ambiente intrauterino. Além disso, a aplicação de ferramentas computacionais baseadas em simulação de expressão gênica permite uma análise sistemática das alterações moleculares induzidas por esse estímulo, otimizando recursos e direcionando a seleção de marcadores a serem validados experimentalmente. A integração entre modelagem *in silico* e validação *in vitro* oferece uma abordagem promissora para explorar os efeitos da exposição ambiental no contexto gestacional.

2.1.6 Referencial teórico

2.1.6.1 Senescência celular: Conceitos e mecanismos

A senescência celular caracteriza-se como o estado de parada estável e, frequentemente, irreversível do ciclo celular associado à manutenção metabólica (Hernandez-Segura; Nehme; Demaria, 2018; López-Otín et al., 2023). Essa resposta pode ser desencadeada por uma variedade de estressores endógenos e exógenos, que, apesar de distintos em sua natureza, convergem para um fenótipo celular comum de parada proliferativa irreversível. Entre os principais agentes indutores, destacam-se a erosão telomérica, o dano persistente ao DNA, a ativação de oncogenes, o estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (Hernandez-Segura et al., 2018).

A senescência, no entanto, não caracteriza um fenótipo homogêneo, mas sim um grupo de fenótipos, ou programas de senescência, evocados sob diferentes estímulos e agrupados em grandes grupos (Hernandez-Segura et al., 2017). Desses, destaca-se principalmente a senescência replicativa, conceituada pela parada do ciclo replicativo induzida pela erosão dos telômeros após sucessivas divisões celulares (Allsopp et al., 1992; D'Adda Di Fagagna, 2008; Hadj Salem et al., 2015; Herbig et al., 2004). Este processo ativa vias de resposta ao dano ao DNA (DDR), que culminam na sinalização via ativação da proteína tumoral p53 (TP53) e subsequente indução do inibidor de quinases dependentes de ciclina p21 (p21^{Cip1}), promovendo o bloqueio do ciclo celular (Herbig et al., 2004). Em paralelo, observa-se a promoção da transcrição do gene CDKN2A, com aumento da expressão da proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina p16 (p16^{INK4a}), reforçando a inibição das ciclinas D associadas a quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) e, conseqüentemente, a ativação da via da proteína do retinoblastoma (RB) (Baker et al., 2011; Beauséjour et al., 2003; Serrano et al., 1997).

Outra categoria particularmente relevante do ponto de vista fisiopatológico é a senescência induzida por estresse oxidativo. Esse processo é desencadeado pelo acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio, que podem surgir como subprodutos do metabolismo mitocondrial, por exposição a agentes tóxicos ou como resposta a alterações inflamatórias crônicas. O ambiente intracelular pró-oxidativo induz dano macromolecular ao DNA, proteínas intracelulares e lipídios, além de comprometimento funcional das organelas celulares, especialmente mitocôndrias e lisossomos, o que ativa vias de resposta ao dano (Correia-Melo et al., 2014; Dumont et al., 2000; Gambino et al., 2013; Mas-Bargues et al.,

2017; Ota et al., 2008; Xiang et al., 2022). Entre os principais mediadores moleculares dessa via, destacam-se a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno 14 (MAPK14 ou p38) e o aumento da expressão de p21^{Cip1} e p16^{INK4a}, culminando na parada do ciclo celular. Assim, a senescência oxidativa representa não apenas uma resposta adaptativa a lesões celulares agudas, mas também uma via de contribuição relevante para o envelhecimento e para doenças crônicas associadas à inflamação persistente, disfunção metabólica e envelhecimento precoce.

Mecanismos adicionais, como a exposição a agentes genotóxicos ou distúrbios da proteostase, também podem induzir senescência, frequentemente associada a alterações cromáticas estáveis e formação de focos de heterocromatina (SAHF) (Gorgoulis et al., 2019). Assim, pode-se afirmar que a senescência constitui um conjunto heterogêneo de programas celulares, cuja indução é sensível a múltiplas perturbações fisiológicas ou patológicas.

2.1.6.2 Aspectos moleculares e celulares da senescência

Em termos morfofuncionais, as células senescentes apresentam um conjunto de características que, em conjunto, permitem sua identificação, ainda que nenhum marcador isolado seja exclusivo ou universal. Morfologicamente, células em senescência costumam assumir uma morfologia aumentada, achatada e vacuolizada, com incremento do volume citoplasmático e nuclear (Muñoz-Espín; Serrano, 2014). Ademais, passam a apresentar atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal), uma enzima lisossomal cuja expressão é aumentada em pH ácido e que constitui um dos métodos histoquímicos mais utilizados para detecção de células senescentes, especialmente em modelos *in vitro* (Dimri et al., 1995). Outros marcadores amplamente descritos incluem a expressão de p16^{INK4a} e p21^{Cip1}, a presença de focos de SAHF, e a ativação de vias de resposta ao dano ao DNA, como a fosforilação da histona H2AX (γ H2AX) (Gorgoulis et al., 2019).

Além disso, células senescentes exibem alterações metabólicas e secretórias significativas. Em particular, observa-se o desenvolvimento de um fenótipo secretório inflamatório, conhecido como fenótipo secretor associado à senescência (SASP), composto por citocinas, fatores de crescimento e metaloproteínases da matriz extracelular (Basisty et al., 2020; Coppé et al., 2010). Esses fatores não apenas atuam de maneira autócrina, mas também exercem efeitos parácrinos sobre células vizinhas, modulando processos como inflamação e remodelamento tecidual (Gorgoulis et al., 2019). Essa combinação de características, embora heterogênea e dependente do tipo celular e do estímulo indutor, é fundamental para a

identificação e compreensão do papel fisiopatológico das células senescentes em diversos contextos biológicos.

2.1.6.3 Estresse oxidativo e dano ao DNA na senescência

O estresse oxidativo é uma condição resultante do desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante da célula. Classicamente, a produção de ROS elenca entre os principais agentes exógenos de dano ao DNA, proteínas e lipídios, levando à disfunção celular (Harman, 1956). Desse modo, a relação entre estresse oxidativo e senescência celular perpassa, necessariamente, a ativação das vias de resposta ao dano no DNA. Desse modo, a produção de ROS e a ativação de DDR caracterizam uma dinâmica de retroalimentação positiva, na qual a promoção de estresse oxidativo induz danos genômicos e, simultaneamente, é intensificada pela ativação de vias celulares que reforçam o estado senescente. Essa interação estabelece um ciclo vicioso que contribui para a manutenção e estabilidade do fenótipo senescente (Correia-Melo et al., 2014; Faraonio, 2022; Hanson & Batchelor, 2022; Proctor & Kirkwood, 2002).

Estudos demonstram que, a ativação de vias de DDR — seja por encurtamento telomérico, lesões oxidativas ou exposição a estressores genotóxicos —, promove um aumento significativo na produção de ROS, tanto por fontes mitocondriais quanto por mecanismos não mitocondriais, como a ativação da NADPH oxidase. Esse aumento é mediado por reguladores como p53, p21 e p16, que não apenas conduzem à parada do ciclo celular, mas também modulam vias pró-oxidativas (Correia-Melo et al., 2014; Faraonio, 2022).

Nesse sentido, o trabalho de Correia-Melo et al. (2014) destaca que o gene p21 atua como um elo crítico nessa relação. Sua ativação está associada ao aumento progressivo dos níveis de estresse oxidativo, que, por sua vez, induz dano a macromoléculas. Dentre essas macromoléculas, destaca-se, nesse contexto, o DNA. Essa retroalimentação é sustentada por alterações mitocondriais funcionais, como perda da eficiência respiratória e comprometimento da biogênese mitocondrial, frequentemente reguladas negativamente pela atividade de p53 sobre os coativadores do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 α/β).

Ademais, o ciclo DDR-ROS também tem efeito deletério nas células circundantes. Nesse sentido, a secreção de elementos do SASP, como citocinas pró-inflamatória, podem agir de forma parácrina sobre células vizinhas, induzindo danos ao DNA e ativando vias semelhantes de senescência via ROS (Basisty et al., 2020; Coppé et al., 2010; Giroud et al.,

2023). Tal fenômeno, conhecido como efeito *bystander*, amplia o impacto do estresse oxidativo no microambiente tecidual (Correia-Melo et al., 2014).

Diante da estreita relação entre estresse oxidativo, dano ao DNA e senescência celular, estratégias voltadas à modulação redox têm ganhado destaque como potenciais abordagens para prevenir, retardar ou até mesmo reverter o fenótipo senescente em contextos fisiopatológicos. A manipulação dos níveis de ROS por meio de antioxidantes exógenos, compostos reguladores da atividade mitocondrial ou intervenções genéticas constitui uma linha promissora de investigação no campo da gerontologia (Faraonio, 2022).

Diversos estudos indicam que a reposição de NAD^+ — um cofator essencial em processos redox e substrato da enzima Sirtuina 1 (SIRT1) — é capaz de atenuar a senescência induzida por agentes oxidativos, como o D-galactose ou o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Wang et al., 2021). O aumento dos níveis intracelulares de NAD^+ promove a ativação de SIRT1, a qual está associada à proteção contra danos oxidativos e à melhora da função mitocondrial em células-tronco mesenquimais. Essa via também estimula a autofagia — processo que contribui para a remoção de organelas danificadas e, assim, reduz a carga oxidativa intracelular.

Outros compostos, como o inibidor de NAMPT FK866, demonstraram capacidade de reduzir a senescência prematura em células da polpa dentária humana ao suprimir a produção de ROS e regular negativamente a expressão de fatores pró-inflamatórios associados ao SASP, como as interleucinas (IL) IL-1 α , IL-6, IL-8 e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), por meio da inibição da via de sinalização Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) (Ok et al., 2021).

Além disso, compostos como a camforquinona também mostraram eficácia na atenuação de marcadores de senescência em modelos celulares e animais, atuando via ativação de SIRT1 e promoção da autofagia (Maharajan & Cho, 2021). Em outro modelo, o silenciamento da enzima mitocondrial Arginase 2 (ARG2) — associada à inibição da autofagia — resultou na redução de marcadores senescentes em fibroblastos cutâneos humanos tratados com H_2O_2 . Essa resposta foi mediada pela microRNA miR-1299, que regula negativamente ARG2, sugerindo o envolvimento de eixos não codificantes como potenciais alvos terapêuticos para o controle da senescência redox-induzida (Kim et al., 2021).

2.1.6.4 Fumaça de cigarro como agente pró-senescência

A fumaça de cigarro é composta por mais de 7.000 substâncias químicas, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados, aldeídos reativos e radicais livres. Diversos desses componentes possuem potencial pró-oxidante elevado, capazes de induzir estresse oxidativo intenso em células expostas (La Maestra et al., 2011; La Maestra; De Flora; Micale, 2015). Essa sobrecarga oxidativa desencadeia danos diretos ao DNA, como quebras de fita dupla, ativando mecanismos clássicos de reparo e sinalização do dano, como as vias p53/p21 e p16/Rb (Das et al., 2023; Hanson & Batchelor, 2022). Quando esses danos ocorrem de maneira crônica ou excedem a capacidade de controle homeostático da célula, ocorre a ativação do programa de senescência como mecanismo de proteção contra transformação maligna.

Além disso, achados sugerem que a exposição crônica à fumaça de cigarro não apenas promove a senescência celular, como também consolida um padrão secretório pró-inflamatório condizente ao SASP (Wu et al., 2022), promovendo um microambiente pró-inflamatório e contribuindo para alterações teciduais, disfunções metabólicas e envelhecimento precoce em diferentes modelos biológicos (Li et al., 2023; Liu et al., 2022). Tais evidências reforçam a fumaça de cigarro como um indutor potente e multifatorial de senescência celular.

Durante a gravidez, a exposição materna ao cigarro está associada a um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode resultar em danos celulares e moleculares em tecidos fetais e placentários (Dutta et al., 2015; La Maestra et al., 2015; Soneji & Beltrán-Sánchez, 2019). Tais efeitos são particularmente críticos no líquido amniótico, cuja composição bioquímica reflete o estado metabólico e inflamatório do ambiente intrauterino. Em estudo conduzido por Menon et al. (2011), gestantes fumantes apresentaram concentrações cerca de três vezes maiores de F2-isoprostanos (F2-IsoP) no líquido amniótico, independentemente da idade gestacional ou da etnia. Os F2-IsoP são produtos da peroxidação lipídica não enzimática do ácido araquidônico e constituem um relevante biomarcador de estresse oxidativo *in vivo*. Essa elevação nos níveis de F2-IsoP é indicativa de uma intensa atividade oxidativa induzida diretamente pela exposição ao cigarro, sugerindo que esse fator ambiental compromete significativamente o equilíbrio redox no ambiente gestacional (Menon et al., 2011).

Além do aumento de F2-IsoP, outros eicosanoides pró-inflamatórios como PGE₂ e PGD₂ também foram encontrados em maiores concentrações no líquido amniótico de fumantes.

Esses compostos, derivados enzimaticamente do ácido araquidônico, estão envolvidos na regulação do início do parto e na ativação de vias inflamatórias. Ainda que sua relação com partos prematuros não tenha sido conclusiva neste estudo, sua elevação em gestantes expostas ao cigarro reforça a hipótese de um ambiente intrauterino pró-inflamatório e pró-oxidativo (Menon et al., 2011).

O achado mais relevante, no entanto, foi a associação clara entre tabagismo materno e ativação de vias oxidativas específicas capazes de induzir dano celular — o que pode favorecer o estabelecimento de senescência celular precoce em tecidos fetais expostos. Em particular, tecidos altamente sensíveis ao estresse oxidativo, como as membranas fetais e as células do líquido amniótico, podem apresentar aumento de apoptose, acúmulo de DNA danificado, como mostrado em experimentos complementares com culturas celulares estimuladas com extrato de fumaça de cigarro (Dutta et al., 2015; Menon et al., 2011, 2013; Sheller-Miller et al., 2019).

Esses resultados corroboram a hipótese de que o cigarro, por meio da indução de estresse oxidativo intenso, atua como um potencial agente indutor de senescência celular no ambiente gestacional.

2.1.6.5 Senescência no desenvolvimento embriológico

A senescência celular é atualmente reconhecida como um processo fisiológico essencial nos tecidos gestacionais, especialmente à medida que a gestação se aproxima do termo. Nesse contexto, observa-se um acúmulo progressivo de estresse oxidativo, que desencadeia a ativação de vias moleculares relacionadas à senescência e promove o encurtamento dos telômeros — marcador clássico de envelhecimento celular. Essas alterações induzem modificações morfológicas e funcionais nas membranas fetais e na placenta, contribuindo para a sinalização e o início do trabalho de parto (Behnia et al., 2015; Menon et al., 2014). Dentre esses processos, destaca-se a liberação de citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-8, elementos importantes do SASP que parecem desempenhar um papel importante na indução da contratilidade uterina durante o parto (Freund et al., 2010; Menon, 2016).

Contudo, diferentes fatores como exposição a agentes químicos, poluição, infecções, obesidade ou tabagismo parecem resultar na exacerbação da produção de ROS, podendo promover uma ativação prematura das vias de senescência celular, o que pode levar à ruptura precoce das membranas fetais e ao parto prematuro. Corroborando, observou-se que membranas fetais obtidas de partos com ruptura prematura das membranas fetais apresentam

comprimento telomérico semelhante ao observado em partos a termo, além de marcadores de senescência, como p38MAPK, aumentados, sugerindo o papel do encurtamento telomérico e da senescência celular nos processos envolvidos na prematuridade (Dutta et al., 2015; Menon et al., 2012; Polettini et al., 2015; Polettini & da Silva, 2020).

Reforçando a hipótese do envelhecimento celular precoce como fator determinante na dinâmica dos tecidos gestacionais, estudos demonstraram que o comprimento dos telômeros apresenta correlação negativa com a idade gestacional, indicando um processo progressivo de encurtamento telomérico conforme o avanço da gestação (Gielen et al., 2014). Ainda, foi observado que células epiteliais amnióticas, quando submetidas a estresse oxidativo *in vitro* a partir da exposição a extrato de fumaça de cigarro, passam a secretar no meio exossomos contendo fragmentos de telômeros fetais e proteínas associadas ao dano celular, como a HMGB1. Esses exossomos, por sua vez, são capazes de induzir senescência em células adjacentes através da ativação da via p38MAPK e do aumento da expressão da proteína p21. Tais achados reforçam o papel funcional dos telômeros e da senescência celular como componentes da sinalização fisiológica do parto, além de sugerirem sua possível contribuição em mecanismos patológicos associados ao parto prematuro (Sheller-Miller et al., 2019).

2.1.7 Metodologia

2.1.7.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental de natureza básica, compreendendo análise *in silico* através de modelagem computacional de redes lógicas e experimentação *in vitro* em linhagens celulares amnióticas imortalizadas de humanos.

2.1.7.2 Local e período de realização

O presente estudo será realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo – RS, e contará com a colaboração do Laboratório de Imunologia da Relação Materno-Fetal, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. As atividades de simulação computacional serão conduzidas na UFFS, enquanto a execução dos ensaios laboratoriais de validação *in vitro* será dividida entre as duas instituições, conforme a disponibilidade de infraestrutura e equipamentos específicos. A execução do projeto está prevista para ocorrer entre agosto de 2025 e julho de 2026.

2.1.7.3 Modelo Experimental e Estratégia de Amostragem

O sistema-modelo adotado neste estudo é composto por linhagem de células amnióticas humanas imortalizadas fornecidas pelo Laboratório de Imunologia da Relação Materno-Fetal, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. A amostragem será não probabilística e intencional, com seleção de amostras baseadas em critérios técnicos, como viabilidade celular, e disponibilidade de material biológico compatível com os objetivos do estudo. Serão utilizadas três réplicas biológicas independentes por condição experimental (grupo controle e grupo exposto) e três réplicas técnicas, a fim de garantir a reprodutibilidade e validade estatística dos achados.

Na fase *in silico*, as análises serão realizadas por meio do *software* PseudoCell, uma rede regulatória lógica multivalorada projetada para simular os principais programas de senescência celular. Nesse contexto, população refere-se ao conjunto teórico de estados de ativação possíveis da rede regulatória sob diferentes estímulos. Como a dinâmica de atualização da rede é estocástica, diferentes trajetórias são possíveis mesmo sob a mesma condição inicial, justificando o uso de múltiplas amostras para caracterizar adequadamente a resposta média da rede. Cada condição experimental será simulada múltiplas vezes com diferentes ordens de atualização dos nós (*random order asynchronous update*), de forma a capturar a variabilidade intrínseca do sistema. Neste contexto, cada repetição da simulação constitui uma amostra computacional, e o conjunto de repetições para uma mesma condição é considerado um experimento. Serão realizadas ao menos 30 simulações por condição ($n = 30$), valor comumente adotado em estudos computacionais baseados em redes lógicas, garantindo variabilidade suficiente para a análise estatística das diferenças de ativação dos nós regulatórios. O número de simulações foi definido com base em recomendações da literatura e replicabilidade observada em estudos anteriores utilizando a mesma ferramenta.

2.1.7.4 Análise *in silico* de Ativação Diferencial

A análise de ativação diferencial será conduzida *in silico* com o auxílio da ferramenta PseudoCell. Para a realização das análises, serão definidas condições experimentais computacionais mediante a estimulação de nós de entrada da rede que mimetizem os impactos pró-oxidativos e pró-inflamatórios conhecidos da fumaça de cigarro. A rede será atualizada por meio de um esquema assíncrono de atualização com ordem aleatória dos nós, permitindo capturar a variabilidade estocástica do sistema. Cada condição será simulada por 1.000 ciclos de atualização e repetida 30 vezes ($n = 30$) para geração de uma matriz de dados representativa.

Os resultados de cada simulação serão expressos em termos de *Node Activity Frequency* (NAF), uma medida que representa a frequência relativa de ativação de cada nó ao longo da simulação. Após a execução das simulações, será gerada uma matriz (CSV) com os NAFs de todos os nós em cada repetição experimental. Esses dados serão analisados por meio da linguagem R, utilizando os pacotes *limma* e *clusterProfiler*, para identificação de nós com ativação diferencial entre grupos controle e expostos, com aplicação de testes estatísticos como *limma-moderated t-test*. O critério de significância será estabelecido em $p < 0,05$, com correção de múltiplas comparações por *False Discovery Rate* (FDR), quando aplicável.

A partir da lista de nós diferencialmente ativados, serão realizadas análises de enriquecimento funcional para identificação de vias moleculares moduladas em resposta ao estímulo. As vias serão agrupadas conforme categorias de *Gene Ontology* (GO) e *KEGG Pathways*, com posterior correlação dos achados computacionais com os dados obtidos nos ensaios *in vitro*.

2.1.7.5 Cultura Celular e Estímulo com Extrato de Fumaça de Cigarro

Para os estudos laboratoriais *in vitro*, serão utilizadas cultura de células amnióticas epiteliais imortalizadas, estimuladas com estressores a fim de gerar danos oxidativos, utilizando-se técnica previamente descrita (Menon et al., 2013). As células amnióticas serão gentilmente cedidas e os experimentos serão realizados pelo Laboratório de Imunologia da Relação Materno-Fetal, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP.

As células serão ressuspensas em meio de cultura completo (Keratinocyte serum-free medium (KSFM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)) suplementado com Primocina (InvivoGen, San Diego, CA, USA) e transferidas para garrafas de cultura, T25 ou T75, contendo meio de cultura KSFM, com troca de meio após 24 horas, mantidas a condições ideais de CO₂ (5%) e temperatura (37 °C) por 24h para verificação de viabilidade celular. Quando 80-90% da confluência celular for atingida, ocorrerá a tripsinização, ressuspensão e realocação celular em placas de 24 poços, onde os experimentos de tratamento celular serão realizados.

As células serão estimuladas com o estressor oxidativo: meio de cultura tratado com extrato aquoso de fumaça de cigarro. Essa solução será preparada borbulhando fumaça de um único cigarro comercial aceso (Camel sem filtro; R.J. Reynolds Tobacco Co., Winston Salem, NC) em 50 mL do meio de cultura acima referido. O extrato será esterilizado por filtração em um filtro de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) para remover microrganismos contaminantes

e partículas insolúveis. As células serão estimuladas com a solução na diluição 1:10 por 24 horas (Menon et al., 2014). Culturas sem estímulo, incubadas apenas com o meio de cultura, serão usadas como controle negativo.

2.1.7.6 Análise de Expressão Gênica por qPCR

A análise da expressão gênica será realizada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), com o objetivo de validar os achados da etapa *in silico*. Serão selecionados genes-alvo identificados como diferencialmente ativados nas simulações computacionais, com base no critério de maior relevância funcional e frequência de ativação nos nós da rede lógica. As sequências de *primers* serão desenvolvidas a partir dos genes encontrados, com auxílio do *software* BLAST.

As células amnióticas de humanos, após exposição ao extrato de fumaça de cigarro por tempo e concentração previamente definidos, serão lisadas para extração de RNA total, utilizando reagentes comerciais como o TRIzol® (Invitrogen). A qualidade e integridade do RNA serão avaliadas por espectrofotometria (260/280 nm) e eletroforese em gel de agarose.

O RNA será então convertido em cDNA por meio de transcrição reversa com enzimas comerciais, seguindo os protocolos do fabricante. As reações de qPCR serão realizadas com primers desenhados para genes-alvo, utilizando sistemas de detecção baseados em intercalantes fluorescentes como o SYBR Green. A quantificação relativa será realizada pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando genes de referência estáveis como controles endógenos.

Todas as reações serão realizadas em triplicata técnica, com ao menos três réplicas biológicas por grupo experimental, e a análise estatística dos níveis de expressão será realizada por meio de testes paramétricos (t de Student ou ANOVA), com significância estatística considerada para $p < 0,05$.

2.1.7.7 Variáveis, instrumentos e coleta de dados

Na etapa *in silico*, as variáveis independentes correspondem aos diferentes estímulos aplicados aos nós da rede (ex: ativação de mediadores oxidativos), definidos por suas frequências de ativação (%). As variáveis dependentes são os níveis de ativação dos nós da rede, expressos em NAF, ao longo das simulações. Os dados gerados serão exportados em formato CSV, contendo as matrizes de ativação de cada nó por repetição. A análise estatística

será realizada em linguagem R, com auxílio dos pacotes *clusterProfiler*, *limma* e *ggplot2* para identificação de alterações significativas nos perfis de ativação entre grupos.

Na etapa *in vitro*, linhagens de células amnióticas humanas imortalizadas serão cultivadas em condições controladas e expostas ao extrato de fumaça de cigarro padronizado. As variáveis independentes incluem o tempo e a concentração da exposição ao estímulo. As variáveis dependentes incluem a expressão de marcadores moleculares de senescência, como γ -H2AX, p21^{CIP1}, p16^{INK4a}, e marcadores do SASP, além de alterações morfológicas observadas por microscopia óptica e/ou fluorescência. A coleta de dados será feita por meio de técnicas de qPCR e/ou imunoenaios, a depender da disponibilidade de reagentes e equipamentos. As análises serão realizadas em triplicata biológica por condição experimental.

2.1.7.8 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados

Os dados brutos gerados pelo software PseudoCell serão exportados em formato CSV, contendo os valores de NAF para cada nó da rede em todas as repetições simuladas. O controle de qualidade envolverá a verificação de outliers, através de método de Tukey, e falhas de leitura e execução, através da avaliação computacional da razão linhas/colunas esperada por arquivo CSV. A análise estatística será conduzida na linguagem R, utilizando os pacotes *limma* para detecção de ativação diferencial entre grupos, com aplicação de *moderated t-test* e ajuste por FDR. Em seguida, será realizada análise de enriquecimento funcional com *clusterProfiler*, explorando os termos GO e as vias do KEGG associadas aos nós diferencialmente ativados. As visualizações serão geradas por meio dos pacotes *ggplot2* e *pheatmap*, facilitando a interpretação gráfica dos resultados.

Os dados provenientes da quantificação da expressão gênica por qPCR serão submetidos a controle de qualidade mediante análise da pureza e integridade do RNA (260/280 nm) sendo consideradas aceitáveis as razões entre 1.8 e 2.1, e análise de curvas de amplificação. O cálculo da expressão relativa dos genes-alvo será feito com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizando os resultados em relação aos genes de referência. A análise estatística será realizada no software GraphPad Prism com aplicação de testes t de Student (quando comparando dois grupos) ou ANOVA (para múltiplas condições), considerando significância estatística para $p < 0,05$.

2.1.7.9 Aspectos éticos

O presente estudo não envolve experimentação com seres humanos ou animais vivos, mas utiliza linhagens celulares estabelecidas de humanos, fornecidas de instituição

devidamente autorizada e mantida em conformidade com as normas de biossegurança e manejo celular. Por essa razão, o trabalho não requer submissão prévia ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) nem ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme previsto na Resolução CNS nº 466/2012 e na legislação brasileira vigente.

Todos os procedimentos laboratoriais seguirão as normas de Boas Práticas de Laboratório e biossegurança, conforme estabelecido pela Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Federal da Fronteira Sul e pelo laboratório parceiro.

2.1.8 Recursos

Quadro 1 - Orçamento

Quadro 1. Orçamento			
Item	Quantidade	Valor Unitário	Total
Notebook	1	R\$ 3.149,00	R\$ 3.149,00
Pacote Office	1	R\$ 80,00	R\$ 80,00
Total			R\$ 3.229,00

Fonte: autor (2024).

Para a realização dos experimentos previstos neste trabalho, os custos serão de responsabilidade da equipe de pesquisa.

2.1.9 Cronograma

Cronograma de atividades compreendendo o período entre agosto de 2025 e julho de 2026.

Atividade/ Mês	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de dados	X	X	X	X	X							
Processamento e análise dos dados			X	X	X	X	X	X				
Redação e divulgação dos resultados								X	X	X	X	

2.1.10 Referências

- ALLSOPP, R. C. et al. **Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 21, p. 10114–10118, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10114>.
- BAKER, D. J. et al. **Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.** Nature, v. 479, n. 7372, p. 232–236, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/NATURE10600>.
- BASISTY, N. et al. **A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development.** PLOS Biology, v. 18, n. 1, e3000599, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000599>.
- BEAUSÉJOUR, C. M. et al. **Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.** The EMBO Journal, v. 22, n. 16, p. 4212–4222, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG417>.
- BEHNIA, F. et al. **Chorioamniotic membrane senescence: A signal for parturition?** American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 213, n. 3, p. 359.e1–359.e16, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2015.05.041>.
- BERNSTEIN, I. M. et al. **Maternal smoking and its association with birth weight.** Obstetrics and Gynecology, v. 106, n. 5 Pt 1, p. 986–991, 2005.
- BIRON-SHENTAL, T. et al. **Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction.** American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 202, n. 4, p. 381.e1–381.e7, 2010.
- BOVÉ, H. et al. **Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta.** Nature Communications, v. 10, n. 1, p. 1–7, 17 set. 2019.
- CARVALHO, M. A. et al. **Associations of maternal personal exposure to air pollution on fetal weight and fetoplacental Doppler: A prospective cohort study.** Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.), v. 62, p. 9–17, 1 jul. 2016.
- CEVIK, J. et al. **Maternal Cigarette Smoking and Congenital Upper and Lower Limb Differences: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Journal of Clinical Medicine, v. 12, n. 13, p. 4181, 21 jun. 2023.

COPPÉ, J. P. et al. **Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor.** PLOS Biology, v. 6, n. 12, e301, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060301>.

CORREIA-MELO, C.; HEWITT, G.; PASSOS, J. F. **Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?** Longevity & Healthspan, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>.

D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response.** Nature Reviews. Cancer, v. 8, n. 7, p. 512–522, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/NRC2440>.

DAS, D. N. et al. **Caveolin-1-derived peptide attenuates cigarette smoke-induced airway and alveolar epithelial injury.** American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 325, n. 5, p. L689–L708, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00178.2022>.

DIMRI, G. P. et al. **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 92, n. 20, p. 9363, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.20.9363>.

DUMONT, P. et al. **Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast.** Free Radical Biology & Medicine, v. 28, n. 3, p. 361–3673, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)

DUTTA, E. H. et al. **Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes.** Molecular Human Reproduction, v. 22, n. 2, p. 143–157, 28 ago. 2015.

FARAONIO, R. **Oxidative Stress and Cell Senescence Process.** Antioxidants, v. 11, n. 9, p. 1718, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11091718>.

FRANCIS, E. C. et al. **Maternal Diet Quality Is Associated with Placental Proteins in the Placental Insulin/Growth Factor, Environmental Stress, Inflammation, and mTOR Signaling Pathways: The Healthy Start ECHO Cohort.** The Journal of Nutrition, v. 152, n. 3, p. 816–825, 1 mar. 2022.

FREUND, A. et al. **Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences.** Trends in Molecular Medicine, v. 16, n. 5, p. 238–246, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>.

GAMBINO, V. et al. **Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging.** Aging Cell, v. 12, n. 3, p. 435–445, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/ACEL.12060>.

GIELEN, M. et al. **Placental telomere length decreases with gestational age and is influenced by parity: A study of third trimester live-born twins.** Placenta, v. 35, n. 10, p. 791–796, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.05.010>.

GORGOLIS, V. et al. **Cellular Senescence: Defining a Path Forward.** Cell, v. 179, n. 4, p. 813–827, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.005>.

HADJ SALEM, I. et al. **Telomere shortening correlates with accelerated replicative senescence of bronchial fibroblasts in asthma.** Clinical and Experimental Allergy, v. 45, n. 11, p. 1713–1715, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/CEA.12611>.

HARMAN, D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** Journal of Gerontology, v. 11, n. 3, p. 298–300, 1956.

HANSON, R. L.; BATCHELOR, E. **Coordination of MAPK and p53 dynamics in the cellular responses to DNA damage and oxidative stress.** Molecular Systems Biology, v. 18, n. 12, e11401, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.202211401>.

HEAZELL, A. E. P. et al. **Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast.** Apoptosis, v. 16, n. 2, p. 135–144, fev. 2011.

HERBIG, U. et al. **Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a).** Molecular Cell, v. 14, n. 4, p. 501–513, 21 maio 2004.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. **Hallmarks of Cellular Senescence.** Trends in Cell Biology, v. 28, n. 6, p. 436–453, 1 jun. 2018.

HERNANDEZ-SEGURA, A. et al. **Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells.** *Current Biology: CB*, v. 27, n. 17, p. 2652–2660.e4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>.

KIM, H. J. et al. **Resolvin D1 suppresses H₂O₂-induced senescence in fibroblasts by inducing autophagy through the miR-1299/ARG2/ARL1 axis.** *Antioxidants*, v. 10, n. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10121924>.

IBRAHIM, A. et al. **Oxidative stress biomarkers in pregnancy: a systematic review.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 22, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2024.

LA MAESTRA, S. et al. **Cigarette smoke induces DNA damage and alters base-excision repair and tau levels in the brain of neonatal mice.** *Toxicological Sciences*, v. 123, n. 2, p. 471–479, out. 2011.

LA MAESTRA, S.; DE FLORA, S.; MICALE, R. T. **Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa.** *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 218, n. 1, p. 117–122, 2015.

LEWANDOWSKA, M. et al. **Smoking and Smoking Cessation in the Risk for Fetal Growth Restriction and Low Birth Weight and Additive Effect of Maternal Obesity.** *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 11, p. 3504, 29 out. 2020.

LI, X. et al. **Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01502-8>.

LIU, W. C. et al. **Cigarette smoke exposure increases glucose-6-phosphate dehydrogenase, autophagy, fibrosis, and senescence in kidney cells in vitro and in vivo.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. **Hallmarks of aging: An expanding universe.** *Cell*, v. 186, n. 2, p. 243–278, 19 jan. 2023.

MAHARAJAN, N.; CHO, G. W. **Camphorquinone promotes the antisenescence effect via activating AMPK/SIRT1 in stem cells and D-galactose-induced aging mice.** *Antioxidants*, v. 10, n. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10121916>.

MALIK, S. et al. **Maternal Smoking and Congenital Heart Defects.** Pediatrics, v. 121, n. 4, p. e810–e816, 1 abr. 2008.

MAS-BARGUES, C. et al. **Role of p16INK4a and BMI-1 in oxidative stress-induced premature senescence in human dental pulp stem cells.** Redox Biology, v. 12, p. 690–698, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.04.002>.

MENON, R. et al. **Amniotic Fluid Eicosanoids in Preterm and Term Births: Effects of Risk Factors for Spontaneous Preterm Labor.** Obstetrics and Gynecology, v. 118, n. 1, p. 121, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/AOG.0B013E3182204EAA>.

MENON, R. et al. **Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro.** American Journal of Pathology, v. 184, n. 6, p. 1740–1751, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.011>.

MENON, R. et al. **Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition?** Placenta, v. 44, p. 1–5, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2016.05.013>.

MENON, R. et al. **Senescence of Primary Amniotic Cells via Oxidative DNA Damage.** PLoS ONE, v. 8, n. 12, p. e83416, 27 dez. 2013.

MENON, R. et al. **Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes.** PLoS ONE, v. 7, n. 2, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031136>.

MIRANDA, J. et al. **The anti-aging factor α -klotho during human pregnancy and its expression in pregnancies complicated by small-for-gestational-age neonates and/or preeclampsia.** The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, v. 27, n. 5, p. 449–457, mar. 2014.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. **Cellular senescence: from physiology to pathology.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 7, p. 482–496, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.

NYUNOYA, T. et al. **Cigarette Smoke Induces Cellular Senescence.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 35, n. 6, p. 681, dez. 2006.

OK, C. Y. et al. **Fk866 protects human dental pulp cells against oxidative stress-induced cellular senescence.** *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10020271>.

OTA, H. et al. **Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 28, n. 9, p. 1634–1639, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.164368>.

POLETTINI, J.; DA SILVA, M. G. **Telomere-Related Disorders in Fetal Membranes Associated With Birth and Adverse Pregnancy Outcomes.** *Frontiers in Physiology*, v. 11, 2 out. 2020.

POLETTINI, J. et al. **Telomere fragment induced amnion cell senescence: A contributor to parturition?** *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0137188>.

PROCTOR, C. J.; KIRKWOOD, T. B. L. **Modelling telomere shortening and the role of oxidative stress.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 123, n. 4, p. 351–363, 2002.

SERRANO, M. et al. **Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a).** *Cell*, v. 88, n. 5, p. 593–602, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9).

SHELLER-MILLER, S. et al. **Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy.** *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37002-x>.

SONEJI, S.; BELTRÁN-SÁNCHEZ, H. **Association of Maternal Cigarette Smoking and Smoking Cessation With Preterm Birth.** *JAMA Network Open*, v. 2, n. 4, p. e192514, 5 abr. 2019.

VAN DEN HOOVEN, E. H. et al. **Air pollution exposure and markers of placental growth and function: The Generation R Study.** *Environmental Health Perspectives*, v. 120, n. 12, p. 1753–1759, 2012.

VON CHAMIER, M. et al. **Nicotine Induces Maternal and Fetal Inflammatory Responses Which Predispose Intrauterine Infection Risk in a Rat Model.** *Nicotine & Tobacco Research*, v. 23, n. 10, p. 1763–1770, 1 out. 2021.

XIANG, Y. et al. **Oxidative stress-induced premature senescence and aggravated denervated skeletal muscular atrophy by regulating progerin–p53 interaction.** *Skeletal Muscle*, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/S13395-022-00302-Y>.

WANG, J. et al. **Exogenous NAD⁺ Postpones the D-Gal-Induced Senescence of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via Sirt1 Signaling.** *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 254, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10020254>.

WU, H. et al. **Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1a.** *International Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 2, p. 661–674, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7150/IJBS.65861>.

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

Este Trabalho de Curso, intitulado “Determinação de desfechos e vias moleculares e celulares associadas à senescência induzida por fumaça de cigarro em células amnióticas”, tem por objetivo investigar os efeitos do estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro sobre a ativação de vias moleculares e celulares de senescência em células epiteliais amnióticas humanas imortalizadas. Para tanto, adota-se um desenho em duas etapas complementares: Modelagem computacional *in silico*, baseada em redes lógicas assíncronas, para prever a modulação de nós regulatórios e a ativação diferencial de vias clássicas de senescência, e validação *in vitro* desses achados por meio de cultivo celular e análises de expressão gênica (qPCR) e de marcadores de dano ao DNA e SASP. Ao correlacionar assinaturas transcricionais e fenótipos celulares, o estudo busca elucidar mecanismos pelos quais a exposição ao tabaco pode precipitar senescência no ambiente gestacional, fornecendo subsídios para estratégias preventivas e terapêuticas voltadas à redução de desfechos obstétricos adversos.

O projeto foi redigido no primeiro semestre de 2025, sob orientação da Prof^a Dr^a Jossimara Polettini ao longo do Componente Curricular de Trabalho de Curso I, de acordo com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e do Regulamento de TC do Curso.

A escolha do tema decorre da relevância clínica do tabagismo materno como fator potencialmente modificável associado a desfechos gestacionais adversos e do crescente interesse em compreender como o estresse oxidativo aciona vias de senescência em tecidos extraembrionários. Investigar a interface entre dano oxidativo e a ativação de eixos de senescência nesse contexto contribui para esclarecer mecanismos plausíveis de fragilização tecidual no ambiente gestacional. Tal enfoque dialoga com prioridades de saúde pública, ao fornecer bases úteis para ações de prevenção e aconselhamento pré-natal.

As etapas computacionais e *in silico* foram realizadas de agosto a novembro de 2025 ao longo do Componente Curricular de Trabalho de Curso II. As simulações foram conduzidas através do *software* PseudoCell, composto por uma rede regulatória lógica multi-valorada voltada ao estudo de programas de senescência, que permite definir a frequência de estímulo externo aplicada a nós específicos ao longo de ciclos de atualização. Neste trabalho, aplicou-se um estímulo de 20% ao nó *Superoxide*, mantendo constantes os demais parâmetros entre grupos, e adotou-se como variável métrica o valor de *Node Activity Frequency* (NAF), definido como o somatório dos estados de ativação do nó ao longo da simulação dividido pelo tempo total. As atualizações da rede ocorrem em ordem aleatória e de forma assíncrona, de modo a refletir a natureza estocástica do sistema.

O desenho comparou a condição estimulada (*Superoxide* 20%) a controles sem estímulo. As saídas do PseudoCell foram exportadas em arquivos CSV contendo uma matriz amostras por nós com as NAF de cada amostra e um registro do estado de todos os nós a cada ciclo, o que possibilitou inspecionar o estado estacionário e garantir reprodutibilidade entre execuções. O pós-processamento foi realizado em linguagem R através da interface de programação *RStudio*. A partir da matriz de NAF, efetuou-se a comparação entre grupos para identificar nós diferencialmente ativados.

Devido a impossibilidades estruturais, os experimentos *in vitro* com células amnióticas não puderam ser conduzidos como previamente intencionado. Dessa forma, a fim de validar externamente os achados realizou-se a análise do transcriptoma público GSE18044, disponível na base de dados Gene Expression Omnibus. Esse transcriptoma contém perfis de expressão gênica de placentas humanas de 76 gestantes que deram à luz no Hospital Infantil de Motol, em Praga, expostas ou não à fumaça do tabaco durante a gravidez. A partir desse conjunto de dados, analisou-se a expressão diferencial dos genes modulados pela fumaça de cigarro e determinou-se as vias de sinalização e os desfechos celulares por eles alterados.

Ao término das etapas experimentais, e mediante a aprovação do TC pela banca examinadora os resultados serão organizados e estruturados para submissão em conformidade com as instruções aos autores – <https://www.sciencedirect.com/journal/placenta/publish/guide-for-authors> - do periódico Placenta (*Elsevier*).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Determinação de Desfechos e Vias Moleculares e Celulares Associadas à Senescência Induzida por Fumaça de Cigarro em Células Placentárias

Vinícius Pierdoná¹, Jossimara Poletini^{1*}

¹ Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 99010-200, Brasil.

* Autor correspondente: Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletini. Universidade Federal da Fronteira Sul, R. Cap. Araújo, 20 - Centro, Passo Fundo – RS, CEP 99010-200. E-mail: jossimara.poletini@uffs.edu.br.

Resumo

A exposição materna à fumaça de cigarro constitui importante fonte de estresse oxidativo no ambiente gestacional e está associada a disfunção placentária, parto prematuro e restrição do crescimento fetal. Entretanto, os mecanismos celulares que conectam esse insulto ambiental à senescência em tecidos gestacionais ainda permanecem pouco esclarecidos. Neste estudo, investigamos vias moleculares e celulares associadas à senescência induzida por estímulo pró-oxidativo mimético à fumaça de cigarro em células placentária. Para isso, combinamos modelagem computacional baseada em rede lógica multivalorada e validação externa em transcriptoma placentário humano de gestantes expostas ao tabaco. O estímulo pró-oxidativo promoveu reorganização coordenada da rede, caracterizada pela ativação de mediadores de dano ao DNA e modulação de componentes relacionados a parada do ciclo celular, apoptose e controle proliferativo. A análise de enriquecimento revelou ativação positiva da via p53, associada a modulação de elementos como H2AX, ATM, CHEK2, BAX, CASP3 e FAS/FASL. De forma convergente, a análise transcricional demonstrou enriquecimento da mesma via em placentas de gestantes fumantes, com genes associados principalmente à sinalização apoptótica e parada do ciclo celular. Em conjunto, os resultados indicam que estímulos pró-oxidativos relacionados ao tabaco podem levar a ativação do eixo ROS-dano ao DNA–p53 em células placentárias, favorecendo um estado pró-senescente e potencialmente contribuindo para alterações da homeostase placentária.

Palavras-chave: Cellular Senescence; Oxidative Stress; Aging.

3.1 INTRODUÇÃO

A gestação constitui um estado biológico marcado por intensas adaptações metabólicas, endócrinas e imunológicas, acompanhadas por aumento fisiológico na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sobretudo em razão da elevada atividade placentária e da demanda energética materno-fetal [1,2]. Embora esse fenômeno integre a dinâmica normal da gravidez, o desequilíbrio entre a geração de ROS e a capacidade antioxidante do organismo pode culminar em um microambiente intrauterino pro-oxidante, com repercussões deletérias sobre o desenvolvimento fetal. Esse quadro tem sido associado a diferentes complicações obstétricas e desfechos perinatais adversos, incluindo pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino e parto prematuro, reforçando a relevância do controle redox sobre a manutenção da homeostase gestacional [3-6].

Entre os fatores ambientais capazes de exacerbar esse desequilíbrio, destaca-se a exposição materna à fumaça de cigarro, reconhecida como importante fonte exógena de estressores oxidativos e compostos genotóxicos [7,8]. como os eixos proteína supressora tumoral p53 (p53)/inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (p21) e inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (p16^{NK4a})/proteína do retinoblastoma (Rb) [9-11]. Adicionalmente, receptores de nicotina identificados no tecido placentário [12], podem contribuir para os efeitos adversos de vasoconstrição e diminuição da reepitelização, aumento da calcificação e apoptose, observados nas placentas de mulheres fumantes [13]. Nesse contexto, a senescência celular emerge como um mecanismo biologicamente plausível de resposta a essa exposição, caracterizando-se pela parada estável do ciclo celular, alterações morfofuncionais e aquisição de um fenótipo secretor pró-inflamatório característico (Fenótipo Secretor Associado à Senescência, SASP) [14]. Longe de representar um fenômeno homogêneo, a senescência compreende programas celulares distintos, sensíveis à natureza do estímulo desencadeante, e tem sido progressivamente reconhecida como elemento central na interface entre injúria ambiental, inflamação e disfunção tecidual [15].

No contexto gestacional, a senescência celular assume particular interesse, uma vez que participa de processos fisiológicos relacionados à maturação das membranas fetais e ao início do trabalho de parto, mas também pode ser induzida de forma prematura por condições patológicas. Evidências recentes sugerem que a intensificação do estresse oxidativo em tecidos gestacionais pode favorecer ativação precoce de vias senescentes, comprometendo a função placentária, a integridade das membranas fetais e o desenvolvimento fetal [3,5]. Assim, o estudo

da senescência induzida por estímulos miméticos à fumaça de cigarro em células de tecido placentário pode oferecer novas perspectivas sobre os mecanismos envolvidos na programação fetal adversa.

À luz dessas considerações, o presente estudo tem como objetivo investigar as vias moleculares associadas à senescência celular induzida pela fumaça de cigarro em células placentárias, combinando modelagem computacional baseada em redes lógicas com posterior validação externa. Essa estratégia permite não apenas a exploração sistemática das interações entre estresse oxidativo, dano ao DNA e programas de senescência, mas também a seleção de marcadores moleculares com potencial relevância biológica. Desse modo, espera-se contribuir para melhorar a compreensão dos mecanismos celulares pelos quais a exposição ambiental ao tabaco pode impactar o ambiente gestacional e, consequentemente, o desenvolvimento fetal.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise *in silico* de Ativação Diferencial

A análise *in silico* foi realizada com auxílio do software PseudoCell [16], composto por uma rede lógica célula-agnóstica e multivalorada criada para avaliar diferentes programas de senescência. Para determinar a ativação diferencial dos nós da rede frente ao estímulo pró-oxidativo mimético à fumaça de cigarro, estimulou-se o nó correspondente à formação de superóxido em uma frequência de 20%. A rede foi atualizada por meio de um esquema assíncrono de atualização com ordem aleatória dos nós, mantida por 1.000 ciclos de atualização e repetida 30 vezes para geração de uma matriz de dados representativa.

Os resultados de cada simulação foram expressos em termos de *Node Activity Frequency* (NAF), representando a frequência relativa de ativação de cada nó ao longo da simulação. Após a execução das simulações, os resultados foram analisados dentro do ambiente estatístico R, utilizando o pacote *limma* [17], a partir de uma abordagem de modelagem linear para identificação de nós com ativação diferencial entre grupos controle e expostos. Foram considerados significativos aquelas relações em $p < 0,05$ após correção por *False Discovery Rate* (FDR), e uma variação relativa (*fold change*) $> 0,0005$.

3.2.2 Análise de enriquecimento funcional por *Gene Set Enrichment Analysis*

A análise de enriquecimento funcional foi conduzida por *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) [18] com base na coleção *Hallmark* da base de dados *Molecular Signatures Database*

(MSigDB) [19,20], a fim de identificar programas biológicos coordenadamente modulados pelo estímulo pró-oxidativo. Inicialmente, os componentes da rede lógica resultantes da análise diferencial foram filtrados para manutenção apenas daqueles correspondentes a símbolos gênicos humanos válidos, excluindo-se nós representativos de espécies químicas, estados celulares ou entidades lógicas compostas. Em seguida, os genes foram ordenados de acordo com a estatística *t*, permitindo avaliar se conjuntos gênicos funcionalmente relacionados apresentavam distribuição não aleatória ao longo da lista ordenada. A análise foi conduzida no ambiente R, utilizando os pacotes *clusterProfiler* [21] e *msigdbR* [22], com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini-Hochberg. Conjuntos gênicos com valor de *p* ajustado $< 0,05$ foram considerados significativamente enriquecidos.

3.2.3 Validação externa em transcriptoma placentário humano

Para validação externa dos achados obtidos no modelo lógico, foi utilizado o conjunto de dados público GSE18044 [23], disponível na base de dados *Gene Expression Omnibus*. Esse transcriptoma contém perfis de expressão gênica de placentas humanas de gestantes expostas ou não ao tabaco durante a gestação, gerados pela plataforma *Illumina HumanRef-8 v2.0 Expression BeadChip*. No âmbito desse trabalho as amostras classificadas originalmente como *light smokers* e *heavy smokers* foram agrupadas em uma única categoria. Ademais, a fim de reduzir possível viés relacionado a alterações metabólicas e inflamatórias associadas ao excesso de peso, gestantes não fumantes com índice de massa corporal $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ foram excluídas da análise. Os dados foram obtidos e processados no ambiente R para análise de expressão diferencial utilizando os pacotes *GEOquery* [24] e *limma* [17]. Genes com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativamente modulados.

3.2.4 Análise de enriquecimento funcional no transcriptoma placentário GSE18044

Para avaliar a convergência entre os achados obtidos no modelo lógico e dados transcriptômicos humanos independentes, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional utilizando os resultados obtidos na análise de expressão diferencial para o transcriptoma GSE18044. Após a análise de expressão diferencial os genes foram ranqueados de acordo com a estatística *t*. Antes do ranqueamento, as sondas foram anotadas para símbolos gênicos humanos e convertidas para identificadores Entrez, utilizando o pacote *org.Hs.eg.db* [25]. Em casos de múltiplas sondas associadas ao mesmo gene, foi mantida a sonda com maior valor absoluto da estatística *t*.

A análise de enriquecimento foi conduzida por GSEA utilizando a coleção *Hallmark* da base de dados MSigDB [18-20], obtida no R por meio do pacote *msigdbR* [22] e *clusterProfiler* [21]. O método de Benjamini-Hochberg foi empregado para ajuste dos valores de p e controle da taxa de falsas descobertas. Os conjuntos gênicos com *Normalized Enrichment Score* (NES) positivo foram determinados como enriquecidos no grupo exposto ao tabaco, enquanto conjuntos com NES negativo foram interpretados como enriquecidos no grupo não exposto. Para caracterização funcional dos genes responsáveis pelo enriquecimento da via de P53, foi extraído o subconjunto de genes *leading edge* obtido pela análise GSEA. Esses genes foram submetidos a análise de enriquecimento funcional por *GO Biological Process*.

3.2.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste t de Student para dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para dados sem distribuição normal. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IQR), conforme especificado na descrição de cada figura. Salvo indicação em contrário, diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.3 RESULTADOS

A exposição ao estímulo pró-oxidativo promoveu a reorganização da rede lógica, marcada pelo aumento significativo da ativação de nós associados à produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de mediadores de dano ao DNA, enriquecimento funcional da via de p53, indução de componentes pró-apoptóticos e redução de reguladores da progressão do ciclo celular, com destaque para proteína quinase mutada na ataxia-telangiectasia (ATM), variante da histona H2A.X (H2AX), quinase de checkpoint 2 (CHEK2), proteína quinase ativada por mitógeno 14/p38 α (MAPK14), proteína ligadora da proteína tumoral p53 2 (TP53BP2), proteína X associada a BCL-2 (BAX), caspase-3 (CASP3), fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 1). Em conjunto, esse perfil sugere que o estímulo mimético ao efeito da fumaça de cigarro desencadeia uma resposta celular coordenada de resposta de dano ao DNA compatível com a instalação de um estado pró-senescente associado ao controle proliferativo e ativação de vias apoptóticas.

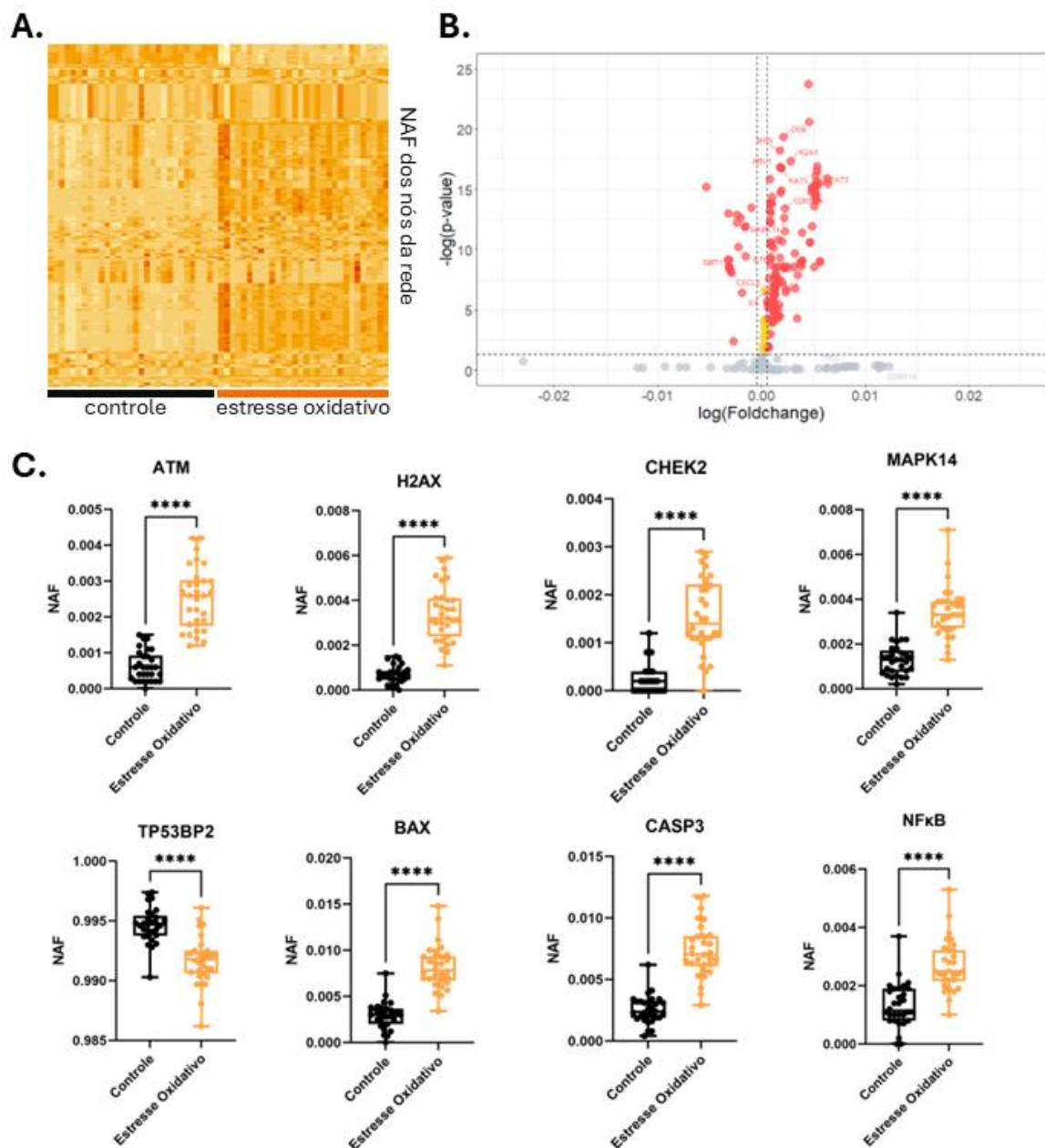


Figura 1. Determinação *in silico* de elementos moleculares e celulares modulados pelo estímulo pró-oxidativo mimético à fumaça de cigarro em modelo lógico. A. Mapa de densidade representando alterações no valor de NAF entre o grupo estresse oxidativo e controle. B. Gráfico de vulcão representando nós com ativação diferencial entre o grupo estresse oxidativo em comparação com o controle. Círculos vermelhos indicam nós com valor de $p < 0,01$ e variação relativa (*fold change*) $> 0,0005$. Círculos amarelos representam nós apenas com valor de $p < 0,01$ e não foram considerados diferencialmente ativos. Círculos cinzas

representam nós considerados não diferencialmente ativos. C. Nós representativos daqueles modulados pelo estímulo pró-oxidativo. Os dados são apresentados como mediana e IQR. Diferenças significativas consideradas quando $p < 0,0001$ (****). NAF: Frequência de Ativação do Nó.

É possível verificar também a separação global entre os grupos controle e superóxido (Figura 1A), indicando que a perturbação alterou o estado de ativação de um conjunto coordenado de componentes da rede, e não apenas de nós isolados. Ademais, os elementos do grupo superóxido tendem a se agrupar e a exibir aumento de atividade de elementos ligados as vias dano ao DNA e resposta ao estresse oxidativo, como ATM, H2AX, CHEK2 e NFκB (Figura 1B-C). Em paralelo, componentes associados à proliferação celular, como Survivin, tem sua atividade relativamente reduzida (Tabela Suplementar 1S). Esse padrão corrobora com a ideia de que o estímulo deslocou a rede de um estado mais homeostático para um estado de vigilância genômica e resposta de dano ao DNA.

Ademais, a análise de GSEA revelou o enriquecimento positivo da via p53 na condição submetida ao estímulo pró-oxidativo (Figura 2A). Nessa análise o *running enrichment score*, representado pela linha verde no gráfico, determina a pontuação acumulada de enriquecimento calculada ao percorrer a lista ordenada, enquanto sua elevação indica a concentração dos genes da via entre os componentes mais positivamente associados à condição experimental. Nesse sentido, a concentração dos genes da via na porção superior da lista ranqueada, acompanhada de elevação precoce do *running enrichment score*, sugere a ativação coordenada de genes associados à resposta ao dano celular, consistente com o engajamento do eixo p53 no contexto de estresse oxidativo.

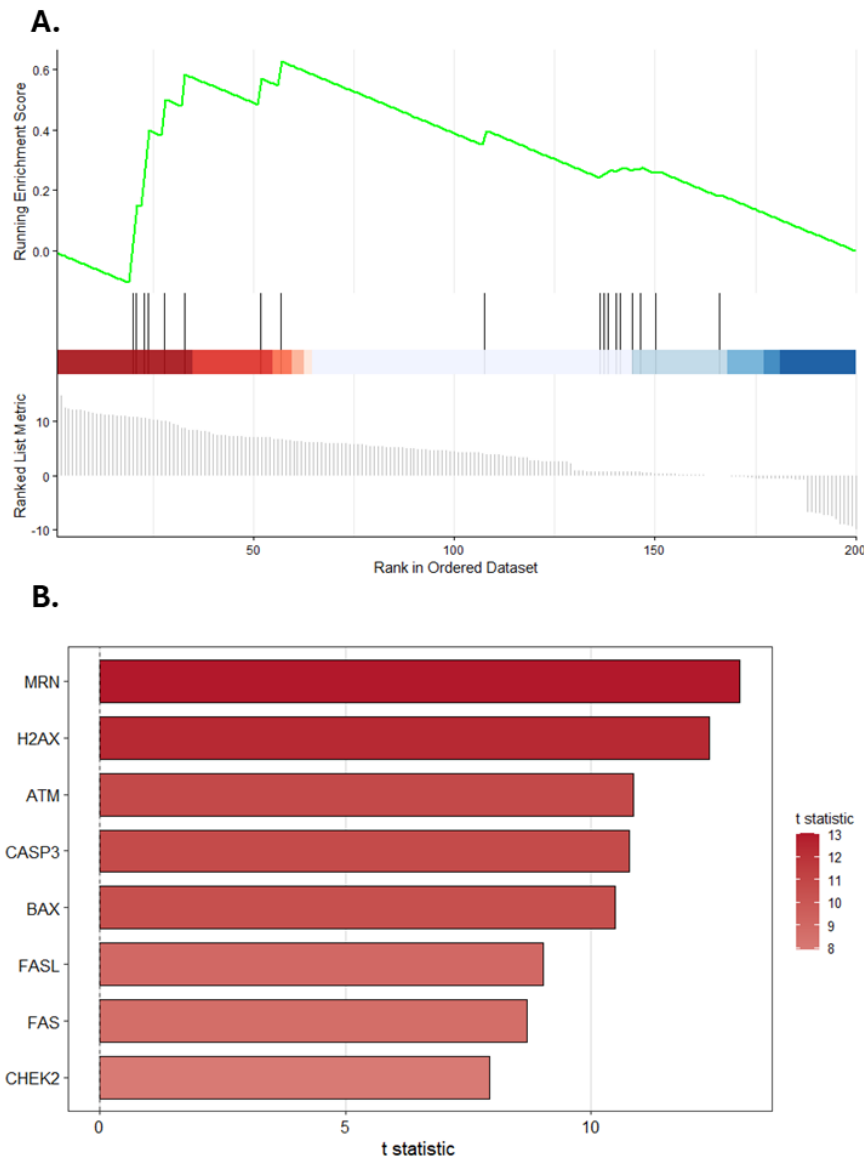


Figura 2. Enriquecimento da via p53 e principais componentes associados à resposta ao dano celular no modelo lógico. A. Curva de enriquecimento por GSEA da via de p53, demonstrando enriquecimento positivo da via entre os componentes mais ativados na condição submetida ao estímulo pró-oxidativo. As barras verticais indicam a posição dos genes pertencentes à via p53 ao longo da lista ranqueada, enquanto a curva verde representa o *running enrichment score*. A faixa colorida representa a direção da associação dos genes ao longo do ranqueamento, em que vermelho indica a ativação positiva na condição estimulada, e azul indica associação com o grupo controle. As barras cinzas inferiores correspondem a contribuição de cada gene para o ranqueamento utilizado no GSEA. **B.** Principais genes

verificados no enriquecimento da via de p53, ordenados de acordo com a estatística t obtida na análise diferencial.

O enriquecimento positivo das vias associadas a P53 foi impulsionado principalmente por genes associados à resposta ao dano no DNA, incluindo o complexo MRE11-RAD50-NBN (complexo MRN), H2AX, ATM e CHEK2, bem como por mediadores ligados à parada do ciclo celular e apoptose, como BAX, receptor de morte FAS (FAS) e caspases efetoras (Figura 2B). Em conjunto, esse perfil sugere a ativação funcional do eixo p53 em resposta ao estímulo pró-oxidativo associado a dois desfechos principais, apoptose e senescência celular.

Nesse sentido, corroborando os resultados verificados nas análises com o modelo lógico, a análise de GSEA realizada no transcriptoma placentário GSE18044 também revelou enriquecimento positivo da via p53 no grupo de gestantes fumantes em comparação às não fumantes (Figura 3A). A curva de enriquecimento demonstrou concentração de genes dessa via na porção inicial da lista ranqueada, sugerindo associação dessa assinatura com a exposição materna ao tabaco. Para caracterizar os componentes funcionais responsáveis por esse enriquecimento, os genes que mais contribuíram para sua significância foram submetidos a análise de enriquecimento funcional (Figura 3B). Essa análise evidenciou termos relacionados principalmente à regulação positiva de apoptose e regulação negativa da proliferação celular, ou senescência. Em conjunto, esses achados sugerem que a assinatura de p53 observada no transcriptoma placentário de fumantes é predominantemente sustentada por genes associados à resposta ao dano celular, apoptose e senescência.

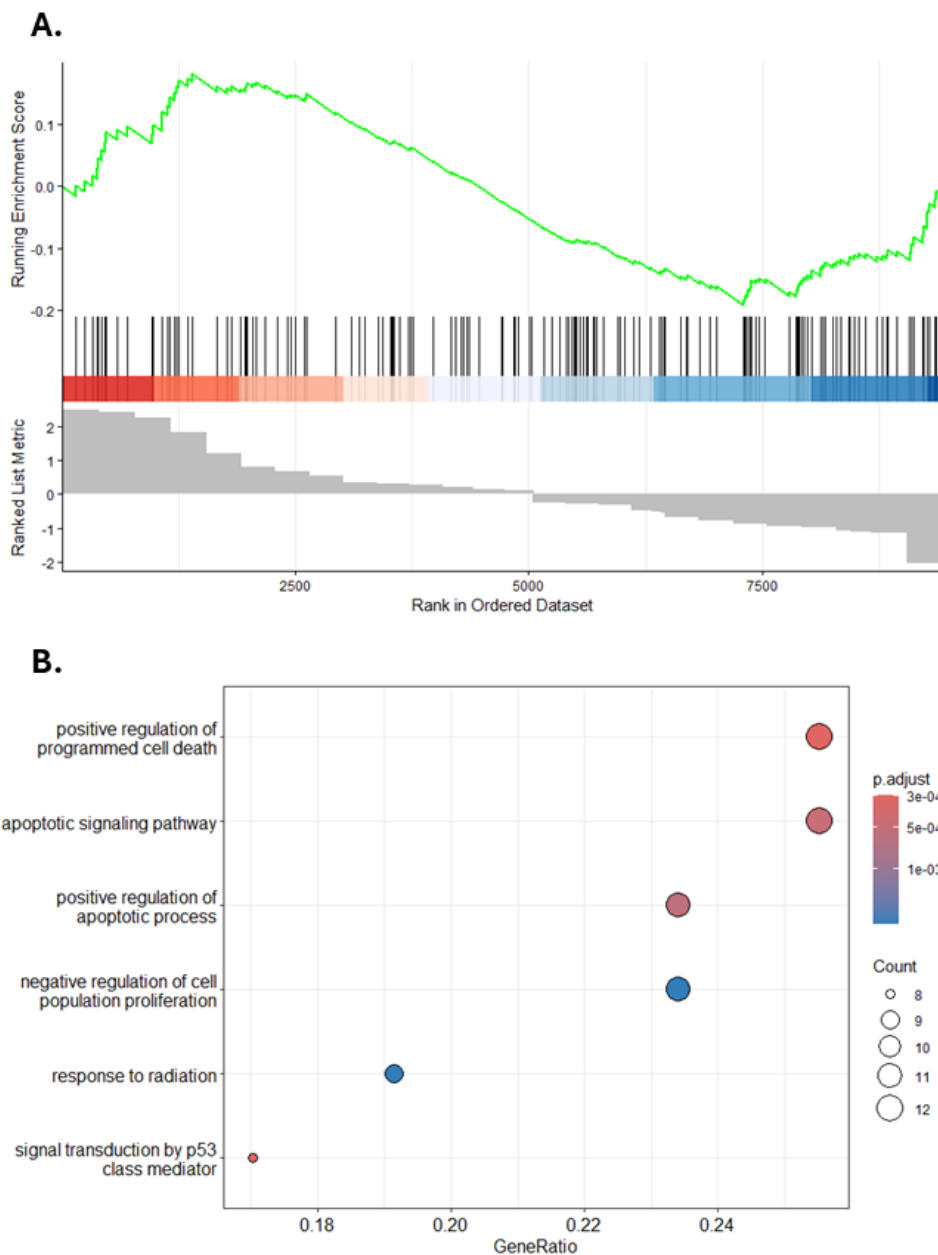


Figura 3. A análise transcriptômica de tecido placentário humano evidencia ativação de programas relacionados à via p53, dano ao DNA, apoptose e parada do ciclo celular em placentas de gestantes fumantes. **A.** Curva de enriquecimento por GSEA da via de p53, demonstrando enriquecimento positivo da via entre os componentes mais ativados na condição submetida ao estímulo pró-oxidativo. As barras verticais indicam a posição dos genes pertencentes à via p53 ao longo da lista ranqueada, enquanto a curva verde representa o *running enrichment score*. A faixa colorida representa a direção da associação dos genes ao longo do ranqueamento, em que vermelho indica a ativação positiva na condição estimulada, e azul

indica associação com o grupo controle. As barras cinzas inferiores correspondem a contribuição de cada gene para o ranqueamento utilizado no GSEA. **B.** Análise funcional dos genes da via p53, com destaque para processos relacionados à sinalização apoptótica e parada do ciclo celular.

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o estímulo pró-oxidativo empregado no modelo foi capaz de induzir uma resposta molecular coordenada, marcada pela ativação de componentes associados ao estresse oxidativo, à resposta ao dano no DNA e à parada do ciclo celular. Em conjunto, esse perfil é consistente com a hipótese de que estímulos miméticos à exposição à fumaça de cigarro possam deslocar células placentárias para um estado de estresse celular intenso, com ativação de vias compatíveis com parada proliferativa, senescência precoce e apoptose. Mais especificamente, o tabagismo durante a gravidez já foi associado a danos significativos por quebra de dupla fita do DNA no sinciciotrofoblasto [26]. Adicionalmente, diversos estudos demonstraram o efeito do estresse oxidativo em desfechos gestacionais adversos, como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino e prematuridade [27-28], no entanto, não há ainda uma definição de qual ou quais vias são ativadas, e tal conhecimento se torna necessário para o desenvolvimento de mecanismos de bloqueio ou inativação molecular para evitar os desfechos desfavoráveis.

A fim de transpor os resultados observados para o contexto dos tecidos placentários, considerando que a técnica empregada no presente estudo é tipo célula-agnostica, torna-se importante ressaltar dados específicos nesses tecidos que também demonstram atividade semelhante sob estímulo oxidativo. Dentre as primeiras observações nesse contexto, Menon et al (2011), em estudo *in vitro*, demonstraram que a exposição de membranas fetais humanas ao meio de cultura tratado com fumaça de cigarro resultou em uma produção significativamente maior de Isoprostano (F2-IsoP), diminuição na expressão de Bcl2 e aumento de caspase 3 (moléculas indutoras de dano oxidativo e aumento de apoptose, respectivamente) em comparação aos controles não estimulados [29]. Dados *in vivo* com camundongas CD-1 prenhes e submetidas à minilaparotomia para injeção de extrato de fumaça de cigarro, diluído em solução salina entre o segundo e terceiro saco gestacional, demonstram peroxidação lipídica e marcadores de estresse oxidativo, como beta galactosidase em tecido do saco amniótico e placentário [30]. Outro estudo *in vivo* mostrou indução de apoptose e parada do ciclo celular

em trofoblastos de camundongas prenhas após injeção de etoposídeo e irradiação gama de 5 Gy, potentes indutores de danos ao DNA [31].

Dentre os nossos resultados merece destaque a ativação de elementos clássicos da resposta ao dano no DNA, como a quebra de fita dupla de DNA (DSB), MRN, H2AX, proto-oncogene ABL1 (ABL1) e lisina acetiltransferase 5 (KAT5), frente o estímulo pró-oxidativo. A convergência desses componentes sustenta a interpretação de que o estresse oxidativo induzido foi suficiente para promover dano a macromoléculas com potencial de comprometer a integridade do genoma. Esse resultado reforça a hipótese de que a agressão pró-oxidativa no ambiente gestacional não se limita à alteração do estado redox celular, mas que pode deflagrar vias de sinalização associadas à interrupção do ciclo celular e à redefinição do desfecho celular. Em concordância, estudo prévio demonstrou aumento de expressão de H2AX em placentas de mães fumantes, associado a uma resposta de reparo de DNA prejudicada, a qual foi avaliada pela proteína 53BP1 (proteína 1 de ligação a p53), um sensor e regulador crítico na resposta a danos no DNA [26].

A análise das vias moduladas pelo ambiente pro-oxidativo corrobora essa noção ao demonstrar enriquecimento positivo da via de P53. Nesse sentido, é importante notar que a ativação da via de p53 constitui um mecanismo central de resposta ao dano oxidativo e ao dano ao DNA, podendo atuar como elemento conector entre a exposição pró-oxidativa e a indução de parada proliferativa e senescência celular [32]. Notavelmente, o enriquecimento da via não parece depender exclusivamente da expressão de TP53 como gene isolado, mas da ativação coordenada de múltiplos componentes a montante e a jusante da rede regulada por ele. Esse padrão é compatível com a natureza multifacetada da resposta mediada por p53, cuja atividade frequentemente é determinada por mecanismos pós-transcricionais [33]. Em revisão recente, Kobayashi et al (2025) reuniram evidências de que a via p53 esteja intrinsecamente envolvida na regulação da senescência celular, autofagia, metabolismo energético e decidualização no endométrio, e que desempenhe um papel fundamental na manutenção da função reprodutiva feminina [34].

A fim de consolidar os achados aplicados aos tecidos placentários, observou-se que a análise do transcriptoma GSE18044 forneceu suporte externo à centralidade do eixo p53 identificado no modelo lógico na resposta ao tabaco. O transcriptoma de gestantes fumantes apresentou enriquecimento positivo da via p53, enquanto a análise funcional dos genes que mais contribuíram para esse enriquecimento, demonstrou que eles se relacionam principalmente

com desfechos celular associados à sinalização apoptótica e regulação negativa da proliferação celular. Tal padrão corrobora os resultados do modelo lógico, no qual o estímulo pró-oxidativo mimético à fumaça de cigarro. Assim, os dados transcriptômicos humanos reforçam a plausibilidade de que a via p53 represente um eixo funcional relevante na interface entre exposição ao tabaco, dano oxidativo e comprometimento da homeostase placentária.

Ademais, os achados sugerem que a rede ativada pelo superóxido se encontra em uma zona de decisão entre diferentes desfechos celulares, na qual coexistem sinais de parada proliferativa e de ativação apoptótica. Essa dualidade é coerente com a literatura, segundo a qual a resposta celular frente a um estímulo exógeno tóxico à célula é composta por uma mistura de diferentes desfechos, cuja proporção irá depender do tipo, da intensidade, duração e contexto do dano [35]. Assim, os achados aqui observados sugerem que a exposição ao tabaco pode desencadear uma resposta complexa, na qual a célula tenta inicialmente conter e reparar o dano, mas que já apresenta, simultaneamente, sinais de ativação de vias efetoras de morte celular ou senescência.

3.5 CONCLUSÃO

Em conjunto, esses resultados sustentam a hipótese de que o programa de senescência induzida pelos estímulos pró-oxidativos associados à fumaça de cigarro perpassa a produção de dano oxidativo a macromoléculas, ativação de DDR, engajamento da via de p53, supressão da progressão do ciclo celular e sinalização pró-apoptótica. No contexto gestacional, tais alterações podem ter implicações importantes, uma vez que o acúmulo precoce de dano oxidativo e de respostas senescentes em tecidos fetais e membranas amnióticas tem sido associado a disfunção placentária, inflamação intrauterina e desfechos adversos, como parto prematuro e restrição do crescimento fetal.

3.6 REFERENCIAS

- [1] L. Myatt, X. Cui, Oxidative stress in the placenta, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 369–382. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0677-x>
- [2] S. Parretti, A. Caroli, E. Torlone, Nutrition and metabolic adaptations in physiological and complicated pregnancy: Focus on obesity and gestational diabetes, *Front. Endocrinol.* 11 (2020) 611929. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.611929>

- [3] E.H. Dutta, F. Behnia, I. Boldogh, G.R. Saade, B.D. Taylor, M. Kacerovský, et al., Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes, *Mol. Hum. Reprod.* 22 (2016) 143–157. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav074>
- [4] A. Ibrahim, M.I. Khoo, E.H.E. Ismail, N.H.N. Hussain, A.A.M. Zin, L. Noordin, et al., Oxidative stress biomarkers in pregnancy: A systematic review, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 22 (2024) 93. <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01259-x>
- [5] R. Menon, I. Boldogh, R. Urrabaz-Garza, J. Poletini, T.A. Syed, G.R. Saade, et al., Senescence of primary amniotic cells via oxidative DNA damage, *PLoS One* 8 (2013) e83416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083416>
- [6] J. Poletini, M.G. da Silva, Telomere-related disorders in fetal membranes associated with birth and adverse pregnancy outcomes, *Front. Physiol.* 11 (2020) 561771.
- [7] M. Lewandowska, B. Więckowska, L. Sztorc, S. Sajdak, Smoking and smoking cessation in the risk for fetal growth restriction and low birth weight and additive effect of maternal obesity, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 3504. <https://doi.org/10.3390/jcm9113504>
- [8] S. Soneji, H. Beltrán-Sánchez, Association of maternal cigarette smoking and smoking cessation with preterm birth, *JAMA Netw. Open* 2 (2019) e192514. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.2514>
- [9] S. La Maestra, G.E. Kisby, R.T. Micale, J. Johnson, Y.W. Kow, G. Bao, et al., Cigarette smoke induces DNA damage and alters base-excision repair and tau levels in the brain of neonatal mice, *Toxicol. Sci.* 123 (2011) 471–479. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr187>
- [10] S. La Maestra, S. De Flora, R.T. Micale, Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218 (2015) 117–122.
- [11] R.L. Hanson, E. Batchelor, Coordination of MAPK and p53 dynamics in the cellular responses to DNA damage and oxidative stress, *Mol. Syst. Biol.* 18 (2022) e11401. <https://doi.org/10.15252/msb.202211401>.

- [12] Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta*. 2005 Nov;26(10):735-46. doi: 10.1016/j.placenta.2004.10.009. Epub 2004 Dec 15. PMID: 16226123.
- [13] Machaalani R, Ghazavi E, Hinton T, Waters KA, Hennessy A. Cigarette smoking during pregnancy regulates the expression of specific nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in the human placenta. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 May 1;276(3):204-12. doi: 10.1016/j.taap.2014.02.015. Epub 2014 Mar 4. PMID: 24607864.
- [14] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, Hallmarks of cellular senescence, *Trends Cell Biol*. 28 (2018) 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- [15] N. Basisty, A. Kale, O.H. Jeon, C. Kuehnemann, T. Payne, C. Rao, et al., A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development, *PLoS Biol*. 18 (2020) e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- [16] V. Pierdoná, P. Lavandoski, R.M. Maurmann, G.A. Borges, J.C.M. Mombach, F.T.C.R. Guma, F.M. Barbé-Tuana, PseudoCell: A multivalued logical regulatory network to investigate premature senescence dynamics and heterogeneity, *Aging Med*. 8 (2025) 145–155. <https://doi.org/10.1002/agm2.70020>
- [17] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, G.K. Smyth, limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, *Nucleic Acids Res*. 43 (2015) e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- [18] A. Subramanian, P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, et al., Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- [19] A. Liberzon, A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdóttir, P. Tamayo, J.P. Mesirov, Molecular signatures database (MSigDB) 3.0, *Bioinformatics* 27 (2011) 1739–1740. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>
- [20] A. Liberzon, C. Birger, H. Thorvaldsdóttir, M. Ghandi, J.P. Mesirov, P. Tamayo, The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection, *Cell Syst*. 1 (2015) 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>

- [21] G. Yu, L.G. Wang, Y. Han, Q.Y. He, clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters, *OMICS* 16 (2012) 284–287.
<https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- [22] I. Dolgalev, msigdb: MSigDB gene sets for multiple organisms in a tidy data format, R package version 26.1.0 (2026). <https://igordot.github.io/msigdb/>
- [23] H. Bruchova, A. Vasikova, M. Merkerova, A. Milcova, et al., Effect of maternal tobacco smoke exposure on the placental transcriptome, *Placenta* 31 (2010) 186–191.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.016>
- [24] S. Davis, P.S. Meltzer, GEOquery: A bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor, *Bioinformatics* 23 (2007) 1846–1847.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm254>
- [25] M. Carlson, S. Falcon, H. Pages, N. Li, org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human, R package version 3.2.3 (2019).
- [26] Slatter TL, Park L, Anderson K, Lailai-Tasmania V, Herbison P, Clow W, Royds JA, Devenish C, Hung NA. Smoking during pregnancy causes double-strand DNA break damage to the placenta. *Hum Pathol.* 2014 Jan;45(1):17-26. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.024. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24125744.
- [27] Vasilaki I, Potiris A, Moustakli E, Mavrogianni D, Daponte N, Karampitsakos T, Kozonis A, Louis K, Messini C, Grigoriadis T, Domali E, Stavros S. Linking Oxidative Stress to Placental Dysfunction: The Key Role of Mitochondria in Trophoblast Function. *Med Sci (Basel).* 2026 Jan 21;14(1):53. doi: 10.3390/medsci14010053. PMID: 41718100; PMCID: PMC12921961.
- [28] Morales-Prieto DM, Fuentes-Zacarias P, Murrieta-Coxca JM, Gutierrez-Samudio RN, Favaro RR, Fitzgerald JS, Markert UR. Smoking for two- effects of tobacco consumption on placenta. *Mol Aspects Med.* 2022 Oct;87:101023. doi: 10.1016/j.mam.2021.101023. Epub 2021 Sep 11. PMID: 34521556.
- [29] Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, Lappas M, Taylor RN. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes.

Placenta. 2011 Apr;32(4):317-22. doi: 10.1016/j.placenta.2011.01.015. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21367451.

[30] Poletini J, Richardson LS, Menon R. Oxidative stress induces senescence and sterile inflammation in murine amniotic cavity. *Placenta*. 2018 Mar;63:26-31. doi: 10.1016/j.placenta.2018.01.009. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29486853; PMCID: PMC5833301.

[31] Yamauchi H, Katayama K, Ueno M, Kanemitsu H, Nam C, Mikami T, Saito A, Ishida Y, Uetsuka K, Doi K, Ohmach Y, Nakayama H. Etoposide induces TRP53-dependent apoptosis and TRP53-independent cell cycle arrest in trophoblasts of the developing mouse placenta. *Biol Reprod*. 2009 Apr;80(4):813-22. doi: 10.1095/biolreprod.108.069419. Epub 2008 Dec 23. PMID: 19109225.

[32] C. Correia-Melo, G. Hewitt, J.F. Passos, Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: Partners in cellular senescence?, *Longev. Healthspan* 3 (2014) 1. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>.

[33] K.H. Vousden, D.P. Lane, p53 in health and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 275–283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>.

[34] Kobayashi H, Umetani M, Nishio M, Shigetomi H, Imanaka S, Hashimoto H. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence in Age-Related Endometrial Dysfunction. *Cells*. 2025 Jun 6;14(12):858. doi: 10.3390/cells14120858. PMID: 40558485; PMCID: PMC12190264.

[35] S. Fulda, A.M. Gorman, O. Hori, A. Samali, Cellular stress responses: Cell survival and cell death, *Int. J. Cell Biol.* 2010 (2010) 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>

4 CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que o estímulo pró-oxidativo mimético à fumaça de cigarro foi capaz de induzir, em modelo lógico de células amnióticas, uma resposta molecular coordenada compatível com dano oxidativo, ativação de resposta ao dano no DNA, modulação da via de p53, apoptose e senescência. A ativação de componentes relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio, associada à ativação de mediadores como MRN, H2AX, ATM, CHEK2, MAPK14, BAX, CASP3 e FAS/FASL, sugere que a exposição pró-oxidativa desloca a rede celular para um estado bimodal de senescência e apoptose.

A análise de enriquecimento funcional reforçou a centralidade da via p53 na construção desse programa de senescência, indicando que o estímulo oxidativo mobiliza uma resposta integrada com participação dos mecanismos de resposta ao dano celular, parada do ciclo celular e apoptose. Esse perfil é compatível com a instalação de um estado pró-senescente, no qual coexistem mecanismos de parada proliferativa e sinais de ativação de morte celular, refletindo a complexidade da resposta celular frente a insultos ambientais intensos.

Além disso, a análise externa do transcriptoma placentário humano GSE18044 evidenciou enriquecimento positivo dessa via em placentas de gestantes fumantes, corroborando os achados no modelo lógico e reforçando a plausibilidade biológica de que a exposição gestacional ao tabaco ative um eixo funcional ROS–dano ao DNA–p53 em tecidos extraembrionários.

Em conjunto, os achados indicam que a fumaça de cigarro pode contribuir para a perda da homeostase placentária e amniótica por meio da indução de dano oxidativo a macromoléculas, ativação da resposta ao dano genômico e engajamento de vias associadas à senescência e apoptose. Dessa forma, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais o tabagismo gestacional pode comprometer o ambiente intrauterino e favorecer desfechos adversos da gestação. Futuras investigações experimentais, especialmente em modelos celulares amnióticos e placentários, serão fundamentais para validar diretamente os marcadores identificados e aprofundar a caracterização funcional da senescência induzida pela fumaça de cigarro.