

FABIANA BOCCI GIANNOCCARO

**DIMETILAMINOETANOL (DMAE) NA VIABILIDADE DE
FIBROBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

SÃO PAULO

2006

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA
UNIFESP-EPM**

COORDENADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

FABIANA BOCCI GIANNOCCARO

**DIMETILAMINOETANOL (DMAE) NA VIABILIDADE DE
FIBROBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS**

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Gragnani Filho

Co-orientadores: Profa. Dra. Christiane S. Sobral

Prof. Dr. Jeronimo Pereira de França

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

SÃO PAULO

2006

Giannoccaro, Fabiana Bocci

Dimetilaminoetano (DMAE) na viabilidade de fibroblastos humanos cultivados. / Fabiana Bocci Giannoccaro --São Paulo, 2006.

vii, 51 f

Tese (mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica

Título em inglês: Dimethylaminoethanol (DMAE) in the viability of cultivated human fibroblasts.

1. Dimetilaminoetanol, 2. Viabilidade, 3. Fibroblastos, 4. Cultura de células

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor de Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
cpm	Contagem por minuto
CRP	Proteína C reativa
D.P.	Desvio padrão
DAG	Diacilglicerol
DMAE	Dimetilaminoetanol
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido de (N-I-2-hidroxietil)piperazina-2-etanosulfônico
kDa	Kilodaltons
mM	MicroMolar
Mg ₂₊	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino

RESUMO

Introdução: O dimetilaminoetanol (DMAE) tem sido utilizado na prática clínica no combate a rugas e flacidez cervico-facial. Sua ação firmadora é explicada devido a sua molécula ser um precursor de acetilcolina, de forma que o DMAE alteraria a contração muscular. Entretanto não existem trabalhos experimentais que comprovem esta teoria. Pela falta de definição do real mecanismo de ação do DMAE, e não existindo referência na Literatura da sua ação sobre os fibroblastos, foi elaborado estudo para avaliar a ação direta sobre os fibroblastos humanos cultivados. **Métodos:** Fibroblastos humanos provenientes de fragmento de pele total desprezado de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos estéticos ou reparadores realizados na Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM. Foi utilizada a técnica de explante, e na quarta passagem celular o meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de DMAE e as células foram avaliadas quanto à proliferação, medidas do cálcio citosólico e ciclo celular. A análise estatística dos resultados foi realizada usando-se o teste de ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. **Resultados:** A proliferação dos fibroblastos mostrou-se diminuída com o aumento das concentrações de DMAE. O tempo de tratamento com tripsina foi maior nos grupos tratados com DMAE de forma dose dependente. Houve aumento de cálcio citosólico na presença de DMAE de forma dose-dependente. Houve um aumento de apoptose nos grupos tratados com DMAE. **Conclusão:** O DMAE diminuiu a proliferação dos fibroblastos, e causou aumento do cálcio citosólico e alterou o ciclo celular causando um aumento da apoptose nos fibroblastos humanos cultivados.

ABSTRACT

Background: Dimethylaminoethanol (DMAE) has been used in medical practice to treat facial wrinkles and cervical flabbiness. Its tensor action is explained by its action as an acetylcholine precursor affecting muscular contraction. However, there are no experimental models proving this theory. Due to the lack of information about DMAE action mechanism and no data about DMAE action on fibroblasts in vitro this study was performed.

Methods: Human fibroblasts from patients who undergone cosmetic or reparative surgery performed on Plastic Surgery Division from UNIFESP/EPM were cultured from discharged total skin fragment. Explant technique was used and fibroblasts from passage four were cultured with different concentrations of DMAE. The cells were evaluated in proliferation, cytosolic calcium, and cellular cycle. Statistical analysis was done using ANOVA and Newman-Keuls test for multiple comparisons.

Results: Fibroblast proliferation diminished with increasing DMAE concentrations. The trypsin treatment in DMAE groups was longer than in control group in a dose dependent way. Increasing in cytosolic calcium was found in DMAE groups in a dose dependent manner. Apoptosis increased in DMAE treatment group.

Conclusion: DMAE diminished fibroblast proliferation, increased cytosolic calcium leading to increasing apoptosis in cultured human fibroblasts.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Sumário	vii
1. Introdução	1
Objetivo	4
2. Literatura	5
3. Métodos	21
4. Resultados	30
5. Discussão	38
Conclusões	46
Referências	47

1. INTRODUÇÃO

As mudanças funcionais que ocorrem com o avanço da idade são atribuídas à vários fatores como defeitos genéticos, meio ambiente, doenças e expressão de genes do envelhecimento, ou gerontogenes (HARRIS, 2003).

Do ponto de vista evolutivo, o envelhecimento é um produto da seleção natural que ocorre nas espécies capazes de reprodução sexual, mas não em espécies que se reproduzem assexuadamente, como as anêmonas do mar. Embora seja uma fase previsível da vida, o processo de envelhecimento não é determinado por um programa genético, pois não existem genes que estabelecem como e quando envelhecer. Há sim genes variantes cuja expressão favorece a longevidade ou reduz a duração da vida (HARRIS, 2003).

Uma das teorias do envelhecimento seria a dos radicais livres, que oxidam as proteínas e os lipídeos, parte desses danos ocorrem na membrana celular. Os lipídeos desta camada podem ser decompostos por uma enzima chamada fosfolipase A2, que é ativada quando a pele sofre trauma ou é exposta ao sol ou à substâncias químicas, levando assim à produção de ácido araquidônico, que por sua vez sofre oxidação e se transforma em substâncias químicas que produzem a inflamação, essa inflamação por sua vez produz mais radicais livres, portanto qualquer processo que gera inflamação celular acelera o processo de envelhecimento.

Com o envelhecimento ocorre uma diminuição geral do metabolismo do organismo. A gordura da face diminui, os músculos faciais enfraquecem levando a flacidez, a pele adelgaça, as fibras colágenas e elásticas já não têm tanto efeito firmador, a circulação periférica diminui e os radicais livres lesam as células (RANG & DALE, 2001).

Algumas teorias sobre o envelhecimento, como a do encurtamento dos telômeros e a do envelhecimento mitocondrial, admitem que as perdas funcionais que ocorrem durante o envelhecimento seriam decorrentes da formação de lesões no DNA. A teoria do encurtamento dos telômeros baseia-se no fato de que a cada divisão celular ocorre uma diminuição das extremidades dos cromossomos. Esse encurtamento progressivo dos cromossomos causa a inviabilidade reprodutiva das células e o envelhecimento (HARRIS, 2003).

Os fibroblastos são as principais células presentes na derme, sendo fundamentais no processo da produção de fibras e matriz extracelular, existindo vários fatores, células e sinais reguladores desse processo. Essas células são responsáveis pelo aspecto firme e elástico da pele jovem, que é perdido com o envelhecimento, pela diminuição ou destruição das estruturas presentes na matriz extracelular.

A substância DMAE ou dimetilaminoetanol é um composto químico naturalmente produzida em pequenas quantidades no cérebro humano e utilizado por nosso organismo na conversão da colina a acetilcolina, pois é análogo à colina e considerado um precursor indireto da acetilcolina. É encontrada largamente em peixes, como sardinha e especialmente no salmão, e é uma substância usada há anos pela medicina alopática para melhorar a memória dos pacientes.

Afortunadamente, médicos e usuários perceberam ao longo dos anos o enrijecimento da região cervical quando da administração oral de DMAE, estimulando o interesse dos cientistas pela sua aplicação dermatológica.

Além disso, devido à sua estrutura única, a molécula de DMAE aplicada sobre a pele é capaz de se interpor entre os componentes das membranas celulares, tornando-se parte delas e produzindo membranas mais resistentes ao stress orgânico. Ela estabiliza as membranas celulares porque previne a destruição desse material e a produção de ácido araquidônico, bem como outros mediadores pró-inflamatórios.

A utilização clínica do DMAE se realiza através do uso de cremes sobre as áreas de flacidez ou com presença de rugas e marcas de envelhecimento, sendo necessário a penetração da substância através da epiderme, com possível atuação na derme e em especial nos fibroblastos. A sua possível atuação nos músculos, aumentando sua tensão por ser precursor da acetilcolina, necessitaria ainda da passagem através de todo o tecido adiposo, fásCIAS, até poder agir sobre a musculatura. Com essa atuação sobre os músculos, possibilitaria o aumento da tensão dos mesmos, mas ao mesmo tempo aumentaria a formação de rugas.

Pela falta de definição do real mecanismo de ação do DMAE, e não existindo referência na Literatura da sua ação sobre os fibroblastos, foi elaborado estudo original para avaliar a ação direta sobre os fibroblastos humanos cultivados.

OBJETIVO

Avaliar a ação do DMAE na viabilidade de fibroblastos humanos cultivados.

2. LITERATURA

A fim de facilitar a leitura, os trabalhos serão apresentados em ordem cronológica e obedecendo a terminologia empregada pelos autores.

Em 1975, DORMARD, LEVRON, BENAKIS determinaram a produção, distribuição e eliminação do 2-(N,N-dimethylaminoethanol-14C1)-ciclohexilpropionato (14C-ciprodenato, Actebral) em ratos e porcos. O dimetilaminoetanol-14C (DMAE) foi administrado em ratos permitindo a comparação da farmacocinética dos dois compostos carbono 14 marcados. A avaliação da localização por autoradiografia e a distribuição quantitativa mostraram que o ciprodenato, uma droga psicoativa, era difundida mais rapidamente pela barreira hemato encefálica que o DMAE. Entretanto, foi também observado que a função cerebral aumenta continuamente com o tempo, independentemente do produto administrado. Ambos os produtos foram primariamente excretados na urina, 30 a 35% da dose em 72 horas em ratos e 6% da dose em 48 horas em porcos, após administração oral de ciprodenato. A radioatividade encontrada nas fezes foi praticamente nula em ratos. A eliminação biliar da droga foi baixa. Além disso, independentemente do animal utilizado o 14C-ciprodenato foi totalmente absorvido. Em ratos, a radioatividade máxima no sangue foi encontrada após 45 minutos até 1 hora da administração oral de 14C-ciprodenato. Estes valores diminuíram lentamente até 3 horas e então começaram a se elevar novamente. A elevação da concentração sanguínea foi praticamente a mesma em porcos sendo o máximo atingido após 1 hora de ingestão oral. Portanto, neste experimento, qualquer via de administração, qualquer dose utilizada ou animal, apresentou uma elevação progressiva de ligação

proteína plasmática tanto para ¹⁴C-ciprodenato, quanto para o dimetilaminoetanol-¹⁴C, *in vivo*.

CHERKIN & EXKARDT (1977) administraram o DMAE bitartarato na dose de 18,4 mg/kg/dia em 15 pássaros japoneses. O DMAE foi administrado na água por 69 semanas a partir de 195 semanas de vida. Um outro grupo de 14 animais recebeu ácido tartárico na água na dosagem de 4,0 mg/kg/dia. Ao contrário do esperado, o grupo tratado com DMAE teve um período de vida após o início do tratamento mais curto (49 semanas) quando comparado ao grupo controle (69 semanas). Não foram encontradas diferenças significantes quanto ao peso corporal ou ingestão diária de líquidos. Três estudos comportamentais foram realizados nos sobreviventes entre 243 e 249 semanas de vida, sendo estes resposta a estímulo luminoso, resposta sexual a fêmeas e monitoração de frequência cardíaca. Foram encontradas diferenças nos três grupos quando comparados animais jovens e animais velhos, entretanto não foram encontradas diferenças entre o grupo que recebeu tratamento com DMAE e o grupo controle.

ZAHNISER, CHOU, HANIN (1977) desenvolveram um ensaio de cromatografia a gás sensível e específico para mensurar os níveis de deanol em tecidos. Os autores utilizaram este ensaio para determinar o efeito de administração aguda de deanol nos níveis teciduais de colina, acetilcolina e deanol em cérebro de roedores. O método se mostrou quantitativo permitindo dosagens da ordem de concentração de 0.30-200 nmol de deanol. Sete parâmetros endógenos e farmacológicos foram avaliados. No cérebro, fígado, coração, pulmão e plasma do grupo controle não foi detectado deanol endógeno livre. Após a administração de deanol foi possível detectar a presença de deanol nos tecidos. Entretanto não houve aumento dos níveis de acetilcolina nos tecidos após a administração de

deanol. Estes achados ocorreram independentemente do tempo após o uso de deanol ou da dose administrada. Os únicos níveis de acetilcolina aumentados detectados ocorreram no núcleo estriado dos camundongos após 30 minutos de estimulação com 900mg/kg de deanol. Entretanto, estes dados não conferiram com aumento de deanol detectado no tecido cerebral. Estes dados foram contraditórios com os dados anteriores da literatura que postulavam um aumento de deanol cerebral causando um aumento cerebral de acetilcolina. Este trabalho sugeriu o papel do deanol como um precursor imediato da síntese de acetilcolina cerebral no sistema nervoso central.

MAEDA, DOI, AKAMATSU, em 1980, modificaram a membrana de fosfolípidos de fibroblastos LM causando uma infecção com vírus de estomatite. Foram testados os análogos da colina, N,N'-dimetiletanolamina, N-monometiletanolamina e etanolamina. Estas modificações isoladamente não afetaram a síntese individual de proteínas virais. A glicoproteína viral foi detectada na membrana plasmática de todas as células modificadas pelo método de digestão por pronase em experimentos de pulso. Entretanto, a quantidade de glicoproteína suscetível à proteólise variou, diminuindo em células modificadas na seguinte ordem: N,N'-dimetiletanolamina, maior que colina, maior que N-monometiletanolamina, maior que células tratadas com etanolamina. Após 4 horas, a glicoproteína estava difusamente distribuída pela membrana plasmática das células modificadas com N,N'-dimetiletanolamina, enquanto nos grupos dos outros análogos foi encontrada em microssomos e na membrana plasmática. Grandes quantidades de glicoproteína foram encontradas na fração solúvel de células tratadas com etanolamina, mas não nos outros grupos celulares. Experimentos com menor intervalo de tempo sugeriram que a migração de glicoproteína dos microssomos para a membrana plasmática foi mais rápida em células tratadas com N,N'-dimetiletanolamina e mais lentos em células modificadas com etanolamina. As modificações lipídicas também resultaram

em números diferentes de vírions produzidos pelas células, diminuindo na seguinte ordem: N,N'-dimetiletanolamina-maior que colina-maior que N-monometiletanolamina-maior que células tratadas com etanolamina. Estes resultados indicam que a modificação dos fosfolípides de membrana influencia não apenas a inserção de glicoproteína nos microsomas e sua migração para a membrana plasmática, mas também a produção viral.

BOVE & HAARSTAD (1981) incubaram macerados de cérebro de rato em meio com alta concentração de potássio 25 mM (HK) resultando em num aumento de quatro vezes na síntese e liberação de acetilcolina (Ach) quando comparada a macerados não despolarizados incubados em meio com baixas concentrações de potássio 4 mM (LK). A liberação de acetilcolina cálcio dependente evocado pela despolarização induzida pelo potássio parece estar relacionada com a formação imediata de neurotransmissor, uma vez que esta liberação foi inibida um minuto após a adição de 0,1 mM hemicolina-3 (HC-3) e foi prontamente revertida pela adição de colina. Em contraste, a liberação de acetilcolina independente de cálcio de macerados não despolarizados foi diminuída apenas quando a concentração de HC-3 foi de 10 mM. O HC-3, seus derivados acetato e DMAE foram equipotentes para determinar a inibição da síntese de Ach, em macerados não despolarizados, mas apenas 1/3 tão ativo quanto o HC-3 em macerados despolarizados por potássio. O acetato de hemicolina e o DMAE se mostraram significativamente mais ativos que o HC-3 como inibidores pós-juncionais de acetilcolina em modelo utilizando a contração do reto abdominal de sapos.

NAGY & FLOYD, em 1984, estudaram as propriedades anti-radicaís livres do dimetilaminoetanol em experimentos de rotação spin utilizando ressonância eletrônica spin. Os experimentos confirmaram as bases

moleculares dos efeitos biológicos de ADP-Fe(II)-H₂O₂ em gerar radicais hidroxila que podem ser armazenados por 5,5-dimetil-1-pirrolinaN-óxido (DMPO) além de enviar um sinal mensurável por espectroscopia de ressonância eletrônica spin. A quantidade de DMPO-OH spin detectada diminuía consideravelmente se dimetilaminoetanol (DMAE), ácido p-clorofenoxiacético (PCPA) ou centrofenixina (CPH) estivessem presentes em concentrações semelhantes de DMPO. Este trabalho demonstrou que os achados não são atribuídos à reatividade dos compostos de ferro e sua oxidação por peróxido de hidrogênio. A reação do DMAE com os radicais OH foi demonstrada pelo uso de marcadores de spin. O DMAE apresentou uma reação depuradora anti-radicaís hidroxila (OH) competitiva com prolina e hidroxiprolina, ambos reagentes co-neutralizadores de radicais OH gerando radicais nitrogenados. O presente estudo demonstrou firmemente as propriedades depuradoras de radicais OH do DMAE. Estes resultados propõem uma explicação para a ação antienvhecimento do DMAE.

HANOVER, PASTAN, WILLINGHAM, em 1985, cultivaram fibroblastos LM e induziram a internalização de [125I]transferrina na presença e ausência de colina exógena. A neo-síntese de fosfatidilcolina foi diminuída de 51% do total para menos de 10%, a taxa inicial de internalização de transferrina não foi afetada. Estes dados sugerem que o processo de endocitose de transferrina pode ocorrer normalmente na ausência de neo-síntese de fosfatidilcolina.

ALKADHI (1986) estudou a contração de músculo peitoral de sapos utilizando dois clamps de microvoltagem. Foi testada a ação de um análogo da hemicolina-3 o DMAE nos aspectos das correntes de voltagem. Em concentrações de cinco mM o DMAE produziu uma diminuição da curva decrescente e um aumento da amplitude do pico de corrente. Em concentrações de 10 a 100 mM o DMAE produziu mudanças bifásicas

caracterizadas por uma mudança transiente da amplitude, seguida por um aumento sustentado. Quando o DMAE foi retirado, houve recuperação assimétrica da curva. Com o tratamento prévio com neostigmina ou colagenase houve uma parcial antagonização dos efeitos iniciais do DMAE, sem alterar os efeitos tardios. Estes dados sugerem que os efeitos iniciais do DMAE podem ser devidos à inibição da enzima acetilcolinesterase. Na ausência de DMAE ocorreu a reversão de seus efeitos sem alterações da voltagem.

LOHR & ACARA (1990) utilizaram perfusão isolada de rim de rato e fatias de rim incubadas para investigar o efeito do 2-dimetilaminoetanol (DMAE), um inibidor da colina oxidase, na excreção renal e metabolismo da colina. Na perfusão de rim isolado, a mesma foi realizada com 300 mM de colina marcada com carbono 14. A maior parte da colina havia sido removida após 25 minutos, com 90 minutos de perfusão quase toda a colina perfundida havia sido metabolizada em betaína. DMAE nas concentrações de 3,0 ou 5,0 mM diminuiu significativamente a remoção de colina perfundida e diminuiu a adição de betaína na perfusão. Neste experimento foi avaliada a região cortical, extra e intramedular renal. DMAE na concentração de 5,0 mM inibiu significativamente a produção de [14C]betaína nas três regiões estudadas. Este estudo mostrou a ação do DMAE como um efetivo inibidor da produção de betaína pelo rim, podendo ser um potente agente para estudos da osmoregulação renal.

MORIYAMA et al. (1992) avaliaram a distribuição seletiva de um adrenoreceptor alfa 1 agonista cloreto de midodrina e seu metabólito ativo 1-(2',5'-dimetoxifenil)-2-aminoetanol, DMAE, foi avaliado em bexiga e uretra de ratas com 8 e com 52 semanas de vida. Inicialmente foi realizada a ligadura bilateral dos ureteres para impedir o refluxo da medicação no trato urinário. Em seguida foram administradas injeções intravenosas de

midodrina e DMAE marcados com carbono 14. Em ratas com 8 semanas de vida, a atividade de ^{14}C -midodrina foi significativamente mais alta ($p < 0.01$) na bexiga do que no músculo femoral o que foi utilizado como controle da distribuição da droga. Dados similares, com distribuição aumentada de ^{14}C -DMAE foi observada na bexiga em comparação ao músculo femoral ($p < 0.01$). Em ratas de 52 semanas, não houve diferença significativa da absorção de midodrina entre os dois tecidos. Entretanto, houve um aumento significativo da absorção de ^{14}C -DMAE observada na uretra em comparação ao músculo femoral ($p < 0.05$). Comparado com a midodrina, a concentração de DMAE teve um aumento significativo na bexiga das ratas de 8 semanas e na uretra das ratas de 52 semanas. Houve também uma distribuição difusa de grânulos de midodrina e de DMAE pela musculatura lisa uretral e vesical. Estes dados demonstram que a midodrina e o DMAE, que se ligam de forma específica aos receptores alfa1 adrenérgicos poderiam ser efetivos para o tratamento de incontinência urinária de stress.

GRANDO et al. (1993a) semearam 500.000 queratinócitos humanos de segunda passagem em géis de agarose preparados em placas de cultura de tecidos de seis poços. Após a semeadura, as células foram depositadas sobre a agarose formando colônias confluentes. As células da periferia das colônias se apresentavam grandes, com citoplasma espreado e se moviam pela superfície da placa sob o gel de agarose. A morfologia dos queratinócitos em migração foi observada microscopicamente e a distância de migração foi medida depois que os géis foram removidos e as células fixadas. Para determinar os efeitos de compostos colinérgicos envolvidos na migração de queratinócitos foram comparados com seus efeitos em proliferação, adesão e espalhamento em diferentes grupos de experimentos. A migração foi inibida por um inibidor específico da síntese de acetilcolina, bromoacetilcolina 0,05 mM e restaurado por exposição

exógena de 5 mM de acetilcolina. Em cultura de queratinócitos a bromoacetilcolina interrompeu a divisão celular. A mostarda de propilbenzilcolina (um inibidor irreversível de acetilcolina) aumentou o número de células, mas interferindo na adesão celular e adesão à matriz. Estes dados sugerem que a adesão célula a célula, adesão à matriz, espalhamento, e locomoção de queratinócitos humanos estão relacionadas com as fases iniciais da re-epitelização cutânea e devem estar relacionadas com a regulação de acetilcolina. Especificamente a acetilcolina é necessária para iniciar a migração dos queratinócitos.

GRANDO et al. (1993b) estudaram em queratinócitos humanos a sua capacidade em produzir, secretar e metabolizar acetilcolina. Para detectar e localizar a enzima sintetizadora colina acetiltransferase e a enzima de degradação acetilcolinesterase, células cultivadas e fragmentos de pele seccionados por criostato foram pré-incubados com anticorpos monoclonais específicos e pelo complexo avidina biotina fosfatase. A atividade da colina acetiltransferase foi monitorizada pela conversão de [3H]acetil CoA em [3H]acetilcolina. A [3H]acetilcolina recém sintetizada foi detectada usando cromatografia. A atividade da acetilcolinesterase foi medida por espectrofotometria. Ambas enzimas colinérgicas foram encontradas nos queratinócitos cultivados e nas camadas basal, espinhosa e granulosa da pele fixada. A colina acetiltransferase foi visualizada próxima ao núcleo da célula, enquanto a acetilcolinesterase foi visualizada no interior ou próximo às membranas celulares. A acetilcolina recém sintetizada foi detectada tanto nos homogeneizados celulares quanto no sobrenadante das células cultivadas. A síntese de acetilcolina foi estimada por acetilcolina marcada produzida pelos queratinócitos em cultura, resultando em 20 pmoles de acetilcolina produzida por mg de proteína por minuto a 37°C. Cada queratinócito sintetizou uma média de 2×10^{-17} moles, e secretou 7×10^{-19} moles de acetilcolina por minuto. Tanto os homogeneizados celulares

quanto o sobrenadante mostraram atividades semelhantes de acetilcolinesterase indicando que os queratinócitos humanos também secretam acetilcolinesterase. Além disso, este trabalho demonstrou que queratinócitos humanos normais possuem colina acetiltransferase e acetilcolinesterase, sintetizando, estocando, liberando e degradando acetilcolina. Como os queratinócitos humanos podem também responder a estímulos da acetilcolina, estes resultados sugerem que a acetilcolina produzida pelos queratinócitos age na epiderme como um hormônio local.

GRANDO et al., em 1995, estudaram epiderme humana normal com marcação para microscopia confocal. Foi utilizado o anticorpo monoclonal para receptor anti-muscarínico M35. Foram marcados os receptores em regiões intercelulares da epiderme normal. Usando microscopia imuno-eletrônica, os receptores pareciam ser aderidos à membrana plasmática dos queratinócitos. Receptores muscarínicos funcionais de alta densidade ($B_{max} = 8.3 \text{ nmol}/2 \times 10^6 \text{ células}$) e receptores muscarínicos de alta afinidade ($K_d = 21.5 \text{ nM}$) foram detectados por ligação saturada de um radioligante reversível $[^3\text{H}]$ quinuclidinil benzilato à superfície celular de células epidérmicas recém isoladas a 0°C . Os receptores foram separados por gel de eletroforese. Três bandas de proteínas, duas de aproximadamente 60 kDa e uma de 95 kDa, foram visualizadas nos imunoblots de membrana ou dos receptores solubilizados separados por um gel de eletroforese de sódio dodecilsulfato-poliacrilamida. O ligante covalente irreversível mostarda $[^3\text{H}]$ propilbenzilcolina confirmou estes resultados. Estes resultados demonstraram que queratinócitos humanos expressam uma população heterogênea de receptores colinérgicos muscarínicos.

GRANDO et al., em 1996, avaliaram queratinócitos humanos isolados de pele de postectomia de recém nascidos. Quando foi adicionada nicotina

às células, ocorreu um aumento do transporte de 45Ca^{2+} transmembrana de maneira concentração dependente. Este efeito foi abolido na presença de um antagonista nicotínico específico, a mecamilamina, indicando que este transporte de cálcio era mediado por receptores nicotínicos de acetilcolina dos queratinócitos. As sequências codificadoras das subunidades alfa 5 e alfa 7 dos receptores nicotínicos foram amplificadas a partir do cDNA isolado dos queratinócitos cultivados. Estas subunidades, assim como as alfa 3, beta 2 e beta 4, previamente isoladas em queratinócitos podem ser componentes de receptores nicotínicos permeáveis a cálcio. Foram mensurados os efeitos colinérgicos nicotínicos na expressão de marcadores de diferenciação em queratinócitos cultivados. Incubações de longo prazo com concentrações micromolares de nicotina marcada aumentaram o número de células formando envelopes cornificados. Houve aumento do número de células marcadas com anticorpos para queratina 10, transglutaminase tipo I, involucrina e filagrina. O aumento destes marcadores de diferenciação celular foi verificado por Western blotting.

KISS, CRILLY, ANDERSON (1996) avaliaram o efeito de monometiletanolamina (1 mM) e dimetiletanolamina (1 mM) em fibroblastos NIH 3T3. Ambas substâncias provocaram um aumento da síntese de DNA respectivamente dez e quinze vezes. Quando ocorreu um tratamento simultâneo de insulina (500 nM) e análogos metilados da etanolamina (1 mM ou menos) resultou em uma ativação sinérgica da síntese de DNA. A seqüência decrescente de potência dos análogos de etanolamina foi dimetiletanolamina, monometiletanolamina e etanolamina. A colina (1-5 mM) isolada não apresentou efeito na síntese de DNA mas aumentou os efeitos combinados de baixas concentrações de análogos de etanolamina e insulina. Os efeitos sinérgicos dos análogos de etanolamina, colina e insulina foram consideráveis (1,7 a 1,9 vezes) e aumentados pela adição de GF 109203X (3 microM), um inibidor específico da proteína C quinase. Os

resultados sugeriram que os análogos de etanolamina aumentam a síntese de DNA induzida por insulina por um mecanismo que é inibido pelo sistema proteína C quinase.

NDOYE et al. (1998) estudaram a estrutura molecular e a localização dos receptores muscarínicos de acetilcolina de alta afinidade (mAChR) em queratinócitos epidérmicos. Foi utilizada reação de polimerase para amplificação de sequências do cDNA para demonstrar a expressão dos subtipos de mAChR m1, m3, m4, e m5. Para visualizar estes mAChR, foi utilizado soro de coelho para sintetizar peptídeos análogos do terminal carboxila de cada subtipo. Os anticorpos se ligaram seletivamente aos mAChR dos queratinócitos em membranas de imunoblotting e epiderme, ambos podendo ser abolidos por pré incubação com o anti soro usado para imunização. Os padrões marcação imunofluorescentes produzidos por cada anticorpo na epiderme sugere que os aspectos dos receptores dos queratinócitos são modificados em função do turnover epidérmico. Análises semiquantitativas de fluorescência revelaram que as células basais expressam predominantemente m3, células espinhosas expressam igualmente níveis de m4 e m5, e células granulosas apresentam em sua maioria m1. Assim, os resultados deste estudo demonstraram pela primeira vez a presença de mAChR m1, m3, m4, and m5 em queratinócitos epidérmicos, e sugerindo que um mesmo citotransmissor, no caso a acetilcolina poderia ter diferentes efeitos biológicos dependendo do estado de maturação celular.

BUCHLI et al. (1999) utilizaram reação de (RT-PCR) e primers específicos para os subtipos de receptores m1 e m5. Estes experimentos demonstraram que apenas os mRNA dos subtipos mAChR m2, m4 e m5 estão presentes em fibroblastos da derme humana. Membranas celulares de fibroblastos dérmicos humanos cultivados e fragmentos de pele humana

normal apresentaram um padrão de marcação específico para anticorpo anti-m2, assim como para anticorpos contra m4 e m5. Em Western blots de proteínas dos fibroblastos, os anticorpos mostraram o receptor m2 em 65 kDa, m4 em 70 kDa, e m5 em 95 kDa. A função dos receptores mAChRs nos fibroblastos foi examinada por medidas dos efeitos muscarínicos na concentração intracelular de cálcio livre ($[Ca^{2+}]_i$). Muscarina aumentou de forma intermitente $[Ca^{2+}]_i$ em cultura de fibroblastos. Este efeito pode ser abolido pela atropine, um antagonista muscarínico. Desta forma, os resultados deste estudo mostraram que os fibroblastos dérmicos humanos expressam receptores m2, m4, e m5 e que estes são responsáveis pela regulação da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$.

SHAHEEN et al., em 2000, utilizaram um modelo de gel de agarose com queratinócitos humanos cultivados como um modelo para estudar a migração destas células. A ativação de receptores nicotínicos de acetilcolina diminuiu a distância de migração dos queratinócitos de forma dose dependente, porém sem alterar a viabilidade celular. A nicotina causou um aumento de influxo de cálcio transmembrana dose dependente, levando a um aumento transiente da concentração de $[Ca^{2+}]_i$. Uma perfeita correlação entre a concentração de nicotina e os ensaios de influxo de cálcio sugerem que a nicotina induz a uma inibição da locomoção e que a migração dos queratinócitos depende da modulação de cálcio metabolizado pelos queratinócitos. Os efeitos da nicotina podem ser mediados pelos receptores alfa 3 e alfa 7 visualizados nos queratinócitos por imunohistoquímica. O presente estudo demonstrou que a nicotina exerce um efeito inibitório sobre a migração de queratinócitos e que o cálcio age como um segundo mensageiro desta cascata. Estes resultados ajudam a explicar os efeitos deletérios da nicotina na epitelização das feridas, sugerindo que o fumo retarda a cura de feridas por um mecanismo mediado por receptores nicotínicos.

UHODA et al. (2002) estudaram os efeitos tensores do 2-dimetilaminoetanol (deanol) gel. Os autores realizaram um estudo de duas fases, randomizado, duplo cego desenhado para comparar o efeito de um gel contendo 3% de DMAE e a mesma formulação sem DMAE. Um estudo piloto com oito voluntários foi realizado inicialmente. No segundo estudo foram avaliados 30 pacientes quanto à sucção da pele e velocidade de propagação de deslizamento da pele. Ocorreu uma grande variação de resultados entre os indivíduos do estudo. Entretanto, a formulação com DMAE aumentou a velocidade de deslizamento da pele e a anisotropia causando um aumento da firmeza cutânea.

ARREDONDO et al., em 2003, cultivaram fibroblastos dérmicos para avaliar o efeito da nicotina nestas células. Os fibroblastos cultivados foram expostos a 10 mM de nicotina. Utilizando RT-PCR e Western blotting, os autores demonstraram que após uma exposição de 24 horas de nicotina houve um aumento de 1,9 a 28 vezes dos níveis de mRNA proteínas reguladoras do ciclo celular como p21, ciclina D1, Ki-67 e PCNA. Houve também um aumento de 1,7 a 2 vezes nos reguladores de apoptose Bcl-2 e caspase 3. A exposição de nicotina também aumentou a expressão de proteínas de matriz dérmica como colágeno tipo alfa1 e elastina assim como metaloproteinase-1. Foram detectados receptores nicotínicos em fibroblastos humanos dos subtipos alfa3, alfa5, alfa7, beta2, e beta4. Baseado nestes dados, alguns dos efeitos patológicos do tabaco podem ser devidos a alterações do turnover da matriz extracelular da pele por via de receptores nicotínicos levando a alterações da remodelação dos fibroblastos dérmicos.

KEIRA et al. (2004) apresentaram uma padronização metodológica para o estabelecimento de uma cultura primária de fibroblastos, sua utilização em experimentos e seu armazenamento.

CHERNYAVSKY et al., em 2004, avaliaram o papel regulatório da migração de queratinócitos através da regulação de receptores nicotínicos de acetilcolina e sua sinalização. Os autores avaliaram mecanismos específicos de quimioquímica e quimiotaxia usando um ensaio de crescimento de queratinócitos em gel de agarose. A migração aleatória dos queratinócitos foi avaliada na presença de hemicolinum-3, um inibidor metabólico da síntese de acetilcolina, alfa conotoxina MII e AulB bloqueadores preferenciais de receptores nicotínicos de acetilcolina. Os resultados apresentaram significância estatística com diminuição da migração dos queratinócitos quando os receptores de acetilcolina foram bloqueados. O uso de oligonucleotídeos específicos para subunidades de receptores nicotínicos e ratos knockout demonstrou o papel de canais alfa3beta2 mediando a quimioquímica dependente de acetilcolina. A sinalização desencadeada pela alfa3beta2 inclui a ativação da proteína-C quinase isoforma delta e eventos RhoA dependentes. A quimiotaxia nicotínica dos queratinócitos foi mais pronunciada através dos gradientes de colina, um potente agonista do receptor alfa 7 nicotínico de acetilcolina. Quando este receptor foi bloqueado houve diminuição significativa ($p < 0.05$) da quimiotaxia dos queratinócitos. A cascata de sinalização deste receptor envolve o cálcio intracelular, a ativação da proteína quinase II, isoformas da proteína C quinase e fosfatidil inositol 3 quinase. A utilização de microscopia de alta resolução demonstrou pela primeira vez que os receptores nicotínicos alfa3 e alfa7 regulam respectivamente a quimioquímica e a quimiotaxia dos queratinócitos, identificando mediadores da cascata de sinalização que possuem importância clínica para cicatrização de feridas.

ARREDONDO et al. (2005) estudaram a regulação de queratinócitos humanos pela via de receptores nicotínicos. Foi clonado o receptor de plasminogênio ativado mamário tipo Ly-6/uroquinase 1 (SLURP-1) e produzido um anticorpo 336H12-1A3 que identificava SLURP-1 nativo. O

SLURP-1 ligado apresentou uma afinidade aumentada ao receptor de nicotina dos queratinócitos quando comparado ao receptor de acetilcolina com $p < 0.05$, e aumentando a atividade das caspases 3 e 8 e o número de células marcadas dUTP-biotina positivas. A atividade pró-apoptótica de SLURP excedeu a atividade do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), o que sugere o envolvimento de duas vias independentes. Em uma série utilizando PCR em tempo real e experimentos de Western blot, Slurp -1 apresentou um aumento da expressão de transglutaminase tipo I, citoqueratina 10, p 21 e caspase-3. Na presença do antagonista carbacol, os efeitos de SLURP-1 na expressão gênica foram aumentados, o que sustenta a noção de que SLURP-1 age como um agonista alostérico no receptor de acetilcolina dos queratinócitos. Assim, as mudanças de estado celular induzidas pela SLURP-1 poderiam resultar dos efeitos mediados pelos receptores de acetilcolina na expressão gênica de queratinócitos. Estes resultados sugerem que o papel biológico de SLURP-1 na epiderme é promover uma fina regulação fisiológica dos queratinócitos através de vias colinérgicas.

GROSSMAN, em 2005, avaliou fórmulas de produtos cosméticos para peles envelhecidas compostas de 2-dimetilaminoetanol (DMAE) ou deanol. Foi realizado um estudo clínico randomizado, no qual um gel facial com 3% de DMAE foi usado de forma contínua por 16 semanas. O grupo placebo utilizou o mesmo gel facial, porém sem DMAE. Neste estudo o DMAE se mostrou seguro e eficaz em diminuir sulcos frontais, assim como as rugas peri-orbitais ($p < 0,005$), além de melhorar a forma dos lábios e a aparência geral da pele envelhecida. Os efeitos não apresentaram regressão após 2 semanas do término da aplicação. Aspectos benéficos ($p > 0,05$ mas ≤ 0.1) foram percebidos nas rugas faciais, na região infra-orbital, no sulco nasolabial, na flacidez de pele cervical e na firmeza cervical. A aplicação do gel se mostrou bem tolerada pelas pacientes, sem diferenças quanto ao

eritema, descamação, ressecamento, prurido ou queimação quando comparados os grupos placebo e o grupo DMAE. Um seguimento de um ano deste trabalho mostrou que a aplicação do gel com DMAE mostrou-se seguro. Os efeitos agudos de firmeza cutânea foram confirmados por medidas quantitativas de força de tensão. Estudos *in vitro* de linfócitos de sangue periférico indicaram que o DMAE possui uma moderada atividade anti-inflamatória. Embora seu mecanismo de ação específico necessite ser elucidado, apresentam-se evidências da ação do DMAE como um modulador da acetilcolina. Outros estudos são necessários para esclarecer seu mecanismo de ação, assim como comparar sua atividade com outras substâncias como antioxidantes tópicos e alfa hidroxí-ácidos.

3. MÉTODOS

3.1. Cultura de fibroblastos.

A amostra utilizada no presente estudo consistiu de linhagens de fibroblastos humanos provenientes de pacientes que se submeteram a procedimentos cirúrgicos estéticos ou reparadores. Os doadores constituíram um total de 10 pacientes, de ambos os sexos, brancos com idade variando de 32 a 53 anos com média de 43,1 anos (Anexo 1).

A cultura primária de fibroblastos humanos foi realizada a partir de fragmento de pele total desprezada em cirurgia realizada na Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM. Os pacientes foram orientados sobre o uso da pele descartada e aceitaram através do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP/EPM, sob o processo número CEP 1498/03 (Anexo 3).

Os fragmentos de pele que seriam desprezados após a cirurgia foram acondicionados em tubos cônicos de 50 ml com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (alta taxa de glicose [4,5 g/L], L-glutamina [584 mg/L], piruvato de sódio [110 mg/L]), armazenadas a 4°C e encaminhadas para posterior preparo no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica, no prazo máximo de 4 horas.

No laboratório, o material foi processado dentro da câmara de fluxo laminar. Retirou-se o tecido subcutâneo e as margens da epiderme do fragmento de pele total. Colocou-se de 30 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) 1x em 8 tubos cônicos de 50 ml, e 1 ml de PBS 1x numa placa de Petri de 100 mm, lavando a pele no primeiro tubo cônico com PBS por agitação manual

vigorosa por 45 segundos, repetindo esse procedimento por mais 7 vezes em tubos distintos, após essa etapa, o fragmento foi colocado na placa.

A técnica de cultivo utilizada foi a de explante. O fragmento de pele foi dividido em pequenos pedaços de 5 mm², e em duas placas de Petri de 100 mm são feitas 10 a 12 áreas com ranhuras para facilitar a aderência da pele na placa. Os pedaços são colocados sobre as ranhuras e a placa fica aberta dentro do fluxo laminar por 30 minutos, com o objetivo da adesão do tecido à placa (KEIRA et al., 2004).

Após a aderência dos fragmentos, foi adicionado 10 ml de meio de cultura para fibroblastos humanos constituído de DMEM, com soro fetal bovino (SFB) a 20% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) e solução de penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Gibco BRL, New York, EUA) à 1%, a 37°C.

O meio de cultura foi colocado com cuidado para não destacar os fragmentos de tecido, e as placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C, com uma mistura gasosa de ar (95%) e dióxido de carbono (5%). No início, cresceram queratinócitos junto dos fibroblastos, que após alguns dias foram predominantes, e após doze dias em média os fibroblastos atingiram a confluência. O subcultivo foi realizado na fase de pré-confluência, com 80% da superfície da placa tomada pelas células, mantendo a capacidade de proliferação celular.

A passagem das células foi realizada através da técnica de suspensão celular enzimática, com a utilização da solução de tripsina 0,25% e ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,02% (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA). Após a aspiração de todo o meio de cultura da placa, retirou-se delicadamente os fragmentos aderidos à superfície da placa, sendo então lavada com 10 ml de PBS, que foi aspirado e então colocado 3 ml da solução de tripsina/EDTA por dois minutos na incubadora. Os

fibroblastos se destacam da superfície, perdendo sua característica forma fusiforme e ficando arredondado e flutuando na solução.

Foi adicionado a essa solução 3 ml do meio de cultura para fibroblastos, sendo levada à centrifugação sob uma força centrífuga relativa de 100g, durante 6 minutos, em centrífuga FANEM® modelo 206-BL. O sobrenadante foi aspirado e desprezado e as células foram ressuspensas em 10 ml de meio de cultura para fibroblastos. As células foram semeadas em garrafas de 75 cm², e armazenadas em incubadora, tendo seu meio de cultura trocado a cada dois dias.

Após 4 a 8 passagens, quando os fibroblastos atingiram um nível de amadurecimento adequado em cultura, sem apresentar interferência sistêmica do doador, as células foram semeadas em garrafas de 25 cm³, na quantidade de 50.000 células em cada garrafa para o início dos experimentos.

3.2. DMAE.

As concentrações de DMAE, a quantidade de células e o tempo de semeadura foram determinados a partir de um projeto piloto desenvolvido durante 6 meses, por falta de dados na literatura. (Anexo 4)

Após 48 horas de cultivo com o meio de cultura para fibroblastos, foi adicionado o DMAE base, diluído em água deionizada, com grau de pureza de 99,8% (Embrafarma Lote: DBA001.04.04) diretamente nas garrafas de cultura com concentrações decrescentes, variando de 0,01 %, 0,005%, 0,0025% da solução base 100%, e um grupo controle, sem a adição do DMAE.

Os cálculos de pipetagem foram realizados com fórmula de concentração e volume final e inicial, baseando-se na solução pura (100%),

objetivando plotar os resultados num gráfico, onde a abscissa representa a concentração de DMAE, e a ordenada a porcentagem de células vivas, após um determinado período de tempo, nos dando uma curva dose-resposta.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, e foram realizadas três trocas de meio de cultura com adição do DMAE a cada troca. No sétimo dia, após a terceira troca, as células foram removidas da garrafa enzimaticamente e contadas através da câmara de Neubauer (Boeco, Germany) com o auxílio do corante Trypan Blue (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) que possibilita a avaliação das células inviáveis.

Foram utilizadas 10 linhagens de células diferentes originárias de dez pacientes doadores de fragmentos de pele.

3.3. Equipamentos, reagentes e marcadores fluorescentes para a Citometria de Fluxo.

Os equipamentos utilizados nessa etapa do experimento foram o espectrofluorímetro (modelo Perkin Elmer LS 5B, Buckinghamshire, Inglaterra); o fluorímetro (SPEX ARCM System, Nova Jersey, EUA); centrífuga de baixa rotação, modelo LS-3 (Celm, SP, Brasil); banho-maria modelo 100 (Fanem Ltda., SP, Brasil); o microscópio invertido de contraste de fase, modelo TMS (Nikon, Japão) e o citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson – BD, San Jose, CA, EUA).

As drogas e reagentes foram obtidas da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), sendo a penicilina, o sulfato de estreptomicina, a glutamina, a saponina, HEPES ácido (ácido de (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico]) e albumina sérica bovina (BSA) - fração V.

Os indicadores de fluorescência utilizados foram o fura-2 acetoximetiléster (fura2/AM) para dosagem dos níveis de cálcio intracelulares foi fornecidos pela Molecular Probe, Eugene, OR, EUA. O indicador foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e acondicionado em frasco de vidro âmbar a -20°C . O detergente ácido plurônico (pluronic F127, Molecular Probe, OR, EUA) dissolvido em DMSO foi adicionado no momento do experimento, na concentração final de 0,01%.

A solução Tyrode normal foi preparada momentos antes do experimento, a partir de duas soluções concentradas (I e II). A diluição foi feita acrescentando-se 40 ml da solução à cerca de 500 ml de água bidestilada. Adicionou-se então 20 ml da solução II. Depois de homogeneizar a solução acrescentava-se 1 g de bicarbonato de sódio e 1 g de glicose, completando-se o volume para um litro, obtendo-se uma solução final de pH 7,4 (ajustado com HCl 1M) e a concentração final da solução está indicada no Anexo 5.

3.4. Medida de cálcio citosólico.

Após a tripsinização de fibroblastos humanos, foram utilizadas suspensões de 10^6 células/ml com viabilidade acima de 95%. Essas células foram ressuspensas em 2,5 ml de Tyrode com 0,2% de albumina sérica bovinas e deixadas na estufa de CO_2 , a 37°C , por 30 minutos. A suspensão de células foi centrifugada a 315 g por 4min e a solução substituída por 2,5 ml de Tyrode normal, sem albumina para dosagem de cálcio. Após a devida homogeneização, transferiu-se para a cubeta quartzo, mantidas à temperatura ambiente, sob agitação constante com barra magnética.

Às células em suspensão acrescentou-se o fura-2/AM (2 μM) (5 μL). Foi adicionado em igual volume o ácido plurônico (5 μl) à 0.01%, sendo

sonicado em um tubo cônico antes de ser colocado para incubação com as amostras contendo fibroblastos. O tempo total necessário de incubação foi geralmente de 2h, tempo este que variou para cada cultura de células dependendo da ação de suas esterases citoplasmáticas. A incorporação celular pelo indicador foi acompanhada pelo deslocamento do espectro de excitação entre 300 a 400 nm, por meio do espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 5 (Figura 1). O fluoróforo quando desesterificado no citoplasma, complexa-se com o cálcio e seu espectro de excitação mostra o deslocamento de seu máximo de fluorescência, que na forma acetoximetil é 390nm, para o intervalo de excitação entre 340 e 350nm. Uma vez incorporado o fluoróforo, essas suspensões de células foram recolhidas em tubos de centrífuga, às quais adicionou-se Tyrode Normal, num volume de 15 ml e centrifugou-se a 315 g por 4min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 2,5 ml de Tyrode normal ou modificado, homogeneizado e transferido para a cubeta de quartzo do fluorímetro SPEX, a uma temperatura de 37°C para a dosagem de cálcio, sob agitação constante com barra magnética.

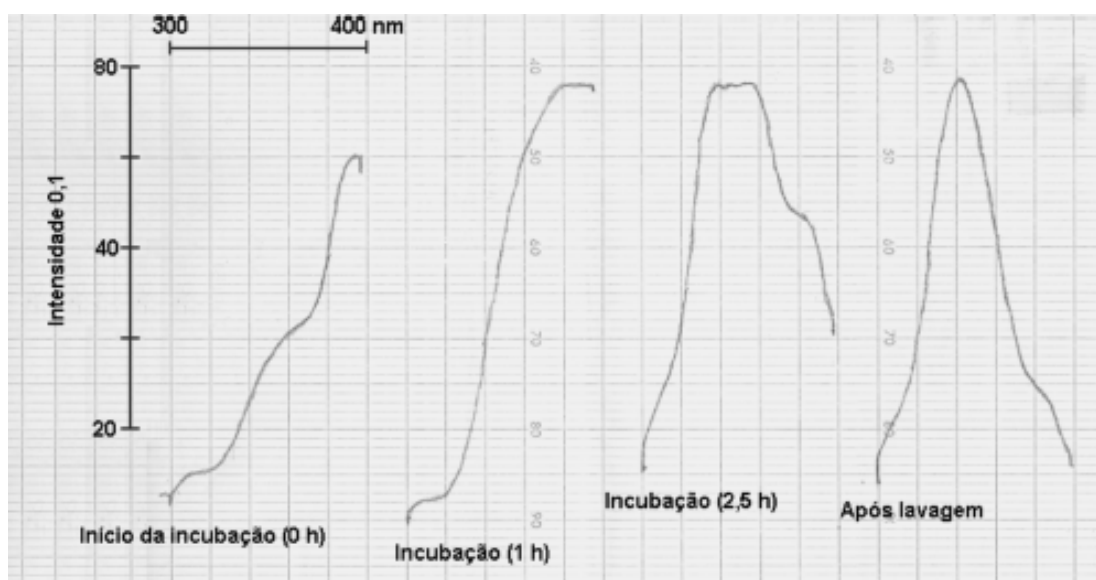


Figura 1 - Espectro de excitação de 300 a 400 nm da incorporação do indicador de cálcio (Fura-2), para fibroblastos, em função do tempo. A escala foi ampliada, após a lavagem do fluoróforo, duas vezes em relação as amostras anteriores (emissão em 520nm).

As leituras foram realizadas em dois comprimentos de ondas de excitação, 340 e 380 nm, cujo programa de computador acoplado ao sistema, alterna os filtros do fluorímetro SPEX em frações de milisegundos, obtendo-se uma leitura alternada da fluorescência da amostra e a emissão da fluorescência foi obtida no comprimento de onda de 505 nm. Foi registrada a autofluorescência dos fibroblastos humanos e o valor obtido foi menor que 10% da fluorescência emitida pelas células em suspensão carregada com o indicador fluorescente fura-2. Esse valor foi considerado desprezível para os cálculos da razão de fluorescência obtidos a partir da estimulação com as drogas.

A razão ($R_{340/380}$) entre as intensidades de fluorescência, emissão fixa em 505nm, quando as amostras são excitadas nos dois comprimentos de onda 340 e 380 nm correspondem ao valor de cálcio, dependendo do tipo de indicador utilizado. Após a estabilização das leituras no fluorímetro foram administradas as drogas, conforme cada protocolo experimental.

3.5. Determinação de células em mitose e em apoptose pela quantificação do ciclo celular.

A fração de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela quantificação de DNA pelo iodeto de propídeo (PI), que é um agente que se intercala de maneira estequiométrica entre os pares de bases da dupla hélice de ácido nucléico. Os ensaios foram realizados de acordo com a

técnica revista por NICOLETTI et al. (1991). As células foram centrifugadas à 200rpm por 15 minutos em tubos de 15ml, desprezou-se o sobrenadante e o botão de células foi ressuspensão em 2ml de etanol gelado. As células foram lavadas duas vezes com 1ml de PBS gelado e ressuspensas em 500 μ l de PBS gelado. Para eliminar a dupla hélice de RNA que estão presentes na amostra foi adicionado RNase em uma concentração de 0,5mg/ml a 4°C por toda a noite. A seguir, colocou-se 1ml de solução contendo PI por 15 min a 4°C. A análise foi realizada em citômetro de fluxo, FACScalibur. Foram analisados 10.000 eventos por amostra. O conteúdo de DNA foi avaliado no detector FL2A, sendo analisado em escala linear. A população celular a ser analisada foi selecionada em histograma bivariado de área de FL2A versus largura do sinal de FL2, para eliminar-se agregados celulares. A análise da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, G₀/G₁, S e G₂/M foi realizada utilizando o software Cell Quest versão 3.4 (BD).

A intensidade da marcação na escala linear do PI no canal FL2A refere-se à quantidade de DNA das células, desta forma as células em G₀/G₁ (2n) apresentam menor intensidade de fluorescência por apresentarem menor quantidade de DNA em comparação com as células na fase G₂/Mitose (4n). As células em apoptose apresentam uma quantidade menor a 2n localizando-se à esquerda da fase G₀/G₁, região subG₀/G₁ (Figura 2).

A análise do histograma foi realizada quantificando a porcentagem das regiões M1 e M2 como mostrado na figura 2 utilizando o programa Cell Quest (versão 3.4 BD). Uma vez delimitada uma região de análise, o programa calcula a média dos eventos da escala linear mediante a fórmula: onde X_i é o valor linear dos eventos e n é o número de eventos usados nos cálculos.

$$\text{Media} = \frac{\sum X_i}{n}$$

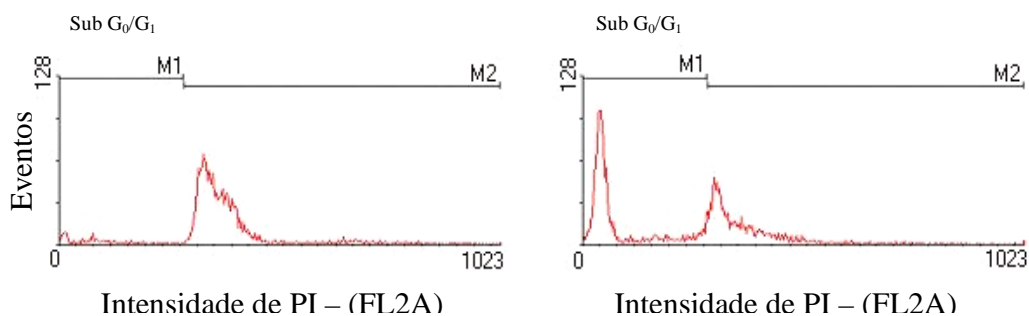


Figura 2 - Histograma do conteúdo de DNA é lido no canal FL2A marcados com PI. As células que apresentam baixo conteúdo de DNA (subG₀/G₁) são as células em apoptose localizando-se na região M1, as células nas outras fases do ciclo celular se encontram na região M2.

Os histogramas apresentados são expressos como a média \pm o erro padrão (S.E.M.) seguido do valor do número de experimentos realizados.

A análise estatística dos resultados foi realizada usando-se o teste de ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. A significância estatística foi dada por $p < 0,05\%$, e quando a mesma existiu foi marcado o resultado com asterisco (*).

4. RESULTADOS

O gráfico abaixo apresenta a proliferação dos fibroblastos humanos cultivados na presença de diferentes concentrações de DMAE e no grupo controle. Foi observado que a proliferação dos fibroblastos encontrava-se diminuída à medida que foram aumentadas as concentrações de DMAE (Figura 3).

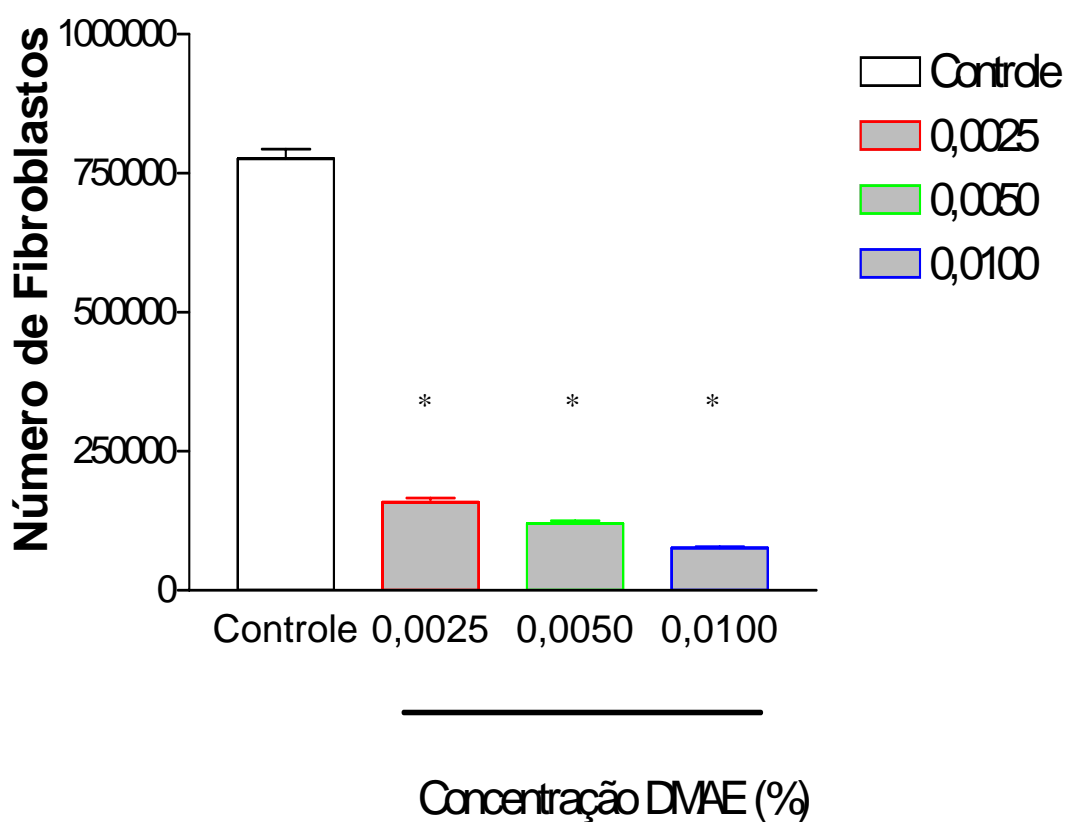


Figura 3 - Número de Células presentes em cultura de fibroblastos humanos para concentrações crescentes de DMAE. Análise estatística para todos os grupos em relação ao controle apresentou $p < 0,05$ (*).

O tempo de tripsinização aumentou de acordo com a concentração de DMAE, em relação ao controle, conforme mostrado na Figura 4. Na concentração máxima de DMAE, o tempo de tripsinização foi, em média, de 3,75 minutos; enquanto, na amostra do grupo controle foi obtido o tempo máximo de 1,75 minutos.

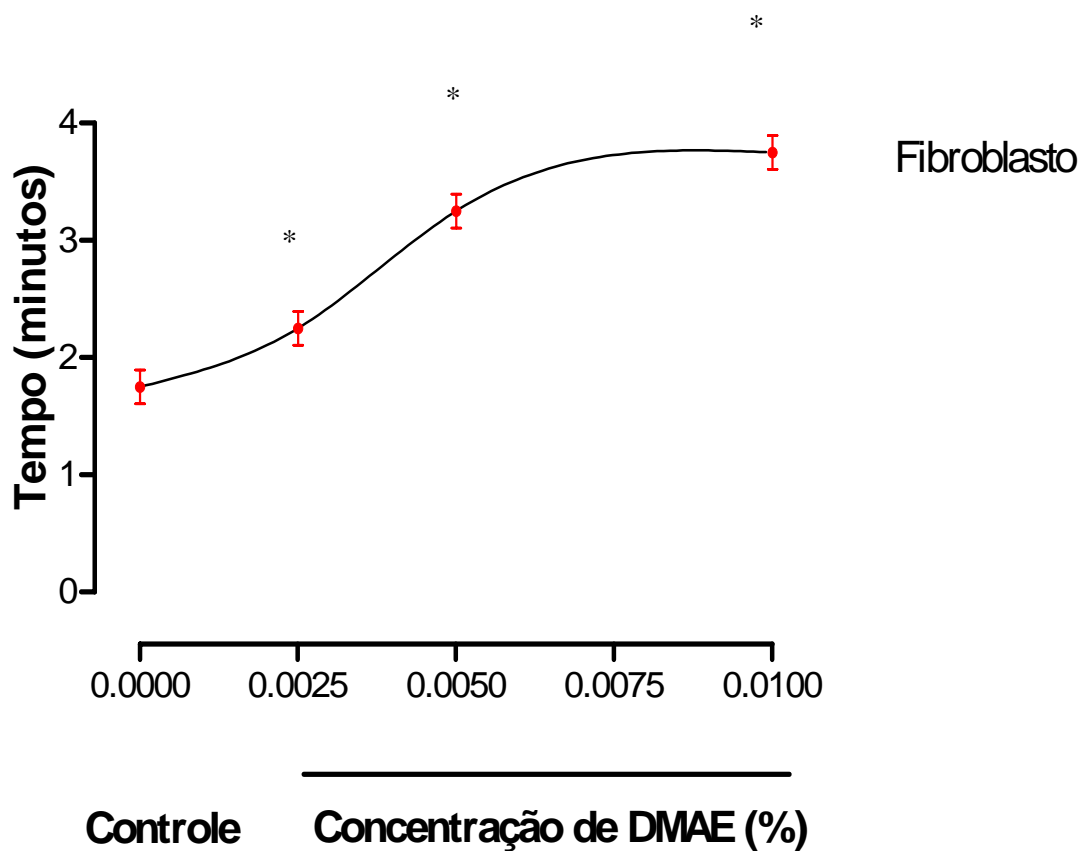


Figura 4 - Tempo de ação da solução enzimática, tripsina e EDTA, sobre os fibroblastos em Cultura com as concentrações crescentes de DMAE. Análise estatística para todos os grupos em relação ao controle apresentou $p < 0,05$ (*).

Quando os fibroblastos foram estimulados com o DMAE, ou não no caso do grupo controle, o cálcio citosólico aumentou proporcionalmente ao aumento das concentrações de DMAE (Figura 5).

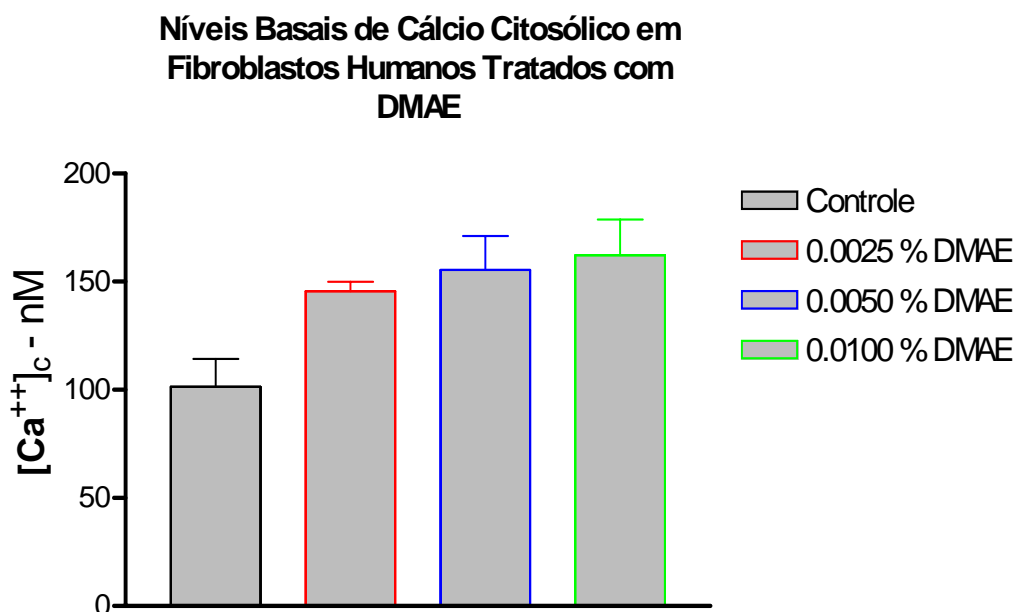


Figura 5 – Concentração citosólica de cálcio após estimulação com diferentes concentrações de DMAE. Não houve diferença estatística significativa.

Em relação ao tempo do aumento do cálcio citosólico quando estimulado pelo DMAE, pode-se observar que o aumento marcante ocorreu após 130 segundos e manteve-se ascendente até 300 segundos, quando o experimento foi cessado (Figura 6).

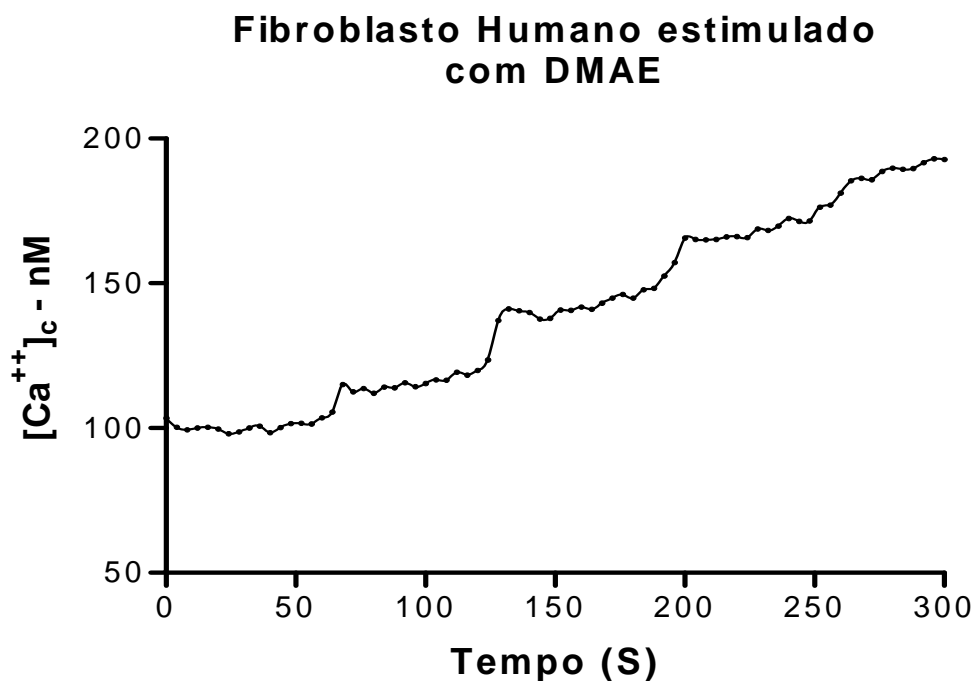


Figura 6 – Concentração do Cálcio citosólico em relação ao tempo de experimento após o estímulo do DMAE nos fibroblastos humanos cultivados.

A análise por citometria de fluxo do número de células em apoptose utilizando o PI foi determinada pelo software Cell Quest que indica além da apoptose as fases do ciclo celular (NICOLETTI et al., 1991) (Figura 7).

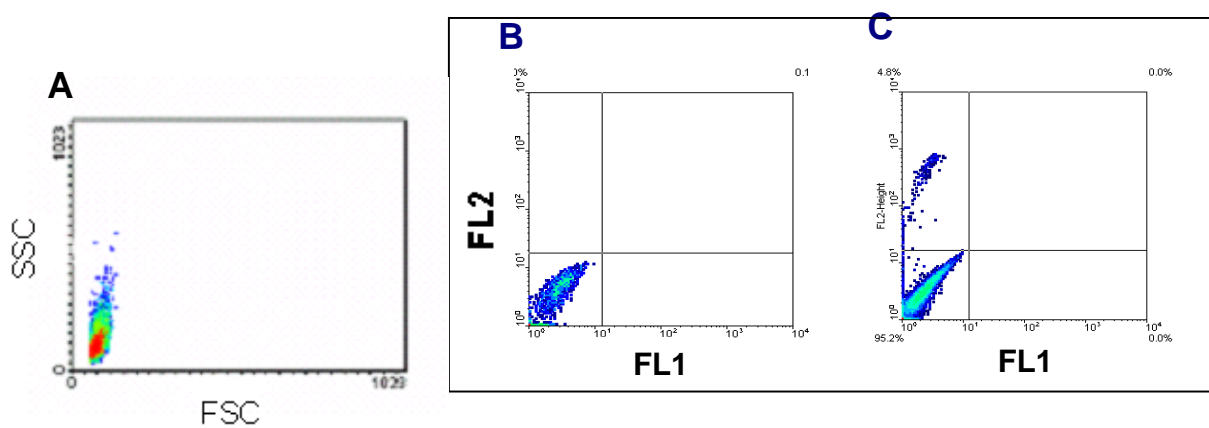
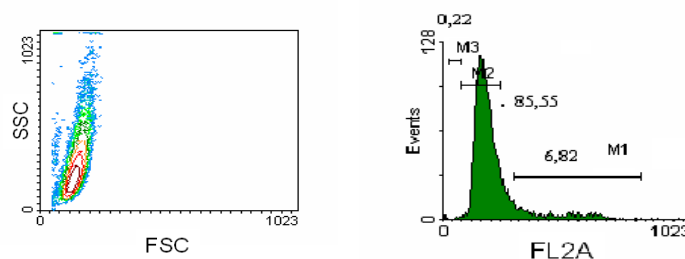


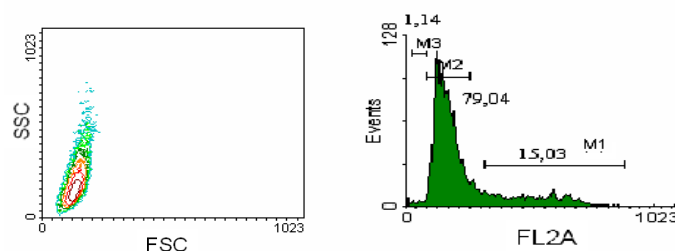
Figura 7 - **(A)** Dot plot mostrando a distribuição de células – fibroblatos humanos - tamanho (FSC) X (SSC) complexidade. **(B)** Dot plot mostrando a intensidade de fluorescência basal das células sem marcação com PI nos canais 515/545nm (FL1) X (FL2) 560/602nm. **(C)** Dot plot mostrando a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI nos canais (FL1) X (FL2). Observar as células marcadas com PI no primeiro quadrante.

Para análise por citometria das células em mitose e/ou apoptose de fibroblastos humanos induzidos pelo DMAE, as células foram marcadas com PI após exposição à concentração de DMAE de 0,01% por períodos de 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 210 determinando-se o percentual de fibroblastos marcados por PI. A Figura 8 mostra os histogramas representativos da distribuição dos fibroblastos, onde M3 significa a região das células em apoptose, M2 a região das células que estão na fase G0/G1 e M1 as células em mitose e síntese.

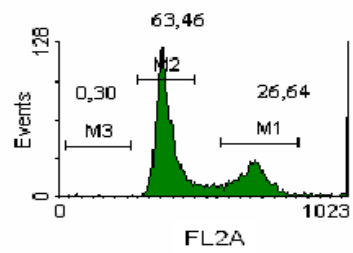
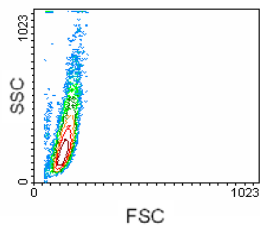
Controle



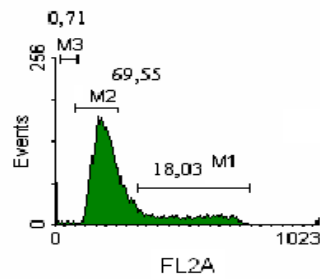
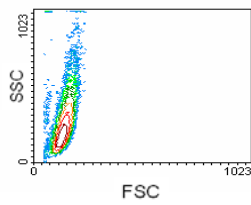
DMAE 15'



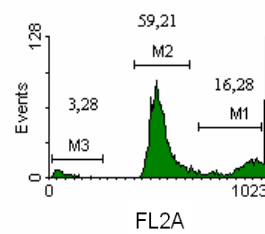
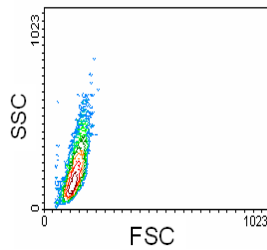
DMAE 30'



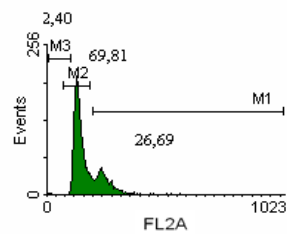
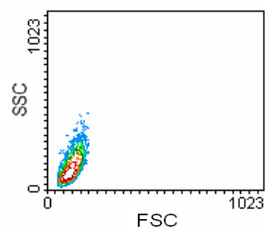
DMAE 45'



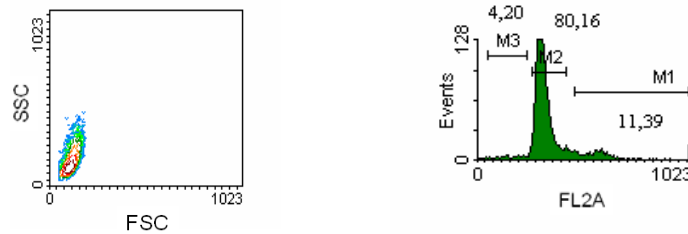
DMAE 60'



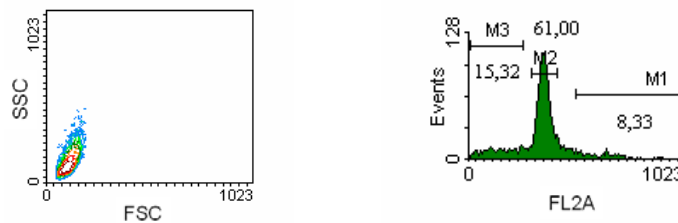
DMAE 90'



DMAE 120'



DMAE 180'



DMAE 210'



Figura 8 - Avaliação das células nas diversas fases do ciclo celular e das células em apoptose pelo uso de PI em fibroblastos humanos estimulados com DMAE por 15', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 210' e controle. A intensidade de fluorescência corresponde ao DNA. À esquerda dot plot característico do FSC (tamanho) X SSC (complexidade) delimitando a região dos fibroblastos. À direita histograma característico da intensidade de fluorescência entre o canal de FL2A e o número de células entre sub-

G0/G1(M3- apoptose), G0/G1 (M2), G2/M, S (M1), com picos de aproximadamente de 32 a 256. Os dados representam valores médios \pm S.E.M. de eventos independentes (N= 6).

Os histogramas mostraram que em relação ao grupo controle, a fase M3 que corresponde a apoptose foi maior a partir de 180 minutos e que também a partir desse momento a fase M1 relativa à mitose/síntese celular foi menor. A fase M1, quando as células foram estimuladas com DMAE, apresentou pico em 60 e 90 minutos, mas foi maior em todos os pontos de avaliação quando comparados ao grupo controle.

5 .DISCUSSÃO

O DMAE é uma substância usada há anos pela medicina alopática para melhorar a memória dos pacientes. Desde 1970, vários autores estudaram o efeito do DMAE na melhora da cognição e da memória em pacientes saudáveis e em pacientes com síndromes como o autismo e o mal de Alzheimer. Atualmente, a terapia oral com o DMAE está incluída em protocolos clínicos para pacientes pediátricos portadores de hiperatividade.

Afortunadamente, médicos e usuários perceberam ao longo dos anos o enrijecimento da região cervical quando da administração oral de DMAE, estimulando o interesse do meio científico devido a sua aplicação dermatológica. Entre 1999 e 2002, houve uma divulgação intensa da experiência clínica com o DMAE aplicado topicamente em preparações cosméticas visando um efeito tensor com uma ação contra o envelhecimento.

DMAE é a abreviatura usada para o 2-dimetilaminoetanol ou deanol, uma molécula pequena capaz de penetrar com facilidade a pele. Apresenta-se na forma de líquido viscoso com um forte odor característico das aminas. Na natureza, é encontrada em grandes quantidades em peixes como anchovas e salmão e em pequenas quantidades no cérebro humano.

Como a substância DMAE é considerada análoga sintética da colina, que é o precursor biológico da acetilcolina, a mesma pode aumentar os níveis de acetilcolina. Entretanto, nem todos os estudos confirmam que o DMAE age como um precursor da acetilcolina. Seu possível mecanismo de ação estaria envolvido com a contração dos músculos abaixo da derme e também por mecanismos de adesão das células da epiderme e derme.

Os possíveis mecanismos de ação desta substância referem-se ao aumento da acetilcolina, e o aumento de sua produção leva a potencialização de seu efeito. Desta maneira a hipertonicidade muscular leva ao efeito “lifting”, não cirúrgico, o DMAE ainda poderia agir sobre a síntese de colágeno da derme. Contudo, não existem evidências experimentais que comprovem tais fatos.

O mecanismo de ação de DMAE na pele ainda não está esclarecido. Já foram descritos receptores muscarínicos de acetilcolina em queratinócitos, melanócitos e fibroblastos da derme; os receptores nicotínicos já foram descritos em queratinócitos. O papel de acetilcolina, e DMAE, como modulador das funções de acetilcolina na pele ainda devem ser melhor estudados. Os benefícios de DMAE podem incluir o potencial antiinflamatório, bem como aumento da firmeza da pele, possivelmente devido ao aumento do tônus muscular facial.

Na literatura, não foram encontrados estudos que comprovem a permeação do DMAE ou de outros ativos dermatológicos até nível muscular. Estes dados direcionaram este trabalho a propor uma explicação do efeito clínico estético causado pelo dimetilaminoetanol baseada em efeitos sobre a derme e não sobre a musculatura como é proposto até o momento.

Apesar do papel da acetilcolina como um neurotransmissor ser bem conhecido, evidências recentes sugerem um papel semelhante as citocinas regulando processos celulares básicos como proliferação, diferenciação, migração e secreção utilizando mecanismos parácrinos e autócrinos. Este papel regulatório poderia contribuir para a atividade cutânea do DMAE.

Este trabalho teve como principal objetivo identificar a ação do DMAE, em cultura de fibroblastos humanos. No presente estudo observou-se que, houve a diminuição do número de fibroblastos, conforme o aumento da

concentração de DMAE suplementado ao meio de cultura. As concentrações da droga utilizadas neste trabalho estão muito abaixo da concentração geralmente usada topicamente em pele íntegra (3 a 5%), pelo fato da solução que o DMAE está solubilizado para uso comercial promover uma alteração drástica no meio de cultura e conseqüentemente morte celular. Utilizando concentrações inferiores ou da ordem de 0,01% o volume de solução não interferiu no pH do meio e apresentou efetiva ação conforme resultados apresentados.

Essas concentrações representam a concentração efetiva que atua ao nível celular após todo o processo de permeação que qualquer substância tópica deve se submeter. Normalmente, a concentração efetiva é próxima a um milésimo da concentração usada topicamente.

No presente estudo, ocorreu a diminuição da proliferação de fibroblastos conforme foram aumentadas as concentrações de DMAE, de 0,025 a 0,01%.

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para detectar as fases do ciclo celular, bem como o número de células em mitose e apoptose em cultura de fibroblastos da pele humana expostos às diferentes concentrações de DMAE, usando iodeto de propídeo (PI).

Para a análise por citometria das células em mitose ou apoptose induzidas pelo DMAE, as células foram marcadas com PI após exposição às diferentes concentrações de DMAE, por períodos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 210 segundos, determinando-se o percentual de fibroblastos marcados por PI. Estes pontos de análise foram determinados por experimento piloto de forma a detectar o pico de ação do DMAE.

Os histogramas mostraram que em relação ao grupo controle, a fase M3 que corresponde a apoptose foi maior a partir de 180 minutos e que

também a partir desse momento a fase M1 relativa à mitose/síntese celular foi menor. A fase M1, quando as células foram estimuladas com DMAE, apresentou pico em 60 e 90 minutos, mas foi maior em todos os pontos de avaliação quando comparados ao grupo controle. O primeiro achado sugere que o DMAE determina a apoptose celular, ou seja, a morte natural que iria ou estava para ocorrer, podendo ser considerado um potencial e possível efeito benigno, pois quando a substância for utilizada clinicamente poderá determinar a morte natural de células que envelheceram, mas ainda mantinham-se aderidas à pele. E o segundo achado sugere um possível efeito benigno quanto ao aumento da mitose e síntese, no caso dos fibroblastos, a síntese de matriz extracelular, como a fibronectina, fibras colágenas, glicosaminoglicanas, entre outras.

O trabalho de BUCHLI et al. (1999) demonstrou a presença de receptores muscarínicos em fibroblastos dérmicos. Como o DMAE é sabidamente um inibidor da acetilcolinesterase poderia explicar as alterações encontradas no presente estudo. Também neste estudo foi correlacionado um aumento intermitente $[Ca^{2+}]_i$ em cultura de fibroblastos com os receptores de acetilcolina. FINK, MORGAN, LOEW (1998) descreveram a técnica de detecção de cálcio intracelular utilizando o marcador fura-2, que foi utilizada neste trabalho. KOHYAMA et al. (2002) demonstraram a contração de géis de colágeno via sinalização de cálcio.

O tempo de tripsinização aumentou de acordo com a concentração de DMAE, em relação ao controle. Na concentração máxima de DMAE, o tempo de tripsinização foi, em média, 3,75 minutos; enquanto a amostra controle apresentou tempo máximo de 1 minuto e 75 segundos. Estes dados demonstram que a presença da substância interferiu no processo de adesão celular, quando as células foram submetidas à ação de proteases (tripsina), podendo sugerir o aumento da produção de matriz extracelular,

não tendo sido o foco do estudo a adesão celular que para tal teríamos de ter usado marcadores de proteínas de adesão.

Esses resultados sugerem uma ação desta substância concentração e tempo dependentes que interfere diretamente na viabilidade celular, na adesão, na proliferação de fibroblastos humanos ou na produção de matriz extracelular. Estes dados podem ser comparados aos de SHAHEEN et al. (2000) que utilizaram um modelo de gel de agarose com queratinócitos humanos cultivados como um modelo para estudar a migração destas células. No estudo destes autores houve também alteração da adesão dos queratinócitos. Como no presente estudo ocorreu alteração da adesão celular dos fibroblastos, apesar dos receptores de acetilcolina não terem sido marcados, um mecanismo envolvendo estes receptores poderiam explicar os resultados apresentados.

O citoesqueleto das células consiste de proteínas estruturais cuja função primária é ligar, ancorar ou amarrar componentes estruturais no interior da célula. Este citoesqueleto possui na face citoplasmática da membrana as junções aderentes constituídas de α -actinina e vinculina onde se ancoram os filamentos de actina (actina-F) e outros filamentos intermediários que constituem a interface dos elementos do citoesqueleto. CHAN et al. (2004) realizaram experimentos demonstrando que a adesão celular ocorria de forma dependente da entrada de cálcio para o compartimento intracelular alterando ligações de caderina e outras ligações intercelulares.

O mecanismo pelo qual ocorreu alteração da adesão celular pode ser explicado de diversas maneiras. YAP, BRIEHER, GUMBINER (1997) demonstraram que a ligação das caderinas se realiza de forma dependente da concentração de cálcio, via glicoproteínas, que são responsáveis pela adesão celular. BABIYCHUK et al. (2002) mostraram a ligação de actina em

células de músculo liso formando um complexo $\text{Ca}(2+)$ e filamentos de actina.

GRANDO et al. (1993a) estudaram em queratinócitos humanos a sua capacidade em produzir, secretar e metabolizar a acetilcolina. Como os queratinócitos humanos podem também responder a estímulos da acetilcolina, estes resultados sugerem que a acetilcolina produzida pelos queratinócitos age na epiderme como um hormônio local. Os mesmos autores, em 1996, avaliaram queratinócitos humanos isolados de pele de postectomia de recém nascidos. Quando foi adicionada nicotina às células, ocorreu um aumento do transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ transmembrana de maneira concentração dependente.

KISS, CRILLY, ANDERSON, em 1996, avaliaram o efeito de monometiletanolamina (1 mM) e dimetiletanolamina (1 mM) em fibroblastos NIH 3T3. Ambas substâncias provocaram um aumento da síntese de DNA respectivamente de 10 e 15 vezes.

NDOYE et al., em 1998, estudaram a estrutura molecular e a localização dos receptores muscarínicos de acetilcolina de alta afinidade (mAChR) em queratinócitos epidérmicos, e sugerindo que um mesmo citotransmissor, no caso a acetilcolina poderia ter diferentes efeitos biológicos dependendo do estado de maturação celular.

SHAHEEN et al., em 2000, utilizaram um modelo de gel de agarose com queratinócitos humanos cultivados como um modelo para estudar a migração destas células. A ativação de receptores nicotínicos de acetilcolina diminuiu a distância de migração dos queratinócitos de forma dose dependente, porém sem alterar a viabilidade celular. A nicotina causou um aumento de influxo de cálcio transmembrana dose dependente, levando a um aumento transiente da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O estudo demonstrou

que a nicotina exerce um efeito inibitório sobre a migração de queratinócitos e que o cálcio age como um segundo mensageiro desta cascata.

UHODA et al., em 2002, estudaram os efeitos tensores do 2-dimetilaminoetanol (deanol) gel. Os autores realizaram um estudo em duas fases, randomizado, duplo cego desenhado para comparar o efeito de um gel contendo 3% de DMAE e a mesma formulação sem DMAE. Inicialmente foi realizado um estudo piloto com 8 voluntários. No segundo estudo foram avaliados 30 pacientes quanto a sucção da pele e velocidade de propagação de deslizamento da pele. Ocorreu uma grande variação de resultados entre os indivíduos do estudo. Entretanto, a formulação com o DMAE aumentou a velocidade de deslizamento da pele e a anisotropia causando um aumento da firmeza cutânea.

NAGY & FLOYD, em 1984, estudaram as propriedades anti radicais livres do dimetilaminoetanol em experimentos in vitro. O DMAE apresentou uma reação depuradora anti-radicaís hidroxila (OH) competitiva com prolina e hidroxiprolina, ambos reagentes co-neutralizadores de radicais OH gerando radicais nitrogenados. O estudo demonstrou as propriedades depuradoras de radicais OH do DMAE. Estes resultados sugerem uma explicação para a ação antienvhecimento do DMAE.

ARREDONDO et al., em 2003, cultivaram fibroblastos dérmicos para avaliar o efeito da nicotina nestas células. Os fibroblastos cultivados foram expostos a 10 mM de nicotina. Houve também um aumento de 1,7 a 2 vezes nos reguladores de apoptose Bcl-2 e caspase 3. A exposição de nicotina também aumentou a expressão de proteínas de matriz dérmica como colágeno tipo I alfa1 e elastina assim como metaloproteinase-1. Foram detectados receptores nicotínicos em fibroblastos humanos dos subtipos alfa3, alfa5, alfa7, beta2, e beta4. Estes marcadores não foram

utilizados no presente estudo, porém podem explicar os dados encontrados da apoptose aumentada.

Estudos *in vitro* de linfócitos de sangue periférico indicaram que o DMAE possui uma moderada atividade antiinflamatória. ARORA et al. (1995) determinaram um dos mecanismos de ação de inter leucina-1 (IL-1) via sinalização de cálcio envolvendo proteínas de ligação. Embora seu mecanismo de ação específico necessite ser elucidado, evidências da ação do DMAE como modulador da acetilcolina apresentam-se consistentes. Outros estudos são necessários para esclarecer seu mecanismo de ação assim como comparar sua atividade com outras substâncias.

Novos estudos envolvendo a interação entre a derme e a epiderme, além da caracterização do papel da acetilcolina no processo de sinalização celular entre estas duas estruturas irão contribuir de maneira expressiva para o conhecimento dos mecanismos de renovação cutânea. Desta forma são necessários estudos experimentais que identifiquem os reais mecanismos de ação do DMAE nas células da pele. Tais estudos irão gerar informações que permitam a utilização da droga de maneira adequada, evitando efeitos colaterais a curto ou longo prazo e que caracterizem sua efetiva ação no rejuvenescimento da pele.

Também serão necessários mais estudos quanto à síntese de matriz extracelular pelos fibroblastos humanos cultivados estimulados por diferentes concentrações de DMAE, para definirmos se a substância apresenta efeito direto sobre a síntese ou efeito através de sinalização como precursor de acetilcolina.

CONCLUSÕES

- 1.) O DMAE alterou a viabilidade dos fibroblastos humanos cultivados, com a diminuição da proliferação.
- 2.) O DMAE determinou o aumento do cálcio citosólico e alterou o ciclo celular com o aumento da apoptose nos fibroblastos humanos cultivados.

REFERÊNCIAS

- Alkadhi KA. Endplate channel actions of a hemicholinium-3 analog, DMAE. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1986;332(3):230-5.
- Arora PD, Ma J, Min W, Cruz T, McCulloch CA. Interleukin-1-induced calcium flux in human fibroblasts is mediated through focal adhesions. *J Biol Chem.* 1995;270(11):6042-9.
- Arredondo J, Hall LL, Ndoye A, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Beaudet AL, Grando SA. Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine. *Lab Invest.* 2003;83(2):207-25.
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Webber RJ, Grando SA. Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2005;125(6):1236-41.
- Babiychuk EB, Babiychuk VS, Danilova VM, Tregubov VS, Sagach VF, Draeger A. Stress fibers-a Ca²⁺ independent store for annexins? *Biochim Biophys Acta.* 2002;1600(1-2):154-61.
- Bove FC, Haarstad VB. Hemicholinium-3 and related ether analogues on the synthesis of acetylcholine by mouse brain (in vitro). *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1981;253(2):278-93.
- Buchli R, Ndoye A, Rodriguez JG, Zia S, Webber RJ, Grando SA. Human skin fibroblasts express m2, m4, and m5 subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *J Cell Biochem.* 1999;74(2):264-77.
- Chan MW, El Sayegh TY, Arora PD, Laschinger CA, Overall CM, Morrison C, McCulloch CA. Regulation of intercellular adhesion strength in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279(39):41047-57.
- Cherkin A, Exkardt MJ. Effects of dimethylaminoethanol upon life-span and behavior of aged Japanese quail. *J Gerontol.* 1977;32(1):38-45.

Chernyavsky AI, Arredondo J, Marubio LM, Grando SA. Differential regulation of keratinocyte chemokinesis and chemotaxis through distinct nicotinic receptor subtypes. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5665-79.

Dormard Y, Levron JC, Benakis A. Pharmacokinetic study of maleate acid of 2-(N,N-dimethylaminoethanol-14C1)-cyclohexylpropionate (cyprodenate) and of N,N-dimethylaminoethanol-14C1 in animals. *Arzneimittelforschung.* 1975;25(2):194-201.

Fink C, Morgan F, Loew LM. Intracellular Fluorescent Probe Concentrations by Confocal Microscopy. *Biophys J.* 1998;1648-58.

Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol.* 1993a;101(1):32-6.

Grando SA, Crosby AM, Zelickson BD, Dahl MV. Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. *J Invest Dermatol.* 1993b;101(6):804-10.

Grando SA, Zelickson BD, Kist DA, Weinshenker D, Bigliardi PL, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Dahl MV. Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. *J Invest Dermatol.* 1995a;104(1):95-100.

Grando SA, Horton RM, Pereira EF, Diethelm-Okita BM, George PM, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1995b;105(6):774-81.

Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol.* 1996;107(3):412-8.

Grando SA. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol.* 2006 Apr;15(4):265-82.

Grossman R. The role of dimethylaminoethanol in cosmetic dermatology. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6(1):39-47.

Hanover JA, Pastan I, Willingham MC. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis does not alter uptake of transferrin by LM fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1985;157(1):276-81.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos IAN. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras.* 2004;19(suppl.1):11-6.

Kiss Z, Crilly KS, Anderson WB. Protein kinase C inhibitors enhance the synergistic mitogenic effects of ethanolamine analogues and insulin in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(1):125-30.

Kohyama T, Wyatt TA, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Kim HJ, Rennard SI. PGD(2) modulates fibroblast-mediated native collagen gel contraction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(3):375-81.

Lohr J, Acara M. Effect of dimethylaminoethanol, an inhibitor of betaine production, on the disposition of choline in the rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252(1):154-8.

Maeda M, Doi O, Akamatsu Y. Behavior of vesicular stomatitis virus glycoprotein in mouse LM cells with modified membrane-phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 1980;597(3):552-63.

Moriyama N, Tajima A, Takahashi S, Homma Y, Higashihara E, Aso Y, Minagawa T, Ota K, Okuyama S. The distribution and localization of alpha 1-adrenoceptor agonist on the bladder and urethra of female rats. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1992;83(4):536-41.

Nagy I & Floyd RA. Electron spin resonance spectroscopic demonstration of the hydroxyl free radical scavenger properties of dimethylaminoethanol in spin trapping experiments confirming the molecular basis for the biological effects of centrophenoxine. *Arch Gerontol Geriatr.* 1984;3(4):297-310.

Ndoye A, Buchli R, Greenberg B, Nguyen VT, Zia S, Rodriguez JG, Webber RJ, Lawry MA, Grando SA. Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1998;111(3):410-6.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139(2):271-9.

Peterson LA, Sharabi FM, Long JP, Taylor CA Jr, Barfknecht CF. The antagonism of nicotine-induced cardiovascular responses by DMAE and DEO analogs. *Eur J Pharmacol.* 1976;37(2):303-10.

Shaheen FA, Souqiyyeh MZ, Abdullah A. Strategies and obstacles in an organ donation program in developing countries: Saudi Arabian experience. *Transplant Proc.* 2000;32(7):1470-2

Uhoda I, Faska N, Robert C, Cauwenbergh G, Pierard GE. Split face study on the cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. *Skin Res Technol.* 2002;8(3):164-7.

Williams AC, Cornwell PA, Barry BW. On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities. *Int J Pharm.* 1992;86:69-77.

Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:119-46.

Zahniser NR, Chou D, Hanin I. Is 2-dimethylaminoethanol (deanol) indeed a precursor of brain acetylcholine? A gas chromatographic evaluation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1977;200(3):545-59.

Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA. Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *Pharmacol Exp Ther.* 2000;293(3):973-81.

NORMAS ADOTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. www.bireme.br – terminologia em saúde.

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. [Http://www.icmje.org](http://www.icmje.org)

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM

FONTES CONSULTADAS

- 1.) Alberts B. & Bray D. Biologia molecular da Célula. 3ª edição. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
- 2.) Arnaldo Z. Biologia Molecular Básica. 3ª edição. Editora Mercado Aberto, 2001.
- 3.) Cosmetic & Pharma – Ano 1 – Mar/Abr de 2003 – 2ª Edição
Freshney RL. Culture of Animal Cell: a manual of basic technique. 3ª edição. New York: Willy-Liss, 1995.
- 4.) Geoffrey M. Cooper. A célula – uma abordagem molecular. 2ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2001
- 5.) Guyton & Hall – Tratado de Fisiologia Médica. 10ª edição. Guanabara Koogan, 2002
- 6.) Harris, MINC - Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento – Editora Senac São Paulo, 2003.
- 7.) <http://www.pharmapress.com.br> – Uma publicação editada pelo PCCA Brasil –Ano 1 Novembro / 2002
- 8.) <http://www.drperricone.com/>
- 9.) Jones GE. Human Cell Culture Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1996.
- 10.) Junqueira & Carneiro – Biologia Celular e Molecular. 7ª edição. Guanabara Koogan, 2000
- 11.) Med News , Ano 4, Abril 2002, nº 46, pag. 8;
- 12.) Piñero EL. Guia Prático e didático de Biologia molecular. 1ª edição. Editora Revinter, 2003
- 13.) Range & Dale – Farmacologia. 4ª edição Guanabara Koogan , 2001
- 14.) The Merck Index 19ª edição , pag. 48

ANEXO 1

Sexo, idade e raça dos pacientes doadores de fragmentos de pele usados no estudo.

	Sexo	Idade	Raça
1	Feminino	53 anos	Branca
2	Feminino	46 anos	Branca
3	Masculino	44 anos	Branca
4	Feminino	41 anos	Branca
5	Masculino	38 anos	Branca
6	Feminino	35 anos	Branca
7	Masculino	32 anos	Branca
8	Feminino	51 anos	Branca
9	Feminino	52 anos	Branca
10	Masculino	39 anos	Branca

ANEXO 2

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

1. Título do projeto: "Proliferação de fibroblastos humanos cultivados em meio suplementado com DMAE."
2. Informações sobre o objetivo: Essa pesquisa na qual você participará como voluntário, tem como objetivo avaliar a proliferação dos fibroblastos, principal célula da derme, através da suplementação de DMAE.
3. Descrição dos procedimentos: Após sua cirurgia estética eletiva, quando normalmente os tecidos redundantes retirados durante o procedimento serão desprezados, os mesmos serão enviados para o laboratório de cultura de células onde faremos as células crescerem dentro de recipientes apropriados.
4. Relação dos procedimentos: A pele que é desprezada em cirurgias estéticas eletivas como blefaroplastia, otoplastia, ritidoplastia, mamoplastia, e abdominoplastia serão encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Células.
5. Descrição dos desconfortos e riscos esperados: Nenhum transtorno será causado, pois o material utilizado seria desprezado, nenhum procedimento a mais será acrescentado à sua cirurgia.
6. Benefício para o paciente: Não há benefício direto ao participante.
7. Procedimentos alternativos: Não existem procedimentos alternativos, pois não serão realizados procedimentos aos já necessários ao procedimento eletivo.
8. Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Fabiana Bocci Giannoccaro que pode ser encontrado no seguinte endereço: Rua Napoleão de Barros, 715, 4ª andar, Telefone: (11) 5576.4118. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 -f andar-cj 14, 5571.1062, FAX 5539.7162 - E-mail: cepunifesp@epm.br.
- 9 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 10 - Direito de confidencialidade - As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

11 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 - Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 - Eu, como pesquisador, comprometo a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo Proliferação de fibroblastos humanos cultivados em meio suplementado com DMAE.

Eu discuti com a Fabiana Bocci Giannoccaro sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura da testemunha Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data /

ANEXO 3



*Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina*

*Comité de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo*

São Paulo, 30 de janeiro de 2004
CEP 1498/03

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) **FABIANA BOCCI GIANNOCCARO**
Disciplina/Departamento: **Cirurgia Plástica/Cirurgia da**
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação de proliferação e produção de colágeno de fibroblastos humanos cultivados em meio suplementado com DMAE".

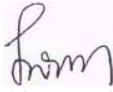
Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas
 2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
 - 3 Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
 - 4 Apresentar primeiro relatório parcial em 28/julho/2004 5.
- Apresentar segundo relatório parcial em 24/janeiro/2005.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade
Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo**

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Rua Botucatu, 572 -1" andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011)
5571-1062 - 5539.7162

ANEXO 4

PROJETO PILOTO

Nas primeiras etapas do projeto piloto, foram utilizadas concentrações da ordem de 1, 3, 5 e 10% da solução do DMAE fornecido pela farmácia de manipulação após ter sido neutralizado seu pH com Lactato (Embrafarma Lote: DLA002.02.03), o que é realizado de rotina para a utilização clínica tópica da substância.

Essas concentrações foram suplementadas no meio de cultura quando do seu processamento inicial, tendo quatro meios de culturas com concentrações fixas. O pH do meio foi drasticamente modificado, chegando próximo de 5. O meio foi então neutralizado para 7,2, valor ideal para as células em cultura, com solução de NaOH 1M, em quantidades diferentes para cada concentração, necessitando de volumes maiores quanto maior fosse a concentração do DMAE (Tabela 1).

Tabela 1- Resultados da contagem de fibroblastos após 24 horas da suplementação de DMAE-Lactato ao meio de cultura. Semeadura de 100.000 células.

Grupos	Número de células
Controle	195.000
1%	80.000
3%	27.500
5%	12.500
10%	75.000

Quando esse meio foi acrescido às garrafas com células semeadas, e avaliadas 24 h após a semeadura foi observado a morte das células, ficando muito poucas células aderidas nas garrafas com menores concentrações.

Nas etapas seguintes, foram diminuídas as concentrações, e foi utilizada a solução DMAE base, cujo pH é ao redor de 11-12, e quando acrescido ao meio, o pH deste chegou a 10,5. O meio foi neutralizado para 7,2 com solução de HCL. Após 24 h de cultivo também foi observada a morte celular generalizada (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da contagem de fibroblastos após 24 horas da suplementação de DMAE- Base ao meio de cultura. Semeadura de 100.000 células.

Grupos	Número de células
Controle	215.000
1%	72.500
3%	52.500
5%	30.000
10%	17.500

Na sequência, as concentrações foram sendo diminuídas e outra mudança no método foi que o DMAE foi pipetado diretamente na garrafa e não preparado conjuntamente com o meio de cultura. E outra alteração é que essa suplementação do DMAE direta na garrafa foi realizada 48 h após a semeadura, e não como vinha sendo realizado, no mesmo momento da semeadura das células. A colocação 48 h após a semeadura deu oportunidade para as células aderirem à garrafa, e iniciarem a proliferação.

Portanto, a primeira troca de meio após 48 h foi realizada também a colocação direta do DMAE na garrafa, e o meio ainda foi trocado mais duas vezes com a adição do DMAE até o início da avaliação. Mas, após 24 h da colocação do DMAE, a maioria das células destacaram-se da garrafa, mostrando a morte celular (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da contagem de fibroblastos após 48 horas da suplementação de DMAE- Base diretamente na garrafa. Semeadura de 100.000 células.

Grupos	Número de células
Controle	410.000
0,3%	245.000
0,15%	372.500
1%	87.500
0,5%	97.500

Após várias etapas diminuindo as concentrações chegamos à redução de 1000 vezes as concentrações iniciais do projeto piloto ou as que são utilizadas topicamente no paciente.

Por fim, foram obtidas concentrações de 0,01%, 0,005% e 0,0025% de DMAE que foram pipetadas diretamente na garrafa de células, sendo realizado três trocas de meio, no segundo, quarto e sexto dia após a semeadura das células, num total de sete dias de experimento, sendo o mesmo avaliado no sétimo dia (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da contagem de fibroblastos dos 10 experimentos.

experimento	controle	0,0025%	0,005%	0,01%
1	860.000	145.000	99.500	65.000
2	762.500	175.000	118.000	85.000
3	835.000	160.000	122.500	70.000
4	765.000	140.000	125.500	77.500
5	747.500	162.500	115.000	75.000
6	740.000	200.000	100.000	67.500
7	697.000	155.000	130.000	77.500
8	805.000	172.500	107.500	82.500
9	707.500	157.500	137.500	72.500
10	840.000	152.500	122.500	90.000

ANEXO 5

COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TYRODE NORMAL

Reagentes	<u>Solução Final</u> (mM)
NaCl	137,00
KCl	2,70
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,36
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,50
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,36
NaHCO ₃	11,90
Glicose	5,50



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Programa de Pós-Graduação
Cirurgia Plástica

Coordenadora : Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

São Paulo, 24 de Julho de 2006

Ilmo. Sr.
Prof.Dr. Nestor Schor
Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da UNIFESP/EPM.

Prezado Professor,

Na condição de orientador da aluna de Mestrado, FABIANA BOCCI GIANNOCARO, venho comunicar que foram avaliadas e realizadas as correções sugeridas pelos membros da banca examinadora para a dissertação intitulada "Dimetilaminoetanol (DMAE) na viabilidade de fibroblastos humanos cultivados". O trabalho final foi revisto e considerado dentro das normas para a encadernação definitiva.

Atenciosamente,

Prof.Dr. Alfredo Gagnani Filho
Orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica
UNIFESP/EPM

Rua Napoleão de Barros, 715 – VI. Clementino – 04024-002 – São Paulo/Brasil
Tel.: (55 11) 5576.4118 / 5576.4065 / Fax (55-11) 5571.6579
e-mail: marta.dcir@epm.br