

JORGE MANUEL

**VITAMINA C NO ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO H₂O₂ EM FIBROBLASTOS
HUMANOS DÉRMICOS CULTIVADOS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências**

São Paulo

2010

JORGE MANUEL

**VITAMINA C NO ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO H₂O₂ EM FIBROBLASTOS
HUMANOS DÉRMICOS CULTIVADOS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO

CO-ORIENTADORES: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE

Prof. LUIZ EDUARDO FELIPE ABLA

São Paulo

2010

Manuel, Jorge

Vitamina C no Estresse Oxidativo induzido pelo H₂O₂ em Fibroblastos Humanos Cultivados. Cultura de Células./ Jorge Manuel -- São Paulo, 2010. XIX, 93f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Vitamin C in oxidative stress induced by H₂O₂ in cultured human fibroblasts

1. Ácido ascórbico. 2. Peróxido de Hidrogênio. 3. Estresse Oxidativo. 4. Fibroblastos. 5. In vitro 6. Apoptose.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

TITULAR: PROFa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais
José Manuel e Maria Teresa Madureira Manuel,
Pelo seu amor em todas as fases da minha vida,
Sua compreensão e incentivo
Que me ajudaram a chegar ao fim de mais uma fase

Aos meus irmãos
José e Alexandre Manuel
Por ser sempre algo a mais que irmãos,
Verdadeiros companheiros para os desafios da vida

*A minha querida e amada esposa **Ana Paula,***
Pelo seu apoio incondicional aos meus objetivos,
seu amor e compreensão

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Esta tese de mestrado não teria sido possível sem a ajuda e apoio de algumas pessoas e nesse momento posso lhes fazer um pequeno agradecimento.

Agradeço à **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células da Pele, pela oportunidade de ter sido seu aluno, na graduação e na residência médica, e por poder realizar este trabalho no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina.

Ao **Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, Professor Orientador do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Plástica, vice Coordenador do Laboratório de Cultura de Células da Pele, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança, dedicação, interesse demonstrado na realização desse trabalho, correção desta tese, orientação e ensinamentos e pela ajuda na construção da minha vida profissional.

Ao **Prof. LUIZ EDUARDO FELIPE ABLA**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, por sua colaboração neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, por sua colaboração neste trabalho, desde a fase experimental até a sua correção, e nos momentos de dificuldade

Ao **Prof. Dr. REINALDO SALOMÃO**, Professor Titular da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo, pela oportunidade de utilizar o equipamento de Citometria de Fluxo, essencial na realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. MILENA BRUNIALTI**, por toda ajuda e ensinamentos e colaboração nesse trabalho.

À Doutoranda **SILVANA GAIBA**, pela amizade, carinho, apoio e auxílio na cultura de células.

À Doutoranda **VANINA MONIQUE TUCCI VIEGAS**, pela amizade sincera e por sua colaboração na cultura de células.

À Profa. **MARIA LUIZA CRISTÓVÃO RAMOS**, pela amizade, carinho, orientações e colaboração nesse trabalho.

A **GABRIELA SOARES BRITO**, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade incondicional, paciência, dedicação e por estar sempre disposta a ajudar, mesmo em prejuízo próprio. Nosso trabalho em conjunto nos deu o título a que ansiávamos.

Ao Mestre **CELESTINO PRÓSPERO**, por sua amizade e colaboração nesse trabalho.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, **MARTA REJANE REIS DA SILVA, SANDRA DA SILVA E SILVANA S. OLIVEIRA**, pela atenção, apoio e amizade.

AGRADECIMENTOS

A todos os **PROFESSORES E ALUNOS** de Pós Graduação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica UNIFESP-EPM, pela colaboração, idéias e sugestões nas reuniões.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

*Valeu à pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS.....	VII
EPÍGRAFE.....	XI
SUMÁRIO	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	7
4. MÉTODOS	18
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS	51
NORMAS ADOTADAS.....	61
ABSTRACT.....	63
APÊNDICES	65
FONTES CONSULTADAS	72

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Variação da intensidade de densidade óptica pelo MTT no decorrer do tempo por grupo..... 30
- Figura 2. Médias da percentagem de fibroblastos senescentes por grupo assinalando-se a diferença estatística entre os mesmos. 31
- Figura 3. Média do percentual de células positivas para Anexina e negativas para PI por grupo, havendo diferença estatística somente entre o grupo Controle e os demais grupos..... 32
- Figura 4. Média dos valores da intensidade de fluorescência, unidades arbitrárias, por grupo..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 5HDC 5-hidroxi-deoxicitidina
- 8DOXIG 8-diidro-desoxiguanosina
- AgNO₃ Nitrato de Prata
- °C Graus Celsius
- A Ascorbato
- AA Ácido Ascórbico
- AV Anexina V
- cm² Centímetro Quadrado
- DCFH-DA Diacetato de Diclorofluoroceina
- DHA Dehidroascorbato
- DHL Desidrogenase Láctica
- DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO Dimetil sulfóxido
- EROs Espécies Reativas de Oxigênio
- FS Fosfatidilserina
- GSH Glutationa
- H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio
- HO-1 Hemi-oxigenase
- l Litro

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- M Molar
- MDA Malonil dialdeído
- ml Mililitro
- mM Milimol
- MMP1 Metaloproteinase 1
- MTT *Method of Transcriptional and Translational* (Proliferação)
- PI Iodeto de Propídeo
- PBS *Phosphate-Buffer Saline* (solução salina fosfatada)
- RDD Resposta ao DNA Danificado
- RL Radicais Livres
- RLA Radical Livre Ascorbato
- rpm Rotações por Minuto
- SOD Superóxido Dismutase
- SPIE Senescência Prematura Induzida Pelo Estresse Oxidativo
- TBARS Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
- UI Unidades Internacionais
- UVA Radiação Ultra-violeta tipo A
- β -gal Beta - galactosidase
- μ m Micrômetro
- μ M Micromol

RESUMO

RESUMO

Introdução: EROs são produzidas durante o metabolismo normal das células, tendo funções fisiológicas importantes como a sinalização celular. Porém, em uma situação que leve o organismo a uma produção exagerada de EROs, temos o chamado estresse oxidativo, que tem ação deletéria às células, podendo levar à apoptose ou à senescência celular. A vitamina C é um dos principais agentes antioxidantes do organismo, atuando em todas as formas de estresse oxidativo. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da vitamina C em cultura de fibroblastos humanos dérmicos submetida ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio. **Método:** O método constitui-se no isolamento e cultivo de fibroblastos humanos dérmico em seis grupos: controle, Vitamina C+, Vitamina C -, H₂O₂, Vitamina C + H₂O₂, Vitamina C - H₂O₂. Os fibroblastos foram submetidos ao estresse oxidativo pela suplementação de H₂O₂ ao meio de cultura por 2 horas. Foram avaliados a proliferação pelo MTT, a senescência celular pela marcação da enzima beta-galactosidase, a apoptose celular e a liberação de EROs pela citometria de fluxo. **Resultados:** Os resultados demonstraram que o peróxido de hidrogênio aumentou significativamente a senescência celular e a apoptose nos fibroblastos. A vitamina C diminuiu significativamente a indução da senescência celular somente no estado intracelular. **Conclusão:** Concluiu-se que a vitamina C não protegeu os fibroblastos humanos dérmicos cultivados contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ e que a Vitamina C intracelular levou a uma diminuição da indução da senescência celular.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dentre todos os constituintes celulares, o DNA nuclear é considerado o mais importante, exercendo controle sobre as demais estruturas e organelas. Logo, qualquer dano em sua estrutura, em uma única fita de DNA ou na dupla fita, é prontamente reconhecido pela célula e desencadeia uma resposta celular conhecida como Resposta ao DNA-Danificado (RDD) (FAGAGNA, 2008). A RDD teria a função principal de impedir que um DNA danificado seja transmitido a células filhas, pela interrupção da duplicação celular, permitindo que os esforços se concentrem no reparo do DNA danificado, visando manter a integridade genômica.

Dependendo da intensidade da lesão, o dano ao DNA pode ser reparado, e a célula entra logo em um novo ciclo celular. Porém, se o dano for mais intenso, pode ser desencadeada a apoptose, definida como um modelo de morte celular utilizada por organismos pluricelulares em uma diversidade de situações, cuja função é a de remover células danificadas de uma maneira irreversível (KERR, WYLLIE, CURRIE, 1972). Ainda, além da apoptose, a RDD pode levar a célula a um estado irreversível de parada de proliferação celular, conhecido com senescência celular, no qual as células não respondem ao estímulo de crescimento, e mostram alterações características em suas propriedades citológicas e bioquímicas, e em seu perfil de expressão genética (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961; ISHIKAWA, 2006).

Não se conhece o fator determinante para que a célula sofra apoptose ou senescência celular, mas esses fatores podem estar relacionados ao tipo e intensidade da agressão e tipo celular (REBBAA, *et al.*, 2003; CAMPISI & FAGAGNA, 2007).

Um dos principais agentes causadores de danos ao DNA são as espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja produção ocorre principalmente no interior das mitocôndrias. As EROs estão envolvidas em processos celulares normais como sinalização celular e a proliferação, porém, quando em excesso as EROs causam danos celulares que são relacionados a numerosas doenças, como a aterosclerose, doenças neurodegenerativas, inflamatórias, diabetes, câncer e envelhecimento (EVANS, DIZDAROGLU, COOKE, 2004). O dano provocado pelas EROs ao DNA estaria também relacionado com o processo de envelhecimento e com a formação de neoplasias (AMES, SHIGENAGA, HAGEN, 1993). O acúmulo de DNA danificado causadp pelas EROs pode levar à senescência e a apoptose (RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER, 2006).

A fim de diminuir as ações prejudiciais das EROs, o organismo possui mecanismos intrínsecos para sua remoção, como enzimas removedoras de EROs, as superóxido dismutase, catalase, peroxidase, etc, proteínas que sequestram íons metálicos de transição como ferritina, transferrina, peptídeos de baixa massa molecular e cofatores, (glutathione, NADPH, tireodoxina), e agentes seqüestradores de radicais livres que são adquiridos na dieta, (tocoferol, vitamina C, entre outros) (DUARTE & LUNEC, 2005; CIRCU & AW, 2010).

A função da vitamina C como protetor contra o dano causado ao DNA pelo estresse oxidativo é controverso. Muitos trabalhos apontam para um efeito protetor da vitamina C em leucócitos (LENTON *et al.*,1999;

CARR & FREI,1999; MOLLER & LOFT, 2004), enquanto outros sugerem não haver efeito protetor, ou mesmo um efeito pro-oxidante (PODMORE & LUNEC, 1998; POULSEN *et al.*, 1998; MOLLER, *et al.*, 2004).

Assim, sabendo-se que a senescência celular e a apoptose são fenômenos relacionados ao estresse oxidativo, e pela ação controversa da vitamina C como antioxidante, foi levantada a hipótese de que a vitamina C apresentaria ação *in vitro* em fibroblastos humanos dérmicos submetidos ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a ação da vitamina C no estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 em fibroblastos humanos dérmicos cultivados.

LITERATURA

3. LITERATURA

HAYFLICK & MOORHEAD (1961) descreveram o isolamento e caracterização de fibroblastos humanos fetais, evidenciando-se que as células tinham uma limitada capacidade de se replicarem. A degeneração e morte desta linhagem de células levantaram a hipótese de que o fenômeno ocorreria pelo envelhecimento celular, limitando a capacidade de divisões celulares dos fibroblastos.

Coube a KERR, WYLLIE, CURRIE (1972) a cunhar o termo apoptose ao fenômeno escrito como morte celular programada, já o identificando como um mecanismo de supressão celular controlado, tendo um papel complementar, mas oposto ao da mitose na regulação da população das células animais. Os autores descreveram as características da apoptose, como a condensação do núcleo e do citoplasma, e seu fracionamento em uma série de fragmentos, sendo degradadas pelas células vizinhas. Também ressaltaram já naquela época a sua importância no tratamento de neoplasias, que poderia ser desencadeada por agentes nocivos.

DARR, COMBS, PINNEL (1993) estudaram a síntese de colágeno e a produção de radicais livres em cultura de fibroblastos dérmicos. Neste trabalho, as culturas de células foram submetidas aos efeitos da vitamina C (concentrações de 200 μ M e 1mM), associados ou não a quelantes de ferro (Desferral e EDTA) e a outros antioxidantes (Catalase e SOD). Os resultados foram avaliados quanto à produção de colágeno e quanto à

produção de radical livre demonstrado pela presença de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) e também pelo malonil dialdeído (MDA). Foi analisada também a influência do meio líquido onde as células se encontravam. Como resultados, os autores observaram que a adição da vitamina C ao meio de cultura aumentou a produção de TBARS (inibida pela adição de quelantes de ferro), sem alterar a produção de colágeno. Quando as células receberam a vitamina C nas concentrações de 200 μ M e 1mM, associada a catalase e a SOD, também ocorreu aumento das taxas de TBARS, sem alteração da produção de colágeno. Com relação à influência do meio líquido dos fibroblastos, os autores observaram dosagens de TBARS aumentadas pela presença de vitamina C quando o meio era solução salina tamponada por fosfato (PBS) e não em meio normal (DMEM). Concluíram que a vitamina C promove um aumento na formação de radicais livres quando em PBS pela provável presença de metais livres, e que este aumento não representou uma diminuição na atividade dos fibroblastos, expressada pela produção de colágeno.

CHEN & AMES (1994) trataram fibroblastos imortalizados por duas horas com H₂O₂ em uma concentração de 200 μ M levando a uma inibição da síntese de DNA. As células falharam em responder a estímulos de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento básico de fibroblastos e fator de crescimento da epiderme. Ainda desenvolveram características morfológicas de células senescentes, demonstrando um método eficiente para levar as células a se tornarem senescentes.

DIMRI *et al.* (1995) publicaram o primeiro trabalho relacionando a enzima betagalactosidase como um biomarcador da senescência celular. Utilizaram diferentes tipos de fibroblastos e queratinócitos, além de células

endoteliais e melanócitos, não expondo-as a nenhum agente agressor. Observou que a enzima lisossomal beta-galactosidase estava presente em células provenientes de indivíduos de maior idade. A enzima não é um marcador universal da senescência, não sendo detectável em alguns tipos celulares e estando presente em células confluentes.

VERMES *et al.* (1995) descreveram o uso da anexina V e do iodeto de propídeo em conjunto para a identificação de células em fase inicial de apoptose por citometria de fluxo. Utilizaram linfócitos humanos que foram irradiados em diferentes intensidades e concluíram que marcação dupla com Anexina V e Iodeto de Propídeo possibilitaria diferenciar células que estariam no início da apoptose daquelas que já se encontrariam em necrose, ou apoptose tardia.

SINGH (1997) expôs linfócitos humanos, fibroblastos neonatais e células Molt-4 ao ascorbato de sódio a concentrações de 25, 50 e 100µM por uma hora. Verificou a presença de danos ao DNA das células em todas as concentrações, principalmente nos fibroblastos e nas células Molt-4. Os fibroblastos quando tratados com concentrações de 100µM ou maiores apresentavam morte celular, e em concentrações de 50µM, considerada fisiológica, houve inibição da proliferação celular.

BLADIER, WOLVETANG, HUTCHINSON (1997) demonstraram que dependendo da concentração de H₂O₂, fibroblastos expostos a estas concentrações poderiam sofrer um processo predominantemente de senescência celular (50 a 100µM), senescência e apoptose (200µM) e apoptose (300 a 400µM). Assim, quanto maior a concentração de H₂O₂, maior a proporção de células em apoptose, o que sugere que o nível de dano teria uma função chave em se determinar a população de células que entrariam em apoptose ou senescência.

KIM, CHO, UM (2000) analisaram a função da caspase-3 no processo de apoptose induzido pela exposição a diferentes concentrações de H₂O₂ em células Jurkat T. Utilizando um inibidor da caspase-3, observaram que o tratamento com H₂O₂ induziu a fragmentação do DNA e condensação do núcleo das células sem o inibidor. Porém este fenômeno não ocorreu em células em que a caspase-3 foi inibida, o que sugere que a caspase-3 é fundamental para os eventos no núcleo das células. Entretanto, a exteriorização da fosfatidilserina (FS) e a morte celular ocorreram independentemente da caspase-3. Concluíram que a via de ativação da apoptose pelo H₂O₂ não depende da caspase-3.

BERTIN-MAGHIT *et al.* (2000) avaliaram durante 5 dias o nível de radicais livres e de antioxidantes em 20 pacientes internados na UTI por queimaduras comprometendo 30% ou mais da superfície corpórea. observaram uma produção aumentada de radicais livres neste período graças a peroxidação lipídica e diminuição da concentração sanguínea de antioxidantes como a vitamina C, vitamina E e o beta-caroteno.

OFFORD *et al.* (2002) demonstraram efeito protetor contra radiação ultra-violeta do tipo A (UVA) dos antioxidantes vitamina C, vitamina E e β-caroteno em fibroblastos dérmicos humanos. Utilizaram a vitamina C na forma de ascorbato de sódio em uma concentração de 14μM, sendo aplicada através de nanopartículas 24 horas antes da exposição à UVA. Mensurou os níveis de metalproteinase 1 (MMP-1), um marcador da degradação do colágeno e do fotoenvelhecimento, e de hemi-oxigenase (HO-1), um marcador do estresse oxidativo, concluindo que a vitamina C e vitamina E apresentam um efeito fotoprotetor, principalmente quando associados, levando a diminuição de MMP-1 e de HO-1.

FRIPPIAT *et al.* (2002) expuseram fibroblastos de pulmão fetal a concentrações subtóxicas de H_2O_2 (150 μ M por duas horas), e observaram o aparecimento das características da senescência celular 72 horas após esta exposição. Identificaram as células senescentes pela marcação da enzima Beta-Galactosidase (β -gal), e mensuraram os níveis de TGF β -1, que estavam aumentados após a exposição graças a ativação (fosforilação) da p38.

SMITH, VISIOLI, HAGEN (2002) estudaram a necessidade de suplementação de vitamina C em cultura de células endoteliais de aorta humana. Trataram as células com 100 μ M de vitamina C, observando que a concentração intracelular máxima ocorre após seis horas de exposição. Este tratamento levaria a uma diminuição do estresse oxidativo, verificado pela mensuração dos níveis de glutathione, que estariam aumentados nos meios suplementados. Avaliaram os níveis de radicais livres produzidos pelo 2,7 diacetato diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), sendo significativamente maiores em meios privados de vitamina C. Os autores ainda trataram as células diariamente com 100 μ M de vitamina C durante sete dias, e quantificaram os níveis de 8-diidro-desoxiguanosina (8DOXIG), um marcador de dano oxidativo ao DNA, provocado pela reação entre o radical hidroxila e o núcleo de base guanina. As células tratadas com vitamina C exibiam níveis progressivamente menores de 8DOXIG, demonstrando um dano oxidativo menor. Assim, os autores concluíram que a suplementação de vitamina C ao meio de cultura de células endoteliais de aorta humana é criticamente importante para manter um meio de cultivo fisiologicamente adequado a estas células.

SUH, ZHU, FREI (2003) avaliaram o efeito pró-oxidante da vitamina C no plasma humano. A vitamina C endógena foi retirada do

plasma humano pela adição da enzima ascorbato oxidase, sendo depois suplementado ou não com ascorbato numa concentração que variou de 25 μ M a 1mM. Subseqüentemente as amostras foram suplementadas com sulfato ferroso de amônio ou sulfato cúprico, e expostas a concentrações diferentes de H₂O₂ (200 μ M a 1mM), sendo avaliado a peroxidação lipídica e protéica. Observaram que o ascorbato não aumentou, mas sim diminuiu a peroxidação lipídica e protéica mesmo após a adição dos íons metálicos e de H₂O₂. Concluíram que em condições fisiológicas do plasma humano, o ascorbato atua como um antioxidante.

KASHINO *et al.* (2003) estudaram o efeito do tratamento do sal de magnésio de ácido ascórbico 2-éster-fosfórico sobre células embrionárias humanas (HE49), fibroblastos dérmicos humanos e sobre fibroblastos de uma paciente do sexo feminino portadora da síndrome de Werner. Observaram uma redução do estresse oxidativo principalmente nas células embrionárias, com um aumento do tempo de vida replicativa, verificado pela diminuição da velocidade de encurtamento dos telômeros. Os autores concluíram que o estresse oxidativo teria uma função chave em determinar o tempo de vida replicativa, e que a supressão do estresse oxidativo pelos agentes antioxidantes estenderia este tempo pela redução da taxa de diminuição dos telômeros.

YUAN *et al.* (2003) estudaram a degeneração de tendões humanos relacionando o estresse oxidativo e apoptose. Utilizaram fibroblastos provenientes de tendões humanos, expondo-os ao H₂O₂ em concentrações que variavam de 50 μ M a 1mM por quatro horas, e analisaram a indução a apoptose. Observaram que ocorria um aumento do número de células mortas com o aumento da dosagem de H₂O₂, e que o número de células apoptóticas aumentavam com o tempo após a exposição ao H₂O₂, até um

máximo de 24 horas. Concluíram que, em fibroblastos provenientes de tendões, a apoptose devido à exposição ao H_2O_2 ocorria pela liberação do citocromo c pelas mitocôndrias e pela ativação da caspase 3.

KEIRA *et al.* (2004) em nosso meio descreveram a padronização da cultura primária de fibroblastos para pesquisas *in vitro*, assim como sua utilização e sua estocagem. Os fibroblastos foram adquiridos de material cutâneo através de fragmentos de pele descartados de procedimentos cirúrgicos.

SANTOS *et al.* (2004) avaliaram a ação antioxidante da vitamina C na lesão causada pela hipóxia em queratinócitos. O dano celular foi estudado através da medida da desidrogenase láctica (DHL) intra e extracelular e o estresse oxidativo através do MDA, que é um produto final da peroxidação lipídica. A incubação em ambiente de hipóxia ou normal foi por 30 minutos com ou sem 50 μ g/ml de vitamina C. Foram 40 garrafas, sendo os experimentos realizados em triplicata. O DHL e o MDA foram medidos imediatamente após o experimento, sendo coletada amostra do meio de cultura. A hipóxia aumentou o DHL e a vitamina C quando presente manteve os níveis de DHL similares aos do grupo controle, diminuindo a morte celular. A produção de radical livre foi detectada pela elevação do MDA no grupo submetido à hipóxia, e foi alterado pelo uso da vitamina C. Concluíram que a vitamina C foi capaz de diminuir o dano celular, mas não teve efeito em prevenir o estresse oxidativo causado pela hipóxia.

DUARTE, GRAGNANI, FERREIRA (2004) estudaram o potencial efeito protetor do antioxidante dimetilsulfóxido (DMSO) contra o estresse oxidativo em cultura de queratinócitos. Eles submeteram as garrafas a privação de glicose e a hipóxia por 30 minutos, sendo avaliado o MDA

como indicador do nível de estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que o DMSO em uma concentração a 2% é um agente protetor contra o estresse oxidativo em cultura de queratinócitos nas condições estudadas.

ZHANG *et al.* (2004) avaliaram a indução de apoptose em enterócitos de ratos submetidos a queimadura de 30% da superfície do corpo e com ressucitação volêmica tardia. Parte do corpo do animal foi mergulhada em água em ebulição por 12 segundos, e após seis horas iniciou-se a infusão de volume e a administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (2,5mM/Kg). Observaram um aumento na indução da apoptose nos enterócitos pelo estresse oxidativo na mucosa intestinal após a queimadura nos ratos. A N-acetilcisteína diminuiu a apoptose induzida pelos radicais livres que eram produzidos no processo de isquemia e perfusão devido ao atraso no início de administração de volume.

OHSHIMA (2006) analisou a formação de células senescentes após várias divisões celulares de fibroblastos humanos. A partir da vigésima passagem as células começaram a apresentar características de senescência replicativa (20%), verificado pela marcação da enzima Beta-galactosidase. Uma parte pequena destas células sofreu apoptose, o que sugere que a apoptose e a senescência estão ligadas, e que a apoptose estaria envolvida na morte de células senescentes.

ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT (2006) estabeleceram a senescência induzida pelo estresse (SPIE) após a exposição a uma concentração subtóxica de H₂O₂. Utilizaram fibroblastos imortalizados de pulmão fetal, e expondo-os a uma concentração de 150μM de H₂O₂ por duas horas obtiveram 48% de células senescentes, contra 18% para o controle, não exposto ao H₂O₂, identificadas pela marcação da enzima lisossomal beta-galactosidase (β-gal). Houve uma expressão aumentada de

TGF- β 1, o qual seria responsável pelo aparecimento de biomarcadores da senescência celular (morfologia de células senescentes, β -gal, e expressão aumentada de genes associados a senescência como fibronectina, osteonectina, SM22 e apolipoproteína J). O TGF- β 1 ainda seria o responsável por estresse oxidativo constante na célula, desencadeado pela produção aumentada de H_2O_2 por uma NADH presente na membrana plasmática.

RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER (2006) suplementaram células Jurkat com concentrações crescentes de dehidroascorbato (DHA), o qual é convertido a ácido ascórbico em ambiente intracelular, atingindo uma concentração máxima de $100\mu M$. Suplementaram posteriormente com $200\mu M$ de H_2O_2 , e mensuraram os níveis de 5-hidroxi-deoxicidina (5HDC) e 8-diidro-desoxiguanosina (8DOXIG), que são marcadores de danos ao DNA das células. Mesmo sem a suplementação de H_2O_2 os níveis de 5HDC e 8DOXIG se mostraram elevados, aumentando após a adição de H_2O_2 em uma concentração de $200\mu M$, concluindo que a vitamina C induziu dano ao DNA pelo estresse oxidativo em células Jurkat.

LOKE *et al.* (2006) estudaram a importância da vitamina C intracelular como antioxidante, evitando danos celulares pelos radicais livres. Monócitos foram expostos a $800\mu M$ de vitamina C por 3 horas, o meio foi trocado e substituído por outro indutor de estresse oxidativo. Observaram uma diminuição da produção de citocinas inflamatórias, protegendo as células do estresse oxidativo.

DREWA *et al.* (2008) expuseram cultura de fibroblastos e de queratinócitos a concentrações baixas (0,5%) de nitrato de prata ($AgNO_3$) por 3 e 12 horas, sendo analisadas pela marcação de anexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo. As concentrações de nitrato de prata foram 3 a 10 vezes menores que a utilizada na prática clínica. Observaram

que ambos os tipos celulares apresentavam aumento da taxa de apoptose, principalmente os queratinócitos, o que sugere que o nitrato de prata destruiria a camada mais externa da pele, prejudicando a cicatrização.

MULLER, LI, MAITZ (2009) expõem cultura de fibroblastos a piocianina, uma substância produzida por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, observaram que as células apresentavam uma parada do crescimento celular. Isso ocorreria graças às propriedades e capacidade da piocianina de produzir EROs, levando a um estado permanente de estresse oxidativo.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. DESENHO DA PESQUISA

O estudo experimental *in vitro* consistiu do cultivo de linhagem primária de fibroblastos dérmicos humanos provenientes de fragmentos de pele desprezados em atos operatórios de pacientes submetidos à postectomias realizadas no Hospital São Paulo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ao responsável pela criança (Apêndice 1). O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP sob o número 1215/07 (Apêndice 2).

4.2. PROCEDIMENTO

4.2.1. Cultivo de fibroblastos

Os fragmentos de pele desprezados em atos operatórios foram acondicionados, em tubos cônicos de 50ml contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) suplementado com penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Gibco – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), armazenadas a uma temperatura entre 3 a 8°C, e encaminhadas para posterior preparo no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica, sendo manipulados nas 6 horas subseqüentes.

A cultura foi iniciada pela técnica de explante (GREEN & GOLDBERG, 1963; GREEN & GOLDBERG 1964; CRAIG,

SCHOFIELD e JACKSON, 1975; RUSSELL & WITT, 1976). Os fragmentos de pele foram processados em ambiente estéril, numa capela de fluxo laminar, com pinça e tesoura, havendo uma separação do tecido subcutâneo da pele. Cerca de 10 fragmentos de pele, de aproximadamente 5mm² cada, foram dispostos em espaços equidistantes em uma placa de Petri de 100mm², cuja superfície interna foi marcada com ranhuras produzidas por uma lamina de bisturi. As placas com os fragmentos foram mantidas abertas dentro deste ambiente por cerca de 40 minutos para que os mesmos secassem e se fixassem na placa. Após este período, acrescentou-se 10ml de meio próprio para cultivo de fibroblastos, constituído de DMEM, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (100UI de penicillina por ml e 100µg de estreptomicina por ml) (Gibco – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas numa mistura gasosa de Dióxido de Carbono a 5%, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias. Entre o 5º e 7º dia foi observado a migração de fibroblastos sobre a placa, atingindo a confluência por volta do 15º dia.

4.2.2. Subcultivo de Fibroblastos

O subcultivo ou passagem foi realizado quando os fibroblastos atingiam uma confluência próxima a 80%. Este procedimento permitiu recolher as células e as distribuir em outros recipientes, a fim de proliferarem e serem utilizadas nos experimentos. Também foi criado um banco de fibroblastos dérmicos humanos, com várias linhagens celulares provenientes de diferentes doadores, para posterior utilização em projetos.

Esse banco foi inicialmente montado com 20 doadores. No presente experimento foi utilizada uma linhagem específica, sendo os experimentos realizados em triplicata.

O meio foi aspirado com Pipeta Pasteur, e os fragmentos de pele foram retirados cuidadosamente com o auxílio de pinças. A placa foi lavada duas vezes com 10ml de PBS e 2ml de uma solução de Tripsina 0,25% e EDTA 0,02% (Gibco – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionados a placa, sendo mantida na incubadora por 2 a 3 minutos. A placa foi levada ao microscópio óptico invertido a fim de se observar o desprendimento dos fibroblastos da placa. Confirmado isso, 4ml de meio de cultura foram adicionados à placa para neutralizar a tripsina.

Esta suspensão de células foi transferida para um tubo cônico de 15ml e centrifugada (80 x g) por 6 minutos. O sobrenadante foi aspirado e as células concentradas ao fundo foram suspensas em 10ml de meio de cultura para fibroblasto. Estas células foram distribuídas em garrafas de 75cm², mantidas em incubadora até a pré-confluência das células na garrafa. Durante este período o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Com a pré-confluência, foram realizadas novas passagens dos fibroblastos para novas garrafas. Ao atingirem a quarta passagem, as células foram utilizadas nos procedimentos ou congeladas em nitrogênio líquido para utilização posterior. Apenas células entre a quarta e a nona passagem foram utilizadas nos experimentos.

Os fibroblastos cultivados foram divididos em seis grupos: **grupo Controle, grupo Vitamina C (-), grupo vitamina C (+), grupo H₂O₂, grupo Vitamina C (+) e H₂O₂, e grupo Vitamina C (-) e H₂O₂.**

No grupo **controle** utilizou-se apenas o meio para fibroblastos. No grupo **Vitamina C (-)** o meio de cultura para fibroblastos apresentava uma concentração de 100µM de Vitamina C (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA), sendo as células expostas a esta concentração por seis horas. Após, o meio foi aspirado, a garrafa lavada com DMEM e substituído por meio para fibroblastos. No grupo **Vitamina C (+)**, após a exposição a uma concentração de 100µM de vitamina C no meio de cultura para fibroblastos por seis horas, e sua aspiração e lavagem com DMEM como no grupo anterior, mas diferentemente daquele, as células foram expostas por mais duas horas a mesma concentração de vitamina C no meio, sendo depois novamente aspirado, lavado com DMEM e substituído por meio de cultura de fibroblastos. No grupo **H₂O₂** o meio de cultura para fibroblastos apresentava uma concentração de 150µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo as células expostas a este meio 2 horas. Após, o meio foi aspirado, a garrafa lavada com DMEM e substituído por meio para fibroblastos. O grupo **Vitamina C (-) e H₂O₂** foi tratado inicialmente de maneira idêntica ao grupo Vitamina C (-), porém, após a lavagem com DMEM foi adicionado um meio de cultura para fibroblastos que apresentava uma concentração de 150µM de H₂O₂, sendo lavado e trocado novamente por meio de fibroblastos após duas horas. O grupo **Vitamina C (+) e H₂O₂** foi tratado com vitamina C por 6 horas, e após a lavagem com DMEM foi adicionado um meio de cultura para fibroblastos que apresentava uma concentração de 150µM de H₂O₂ e 100µM de vitamina C, sendo lavado e trocado novamente por meio de fibroblastos após duas horas. As garrafas dos grupos descritos permaneceram em incubadora úmida a 37°C, com CO₂ a 5%.

A disposição dos experimentos e sua sequência de exposição à vitamina C e/ou ao H₂O₂ estão demonstradas nos quadros 1 e 2.

Quadro 1. Sequência temporal da exposição à vitamina C e/ou ao H₂O₂ em cada grupo.

	Vitamina C*	Vitamina C	H ₂ O ₂
GRUPOS/ TEMPO	6h	2h	
Controle	NÃO	NÃO	NÃO
Vitamina C (+)	SIM	SIM	NÃO
Vitamina C (-)	SIM	NÃO	NÃO
H₂O₂	NÃO	NÃO	SIM
H₂O₂ Vit C (+) **	SIM	SIM	SIM
H₂O₂ Vit C (-)	SIM	NÃO	SIM

* Após a aplicação de vitamina C por 6 horas, houve troca do meio e exposição às drogas seguintes (vitamina C e/ou H₂O₂)

** Aplicação concomitante de vitamina C e H₂O₂ por 2 horas

Quadro 2. Sequência temporal da análise dos experimentos

	0h	6h	24h	48h	72h
	Término da exposição ao H ₂ O ₂ e/ou Vit C				
MTT			1ª Aval	2ª Aval	3ª Aval
Senescência			Distribuição em placas de 24 poços		Aplicação do Kit Senescência
Apoptose			Citometria		
Radicais Livres		Citometria			

4.2.3. Proliferação celular pelo MTT

A proliferação celular foi avaliada utilizando o MTT (*method of transcriptional and translational*), previamente descrito por MOSMANN (1983). Este método é baseado na conversão do sal amarelo tetrazólico do MTT em cristais de formazan, que têm coloração púrpura e são insolúveis na água. Esta conversão ocorre no interior das mitocôndrias, logo, somente

em células viáveis, sendo estes cristais solúveis em solução de álcool isopropanolol acidificada. Esta solução com os cristais dissolvidos pode ser analisada em um espectrofotômetro.

As células de cada grupo foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços. Foram distribuídas $2,5 \times 10^3$ células por poço contendo 100 μ l de meio para fibroblastos e mantidas em incubadora úmida a 37°C, com CO₂ a 5%, por 24 horas. As células foram estimuladas conforme descrito anteriormente e 24 horas depois, 10 μ l do reagente MTT (0,5mg/ml) foi adicionado aos poços de cada grupo incubado por 4 horas a 37°C. A seguir, o conteúdo foi aspirado e 100 μ l da solução 0,04M de HCl em isopropanol foram adicionados e mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente.

A leitura por espectrofotometria foi feita utilizando o leitor de microplacas para teste de ELISA (Anthos 2010, Anthos Labtec Instruments[®], Wals/Salzburg, Austria) calibrado em 590nm. O mesmo procedimento foi realizado diariamente por sete dias, obtendo uma curva de proliferação.

4.2.4. Senescência Celular

Para a avaliação da senescência foi utilizado o *Senescence Detection Kit* (Cat -JM-K320-250, MBL[®] Int Corp., MA, EUA), para marcação e identificação da enzima beta-galactosidase. Este kit marca as células senescentes em azul, sendo identificadas na microscopia óptica com aumento de 200 vezes.

As células foram colocadas em garrafas de 25cm² e quando atingiram uma confluência de 70-80%, foram expostas a vitamina C e ao H₂O₂ conforme descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após o término

da exposição ao H₂O₂, as células foram tripsinizadas e distribuídas em placas de 24 poços, em uma concentração de 5000 células por poço. O kit para detecção da senescência foi aplicado 48 horas após essa distribuição, ou seja, 72 horas após o término do estresse oxidativo provocado pela exposição ao peróxido de hidrogênio, conforme descrito por ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT (2006). A população de células positivas para a enzima beta-galactosidase foi determinada pela contagem de 300 células por poço. A porcentagem de células positivas para a enzima beta-galactosidase foi dada pelo número total de células contadas em cada poço.

4.2.5. Citometria de Fluxo

Apoptose

Para a avaliação da apoptose das células foi utilizado o Iodeto de Propídeo (PI) e a Anexina V conjugada a FITC (AV) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, EUA) (NICOLETTI *et al.*, 1991; VERMES *et al.*, 1995). Este método se baseia na detecção da exposição da fosfatidilserina na parte externa da membrana celular nos estágios iniciais da apoptose. A AV se liga à fosfatidilserina de uma maneira irreversível, podendo ser identificada.

A exposição da fosfatidilserina na superfície celular é uma das características mais comuns em células apoptóticas. O anticorpo anexina V-fluoresceína se liga a este fosfolípido. Em conjunto com este anticorpo utiliza-se o PI, que não penetra pela membrana plasmática de células vivas, ou células que entraram no processo precoce de apoptose. Células necróticas incorporam PI ao seu núcleo.

Os fibroblastos de todos os grupos foram avaliados por citometria de fluxo 24 horas depois do estímulo pelo H₂O₂ dos grupos que assim o receberam e também os que não receberam.

Para realização desse experimento, as células foram tripsinizadas e suspensas em PBS, sendo centrifugadas (80 x g) por 6 minutos. As células foram distribuídas em quatro tubos contendo 250.000 células/ml em 1ml do tampão para anexina, (kit de anexina V - BD Pharmingen, San Jose/CA/USA) conforme orientação do fabricante.

No primeiro tubo permaneceram somente as células, sem marcação, no segundo tubo as células foram marcadas com 5µl de Anexina V (FITC), no terceiro tubo as células foram marcadas com 10µl de PI, e no quarto tubo as células foram marcadas com 5µl de Anexina V (FITC) e 10µl de PI. Esses volumes dos marcadores foram determinados inicialmente para os fibroblastos dessa linhagem específica através de várias combinações de volumes sugeridas pelo fabricante em associação com os resultados da população adquirida para cada marcador isolado e em associação, descartando-se a marcação de fundo.

Após a marcação as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 300µl do tampão para anexina e levados para a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur com 4 canais. A aquisição e análise dos dados foi feita utilizando-se o programa CELL QUEST.

Produção de Radicais livres

Para a detecção da produção de radicais livres foi utilizado o Diacetato Diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

O DCFH-DA é oxidado pelo peróxido de hidrogênio transformando-se em diclorofluoresceína (DCFH), passando a ser fluorescente e polar, o que permite atravessar a membrana da célula (ROBINSON *et al.*, 1988). Por citometria de fluxo essa fluorescência emitida no comprimento de luz verde, possibilita a análise individual de cada célula positivamente reativa aos radicais livres.

Os fibroblastos foram semeados em garrafas de 75cm², nos grupos descritos anteriormente. Após a aplicação da vitamina C ou do H₂O₂, ou de ambos, as garrafas foram lavadas com PBS duas vezes, tripsinizadas, centrifugadas (80 x g) por 6 minutos, e então foram suspensas em 800µl de PBS.

Para utilizar o DCFH-DA, uma solução estoque de 25mM foi mantida congelada a -20° C, protegida da luz, utilizando-se como solvente álcool absoluto (etanol). No momento da utilização, esta solução foi descongelada, e 25µl foram diluídos em 2,05ml de PBS, criando-se uma solução final de DCFH-DA. No momento do uso, 200µl desta solução final foram adicionados a cada grupo (volume final de 1000µl), incubando-se protegido da luz e a uma temperatura de 37° C por 30 minutos, e levadas para a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur. A leitura dos dados foi realizada no programa CELL QUEST.

4.2.6. Método Estatístico

A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de **ANOVA** para variáveis ou para comparações em três ou mais grupos, aplicando-se o teste de **Tukey** para comparação das médias. A significância estatística foi dada para $p < 0,05$.

Nos gráficos, quando houve uma diferença significativa entre os grupos, foi assinalado com um asterisco (*).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

5.1.1. MTT

A média do percentual da intensidade de densidade óptica no decorrer do tempo medida pelo MTT em todos os grupos apresenta-se na figura 1, demonstrando dois padrões de curvas de crescimento, um formado pelos grupos em que houve a exposição ao H₂O₂, e outro em que não houve esta exposição.

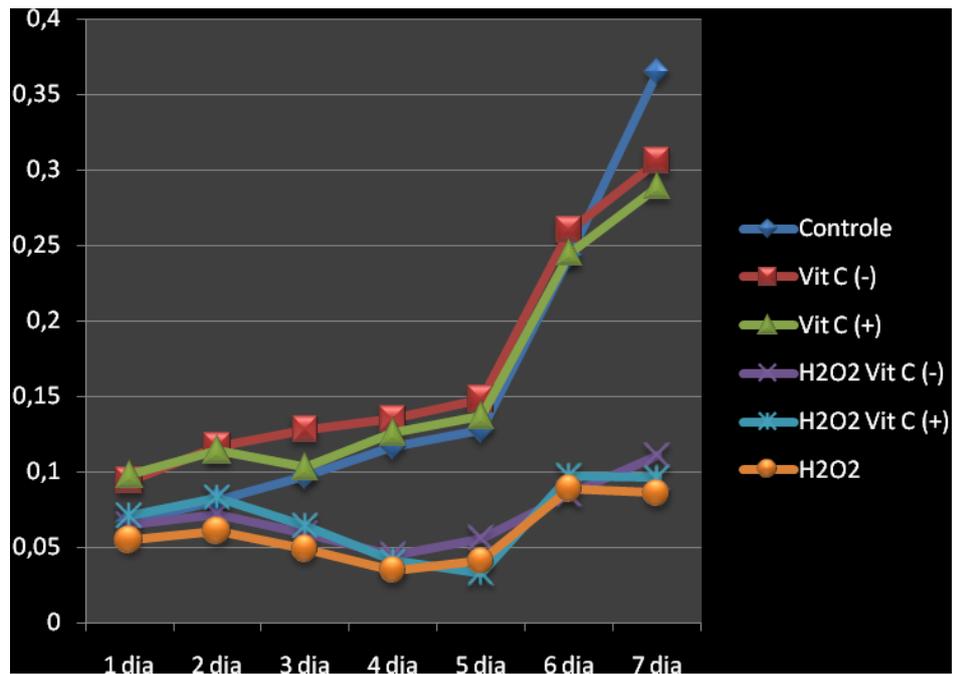


Figura 1. Variação da intensidade de densidade óptica pelo MTT no decorrer do tempo por grupo.

5.2. SENESCÊNCIA

A figura 2 demonstra a média da percentagem de população celular senescente nos diferentes grupos.

O grupo **Controle** apresentou diferença estatística com relação a todos os grupos, exceto os grupos **Vitamina C (+)** e **Vitamina C (-)**.

O grupo H_2O_2 somente não apresentou diferença estatística com o grupo **Vitamina C (+) H_2O_2** .

Os grupos **Vitamina C (+)** e **Vitamina C (-)** tiveram comportamento semelhante, com diferenças estatísticas com os grupos **Controle**, **Vitamina C (+) H_2O_2** e **Vitamina C (-) H_2O_2** . Não houve diferença estatística entre os dois grupos.

Os grupos **Vitamina C (+) H₂O₂** e **Vitamina C (-) H₂O₂** não apresentaram diferença estatística entre si, porém o primeiro não teve diferença estatística com o grupo **H₂O₂**, enquanto o grupo **Vitamina C (-) H₂O₂** apresentou diferença.

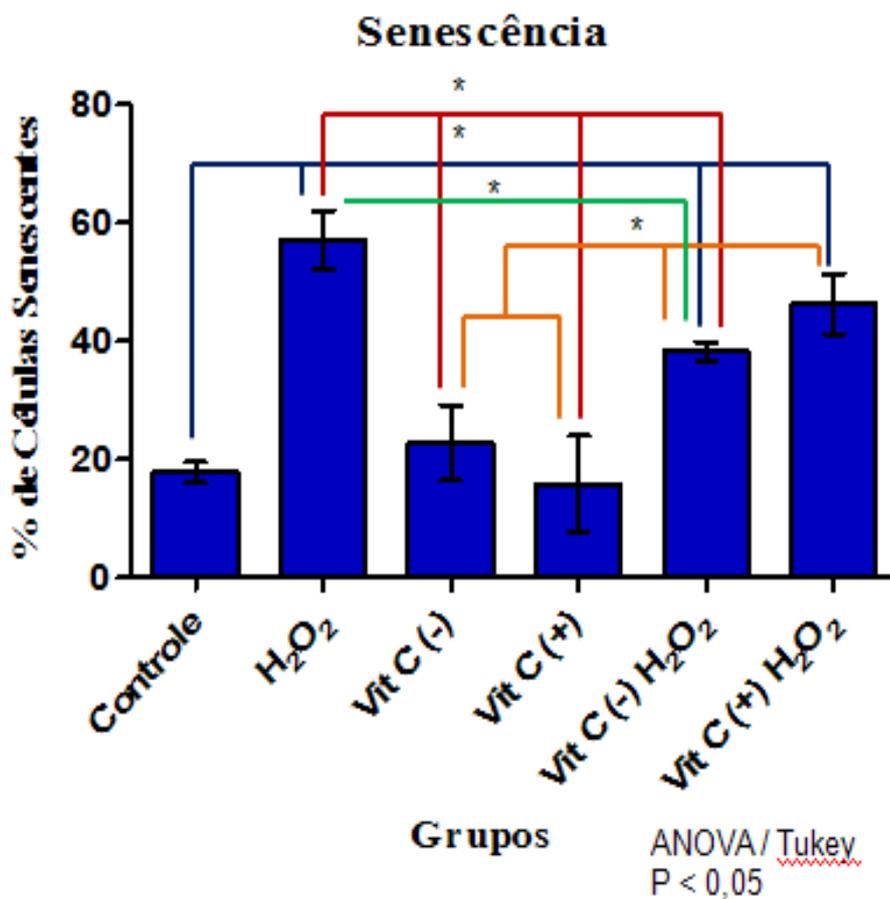


Figura 2. Médias da percentagem de fibroblastos senescentes por grupo assinalando-se a diferença estatística entre os mesmos.

5.3. APOPTOSE

Na figura 3 observa-se a média do percentual de células positivas para Anexina e negativas para o Iodeto de Propídeo em cada um dos grupos estudados. Houve diferença significativa somente entre o grupo Controle e os demais grupos.

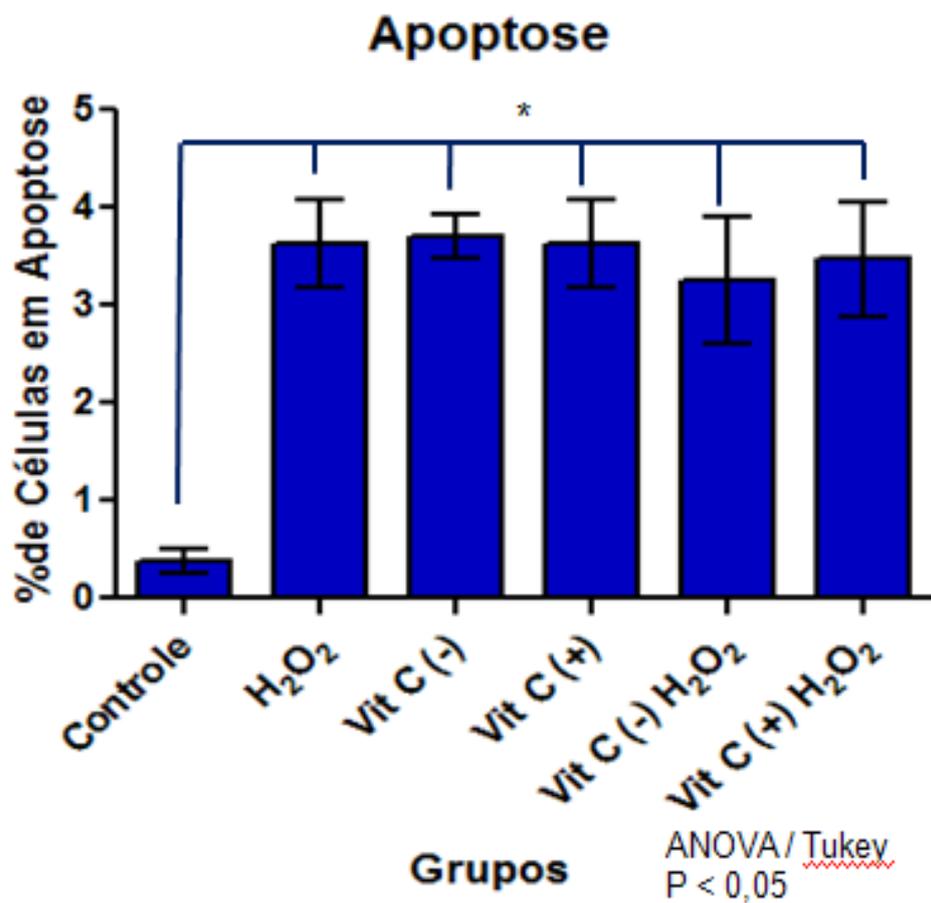


Figura 3. Média do percentual de células positivas para Anexina e negativas para PI por grupo, havendo diferença estatística somente entre o grupo Controle e os demais grupos.

5.4. PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Na figura 4 observam-se os valores médios da intensidade de fluorescência obtidos na citometria de fluxo nos diferentes grupos. Só houve diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos.

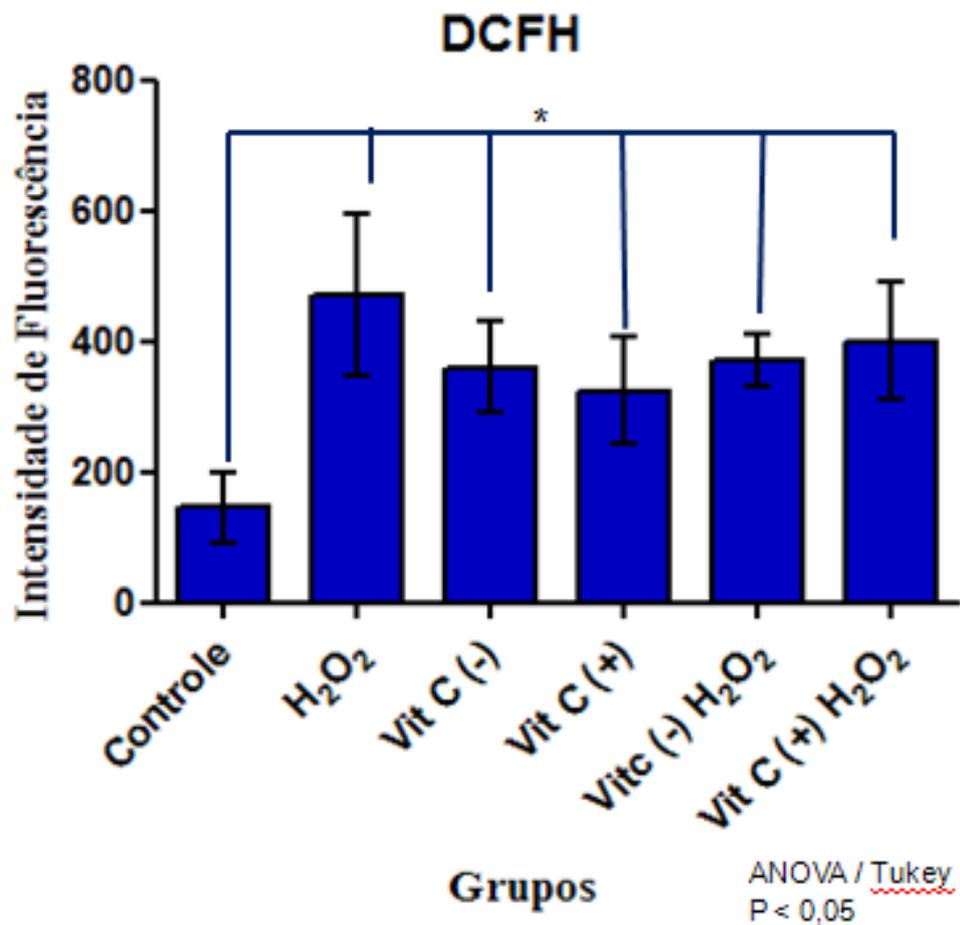


Figura 4. Média dos valores da intensidade de fluorescência, unidades arbitrárias, por grupo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As células do corpo humano estão frequentemente expostas às ações dos EROs, que são provenientes de várias origens, tanto externas como internas, sendo a última oriunda principalmente do metabolismo do organismo. Assim, a produção de EROs e sua conseqüente reação com as várias moléculas do organismo como proteínas, lipídios e o DNA ocorre de uma maneira inevitável nos organismos aeróbios. Em baixas concentrações, os EROs desempenham importantes funções fisiológicas como a sinalização celular (POLI *et al.*, 2004), enquanto que grandes concentrações de EROs apresentam um efeito danoso às células, levando ao denominado estresse oxidativo, danificando estruturas moleculares como proteínas, lipídios e DNA (STADTMAN, 2004; VALKO *et al.*, 2006). Este aumento de EROS está relacionado com o desenvolvimento de inúmeras doenças, como a aterosclerose, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas (EVANS, DIZDAROGLU e COOKE, 2004; AMES, SHIGENAGA, HAGEN, 1993), além do envelhecimento (STADTMAN, 2004).

Pacientes grandes queimados apresentam uma grande produção de radicais livres, tendo um índice maior de mortalidade quando há atraso na reposição volêmica, havendo um estado de choque e lesão da mucosa intestinal pelo processo de isquemia, com translocação bacteriana e passagem de endotoxinas, levando a sepse e conseqüente síndrome de disfunção múltipla de órgãos (ZHANG *et al.*, 2004). A produção de EROs

estaria aumentada na mucosa intestinal afetada pelo atraso na reposição volêmica, o que lesaria a mucosa e levaria a apoptose das células (YANG, SHENG, GUO, 1997; BERTIN-MAGHIT *et al.*, 2000). Dessa forma, o estresse oxidativo tem uma importante função na fisiopatologia do trauma térmico. BERTIN-MAGHIT *et al.* (2000), observaram que nestes pacientes há uma grande produção de radicais livres, devido principalmente a peroxidação lipídica, e uma diminuição da concentração sanguínea de antioxidantes como as vitaminas C e E.

Um dos procedimentos para se evitar infecções nas áreas queimadas, e que seria responsável por um prolongado período de cicatrização, e conseqüente formação de uma cicatriz hipertrófica, é o uso de curativos com AgNO₃ a 0,5%, que são utilizados para se evitar a infecção principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, o AgNO₃ apresenta um efeito citotóxico nas células do ferimento, desencadeando um atraso no processo de cicatrização e aumento do risco de cicatriz hipertrófica (COOPER, LAXER e HANSBROUGH, 1991).

DREWA, SZMYTKOWSKA, CHABERSKI (2007) demonstraram a citotoxicidade do AgNO₃ expondo fibroblastos murinos a baixas concentrações desta droga por curtos períodos de tempo (3 e 12 horas), verificando a viabilidade celular pela coloração com *Trypan Blue*. Posteriormente observaram que concentrações 3 a 10 vezes menores daquela utilizada na prática clínica, induziam os fibroblastos e principalmente os queratinócitos a apoptose (DREWA *et al.*, 2008).

Além disso, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sintetizam e liberam para o meio a piocianina, substância que leva a uma parada permanente da proliferação celular e a apresentar características de células senescentes, tanto na morfologia e na expressão gênica, como a síntese da enzima Beta-

galactosidase. O mecanismo pelo qual a piocianina leva a senescência celular é devido a suas propriedades de reduzir moléculas de oxigênio a EROs, que produzem um baixo nível, mas persistente, de estresse oxidativo (MULLER, LI e MAITZ, 2009).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente solúvel em água necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno (DARR, COMBS, PINNEL, 1993), e é um importante antioxidante no plasma humano, eliminando radicais livres e protegendo contra a peroxidação lipídica (FREI, STOCKER, AMES, 1988). Ele é amplamente distribuído em todos os tecidos do corpo, e recicla outros antioxidantes como a vitamina E e a Glutathione (HALLIWELL, 2001). Ascorbato, a forma predominante da vitamina C no pH fisiológico, é um eficiente doador de elétrons em muitas reações biológicas, capazes de substituir moléculas altamente reativas e danosas, pelo radical livre ascorbato (RLA) (DUARTE, ALMEIDA, JONES, 2007). O ascorbato (A) rapidamente passa por duas consecutivas reações reversíveis de perda de elétrons, gerando inicialmente o RLA, e após nova perda de elétron, o dehidroascorbato (DHA). O RLA é um radical livre pouco reativo, com um potencial de redução baixo em relação a outros radicais livres, o que torna o ascorbato um eficiente doador de elétrons, neutralizando a ação de radicais livres de maior reatividade por um de menor intensidade (DUARTE & LUNEC, 2005).

Porém, essa função protetora da vitamina C contra o estresse oxidativo, anulando os efeitos deletérios dos radicais livres, é ainda um assunto muito controverso na literatura. De um lado há trabalhos que demonstram um efeito protetor da suplementação da vitamina C (CARR & FREI, 1999; PONEC *et al.*, 1997), e que sua ausência levaria a um aumento

do estresse oxidativo (SMITH, VISIOLI, HAGEN, 2002). De outro lado, há trabalhos que sugerem um efeito pró-oxidante da vitamina C, levando a danos no DNA nuclear (SINGH, 1997; DUARTE & LUNEC, 2005; RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER, 2006; DUARTE, ALMEIDA, JONES, 2007).

SUH, ZHU, FREI (2003) demonstraram que no plasma humano vitamina C não age como um pró-oxidante, mas sim como um antioxidante mesmo com a suplementação do meio com íons Fe^{2+} e H_2O_2 , prevenindo a peroxidação lipídica e não promovendo a oxidação protéica.

O mecanismo de dano ao DNA induzido pela vitamina C e pelo H_2O_2 provavelmente envolve a reação dos íons Fe^{2+} ou Cu^+ com o H_2O_2 (HENLE & LINN, 1997), levando a formação de radicais hidroxilas que parece estar relacionada diretamente com o mecanismo de dano ao DNA. BARBOUTI *et al.* (2007), utilizando quelantes metálicos, demonstraram que o íon intracelular Ferro contribui mais com o dano oxidativo ao DNA que o íon Cobre.

RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER (2006), em um estudo com células Jurkat, expuseram as células ao H_2O_2 , gerando radicais hidroxilas ao reagir com o Fe^{2+} do meio, e a tert-butil-hidroxiperóxido, substância que produz radicais alcóxilas (radicais alcalinos ligados ao oxigênio). Observaram que somente os radicais hidroxila, gerados pelo H_2O_2 produziam dano ao DNA.

A concentração de $100\mu\text{M}$ de vitamina C utilizada foi escolhida baseando-se em trabalhos na literatura (DUARTE, ALMEIDA, JONES, 2007; DUARTE & JONES, 2007; SINGH, 1997; SMITH, VISIOLI, HAGEN, 2002). Outros autores utilizaram concentrações em outros tipos de experimentos, como PONEC *et al.*, 1997: $250\mu\text{M}$; SUH, ZHU, FREI

2003, 25 μ M – 1mM; SANTOS, *et al.*, 2004, 250 μ M; RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER, 2006, 2000 μ M.

Logo, a concentração utilizada segundo a literatura é bastante variável, e muitos autores utilizaram concentrações variáveis na busca do efeito mais adequado. Utilizamos a dosagem de 100 μ M, pois é a que mais se aproxima a concentração fisiológica do plasma sanguíneo de 80 μ M (RODRIGO, GUICHARD e CHARLES, 2007).

DUARTE, ALMEIDA, JONES (2007) demonstraram que concentrações maiores que 100 μ M de ácido ascórbico levam ao dano do DNA de uma maneira concentração dependente. Além disso, o ascorbato de sódio em concentrações de 25 a 100 μ M causam danos ao DNA de fibroblastos e linfócitos (SINGH, 1997).

O tempo de exposição das células à vitamina C foi de seis horas, pois após este período, as células expostas a uma concentração de 100 μ M de vitamina C, atingem sua concentração máxima (SMITH, VISIOLI, HAGEN, 2002; DUARTE, ALMEIDA, JONES, 2007). Com estas informações, neste trabalho foi construído um modelo de estudo para se avaliar a ação da vitamina C quando em sua concentração intracelular máxima e em sua concentração extracelular fisiológica.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma molécula intermediária produzida durante a defesa enzimática antioxidante das células. Surge pela ação de enzimas superóxido-dismutases, sendo convertida em água pelas glutathione-peroxidase e catalases (BLADIER, WOLVETANG, HUTCHINSON, 1997). Atravessa facilmente todas as membranas celulares (BAYIR, 2005), se difundindo por todos os compartimentos, causando efeitos danosos às células. É uma molécula pouco reativa, porém na presença de íons metálicos de transição ele pode ser convertido a moléculas

altamente reativas, os radicais hidroxila (HALLIWELL, CLEMENT, LONG, 2000). Tal reação entre o H_2O_2 e íons metálicos, geralmente ferro ou cobre produzindo radicais hidroxila é denominada reação de Fenton. Dentre os RL que causam danos ao DNA, os radicais hidroxila parecem ser os principais causadores de danos (HENLE & LINN, 1997). Assim, as mutações induzidas pelo H_2O_2 são uma consequência direta dos radicais livres gerados após a sua decomposição (TERMINI, 2000).

Os experimentos foram realizados quando os fibroblastos atingiram uma confluência de 80%, facilmente observada pela existência de poucos espaços não ocupados pelos fibroblastos, evitando-se o estado de pós-confluência para que não ocorresse uma marcação falso-positiva para a enzima β -gal, identificadora de células senescentes. Apesar desta enzima ser utilizada como marcador da senescência celular, ela se torna presente também em cultura de células pós-confluentes, ainda não senescentes (DIMRI *et al.*, 1995 ; FRIPPIAT *et al.*, 2001; FRIPPIAT *et al.*, 2002 ; ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT, 2006). Ainda, cultura com baixa confluência também apresentam um número aumentado de células marcadas com a enzima β -gal (SEVERINO *et al.*, 2000).

DUARTE, ALMEIDA, JONES (2007) descrevem a necessidade de se utilizar a cultura próxima a confluência, quanto utilizado concentrações fisiológicas de vitamina C, menor ou igual a $100\mu M$. Uma cultura pouco confluenta sofreria uma ação maior dos radicais livres, levando ao destacamento das células e necrose.

Para a avaliação da proliferação celular foi utilizado o MTT, previamente descrito por MOSMANN (1983). O sal tetrazólio penetra nas células e é metabolizado na mitocôndria, portanto, somente em células

viáveis. O produto metabolizado apresenta coloração púrpura, cuja intensidade pode ser mensurada em um espectrofotômetro.

No estudo podemos observar dois padrões de curvas: um que compreende os grupos em que o meio foi suplementado com o H_2O_2 , e outro que compreende os grupos em que não foi adicionado o H_2O_2 (figura 1). Podemos observar que independente da suplementação da vitamina C, os grupos expostos ao H_2O_2 tiveram crescimento semelhante, sugerindo não haver uma ação antioxidante pela vitamina C.

DUARTE, ALMEIDA, JONES (2007) analisaram pelo MTT a ação da vitamina C na mesma concentração utilizada neste estudo, porém não como uma curva de crescimento, somente 24 horas após a suplementação da vitamina C, tendo resultado semelhante na análise de 24 horas obtida nesta trabalho.

A coloração da enzima beta-galactosidase foi utilizada como forma de identificação de células senescentes, como em estudos prévios (ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT, 2006; DUMONT *et al.*, 2000; FRIPPIAT *et al.*, 2000; FRIPPIAT *et al.*, 2001; FRIPPIAT *et al.*, 2002; SEVERINO *et al.*, 2000).

Como resultados, obtivemos 19% de células senescentes no grupo controle, e 58% no grupo exposto ao H_2O_2 . ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT (2006) obteve 18% de células senescentes no controle, e 48% no grupo H_2O_2 ; FRIPPIAT *et al.* (2001), obteve 15% e 55% respectivamente.

O grupo exposto ao H_2O_2 , mas que apresentava a vitamina C somente intracelular teve diferença estatística quando comparado ao grupo

H₂O₂, demonstrando um possível efeito protetor contra o estresse oxidativo da vitamina C em sua forma intracelular.

SMITH, VISIOLI, HAGEN (2002) avaliando somente a vitamina C intracelular, observaram um aumento do estresse oxidativo nas células privadas da vitamina C.

Para a avaliação da indução a apoptose dos fibroblastos foi utilizada a marcação com a Anexina V (AV) e o Iodeto de Propídeo (PI) e análise pela citometria de fluxo, como descrito por NICOLETTI *et al.* (1991) e VERMES *et al.* (1995). A escolha desta combinação de marcadores se baseia no fato de que a AV possui alta afinidade pela fosfatidilserina, uma proteína intranuclear que no momento de lesão celular irreversível se torna um marcador de superfície da célula. Isto ocorre tanto nos estágios iniciais da apoptose quanto nas células em necrose. A diferença entre estes dois processos é que na apoptose, a membrana celular se mantém intacta, enquanto na necrose ocorre a perda da integridade da membrana celular e esta se torna permeável, sendo possível a coloração do DNA nuclear pelo PI.

O PI foi utilizado para verificar a integridade da membrana plasmática no ensaio da apoptose com AV. Ele é um corante vital fluorescente que marca o DNA e não a membrana plasmática de células viáveis ou nos estágios iniciais da apoptose, pois nestas células a integridade da membrana plasmática é mantida. Nos estágios finais da apoptose ou de células não viáveis, a membrana plasmática se torna permeável, permitindo assim, a entrada do PI nestas células. A AV se liga a fosfatidilserina das células nos estágios iniciais da apoptose e continua ligada até a morte da célula. Assim, na avaliação da citometria de fluxo, as células positivas para Anexina V são consideradas células em apoptose, as

positivas tanto para Anexina V e quanto para Iodeto de Propídeo são células em necrose, e as que são negativas para ambos são células viáveis.

Neste estudo houve somente diferença estatística entre o grupo controle e todos os demais, demonstrando haver uma indução a apoptose mesmo nos grupos em que não houve exposição ao H_2O_2 . Duarte et AL (DUARTE, ALMEIDA, JONES, 2007; DUARTE & JONES, 2007), descrevem a auto-oxidação da vitamina C *in vitro*, em que há a produção final de H_2O_2 , o qual levaria ao estresse oxidativo. SINGH (1997) descreve aumento das lesões ao DNA do núcleo devido ao H_2O_2 produzido pela vitamina C. DUARTE, ALMEIDA, JONES (2007) e RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER (2006) descrevem o aumento do estresse oxidativo quando a vitamina C e o H_2O_2 estão juntos no meio. SANE *et al.* (2004) realizaram um estudo com células Jurkat indicando que o ascorbato aumenta a morte celular de uma maneira sinérgica com o H_2O_2 gerando mais EROs

Por meio da detecção da fluorescência do DCFH foi possível demonstrar aumento do estresse oxidativo entre todos os grupos, principalmente no exposto somente ao H_2O_2 , porém, sem diferença estatística, havendo somente diferença entre o grupo controle e os demais.

A senescência celular limita a vida reprodutiva de uma cultura de células. Durante a divisão celular, parte do DNA telomérico é perdido, e este é considerado o principal mecanismo limitador da capacidade de proliferação celular, pois telômeros criticamente curtos ativam o processo de senescência celular. Tal tipo de senescência celular é denominada de senescência replicativa, ocorrendo após um determinado número de divisões celulares (SHAY & WRIGHT, 2000). Entretanto, a senescência celular pode ser induzida por substâncias que provocam danos ao DNA

(CHEN & AMES, 1994; DUMONT *et al.*, 2000), e fatores que estimulam a expressão oncogenes (FRIPPIAT *et al.*, 2000). Esta forma de senescência celular, não induzida pelo encurtamento dos telômeros, é denominada de senescência prematura induzida pelo estresse oxidativo (SPIE) (ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT, 2006; ISHIKAWA, 2006), surgindo alguns dias após uma única ou repetida exposição a uma concentração subcitotóxica de H₂O₂ (FRIPPIAT *et al.* 2000; CHEN & AMES, 1994), hidroperóxido (DUMONT *et al.*, 2000), ou radiação UVB (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2004). As células em SPIE desenvolvem várias características de células em senescência replicativa como uma morfologia típica, com células achatadas e aumento do núcleo, enzima β -gal, além da mudança na expressão de vários genes, com rápida diminuição da síntese do DNA, e um estado irreversível de parada da proliferação celular (DUMONT *et al.* 2000). RICHTER & VON ZGLINICKI (2007) demonstraram que o estresse oxidativo aumenta a taxa de encurtamento dos telômeros, levando-os mais rapidamente à denominada senescência replicativa.

Não está claro o motivo pelo qual algumas células podem se recuperar da agressão pelo estresse oxidativo e entrar novamente no ciclo celular, enquanto outras não recuperam mais a capacidade proliferativa, entrando num estado de senescência celular definitivo, e por último, células que sofrem apoptose. Uma possibilidade pode ser a heterogeneidade do dano causado no DNA pela exposição ao H₂O₂. Um fator determinante conhecido é o tipo celular, sabendo-se que fibroblastos tendem a desenvolver mais o processo de senescência celular, enquanto leucócitos tendem a apresentar apoptose (CAMPISI & FAGAGNA, 2007). A natureza e a intensidade do dano também parecem ser importantes (REBBAA *et al.*,

2003; MARTINDALE & HOLBROOK 2002), porém a maioria das células são capazes de ambos.

A concentração de H_2O_2 , $150\mu M$, foi baseada a partir de trabalhos prévios (ZDANOVE, REMACLE, TOUSSAINT, 2006; FRIPPIAT *et al.*, 2001), e utilizada tanto para a indução a senescência como para a apoptose. YUAN *et al.* (2003), utilizou uma concentração de $50\mu M$ de H_2O_2 por 4 horas para induzir fibroblastos de tendão a apoptose, atingindo uma maior média de células em apoptose.

HAMPTON & ORRENIUS (1997) e KIM, CHO, UM (2000) referem que o mecanismo de indução a apoptose pelo H_2O_2 ocorre por uma via diferente da ativação das caspases, não por sua ativação.

O dano causado ao DNA pelo estresse oxidativo muda de intensidade dependendo do tipo celular. As células Jurkat parecem ser seis vezes mais sensíveis do que células HL-60 ao dano ao DNA provocado pela associação de H_2O_2 e ascorbato. O motivo para tal diferença de resposta entre dois tipos celulares parece ser a concentração intracelular de mecanismos antioxidantes (RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER, 2006), como a glutathiona, cuja concentração intracelular é menor daquela encontrada em células HL-60 (SANE *et al.*, 2004). Células cancerosas parecem ser mais sensíveis aos efeitos tóxicos do H_2O_2 do que células normais, possibilitando um potencial tratamento para o câncer o uso de vitamina C (CHEN *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos neste estudo abrem perspectivas para novos projetos relacionados ao estresse oxidativo e antioxidantes. RIVIÈRE, RAVANAT, WAGNER (2006) utilizaram o dehidroascorbato (DHA) que entra rapidamente nas células e é convertido a ácido ascórbico. O DHA entra nas células por meio de transportadores de glicose (Glut 1, Glut 3,

Glut 4), sendo rapidamente reduzido a ascorbato. A vantagem de se utilizar o DHA ao invés do ascorbato para investigar a vitamina C intracelular, é que o DHA não reage com os íons metálicos do meio, evitando a produção de EROs

DUARTE, ALMEIDA, JONES (2007) e DUMONT *et al.* (2000) utilizaram uma forma de vitamina C ligado ao ânion fosfato e ao Magnésio, o ascorbato 2-fosfato de magnésio, uma forma estável da vitamina C que não se auto-oxida no meio e que logo após entrar nas células é logo convertida a vitamina C. Esta forma de vitamina C permite o uso de concentrações maiores de vitamina C, sendo a forma de vitamina C que se adequaria melhor ao estudo de uma cultura celular com baixa concentração de células.

DUARTE, GRAGNANI, FERREIRA (2004) analisaram a ação protetora antioxidante do dimetil sulfóxido (DMSO) em uma linhagem primária de queratinócitos humanos cultivados contra o estresse oxidativo gerado pela privação da glicose e a hipóxia. Analisaram a produção de malonil dialdeído (MDA), um marcador indireto do estresse oxidativo. Observaram uma produção menor de MDA nas células que foram expostas juntamente com o DMSO.

SANTOS *et al.* (2004) avaliaram a ação antioxidante da vitamina C no estresse oxidativo induzido pela hipóxia. Utilizaram uma concentração de vitamina C de 50µg/ml, expondo-as por 8 horas antes da hipóxia. Observaram que, apesar de não haver uma diminuição do estresse oxidativo, nos grupos suplementados com a vitamina C houve uma diminuição do dano celular.

OFFORD *et al.* (2002) avaliou o efeito foto protetor da vitamina C e E, além de outros oxidantes quando expunha fibroblastos a radiação UVA.

Como visto acima, a metodologia utilizada neste trabalho permite várias modificações para perspectivas de futuros projetos correlacionadas ao tema, desde o agente oxidante como o antioxidante. A concentração de vitamina C intracelular se torna também importante, podendo-se criar estudos para se relacionar o tempo de exposição e a concentração intracelular. A cultura de fibroblastos oferece um ótimo sistema para estudo dos mecanismos relacionados a apoptose e a senescência, seus mecanismos de defesa e que estariam relacionados com seu desenvolvimento.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A vitamina C não protegeu os fibroblastos humanos dérmicos cultivados do estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 , embora a Vitamina C intracelular levou a uma diminuição da indução a senescência celular.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Sep;90:7915-22.

Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E, Kanavaros P, Galaris D. Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jul 4;43:1377-87.

Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 (suppl)): S498 -S501.

Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens J-P, Bouchard C, Gueugniaud P-Y, Petit P, Delafosse B. Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Care Med*. 2000 Mar 28;26:800-3.

Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis. *Cell Growth & Differ*. 1997 May;8:589-98.

Campisi J, Fagagna FDAD. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Aug 1;8:729-41.

Carr A, Frei B. Does Vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J*. 1999;13:1007-25.

Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 May;91:4130-4.

Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Sep 20;102(38):13604–9.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jan 4;48:749-62.

Cooper ML, Laxer JA, Hansbrough F. The Cytotoxic Effects of Commonly Used Topical Antimicrobial Agents on Human Fibroblasts and Keratinocytes. *J Trauma*. 1991;31(6):775-84.

Craig RDP, Schofield JD, Jackson SS. Collagen biosynthesis in normal human skin, normal and hypertrophic scar and keloid. *Eur J Clin Invest*. 1975;5:69-74.

Darr D, Combs S, Pinnel S. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Dec;307(2):331-5.

Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, Longueville F d, Boffe S, Remacle J, Toussaint O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-Beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;118(4):743-58.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M. A Biomarker that

identifies senescent human cells in culture and aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Sep;92:9363-7.

Drewa T, Szmytkowska K, Chaberski M. The short term exposition of AgNO₃ on 3T3 mouse fibroblasts cell line. Acta Pol Pharm. 2007;64(2):175-8.

Drewa T, Szmytkowska K, Czajkowski R, Debski R, Lysik J, Zegarska B. The proapoptotic influence of AgNO₃ on human keratinocytes and fibroblasts in vitro, the impact for burned patient management. Acta Pol Pharm. 2008;65(5):515-9.

Duarte IdS, Gragnani A, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide and oxidative stress on cultures of human keratinocytes. Can J Plast Surg. 2004;12(1):13-6.

Duarte TL, Almeida GM, Jones GDD. Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and Transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. Toxicol Lett. 2007 Feb 20;170:57-65.

Duarte TL, Jones GDD. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. Free Radic Biol Med. 2007 Jul 19;43:1165-75.

Duarte TL, Lunec J. When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res. 2005 Jul;39(7):671-86.

Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati J-B, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. Free Radic Biol Med. 2000 Nov 16;28(3):361-73.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutat Res.* 2004;567:1-61.

Fagagna FDAD. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jul;8:512-23.

Frei B, Stocker R, Ames BN Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Dec;85:9748-52.

Frippiat C, Chen QM, Remacle J, Toussaint O. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol.* 2000;35:733-45.

Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes J-P, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H₂O₂ Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-beta 1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2531-7.

Frippiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jul 25;33(10):1334-46.

Green H, Goldberg B. Kinetics of collagen synthesis by established mammalian cell lines. *Nature.* 1963;200:1097-8.

Green H, Goldberg B. Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line. *Nature.* 1964;204:347-349.

Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.* 2001 Jul 24;475:29-35.

Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000 Nov 6;486:10-3.

- Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997 Jan 14;414:552-6.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 May 15;25:585-621
- Henle ES, Linn S. Formation, Prevention, and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem.* 1997 Aug 1;272(31):19095-8
- Ishikawa F. Cellular Senescence as a Stress Response. *Cornea.* 2006 Dec;25(Suppl 1):S3-6.
- Kashino G, Kodama S, Nakayama Y, Suzuki K, Fukase, K, Goto M, Watanabe M. Relief of oxidative stress by ascorbic acid delays cellular senescence of normal human and Werner syndrome fibroblast cells. *Free Radic Biol Med.* 2003 May 22;35(4):438-43.
- Keira SM, Ferreira LM., Gragnani A, Duarte IdS, Santos IANd. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras.* 2004;19(Special Edition):11-6.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
- Kim DK, Cho ES, Um H-D. Caspase-Dependent and Independent Events in Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide. *Exp Cell Res.* 2000;257:82-8.
- Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, Payette H, Wagner JR. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1999;20:607-13.
- Loke WM., Proudfoot JM, McKinley AJ, Croft KD. Augmentation of monocyte intracellular ascorbate in vitro protects cells from oxidative

damage and inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 8;345:1039-43.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002 Dec 6;192:1-15.

Moller P, Loft S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat Res.* 2004;551:79-81.

Moller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen HE. Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr.* 2004;43:267-85.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Jun 20;16(65):55-63.

Muller M, Li Z, Maitz PKM. Pseudomonas pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: Role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Burns.* 2009 Nov 10;35:500-8.

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.

Offord EA, Gautier J-C, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Kramer K, Applegate LA. Photoprotective Potential of Lycopene, Beta-Carotene, Vitamin E, Vitamin C and Carnosic Acid in UVA-Irradiated Human Skin Fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2002 Mar 1; 32(12):1293-303.

Ohshima S. Apoptosis and necrosis in Senescent Human Fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 228-34.

Podmore DI, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998;392:559.

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative Stress and Cell Signalling. *Curr Med Chem*. 2004;11:1163-82.

Ponec M, Weerhein A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM. The Formation of Competent Barrier Lipids in Reconstructed Human Epidermis Requires the Presence of Vitamin C. *J Invest Dermatol*. 1997 May 26;109(3):348-55.

Poulsen HE, Weimann A, Salonen JT, Nyssonen K, Loft S, Cadet J, Douki T, Ravnat JL. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature*. 1998;395:231-3.

Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*. 2003;22: 2805-11.

Richter T, von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2007 Aug 14; 42:1039-42.

Rivière J, Ravanat J-L, Wagner JR. Relief of oxidative stress by ascorbic acid delays cellular senescence of normal human and Werner syndrome fibroblasts cells. *Free Radic Biol Med*. 2006 May; 40:2071-9.

Robinson JP, Bruner LH, Bassoe C-F, Hudson JL, Ward PA, Phan SH. Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism. *J Leukoc Biol*. 1988 Oct;43(4):304-10.

Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical Pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21: 111-27.

Russell JD, Witt WS. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57:207-12.

Sane AT, Cantin AM, Paquette B, Wagner JR. Ascorbate modulation of H₂O₂ and camptothecin-induced cell death in Jurkat cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 54: 315-21.

Santos LLR, Gragnani A, Ferreira LM, Duarte, IDS, Silva RG. Vitamin C and oxidative stress on cultured human keratinocytes. *Can J Plast Surg.* 2004;12(1):17-9.

Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is Beta-Galactosidase Staining a Marker of Senescence *in Vitro* and *in Vivo*? *Exp Cell Res.* 2000;257:162-71.

Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1:72-6.

Singh NP. Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutat Res.* 1997;375:195-203.

Smith AR, Visioli F, Hagen TM. Vitamin C matters: increased oxidative stress in cultured human aortic endothelial cells without supplemental ascorbic acid. *FASEB J.* 2002 Jul;16:1102-4.

Stadtman ER. Role of Oxidant Species in Aging. *Curr Med Chem.* 2004; 11: 1105-12.

Suh J, Zhu B-Z, Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2003 Feb;34(10):1306-14.

Termini J. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res.* 2000;450:107-24.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izacovic M, Mazur M. Free radicals, metals and oxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.

Vermes I, Haanen C, Steffen-Nakken e Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Mar;184(1):39 – 51.

Yang H, Sheng Z, Guo Z. Oxygen-free radical injury and its relation to bacterial and endotoxin translocation after delayed fluid resuscitation: clinical and experimental study. *Chin Med J.* 1997;110:118-24.

Yuan J, Murrell G AC, Trickett A, Wang M-X. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Apr;1641:35-41.

Zdanove S, Remacle J, Toussaint O. Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 210-6.

Zhang C, Sheng Z-YCY, Hu S, Gao J-C, Li J-Y, Yu S, Liu Y. The Role of Oxygen-Free Radical in the Apoptosis of Enterocytes in Scalded Rats After Delayed Resuscitation. *J Trauma.* 2004 Mar;56:611-7.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

- Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/>
–terminologia em saúde.
- Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. Programa de Pós –graduação em Cirurgia Plástica Reparadora da UNIFESP-EPM.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: ROS are produced during normal cell metabolism, and have physiological functions such as cell signaling. However, in a situation that leads the body to an overproduction of ROS, we have the so called oxidative stress, which has deleterious effects on cells and may lead to apoptosis or cell senescence. Vitamin C is one of the major antioxidants in the body, acting in all forms of oxidative stress. **Objective:** The objective of the present study was to investigate the effects of vitamin C in cultured human dermal fibroblasts subjected to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. **Methods:** The method consisted in the isolation and cultivation of human dermal fibroblasts into six groups: control, vitamin C (+), Vitamin C (-), H₂O₂, Vitamin C (+) H₂O₂, Vitamin C (-) H₂O₂. Fibroblasts were submitted to oxidative stress by the addition of H₂O₂ to the culture medium for 2 hours. The following points were evaluated: cell proliferation by MTT, cell senescence by marking the enzyme beta-galactosidase, cell apoptosis and the release of free radicals by flow cytometry. **Results:** The results demonstrated that hydrogen peroxide significantly increased senescence and apoptosis in fibroblasts, and that vitamin C only decreased induced cell senescence significantly when intracellular. **Conclusion:** We concluded that vitamin C did not protect cultured human dermal fibroblasts against oxidative stress induced by H₂O₂ and that intracellular vitamin C led to a decrease in the induction of cell senescence.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice 1

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Título: VITAMINA C, E e TGF-Beta 1 NO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO H₂O₂ EM FIBROBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS.

Essas informações estão sendo fornecidas para você e para seu representante legal (caso necessário) para participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a resposta de uma cultura celular específica durante o estresse oxidativo.

Serão utilizados os fragmentos de pele desprezados após a cirurgia de fimose (prepúcio), a fim de cultivar um certo tipo de célula que irá ser utilizada neste experimento. Isto não implicará em nenhuma mudança na técnica cirúrgica nem comprometerá o resultado, pois como já colocado acima, serão utilizados fragmentos de pele que serão desprezados, não apresentando qualquer risco ao paciente.

Não há benefício direto para o participante deste projeto. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a vitamina C pode proteger fibroblastos de um certo tipo de ação lesiva provocada pela água oxigenada. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício com a utilização da vitamina C.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Jorge Manuel que pode ser encontrado no endereço Rua Pedro de Toledo, 725, Telefone 55716579. 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 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br.

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;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente; O paciente terá direito a ser informado sobre os resultados do estudo, tão logo eles sejam obtidos.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira

Apêndice 2 - Comitê de Ética: 1215/07



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 31 de agosto de 2007
CEP 1215/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) JORGE MANUEL

Co-Investigadores: Jorge Manuel; Alfredo Gragnani Filho (orientador)

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Vitaminas C e E e TGF b1 no estresse oxidativo induzido pelo H2O2 em fibroblastos humanos cultivados".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico observacional.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco, nenhum procedimento invasivo.

OBJETIVOS: Avaliar a ação da vitamina C, E e do TGF beta 1 no estresse oxidativo de fibroblastos humanos cultivados induzido pelo H2O2.

RESUMO: Serão utilizados os fragmentos de pele que habitualmente são desprezados após a cirurgia de postectomia em crianças, realizadas no Hospital São Paulo e no Hospital de Diadema. As amostras obtidas são mantidas em meio de Eagle modificada por Dulbecco, acrescido de 0,5 ml de penicilina/estreptomicina e armazenadas a 4°C, sendo processadas no Laboratório de cultura de células da Disciplina de cirurgia Plástica da Unifesp, dentro de seis horas, em fluxo laminar com o auxílio de pinças e tesouras, a fim de separá-las do tecido subcutâneo. As garrafas com fibroblastos são suplementadas com 50 microgramas de ácido ascórbico e 1microM de tocoferol, nos grupos respectivos, nas 24 horas antes da agressão com H2O2, e as garrafas do grupo TGF beta1 serão suplementadas. Para submeter os fibroblastos cultivados ao estresse oxidativo, é adicionado 10 microlitros de H2O2, nas respectivas garrafas e incubadas á 37°C, CO2 5%, por 24 horas. Para a avaliação da viabilidade e apoptose celular é utilizado o iodeto de proptídeo e a anexina no citômetro de fluxo, com a utilização de sonda fluorescente com o objetivo de avaliar a produção de ROS no ambiente intra e extracelular. Para a avaliação da senescência utiliza-se a produção de fibronectina pelas células através do método de ELISA, com o objetivo de determinar a perda da função principal do fibroblasto que é a formação de matriz extracelular. Os resultados serão analisados pelo teste estatístico de Wilcoxon para variáveis dependentes e o teste de Mann-Whitney para variáveis independentes. Para comparações entre os grupos será utilizado o teste de Friedman.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Importância do cultivo de fibroblastos para a investigação da citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos laboratoriais in vitro de cultura de células de domínio da equipe.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

TCLE: .

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento específico.

CRONOGRAMA: 18 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 30/8/2008 e 30/8/2009.

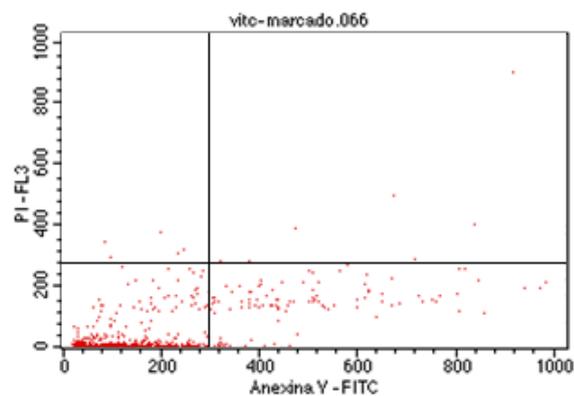
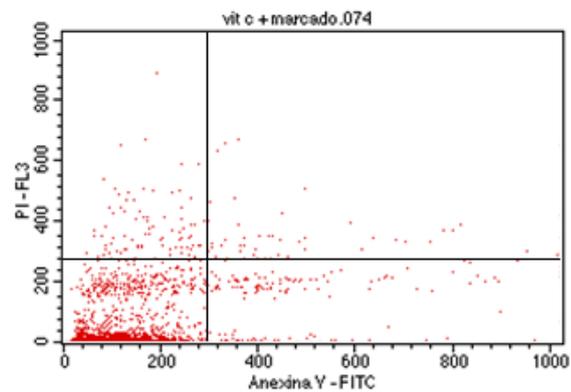
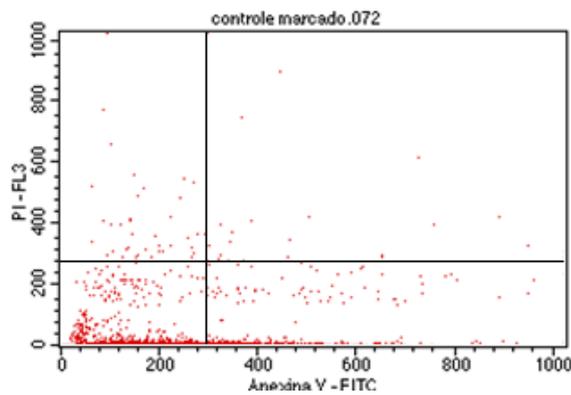
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

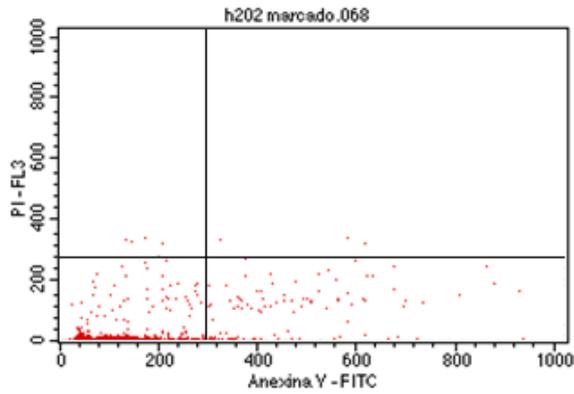
1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso 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.

Atenciosamente,

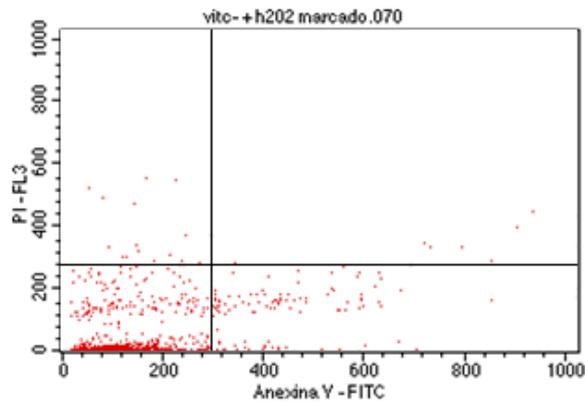
Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Apêndice 3 – Gráficos referentes a um experimento para estudo da Apoptose – Citometria de Fluxo

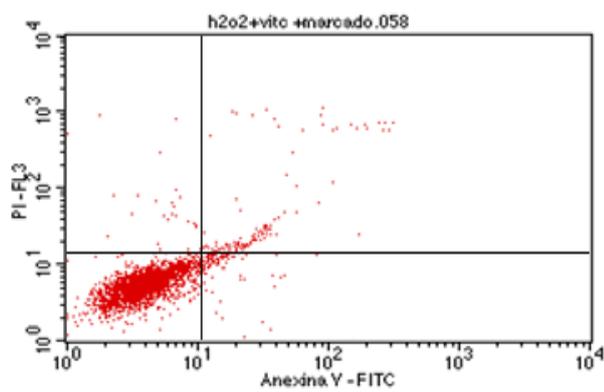




Quac	Events	% Gated	% Total
UL	9	0.09	0.07
UR	5	0.05	0.04
LL	10000	98.29	73.62
LR	371	3.57	2.73



Quac	Events	% Gated	% Total
UL	45	0.43	0.32
UR	16	0.15	0.11
LL	10050	96.32	70.42
LR	323	3.10	2.26



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	101	1.29	0.63
UR	347	4.43	2.17
LL	7130	90.94	44.63
LR	262	3.34	1.64

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Freshney RI. Animal cell culture: a practical approach. 1.ed. Oxford: IRL Press; 1986. 591p.

Freshney RL. Cultured of Animal Cell: a manual of basic technique. 3° ed. New York: Wily-Liss; 1995.

Jones GE. Human Cell Cultures Protocols. Totowa. New Jersey: Humana Press;1996.