

LAELCIO LINS RAMOS DOS SANTOS

**Vitamina C no estresse oxidativo em  
queratinócitos cultivados e submetidos a  
hipóxia**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de DOUTOR em  
Medicina.**

**SÃO PAULO**

**2002**

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP  
Escola Paulista de Medicina

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LYDIA MASAKO FERREIRA  
*Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica  
Reparadora da Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina*

Co-Orientadores: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO

*Doutor em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação  
em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de Medicina*

Prof. Dr. SANDRO PERCÁRIO

*Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em  
Clínica Médica da Disciplina de Pneumologia da  
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina*

À Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA, por suas orientações a elaboração deste trabalho, mas principalmente pela confiança e estímulo ao crescimento pessoal e científico dos que a cercam.

Ao corpo docente  
da Disciplina de Cirurgia Plástica  
da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina:  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. DULCE MARIA FONSECA SOARES MARTINS,  
Prof. Dr. IVAN DUNSHEE DE ABRANTES OLIVEIRA SANTOS,  
Prof. Dr. ROBERTO RUDGE RAMOS,  
Prof. Dr. HELTON TRABER DE CASTILHO,  
Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO,  
Pelos preciosos ensinamentos e pela valorosa contribuição à realização deste  
trabalho.

Ao Fundo de Apoio aos Docentes e Alunos – FADA – UNIFESP/EPM (SPDM) pelo suporte financeiro parcial ao Laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica desta instituição, que muito auxiliou a realização deste estudo.

A Disciplina de Cirurgia Plástica UNIFESP/EPM por me possibilitar o uso do  
Laboratório de cultura de células, sem o qual seria impossível a realização  
deste trabalho.

Ao meu pai,

**JOSÉ LUIZ**

Por me ensinar com suas atitudes como ser humano e como médico a dimensão de palavras como bondade, humildade, sinceridade e tantas outras...

A minha mãe,

**LEYNALZE**

Pela enorme emoção com que tem lutado, sempre ao meu lado, para me fazer maior nos difíceis desafios da vida.

Aos meus irmãos

LENIZE

LENIRA

LENILDA

JOSÉ LUIZ

LEYNALZE

Pelo carinho, confiança e incentivo sempre presentes nestes 40 anos.

Aos meus sobrinhos

LAIS

LILIA

LUCAS

GABRIEL

CAROLINA

LUIZ EDUARDO

Pelo estímulo da alegria, esperança e energia da juventude.

À

Minha esposa

REGINA

que tem feito do nosso tempo algo sempre melhor por sua cumplicidade,  
companheirismo e compreensão, demonstrações silenciosas de um amor  
verdadeiro.

Ao Prof. Dr. ELIAS RODRIGUES DE PAIVA, docente aposentado do  
Departamento de Medicina Preventiva da UNIFESP-EPM, pela cordial  
acolhida e pelos ensinamentos estatísticos que ajudaram a enriquecer este  
trabalho.

Ao Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO, pelo apoio e incentivo em todas as fases dessa pesquisa e pela sua estimada amizade.

Ao Prof. Dr. SANDRO PERCÁRIO pela generosidade e desprendimento ao transmitir-me parte de seu vasto conhecimento em Bioquímica que tanto ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. NESTOR SCHOR pela grande colaboração em permitir o uso das instalações do Laboratório da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP para execução de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. JOSÉ CARLOS COSTA BATISTA DA SILVA por permitir a realização das dosagens de Malonaldeído no Laboratório de Oxidologia.

Ao Prof. Dr. MARCELINO DE SOUZA DURÃO pelas várias idéias e soluções que tanto ajudaram na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. IVONE DA SILVA DUARTE pelas valorosas orientações, amizade e o constante apoio dados no decorrer deste trabalho.

A RONALDO GONÇALVES DA SILVA, pela orientação e transferência de conhecimentos, além da maneira franca e amiga que marcou o período de pesquisa no Laboratório da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

A CLARA VERSOLATO RAZVICKAS E GEOVANE ARAUJO LIMA pela constante colaboração durante as atividades no Laboratório da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP.

Aos colegas Dra. CHRISTIANE S. SOBRAL, Dra. ANELISA BITTENCOURT CAMPANER, Dr. SIDNEY MAMORU KEIRA, Dr. LUIS EDUARDO FELIPE ABLA pela colaboração para realização deste trabalho.

À acadêmica de Farmácia LIZANDRA CRISTINA CRISTÓVÃO DI LORENZO, bolsista da disciplina de Cirurgia Vascular, pela participação nos estudos de Oxidologia.

A todos os alunos do curso de Pós-Graduação e residentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, pelo intercâmbio de conhecimentos.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM,  
SANDRA DA SILVA, SILVANA S. OLIVEIRA E MARTA REJANE DOS  
REIS DA SILVA pela atenção, apoio e incentivo durante a elaboração deste  
trabalho.

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	iv
Listas .....	xviii
Resumo .....	xxi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	8
2.1 Tecidos e antioxidantes.....	8
2.2 Cultura de células e antioxidantes.....	17
3 MÉTODOS .....	39
3.1 Cultura de células.....	39
3.1.1 Cultura de fibroblastos J2-3T3.....	39
3.1.2 Cultura de queratinócitos humanos.....	41
3.1.2.1 Coleta da pele.....	41
3.1.2.2 Cultura propriamente dita.....	42
3.2 Hipóxia.....	43
3.2.1 Estabelecimento do protocolo adequado.....	45
3.3 Permeabilidade da membrana celular.....	46
3.3.1 DHL no meio de cultura.....	46
3.3.2 DHL celular.....	47
3.4 Peroxidação lipídica.....	48
3.5 Vitamina C.....	49
3.5.1 Dose utilizada.....	50
3.5.2 Definição do momento da administração da vitamina C..	50
3.6 Grupos de estudo.....	50
3.7 Experimento.....	51
3.8 Método estatístico.....	51

4 RESULTADOS .....	53
4.1 Dosagem de DHL.....	53
4.2 Dosagem de MDA.....	55
5. DISCUSSÃO .....	58
5.1 Modelo experimental.....	60
5.1.1 Cultura de queratinócitos.....	66
5.1.2 A privação de oxigênio.....	68
5.1.3 A vitamina C.....	71
5.1.4 Marcadores de dano celular.....	76
5.2 Análise dos resultados.....	78
5.2.1 Dosagem do DHL.....	78
5.2.2 Dosagem do MDA.....	79
5.2.3 Comparação dos valores do DHL e do MDA.....	81
6 CONCLUSÕES .....	85
7 ANEXOS .....	86
8 REFERÊNCIAS .....	87
Abstract	
Apêndice	
Bibliografia Consultada	

## Lista de figuras

Figura 1.	Garrafa de cultura (175cm <sup>2</sup> ) com células 3T3-J2. ....	40
Figura 2.	Biópsia de pele para isolamento de queratinócitos.....	41
Figura 3.	Cutura de queratinócitos em garrafas de 25 cm <sup>2</sup> .....	43
Figura 4.	Sistema de gases contendo 95% de N <sub>2</sub> e 5% de CO <sub>2</sub> .....	44
Figura 5.	Garrafas submetidas a substituição gasosa por 30 minutos.....	45
Figura 6.	Garrafa de cultura e espátula utilizada para realização de raspado de quertinócitosamina .....	48
Gráfico 1.	Médias das dosagens de DHL e MDA dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitaminaC.....	57

## **Lista de tabelas**

- Tabela 1 – Dosagem de DHL nas amostras das garrafas dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, respectivas médias e resultados estatísticos.....54
- Tabela 2 – Dosagem de MDA nas amostras das garrafas dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, respectivas médias e resultados estatísticos.....56

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

AA	Ácido ascórbico
ACH	Acetilcolina
DA	Dopamina
DHA	Ácido Dehidroascórbico
DHL	Desidrogenase Láctica
DPPD	Diphenyl-p-phenylenediamine
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
EGTA	Catecolaminas
ERTO	Entidades Reativas Tóxicas do Oxigênio
ERN	Entidades Reativas do Nitrogênio
HBO	Oxigênio em Alta Pressão
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
MDA	Malonaldeído
NAC	N-acetil-cisteína
VAC	Pressão Sub-Atmosférica
RL	Radicais Livres
TGF	Fator de Crescimento Transformador
XO	Xantina-Oxidase

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da Vitamina C em culturas de queratinócitos humanos submetidos a hipóxia gasosa, quanto à agressão celular e ao estresse oxidativo. O método constituiu-se no isolamento e cultivo de queratinócitos humanos em 40 garrafas, que foram divididas em quatro grupos: controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C. Os queratinócitos foram submetidos a hipóxia por substituição gasosa no interior das garrafas por uma mistura contendo 95% de nitrogênio e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 30 minutos. Foram avaliados a agressão celular através de dosagem DHL e o estresse oxidativo pela dosagem de MDA. Os resultados demonstraram que a hipóxia aumentou em cerca de 8 vezes a liberação de DHL pelos queratinócitos e que a vitamina C foi eficaz em inibir esta agressão. Quanto à produção de radicais livres, a hipóxia dobrou os valores de MDA dos grupos controle, sendo que a vitamina C levou a um aumento de peroxidação lipídica.

Assim, concluímos que a vitamina C foi capaz de diminuir de maneira significativa a agressão celular pela hipóxia, havendo entretanto piorado o estresse oxidativo (não significativa).

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com as perdas de tecido por alteração do aporte nutricional tem sido de grande importância em várias áreas da medicina.

Em Cirurgia Plástica, o conhecimento detalhado dos mecanismos de isquemia e necrose cutânea tem merecido estudos, seja na busca de substâncias que melhorem o aporte nutricional a enxertos ou retalhos (vasodilatadores), seja através de drogas que reduzam o dano celular dos tecidos submetidos à diminuição de sua irrigação (hipóxia, diminuição de aporte energético, produção de radicais livres).

Inúmeros estudos têm dedicado especial atenção a este assunto em trabalhos clínicos (HAERTSCH, 1981; BARCLAY, 1982; FERREIRA, 1985; FERREIRA et al, 1986 a,b,c; FERREIRA et al, 1987 a,b,c; FERREIRA et al, 1988), em animais (FERREIRA ET AL, 1995) e mais recentemente em células cultivadas em laboratório (DUARTE, 2001).

O conhecimento do comportamento biológico das substâncias relacionadas à morte de células epiteliais é de grande importância em Cirurgia Plástica, visando o aprimoramento do tratamento de queimaduras, lesões traumáticas, tumores benignos e malignos da pele, cicatrizes hipertróficas, úlceras crônicas, processos de isquemia-reperfusão (retalhos micro-cirúrgicos)

entre outros. Os radicais livres (RL) ou espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) e do nitrogênio (ERN) estão envolvidos em maior ou menor grau em todos estes processos.

Radical livre pode ser definido como sendo qualquer espécie química que apresente vida independente e que possua um ou mais elétrons não pareados em sua camada de valência. A presença desses elétrons não pareados faz estas espécies apresentarem propriedades paramagnéticas, gerando uma molécula altamente reativa e instável (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989).

As mais importantes manifestações da produção de radicais livres são a peroxidação lipídica e a oxidação protéica (STADTMAN, OLIVER, 1991).

Várias doenças degenerativas humanas têm sido associadas com a peroxidação lipídica como arterosclerose e envelhecimento (AMES et al, 1993), câncer (CERUTTI, 1985), artrite reumatóide (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989), doenças cardiovasculares (CHAKRABARTY et al, 1992) e toxicidade por elementos químicos (AMES, 1983).

No nosso meio, diversos autores têm se dedicado ao estudo de fenômenos oxidativos em retalhos cutâneos como DUARTE (1996), HUFFENBAECHER (1996), SANTOS (1996), ABLA (1997), GOMES (1997), CYMROT (1999) e OKAMOTO (2001).

Assim como acontece em outros tecidos, as células epiteliais estão constantemente produzindo radicais livres, elementos estes rapidamente removidos por defesas próprias do organismo que envolve eficientes sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Desta maneira, há uma prevenção dos efeitos deletérios dos RL e se mantém um equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em uma estabilidade celular e tecidual (FUCHS et al,1989; BISSETT et al,1990; YOHN et al,1991).

Como antioxidantes celulares enzimáticos podem ser citados a superóxido dismutase, catalase, tioredoxina redutase e a glutathione peroxidase. Dentre os não enzimáticos, de baixo peso molecular, os mais importantes são o beta-caroteno, glutathione (GSH), o  $\alpha$ -tocoferol e a vitamina C (BEATE et al, 1997).

A vitamina C atua como um potente antioxidante em fluidos biológicos (FREI et al, 1989), neutralizando fisiologicamente as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN) (HALLIWELL, 1996). Evidências clínicas de interação da vitamina C com substâncias oxidantes têm sido encontradas em fluidos extracelulares como o que reveste a árvore respiratória e o plasma (CARR, FREI, 1999). A vitamina C é rapidamente depletada nestes fluidos em condições de estresse oxidativo como tabagismo (LYKKESFEKD et al, 1997), inflamações relacionadas com a

artrite reumatoide e na síndrome da angústia respiratória do adulto (HALLIWELL et al, 1996).

A vitamina C, ao reagir com radicais livres pode regenerar outras pequenas moléculas antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol, glutathione (GSH),  $\beta$ -caroteno de suas respectivas espécies radicais. Interação da vitamina C com o radical  $\alpha$ -tocoferoxyl acaba por regenerar o  $\alpha$ -tocoferol movendo o radical da fase lipídica para a fase aquosa, prevenindo assim a peroxidação lipídica mediada pelo  $\alpha$ -tocoferoxyl.

A vitamina C é um efetivo antioxidante por várias razões. Primeiramente, após reagir com um radical livre, a vitamina C se transforma no radical livre ascorbyl, que tem um baixo potencial de redução (BUETTNER, 1993). Segundo, o radical ascorbil reage com outro radical idêntico, formando vitamina C e ácido dehidroascórbico (DHA). Além disso, a vitamina C pode ser regenerada pela reação entre o radical ascorbil e DHA por dois mecanismos diferentes (um sistema enzima-dependente e outro não enzima-dependente). Os sistemas enzima-dependentes são catalizados pela semidehidroascorbato redutase (NADH-dependente) (WELLS, JUNG, 1997) e pela tioredoxina redutase (NADPH-dependente) (MAY, 1998). Como sistemas não enzimáticos podem ser citados o GSH e o ácido lipóico (WELLS, JUNG, 1997).

Em algumas condições patológicas como diabetes, doenças inflamatórias da pele (lúpus eritematoso, psoríase, dermatite de contato) ou cicatrização de feridas, grandes quantidades de vitamina C extracelular são oxidadas a DHA, que pode passar para o interior das células e novamente ser reduzida a vitamina C. Tem sido demonstrado que a captação e a redução intracelular de DHA formado no interstício contribui para manutenção das concentrações de vitamina C no interior das células (SAVINI et al, 2000).

Estudos de mecanismos de transporte têm demonstrado dois sistemas diferentes envolvidos na obtenção intracelular de vitamina C pelas células de animais mamíferos: Na<sup>+</sup>-dependente co-transportador de vitamina C e transporte de DHA facilitado pela glucose (TSUKAGUCHI et al, 1999).

Após a obtenção intracelular de DHA, este pode ser reduzido por reação química direta com a glutathiona reduzida (WINKLER et al, 1994), porém todas as etapas desta reação ainda estão em estudo e parece haver diferenças de acordo com o tecido implicado na reação.

Outros autores também têm descrito o papel pró-oxidante da vitamina C quando em presença de metais pesados (FUKUTAWA et al, 1981; BHATNAGAR, 1996). Apesar da ocorrência desta reação *in vitro*, sua relevância *in vivo* tem sido motivo de controvérsia, principalmente pela baixa disponibilidade destes íons na forma livres nos sistemas orgânicos. Entretanto,

em algumas condições patológicas, estes metais podem ter suas ligações com proteínas desfeitas (por exemplo: ceruloplasmina, ferritina, transferrina), podendo assim reagir com a vitamina C e gerar radicais livres.

SANTOS (1996) desenvolveu estudo em retalhos isquêmicos no dorso de ratos, onde a vitamina C diminuiu de maneira significativa a necrose dos retalhos quando comparados ao grupo controle. No grupo de tratamento houve também uma redução significativa da peroxidação lipídica (quantificada pela dosagem de MDA) medidas no sangue e na pele normal. Paradoxalmente, na pele do retalho as dosagens de MDA mostraram-se mais elevadas que o grupo controle.

Posteriormente, KUGIYAMA et al (1998) estudando a resposta do diâmetro da artéria coronária esquerda em pacientes submetidos à infusão de acetilcolina (Ach) combinada à infusão de vitamina C ou solução salina (placebo) sugeriram que a vitamina C pode atenuar os espasmos vasculares.

Assim, propusemos um prosseguimento a estes trabalhos utilizando novamente a vitamina C como anti-oxidante em modelo experimental de células epiteliais cultivadas, evitando os possíveis efeitos da vitamina C sobre a fisiologia vascular dos retalhos.

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da vitamina C em culturas de queratinócitos humanos, submetidos a hipóxia gasosa, na agressão celular e no estresse oxidativo.

## **2. LITERATURA**

A fim de facilitar a leitura, as principais obras referentes ao tema foram divididas em literatura sobre antioxidantes nos tecidos e na cultura de células.

### **2.1. TECIDOS E ANTIOXIDANTES**

GOMES (1993) estudou os efeitos da nicotina em dose “leve” (0,6mg/kg/dia) e “pesada” (1,2mg/kg/dia) na viabilidade cutânea de retalhos isquêmicos em dorso de ratos. Com o objetivo de analisar a reversibilidade da suspensão do uso da nicotina, o autor dividiu os animais em dois grupos: no primeiro os animais receberam a nicotina no pré e no pós-operatório e no segundo somente no pré-operatório. A conclusão deste estudo foi de que a suspensão da nicotina no pós-operatório pode levar a uma diminuição das necroses cutâneas.

ASHOORI et al (1994) utilizaram, em retalhos cutâneos randômicos e retalhos ilhados, o ácido elágico, curcumin ácido clorogênico e  $\alpha$ -tocoferol nas doses de 10, 60, 80, e 100  $\mu$ M uma vez ao dia, durante três dias. Os

autores demonstraram a relação de dependência entre o nível de peroxidação lipídica (medido pela dosagem do malonaldeído) e o grau de necrose nos dois tipos de retalhos; a ocorrência da peroxidação lipídica antes e depois da reperfusão e que dentre as substâncias testadas, o ácido elágico foi o mais eficaz na supressão da peroxidação lipídica, aumentando a viabilidade dos dois tipos de retalho.

DUARTE (1996) estudou o efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) em retalhos isquêmicos do dorso de ratos com base cranial. Esta droga, um antioxidante, foi administrada por via enteral em 28 ratos nos quais foram realizados retalhos cutâneos randômicos com dimensões de 10 x 4 cm. O grupo controle recebeu água destilada diariamente. O grupo experimental recebeu DMSO na dose de 2ml/kg/dia. Neste estudo a média das porcentagens das áreas de necrose cutânea foi menor no grupo testado (67,5% no grupo controle e 31,37% no grupo experimental). Os valores do malonaldeído no soro, na pele sã e na região de transição entre pele sã e a necrótica, foram menores no grupo experimental do que no controle.

HUFFENBAECKER (1996) realizou estudos, administrando manitol por via intraperitoneal na dose de 400mg/kg em ratos submetidos à elevação

de retalhos cutâneos isquêmicos na região dorsal. Essa droga foi administrada 15 minutos antes do ato operatório e cinco minutos após o mesmo. Ao final de sete dias de observação, o autor obteve como resultado, menores áreas de necrose cutânea nos grupos de experimento do que no grupo controle. Os níveis de malonaldeído, tanto no sangue quanto nos fragmentos cutâneos provenientes de biópsias na pele normal e pele da transição viável-necrótica foram menores quando comparadas aos do grupo que recebeu apenas solução salina.

SANTOS (1996) estudou o efeito da vitamina C em retalhos isquêmicos do dorso de ratos. A dose empregada de vitamina C foi de 500 mg/kg de peso por via enteral 30 minutos antes da cirurgia e nos dias subsequentes, diariamente, até o sétimo pós-operatório. A área de necrose foi significativamente menor no grupo que recebeu a vitamina C quando comparado ao grupo controle (67,5% de necrose no grupo controle e 52,5% no grupo experimental). No grupo de tratamento houve também uma redução significativa da peroxidação lipídica (quantificada pela dosagem de MDA) medidas no sangue (680 ng/ml no grupo controle e 408 ng/ml no grupo experimental) na pele normal (2038 ng/ml no grupo controle e 1238,3 no grupo experimental). Na transição entre pele sã e pele necrótica, no interior do

retalho, as dosagens de MDA mostraram-se mais elevadas que o grupo que recebeu a vitamina C do que no grupo controle (1235 ng/ml no grupo controle e 3113,2 no grupo experimental).

WU et al (1996) realizou modelo experimental de isquemia em orelhas de 40 coelhos (ligadura de dois dos três pedículos vasculares da orelha) e hipóxia gasosa onde culturas de células (garrafas de cultura foram colocadas em estufas com concentração de oxigênio de 3,5% por 48 a 72 horas). Em cada uma das orelhas isquêmicas foram realizadas três ferimentos de 6 mm de diâmetro e testadas doses de 1, 5, 30 e 40  $\mu\text{g}$  de fator de crescimento de queratinócito (KGF). Os autores observaram que na quantidade de 1 $\mu\text{g}$  não houve melhora da cicatrização e que nas doses de 5, 30 e 40  $\mu\text{g}$  houve aumento significativo na re-epitelização. Com 30  $\mu\text{g}$  a camada de epitélio foi três vezes mais espessa que o grupo controle (solução salina). Houve também maior formação de tecido de granulação em todos os grupos tratados com KGF, sendo esta formação maior no que recebeu 40  $\mu\text{g}$  (avaliado no 10º dia pós-operatório). As culturas de fibroblastos e queratinócitos demonstraram uma maior proliferação celular e produção de TGF- $\alpha$  (fator de crescimento transformador  $\alpha$ , tido como estimulador da proliferação de queratinócitos e fibroblastos, agente angiogênico e promotor da deposição de matriz

extracelular) quando os meios de cultura eram suplementados com KGF e que este fator de crescimento promoveu maior proliferação celular quando as culturas foram submetidas a hipóxia gasosa.

ABLA (1997), utilizando a N-acetilcisteína (NAC) por via enteral na dose de 300 mg/kg durante sete dias, em ratos submetidos à elevação de retalhos cutâneos isquêmicos de dorso constatou a eficácia dessa droga na redução da necrose desses retalhos. Nesse trabalho, os valores do malonaldeído no soro significativamente maiores no grupo controle quando comparados ao grupo experimental. Dentro deste grupo os níveis de malonaldeído no soro estiveram mais elevados nos animais que evoluíram com áreas de necrose maiores no retalho. Esses dados, segundo o autor, não permitem estabelecer uma relação direta entre os níveis plasmáticos dessa droga e a extensão da necrose no retalho devido a inespecificidade do método e a possibilidade de estarem ocorrendo processos oxidativos em outros tecidos. No retalho, biópsia coletada na área de transição entre pele sã e pele necrótica apresentou níveis de malonaldeído mais elevados no grupo de tratamento do que no grupo controle, embora a área de necrose cutânea tenha sido menor no grupo que recebeu a NAC. Segundo o autor, esse fato poderia

ser explicado pela presença de tióis protéicos intracelulares responsáveis pela manutenção da capacidade regenerativa da célula.

GOMES (1997) estudou a influência da N-Acetilcisteína (150 mg/kg/dia) e da nicotina (1,2 mg/kg/dia) nos retalhos cutâneos randômico em ratos. A agressão oxidativa provocada pelas espécies reativas tóxicas do oxigênio foi avaliada por meio de dosagens de malonaldeído em quatro regiões dos retalhos (extremidade distal da necrose, transição da pele normal/necrose, pele viável a 1cm distal à base do retalho, pele normal fora do retalho) e no sangue destes animais. O autor conseguiu concluir que a área de necrose foi maior no grupo que recebeu somente a nicotina injetável e também que a N-Acetilcisteína não previniu a necrose tecidual. No grupo controle, os níveis de malonaldeído foram maiores no soro do que nos retalhos, indicando um alto grau de lesão oxidativa sistêmica. Nos retalhos do grupo controle, a extremidade distal da necrose apresentou os valores médios maiores em relação aos das demais áreas. No grupo tratado com N-Acetilcisteína, os valores médios do malonaldeído no soro foram menores quando comparados aos dos fragmentos cutâneos nas áreas viáveis de pele, não havendo diferença significativa em relação às áreas de necrose e de transição necrose/pele normal. Nos retalhos dos animais submetidos a N-Acetilcisteína, os níveis de

malonaldeído foram menores nas áreas de necrose do que nas áreas de transição necrose/pele normal ou de pele normal, indicando que essa substância não foi eficiente como anti-oxidante. O grupo tratado com nicotina e N-Acetilcisteína apresentou níveis de malonaldeído elevados nos fragmentos de pele, porém não houve diferença significativa entre as áreas testadas; o soro destes animais também apresentou medidas elevadas desse aldeído, não diferindo significativamente das dos fragmentos cutâneos. Nos ratos tratados exclusivamente com nicotina, os fragmentos cutâneos não apresentaram diferenças significantes de malonaldeído, que se mostrou elevado no soro desses animais. Não houve diferença significativa nos níveis de MDA entre os fragmentos de pele e o soro.

KUGIYMA et al (1998) estudaram a resposta do diâmetro da artéria coronária esquerda em pacientes submetidos a infusão de acetilcolina (Ach) combinada a infusão de Vitamina C ou solução salina (placebo) em 32 pacientes com angina coronariana espástica e em 34 pacientes controle. Como conclusões, obteve que a vitamina C atenuou o espasmo coronariano em pacientes com angina espástica, mas o mesmo efeito não foi observado nos pacientes do grupo controle (sem doença coronariana).

CYMROT (1999) estudou o comportamento do estresse oxidativo e da defesa antioxidante em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. Nesse experimento, o autor realizou retalhos cutâneos com base cranial em dorso de ratos, que foram divididos em três grupos de seis animais. No pós-operatório imediato (POI), no terceiro (PO3) e no sétimo pós-operatório (PO7) os animais foram avaliados clínica e laboratorialmente. As análises laboratoriais revelaram níveis de malonaldeído no soro significativamente menores no grupo POI do que no grupo PO3 e PO7; os níveis de malonaldeído nos fragmentos cutâneos não diferiram entre si. Os valores da capacidade antioxidante total no soro dos animais, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, porém nos fragmentos cutâneos eles diminuíram significativamente no decorrer do tempo.

FABIAN et al (2000) estudou etapas da cicatrização de feridas em orelhas de coelhos submetidos a isquemia e aos efeitos do oxigênio em alta pressão (HBO) e ao curativo sob pressão sub-atmosférica (VAC). Um total de 41 animais foram submetidos à ligadura de dois dos três principais pedículos das orelhas, bilateralmente, e criadas quatro feridas circulares de 8 mm em cada orelha. Os autores promoveram curativos simples em 21 orelhas, curativos VAC em 21 orelhas. Os outros 20 animais foram submetidos à

câmara hiperbárica, sendo que em 20 orelhas foi realizado curativo simples e em outras 20 orelhas foram submetidas a curativos VAC. A avaliação realizada quanto ao tecido de granulação demonstrou que os curativos VAC apresentaram mais formação deste tecido (comparados aos curativos simples), enquanto que os submetidos a HBO não apresentaram melhores resultados estatísticos (nem quando comparados ao curativo simples nem ao curativo VAC). A avaliação quanto à re-epitelização foi observado que o curativo VAC apresentou crescimento epitelial mais rápido (quando comparados ao curativo simples), enquanto que os animais submetidos a HBO não apresentaram aumento da epitelização (nem quando comparados aos curativos VAC).

COELHO (2000) realizou estudo sobre a influência do oxigênio em alta pressão (hiperbárico) em enxertos de pele no rato. A avaliação morfológica e morfométrica dos enxertos revelou um aumento das fibras colágenas e elásticas, assim como um aumento de neoformação vascular.

OKAMOTO (2001) estudou o estresse oxidativo local e sistêmico em retalhos cutâneos isquêmicos em dorso de ratos, na fase aguda, até uma hora após a elevação dos retalhos. Foram estudados 30 animais distribuídos em 5 grupos (1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos) nos quais

foram coletadas amostras dos fragmentos cutâneos de diversas áreas dos retalhos elevados (das áreas mais distais em relação à base do retalho para as mais proximais) e uma amostra de sangue de cada animal, nos mesmos períodos citados. Uma amostra não isquêmica, fora do retalho foi analisada e serviu como controle. Neste estudo, concluiu-se que o estresse oxidativo local e sistêmico, avaliado pelo MDA, é maior nos períodos mais precoces após o ato operatório (15 minutos para o soro e 5 minutos para o retalho isquêmico).

## **2.2. CULTURA DE CÉLULAS E ANTIOXIDANTES**

GREEN et al (1979) afirmaram que com o desenvolvimento das culturas de queratinócitos humanos, obtido até esta data, tornava-se possível pensar no uso de pequenos fragmentos de epiderme para obter-se grandes extensões de epitélio estratificado bastante semelhante a epiderme normal e que, portanto, poderia ser utilizado para reparar lesões epidérmicas extensas. Descreveram os pontos que consideraram os mais importantes em relação à cultura de queratinócitos: 1. As células epidérmicas dos neonatos podem ser transferidas para múltiplos subcultivos com o uso associado das células 3T3. 2. Uma única célula pode iniciar uma colônia que forma um epitélio estratificado, sendo que as células que ficam aderidas à superfície do frasco de

cultura tornam-se semelhantes às da camada basal da epiderme, enquanto as células que afastam-se dessas tornam-se terminalmente diferenciadas. 3. A multiplicação dos fibroblastos presentes na amostra original de epiderme é controlada pela ação inibitória das células 3T3. 4. As células epidérmicas cultivadas apresentam, à microscopia eletrônica, as características histológicas principais dos queratinócitos. 5. As células mantêm o número diplóide de cromossomos e não desenvolvem linhagem estabelecida.

GOTO, TANAKA (1981) utilizaram modelo experimental de membranas celulares cuja fração foi retirada de cérebro ratos, para estudo dos efeitos da vitamina C (10mM) na peroxidação lipídica e na atuação da enzima Na,K-ATPase. Após submeter às células a um método específico para o isolamento da membrana lipídica, foram realizados experimentos para determinação da atividade enzimática através da adição de ATP e da peroxidação lipídica (avaliado pelo método Ottolenghi modificado). Foram testados os efeitos inibidores da vitamina C (na presença e na ausência de metais pesados), dopamina (DA), catecolaminas (EGTA). Os autores observaram uma forte reação de peroxidação quando o substrato (membrana lipídica) foi adicionado a ATP e vitamina C e que esta reação não aconteceu quando metais pesados foram mantidos suprimidos do meio. A DA e as

EGTA também inibiram a peroxidação quando na presença de ATP. A ação da enzima Na,K-ATPase teve sua ação fortemente inibida pela vitamina C, DA e EGTA. Assim, os autores discutem a possível ligação irreversível do radical ascorbato sobre os grupos sulfidrilas (sensíveis a radicais livres) presentes na enzima Na,K-ATPase. EGTA e DA poderiam atuar como eliminadores do radical ascorbato e impedindo a inibição da atividade enzimática. Também foi discutida a possível importância da presença da vitamina C e da enzima Na,K-ATPase em compartimentos separados por uma membrana plasmática, nos seres vivos.

FUJIMOTO et al (1982) estudando a peroxidação lipídica em mitocôndrias de células hepáticas de ratos. Os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram o fígado retirado e imediatamente colocados em solução salina fria. Após a sua homogeneização foi feita a retirada da sucrose, pois este elemento interfere na reação do ácido tiobarbitúrico. A seguir as mitocôndrias foram separadas e as amostras resultantes divididas em duas partes: uma delas para experimentos de peroxidação lipídica e o outro para quantificações de vitamina C, ferro, e fosfolípidos no interior das mitocôndrias. Para o estudo da peroxidação lipídica foram utilizados a vitamina C, o ferro e o N, N'- difenil-p-fenilenediamina (DPPD) a  $10^{-7}M$ , que

é um potente eliminador de radicais livres. A avaliação da produção de radicais livres foi feita pela dosagem do MDA. Os resultados da peroxidação lipídica demonstraram que a vitamina C e o metal pesado (ferro), cada um isoladamente não induziram a um aumento significativo na formação de MDA. Quando as duas substâncias foram adicionadas simultaneamente ocorreu uma significativa formação de radicais livres. Porém, quando a estes elementos foi adicionado DPPD ocorreu diminuição significativa dos níveis de MDA com diminuição da vitamina C no interior das mitocôndrias de cerca de 50%, sem entretanto alterar a entrada mitocondrial de ferro. Os autores sugerem o possível envolvimento positivo da peroxidação da vitamina C pelo ferro, o que facilitaria a penetração do radical dehidroascorbato para o interior da mitocôndria. Novos estudos são sugeridos para confirmação desta hipótese, bem como para o melhor conhecimento dos mecanismos de transporte transmembrana do DPPD. Ainda neste estudo os autores observaram que o ácido aracdônico é o fosfolípide de membrana mais utilizado como substrato na peroxidação lipídica (ocorreu um consumo de 39 a 41% do mesmo).

LIEBLER et al (1986) estudando lipossomos compostos por uma bicamada de fosfolípidos, induziu a peroxidação lipídica pela adição de metais pesados (ferro),  $H_2O_2$ , associado a vitamina C (concentrações de 0,1 a 1mM).

Como anti-oxidantes foram utilizados o  $\alpha$ -tocoferol e o GSH, sendo que os resultados foram avaliados pela dosagem do MDA.

Como resultados, observaram que o sistema ( $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{lipossoma}$ ) mostraram aumento do MDA quando submetidos a vitamina C, ao GSH e a ambos. Quando, ao sistema, foi associado o  $\alpha$ -Tocoferol e a vitamina C houve uma reversão do efeito pró-oxidante da vitamina C, com uma prevenção da depleção do  $\alpha$ -Tocoferol por 90 minutos.

FALANGA et al (1991) estudaram os efeitos da hipóxia em culturas de fibroblastos submetidos a hipóxia gasosa na gene da secreção de TGF- $\beta$ 1c (fator de crescimento transformante  $\beta$ 1) e na transcrição gênica do RNAm responsável pela produção destes fatores de crescimento. Os fibroblastos foram obtidos de fragmentos de derme humana cultivados até atingir condição de semi-confluência. As culturas foram submetidas a concentrações normais de oxigênio (5%CO<sub>2</sub>, 15% O<sub>2</sub>) e a hipóxia foi feita por substituição gasosa de oxigênio nas estufas por nitrogênio, até atingir concentração de 2% de oxigênio. Os resultados foram avaliados após 24, 48 e 72 horas. Como resultados, os autores não encontraram diferenças quanto ao número e forma das células submetidos ou não a hipóxia. Quanto aos níveis de TGF- $\beta$ 1, aos 24 horas de hipóxia não houve aumento, porém após 48 horas houve

aumento significativo, que chegou a 9 vezes após 72 horas. Quanto aos níveis de RNAm para TGF- $\beta$ 1 houve uma diminuição nos dois grupos nas primeiras 24 horas. Em contraste, em culturas expostas a hipóxia houve aumento nos níveis de RNAm para TGF- $\beta$ 1 de cerca de 8 vezes. Estes efeitos foram revertidos quando as culturas foram novamente expostas a concentrações de oxigênio de 15% por 24 horas. Assim, os autores concluíram que a exposição prolongada de fibroblastos a hipóxia induz um grande aumento seletivo na produção de TGF- $\beta$ 1, regulado por aumento por aumento da atividade de transcrição do gene para TGF- $\beta$ 1. Os autores discutem ainda que, neste trabalho não foram testados a atividade biológica de TGF- $\beta$ 1 sintetizado por estímulo de hipóxia.

IANNONE et al (1993) estudaram a formação de radicais livres em queratinócitos humanos frescos ou cultivados, submetidos a hipóxia e a vários peróxidos como: cumene hidroperóxido (cum-OOH), t-butil-hidroperóxido (t-but-OOH) e benzoil-peróxido. A hipóxia foi realizada por substituição do conteúdo gasoso das garrafas por nitrogênio pelo período de 10 minutos de incubação. Os meios de cultura foram suplementados com deferoxamina (quelante do ferro). Os resultados foram avaliados pelo teste de exclusão de azul de tripam (viabilidade), DHL (agressão celular) e espectroscopia da

ressonância-spin de elétrons (RSP) para avaliação dos radicais livres. A ativação intra-celular de radicais livres pode ser demonstrada pelos agentes hidrofílico e membrana-impermeável (ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfônico ou DNBNS) e agentes lipofílicos, membrana permeável ( $\alpha$ -4-pyridyl-1-óxido-N-t-butyl-nitrone ou POBN). Os radicais livres reagem com marcadores DNBNS ou POBN que são facilmente identificáveis por espectroscopia ESR. Os resultados mostraram não haver diferenças entre as células epiteliais frescas e as cultivadas, quanto à formação dos radicais livres. O experimento em que o agente pró-oxidante Cum-OOH foi utilizado em altas concentrações (25mM) houve um severo dano celular, demonstrado por ausência de exclusão do corante azul de tripam e por alta liberação de DHL (cerca de três vezes maior que o controle). Neste caso, como houve uma grande destruição celular foi possível a detecção de radical methyl para RSP pelo marcador DNBNS (membrana-impermeável). Em baixas concentrações de Cum-OOH (1 mM) e t-but-OOH em altas (25mM) e baixas concentrações (1 mM) não ocorreram alterações na viabilidade celular pelo teste de exclusão de azul de tripam e houve apenas modesta alteração do DHL. Ainda assim, a formação de radicais livres no meio extra-celular foi detectado por DNBNS. O benzoil peróxido não evidenciou formação de radicais livres. No experimento em que as células foram submetidas a hipóxia,

a produção de radical methyl foi significativamente aumentada, apesar de não ter sido demonstrado mudanças na viabilidade celular (azul de tripam) e na agressão celular (DHL).

DARR et al (1993) estudaram a síntese de colágeno e a produção de radicais livres em culturas de fibroblastos. Neste trabalho, as culturas de células foram submetidas aos efeitos da vitamina C (concentrações de 200  $\mu$ 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 radicais livres demonstrado pela presença de TBARS (Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) e também pelo malonaldeído. 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  $\mu$ M e 1mM, associada a catalase e a SOD também ocorreu aumento das taxas de TBARS, sem alteração da produção de colágeno. Com relação a 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.

KANEKO et al (1993) realizaram experimento em cultura de células endoteliais humanas obtidas de veias umbilicais. Foi utilizado o hidroperóxido do ácido linoleico (LOOH) como agente pró-oxidante e a vitamina C, o  $\alpha$ -tocoferol e quatro derivados lipofílicos da vitamina C (6-O-Palmitoyl, 6-O-Estearoyl, 2,6-O-Dipalmitoyl éster e 2-O-Octadecyl éster) como antioxidantes. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do azul de tripam. Os autores observaram que as culturas celulares incubadas com vitamina C (50 $\mu$ M e 500 $\mu$ M) 24 horas antes de serem colocadas em contato com LOOH, não foram protegidas do dano oxidativo. Porém, quando LOOH foi colocado em contato com culturas previamente incubadas com derivados lipofílicos da vitamina C os efeitos protetores se mostraram efetivos, porém pouco intensos. Quando as culturas foram expostas ao agente oxidante e a associação da vitamina C com  $\alpha$ -tocoferol também não houve diminuição do dano oxidativo, sendo que

quando a vitamina C foi substituída por seus derivados lipofílicos, ficou demonstrado efeito sinérgico na diminuição do estresse oxidativo.

BHATNAGAR (1994) estudou os fenômenos oxidativos em miócitos de ratos os quais foram irrigados com tert-butil hidroperóxido (t-BHP), um agente oxidante, dithiothreitol (DTT), um inibidor da oxidação de tiols; prometazina, que inibe a quebra de ácidos graxos insaturados e sulfato ferroso associado com ascorbato (Fé-ASC). Neste trabalho foram analisados as a carga energética total das células, ATP, ATP-ADP, TBAR (produto da peroxidação lipídica), tióis protéicos e não protéicos. Com o uso de Fé-Asc as células mantiveram-se viáveis (o que pôde ser demonstrado por sua capacidade de eliminar o corante azul de tripam) e mantiveram a morfologia durante todo o experimento. Embora tenha ocorrido um grande aumento na concentração da TBAR, não houve redução do tióis protéicos ou da carga energética total. Os tióis não protéicos e o ATP sofreram pequena redução. A prometazina inibiu o aumento de produtos da peroxidação lipídica induzida pelo Fé-Asc. O autor concluiu que o dano celular irreversível induzido pela ação dos radicais livres deve ser decorrente também da perda de tióis protéicos e que a carga energética total da célula e a peroxidação lipídica não mantêm

relação direta com a viabilidade dos miócitos submetidos ao estresse oxidativo.

MUKHOPADHYAY et al (1993) realizaram estudos do estresse oxidativo na peroxidação lipídica e na oxidação protéica de microsomas de células cardíacas de porcos da raça guinea. Neste estudo o estresse oxidativo foi induzido de duas maneiras diferentes: um pela presença de  $O_2^-$  (gerada pela ação da xantina-oxidase em acetaldeído) e o outro pela adição de NADPH às alíquotas examinadas. Vários antioxidantes foram testados, dentre eles a vitamina C (na concentração de  $100\mu M$ ) e avaliados pela peroxidação lipídica (formação de hidroperóxido lipídico-LOOH e de MDA) e pelo dano protéico (eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato poliacramida – SDS-PAGE). A deferroxamina foi utilizada com quelante de ferro. Como resultados os autores observaram que, na ausência de ferro livre, o estresse oxidativo iniciado pelo radical  $O_2^-$  é totalmente prevenido pela vitamina C e pela superóxido dismutase (SOD). A Catalase, o  $\alpha$ -tocoferol, a Glutathione, o Ácido Úrico, a Thiourea, o Manitol, e a histidina não foram efetivos. Na ausência do quelante de ferro, a produção de MDA e de LOOH não só não foi prevenida, como teve um aumento de 25% e 30%, respectivamente (o autor sugere a provável presença de metais “contaminantes” nos reagentes utilizados). Quando o

estresse foi iniciado pelo NADPH a produção de LOOH foi inibida exclusivamente pela vitamina C. O dano oxidativo de proteínas de microsossomos do fígado de porcos também foi totalmente inibido pela vitamina C, independentemente se o estresse oxidativo foi iniciado pelo  $O_2^-$  ou pelo NADPH. Os autores sugerem ainda que os resultados podem ser extrapolados ao homem, pois os porcos da raça guinea, assim como os seres humanos não produzem vitamina C.

MUKHOPADHYAY et al (1995) demonstraram que NADPH dá início a peroxidação lipídica e ao dano oxidativo de proteínas em microsossomos de todos os tecidos extra-hepáticos como pulmão, rim, glândula adrenal, cérebro, quando na ausência de ferro. Demonstrou também que tanto a peroxidação lipídica quanto o dano oxidativo são prevenidos de maneira específica pela vitamina C.

HERRICK et al (1996) realizaram estudos da produção de matriz extracelular (colágeno e fibronectina) por fibroblastos oriundos de úlceras isquêmicas ou pele normal. A pesquisa submeteu ainda as culturas de fibroblastos a hipóxia gasosa (por substituição dos gases da estufa por mistura contendo 95% de  $N_2$  e 5% de  $CO_2$ ), por 20 minutos, levando a uma  $pO_2$  menor

que 20 mmHg no meio de cultura. Os autores observaram que em condições normais de oxigênio, a produção de fibronectina foi equivalente nos fibroblastos derivados de úlceras isquêmicas quando comparados aos derivados de pele normal, sendo que estes produziram uma quantidade maior de colágeno. Quando os fibroblastos foram submetidos a hipóxia, não ocorreram diferenças quanto à produção de fibronectina, havendo uma diminuição da síntese de colágeno. Esta diminuição foi ainda maior nos fibroblastos derivados da pele normal do que nos derivados de úlceras isquêmicas. Os autores sugerem que possa haver uma adaptação lenta dos fibroblastos há um regime de hipóxia progressiva nas úlceras isquêmicas.

STEWART et al (1996) estudaram os mecanismos de dano do DNA por radiação ultravioleta B (UVB) na dose de 4 a 750 mJ/cm<sup>2</sup> e a ação da vitamina C (0,4 ou 0,8 µg/ml), selenita (5 ou 12,5 µM) e o Trolox<sup>®</sup> (análogo da vitamina E solúvel em água na dose de 10 ou 20 µg/ml). Os estudos foram realizados em queratinócitos de ratos cultivados (BALB/c MK-2). O dano sobre o DNA foi medido pela formação de 8-hidroxydeoxyguanosina (8OhdG), a viabilidade celular pelo método de exclusão de corante azul de tripam e a peroxidação lipídica pela produção de TBARS. Como resultados, observou que a viabilidade celular não se alterou com a dose de UVB. A

peroxidação lipídica aumentou após 24 horas da irradiação nas doses de 200 e 500 mJ/cm<sup>2</sup>. A peroxidação lipídica não aumentou após quatro horas de irradiação. O dano sobre o DNA foi maior com o aumento das doses de UVB e os três nutrientes diminuíram de maneira significativa o dano sobre o DNA irradiado.

TEBBE et al (1997) realizaram culturas de queratinócitos e as submeteu aos efeitos oxidantes da irradiação ultravioleta tipo A (UVA) na dose de 20 J/cm<sup>2</sup>. Utilizou a vitamina C como antioxidante nas concentrações de 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-6</sup>M por cinco dias e teve como marcadores do nível de agressão celular a desidrogenase láctica (DHL) e de lesão oxidativa o MDA, TBARS e o consumo de glutatona. Foram estudados também a secreção e a expressão de RNAm das inter-leucinas Il-1 $\alpha$  e Il-6. Como resultado, os autores observaram que a peroxidação lipídica induzida por UVA foi inibida pela vitamina C de maneira concentração dependente: o MDA teve redução de 47% e o TBARS mostrou redução de 49% quando comparado ao controle (que não recebeu vitamina C). A liberação de DHL foi 45% menor com a presença de vitamina C e a expressão de RNAm para Il-1 $\alpha$  mostrou-se semelhante a de células não irradiadas, quando na presença de vitamina C. Os resultados da expressão de RNAm para Il-6 foi semelhante para irradiados e não irradiados e não

apresentou mudanças ao ser colocado em contato com vitamina C. A secreção de Il-1 $\alpha$  e Il-6 foi significativamente maior em queratinócitos irradiados de que nos não irradiados. Nas culturas irradiadas e submetidas à vitamina C houve diminuição significativa de secreção destas citocinas. Assim, os autores concluem que a vitamina C apresentou um grande efeito protetor em queratinócitos humanos cultivados e submetidos à ação de UVA em relação a peroxidação lipídica e a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

DETMAR et al (1997) referiram-se à pele como um tecido composto, constituído por uma porção avascular (células epiteliais), com alta demanda metabólica e dependente da derme adjacente para sua nutrição. Este tecido passa por situações de hipóxia como na presença de tumores malignos e na cicatrização de feridas. Assim, para estudar a ação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), também chamado fator de permeabilidade vascular (VPF) os autores submeteram fragmentos de pele, culturas de fibroblastos, de queratinócitos e de células endoteliais a hipóxia. Para o estudo de VPF/VEGF foram analisadas sua expressão gênica (RNAm) em queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, bem como seus receptores (Flt-1 e KDR). As culturas foram submetidas a hipóxia por substituição do conteúdo gasoso das estufas por uma mistura contendo 95% de N<sub>2</sub> e 5% de

CO<sub>2</sub>. Os autores observaram que a expressão de RNAm para VPF/VEGF foi significativamente aumentada em queratinócitos, fibroblastos e em células endoteliais após 24 horas de cultura. A hipóxia também aumentou a expressão deste RNA nos três tipos de células. A expressão de receptor Flt-1 para VPF/VEGF foi induzido pela hipóxia enquanto que o receptor KDR foi inibido pela baixa concentração de oxigênio. Os autores concluíram que a hipóxia regula a angiogênese cutânea e a permeabilidade micro-vascular por dois mecanismos diferentes: induzindo a produção de VEGF/VPF em células epiteliais, mesenquimais e endoteliais e por dois mecanismos de modulação distintos de expressão de seus receptores nas células endoteliais.

GHOSH et al (1997) estudaram a peroxidação lipídica em microsomas de fígado de porcos. Aos microsomas foram adicionados NADPH-P450 redutase (inibidor da peroxidação lipídica), P450, quelante do ferro (deferroxamina, 20 μM), vários antioxidantes (testados) e anticorpo anti-P450. A vitamina C foi utilizada na concentração de 20μM. A peroxidação lipídica foi avaliada pela formação de dienos, hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e pelo MDA. Os autores observaram que a peroxidação lipídica iniciada por NADPH é tempo dependente e foi totalmente inibida pela vitamina C, medida pela formação de conjugados dienos (LOOH). Além disso, demonstraram também

que a peroxidação é mediada pelo citocromo P450 (processo foi completamente inibido com uso de anticorpos anti-P450). Outros agentes antioxidantes como superóxido dismutase, catalase,  $\alpha$ -tocoferol, manitol, ácido úrico, histidina, tiourea,  $\beta$ -caroteno e probucol não tiveram qualquer efeito sobre este sistema.

O'TTOLE et al (1997) estudaram o efeito da hipóxia sobre a motilidade dos queratinócitos humanos cultivados. A retirada de oxigênio das culturas foi feito pela introdução de uma mistura gasosa contendo 95% de nitrogênio e 5% de dióxido de carbono nas estufas de cultura por 18 horas. Os autores observaram que os queratinócitos colocados sobre uma camada de fibronectina e colágeno exibiram mobilidade 40% maior quando em hipóxia, quando comparados aos colocados em condições normais de oxigênio (controle). A hipóxia não alterou a síntese e secreção de proteínas pelos queratinócitos. Quando comparados ao grupo controle, os queratinócitos submetidos a hipóxia mostraram aumento na expressão e redistribuição de proteínas (ezrim, radixim e moesim) associadas à lamelopodia, que são alterações de conformação da membrana plasmática responsável pela motilidade celular. Observaram ainda que a hipóxia diminuiu a secreção de laminina-5, agente inibidor da motilidade de queratinócitos. A hipóxia não

alterou o número de receptores de membrana para integrina (receptores para EGF) e aumentou a secreção de colagenase tipo IV.

DURÃO JÚNIOR (1999), estudando os efeitos de fatores de crescimento sobre células renais submetidas à privação de glicose e hipóxia gasosa, utilizou modelo experimental onde a substituição dos gases se fez no interior das garrafas. Assim, cada garrafa foi fechada com uma rolha de silicone e lacrada com *parafilm*. Agulhas foram utilizadas para transfixar a rolha e através de uma destas agulhas, um sistema para infusão de mistura gasosa contendo 95% de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) foi conectado. Durante vinte minutos, 3 a 4 litros por minuto desta mistura foi conectada. Durante vinte minutos, 3 a 4 litros por minuto desta mistura foi infundida com a diminuição da concentração de oxigênio do meio de cultura para valores médios de 35mmHg (medidos por gasometria do líquido do meio de cultura). O autor concluiu que o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) permitiu uma redução da liberação de DHL e do fenômeno de apoptose em células renais MDCK.

DREHER et al (1999) demonstraram que o dano oxidativo é um evento bastante rápido e que a vitamina C previne este tipo de lesão se estiver presente em altas concentrações. A ausência de mecanismos que reciclem a

vitamina C pode resultar no seu rápido consumo e depleção com a conseqüente perda da capacidade de defesa antioxidante da célula.

SHIMMURA et al (1999) estudaram a formação de radicais livres e morte de células corneanas induzidas pelo uso de laser *excimer*. Antes da irradiação por laser utilizaram os seguintes antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), dimetil sulfóxido (DMSO) e EPCK-1 (um análogo das vitaminas C e E). Relataram que a formação de radicais livres ocorreu às custas do radical hidroxila e que sua formação foi inibida de forma dose dependente pela adição de DMSO e EPCK-1. O uso de superóxido dismutase não surtiu o mesmo efeito, o que foi explicado por sua atuação ser mais importante sobre o radical superóxido. Os autores inferiram que o resultado do uso de antioxidantes neste estudo pode significar que a formação dos radicais livres pode participar da regulação da cicatrização das lesões do estroma corneano, através do comprometimento da integridade da membrana celular ou atuando sinergicamente com outros fatores que favoreçam a apoptose.

GRAGNANI FILHO (1999) estudou o restabelecimento da barreira epidérmica avaliada pela medida da capacitância elétrica superficial (SEC) da epiderme em enxerto composto de queratinócitos cultivados e derme acelular

humana *in vitro* e *in vivo*. A medida da SEC *in vitro* foi realizada 24 horas após a elevação dos enxertos compostos à interface ar-líquido durante 30 dias. A avaliação microscópica dos enxertos compostos *in vitro* (n=6) demonstrou a formação parcial da camada córnea (SC) no terceiro dia e completa no sétimo dia após a elevação à interface ar-líquido. A medida da SEC e a avaliação microscópica delimitaram a formação do SC entre o quarto e o sexto dia. Os enxertos compostos *in vitro* foram transplantados para o dorso de cinco ratos atímicos após 10 dias em cultura. A auto-enxertia de pele foi realizada em três ratos. A medida da SEC dos enxertos compostos, auto-enxertos e pele normal do rato foi avaliada e foi mantido o baixo valor da SEC antes da enxertia, sugerindo que a interface ar-líquido favoreceu a maturação do enxerto composto *in vitro*. Não foi observada diferença estatística entre os enxertos de rato e a pele normal do rato. Quando comparada com os auto-enxertos de rato, a contração dos enxertos compostos foi significativamente maior. O autor concluiu que a medida da SEC é uma técnica não invasiva que determina um índice quantitativo da formação da barreira, que pode ser empregada em estudos experimentais e clínicos na definição do restabelecimento da barreira da epiderme.

SAVINI et al (2000) realizaram estudos referentes ao transporte e “reciclagem” da vitamina C em queratinócitos humanos da linhagem HaCaT. A vitamina C é transportada para o interior da célula por um sistema co-transportador  $\text{Na}^+$ -dependente e atinge o patamar máximo em cerca de seis horas após sua adição ao meio de cultura. A vitamina C ao entrar em contato com um radical livre vai inativá-lo, sofrendo um processo de redução para dar origem ao ácido dehidroascórbico (DHA). Neste trabalho os autores demonstraram que o DHA presente no interstício é transportado para o interior das células por um outro sistema transportador  $\text{Na}^+$ -independente e mediado positivamente por transportadores de hexose. Esta entrada de DHA é bastante rápida, atingindo seu patamar máximo cerca de 30 minutos após o início do processo. Ao penetrar na célula, o DHA sofrerá a ação de mecanismos enzimáticos (provavelmente mais de uma enzima) com atividade redox (disulfide/dithiol), glutathione-independente, que acaba por regenerar DHA em vitamina C.

DUARTE (2001) realizou estudos em cultura de queratinócitos submetidos a hipóxia gasosa e a privação de glicose, com e sem uso de um antioxidante, DMSO, avaliado através da dosagem do MDA. Concluiu que o DMSO foi eficiente na redução do estresse oxidativo de culturas de

queratinócitos, causado pela privação de glicose e hipóxia, avaliado pelos valores de MDA comparando-se aos grupos controle.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. CULTURA DE CÉLULAS**

Quanto à cultura de queratinócitos, foram realizadas as seguintes etapas:

##### **3.1.1. Cultura de fibroblastos J2-3T3**

Para cultura de queratinócitos foi necessário o desenvolvimento de uma cultura prévia de fibroblastos, chamada de camada sustentadora. Os fibroblastos utilizados neste trabalho são de origem de ratos, da linhagem 3T3-J2, originalmente fornecidos por HOWARD GREEN (do Departamento de Biofísica e Fisiologia da Harvard Medical School, Boston, Ma).

Os fibroblastos 3T3-J2 descongelados foram colocados em garrafas de plástico de 175 cm<sup>2</sup>, na quantidade de  $5 \times 10^5$  células por garrafa com meio de cultura para 3T3-J2.

Após a semeadura das células nas garrafas, os cuidados com relação ao meio gasoso foram tomados da seguinte maneira: preenchimento

das garrafas com mistura de CO<sub>2</sub> a 10% em ar por 10 segundos, sendo então procedido o firme fechamento das garrafas, que foram colocadas em incubadora úmida com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e 37° C por duas horas. Após este período, a tampa da garrafa foi aberta permitindo a saída do excesso de gás produzido. A tampa da garrafa foi então parcialmente fechada (para manter o pH da garrafa em equilíbrio com o do meio ambiente - 7,2) e novamente armazenada em incubadora.

O crescimento celular foi observado diariamente em microscópio específico e os meios de cultura trocados a cada dois dias.

O crescimento das células manteve a linhagem 3T3-J2 e supriu a necessidade da camada sustentadora para o cultivo de queratinócitos.

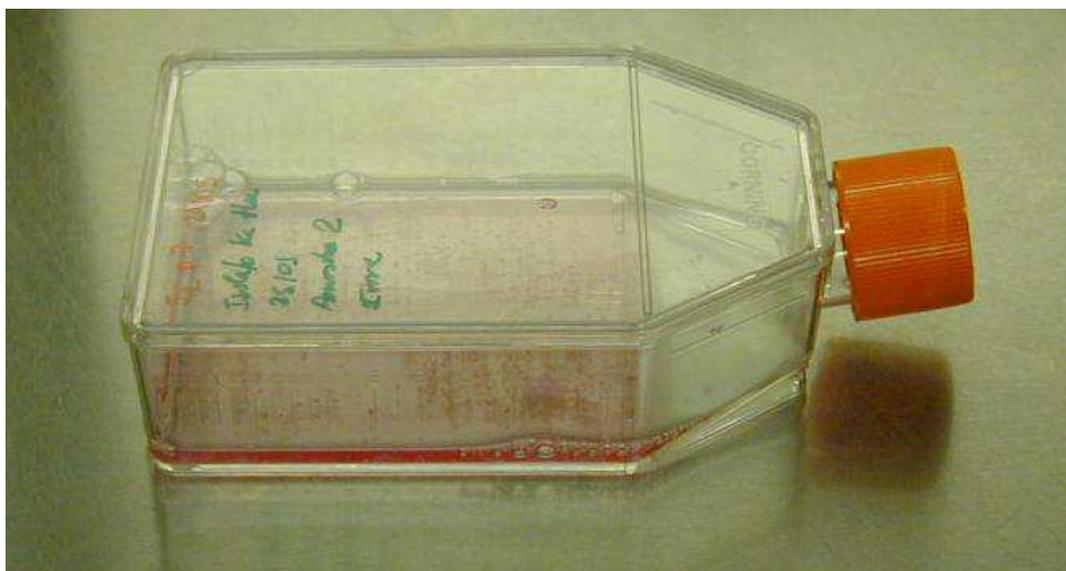


Figura 1: Garrafa de cultura (175cm<sup>2</sup>) com células 3T3-J2.

### 3.1.2. Cultura de queratinócitos humanos

#### 3.1.2.1. Coleta da pele

Fragmentos de pele de prepúcio de crianças submetidas a postectomias foram coletados e colocados em tubos cônicos estéreis de 50 ml, contendo 30ml do meio de cultura para queratinócitos sem fatores de crescimento. Estes frascos permaneceram a baixas temperaturas em caixa de isopor preenchida com gelo. As biópsias assim obtidas foram processadas até 6 a 8 horas após sua obtenção.

Todos os doadores tiveram termo de consentimento assinado pelos pais.



Figura 2: Biópsia de pele para isolamento dos queratinócitos.

### **3.1.2.2. Cultura propriamente dita**

A cultura dos queratinócitos foi realizada de acordo com o método descrito por GREEN et al (1979), revisado em 1985. Em cada experimento foram utilizadas diferentes linhagens de queratinócitos.

Após a realização do isolamento e a adição dos queratinócitos às garrafas previamente semeadas com fibroblastos da linhagem J2-3T3 (50% de confluência), as mesmas foram colocadas em estufa aquecida a 37°C. A fase gasosa foi mantida pela abertura parcial da tampa das garrafas quando as mesmas se encontravam dentro da estufa, onde a concentração de gases é mantida constante (5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar).

O meio de cultura fora trocado a cada dois a três dias e foi constituído por uma mistura 3:1 de DMEN e meio F12 de HAM, ou seja, 750ml:250ml respectivamente para um total de 1 litro; suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS); 24mg de adenina; 1mg de toxina do cólera (*Vibrio Cholerae*, Tipo Inaba 569B); 2 ml de penicilina/estreptomicina; 2ml de hidrocortizona; 1ml de transferrina/triiodo-L-tironina (transferrina humana, parcialmente saturada de ferro), (3,3',5 triiodo-L-tironina, sal sódico); 1,3ml de insulina; o pH foi ajustado em 7,2. Este meio foi esterelizado com filtro 0,45µm e armazenado em refrigerador de 2 a 4°C, mostrando coloração vermelha.



Figura 3: Cultura de queratinócitos em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>

### 3.2. HIPÓXIA

Cada garrafa de cultura foi fechada com rolha de silicone e lacrada com parafilm. Utilizamos duas agulhas para transfixar a rolha e através de uma destas agulhas foi conectado um sistema para infusão de mistura gasosa contendo 95% de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Durante 30 minutos, 3 a 4 litros por minuto desta mistura gasosa foi infundida com a intenção de promover a maior substituição possível do conteúdo gasoso da garrafa. Ainda durante a infusão, as garrafas foram mantidas sobre agitador de maneira a garantir equilíbrio gasoso entre líquido e gases no interior da garrafa, conforme proposto por DURÃO JR, 1999.

As garrafas de cultura que não foram submetidas à hipóxia foram retiradas da incubadora e agitadas pelo mesmo período.

Após o término do período de hipóxia todas as garrafas foram abertas para os procedimentos de extração de DHL e dosagem do MDA.



Figura 4: Sistema de gases contendo 95% de  $N_2$  e 5% de  $CO_2$ .

### 3.2.1. Estabelecimento do tempo de hipóxia

O tempo de hipóxia foi de 30 minutos, tendo sido determinado em projeto piloto preliminar a realização deste trabalho. Os resultados obtidos para definição do tempo de hipóxia encontram-se demonstrados em anexo.

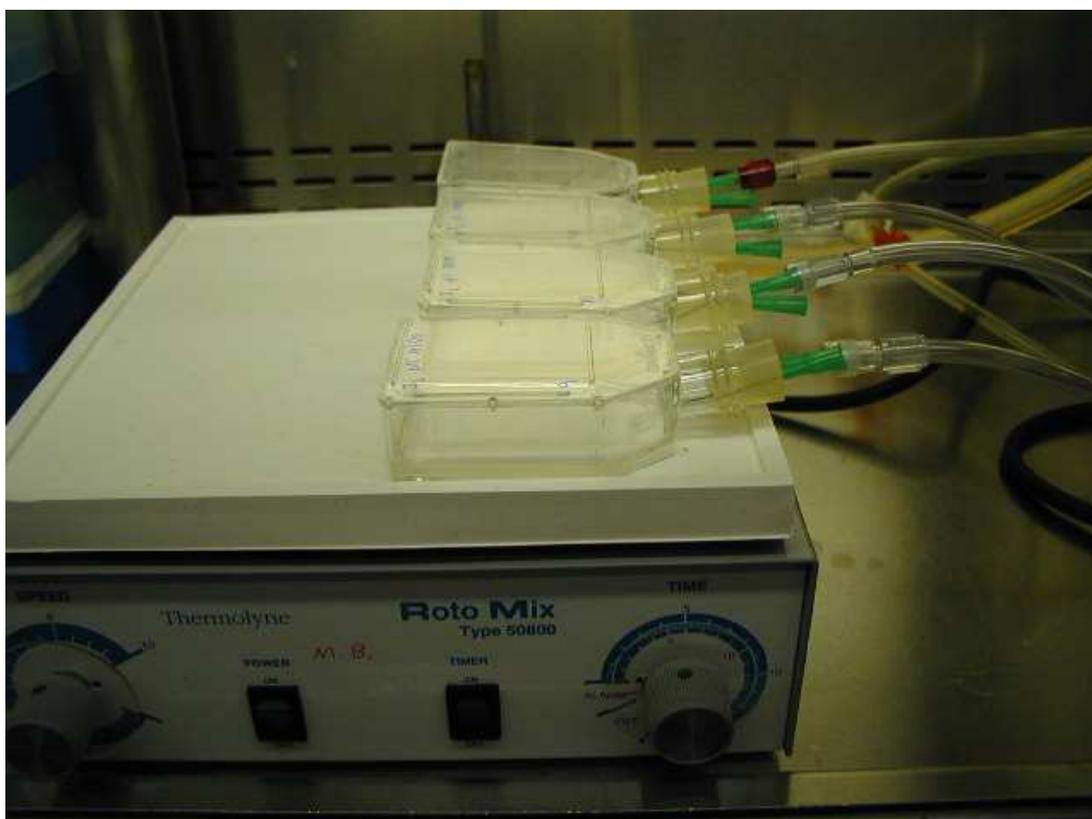


Figura 5: Garrafas submetidas a substituição gasosa por 30 minutos.

### **3.3. Permeabilidade da membrana celular**

A liberação da enzima intracelular desidrogenase láctica (DHL), foi utilizada como marcador de lesão da membrana celular. A relação entre a atividade do DHL extracelular (meio de cultura) e a atividade total (celular + meio de cultura) guardando uma relação com o grau de lesão celular.

A enzima DHL cataliza a redução do piruvato a lactato. No ensaio a conversão de piruvato a lactato, associada a oxidação estequiométrica de NADH a NAD foi seguida espectrofotometricamente ( HITACHI U-3210, Japão) contra um branco a 340 nm: Piruvato + NADH  $\leftrightarrow$  Lactato + NAD<sup>+</sup> . Durante toda a leitura, as amostras foram mantidas sob agitação e temperatura de 25°C constantes.

#### **3.3.1. DHL no meio de cultura**

Todo o meio de cultura foi aspirado e transferido para um tubo cônico, centrifugado a 2000 rpm durante quatro minutos e a seguir, o sobrenadante foi retirado para leitura, utilizando-se 300µl da amostra, 100 µl da solução de piruvato de sódio a 10%, 100 µl de solução de NADH 2mM, 100 µl de

solução de Tris HCL 1M EDTA 5 mM pH de 8,0 e 400 µl de água destilada para completar o volume final de 1 ml.

### 3.3.2. DHL celular

Realizada a aspiração de todo o meio de cultura, as células foram lavadas com 5 ml de PBS por duas vezes. A seguir, adicionou-se 500 µl de solução do detergente Triton X-100 (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) a 1% e as garrafas de cultura foram incubadas a 37°C por um período de 30 minutos para a ocorrência da lise celular. As células foram raspadas das garrafas e o conteúdo levado para leitura. Utilizamos 50 µl desta amostra, 100 µl de solução de piruvato de sódio a 10%, 100 µl de solução de NADH 2 mM, 100 µl de solução Tris HCL 1M EDTA 5mM pH de 8,0 e 650 µl de água destilada para completar o volume final de 1 ml.

Os resultados foram expressos e porcentagem (%) de liberação de DHL.

$$\text{DHL} = \frac{\text{ATIVIDADE DA ENZIMA NO MEIO DE CULTURA}}{\text{ATIVIDADE TOTAL DA ENZIMA (Meio + célula)}} \times 100$$



Figura 6: Garrafa de cultura e espátula utilizada para realização do raspado dos queratinócitos.

### **3.4. Peroxidação lipídica**

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico com determinação do MDA (PERCÁRIO, 1994).

Para a dosagem do MDA, foram colhidas amostras das células cultivadas e dos meios de cultura, que foram armazenadas a 4°C por até sete dias e depois desse período à -80°C. A dosagem das concentrações de MDA

nas amostras de meio de cultura e nas de homogeneizado celular foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico, em que a 500µl da amostra junta-se 1,0ml do reagente do ácido barbitúrico (TBA 1mM em KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 75mM). Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C/60 minutos), após a incubação, deixa-se esfriar a temperatura ambiente ou em água corrente. Adiciona-se 4,0ml de álcool n-butílico, homogeneiza-se bem e centrifuga-se a 3000rpm por 15 minutos. Coleta-se 3,0 ml do sobrenadante para a leitura espectrofotométrica a 535nm. Duas leituras são realizadas e o valor final de absorbância é determinado pela média das duas leituras. Com o valor de absorbância determina-se a concentração de MDA, a qual é expressa em ng/ml. O intervalo de normalidade empregado é de 0 a 440ng/ml.

### **3.5. Vitamina C**

A vitamina C utilizada neste experimento foi o L-Ascorbic Acid obtida do laboratório Sigma Chemical Company®.

#### **3.5.1. Dose utilizada**

A dose de vitamina C utilizada neste trabalho foi a de 50µg/ml (PONEC, M., et al, 1997).

### **3.5.2. Definição do momento da administração da vitamina C**

As garrafas que receberam vitamina C foram suplementadas 8 horas antes da hipóxia e cinco minutos antes da retirada do oxigênio.

### **3.6. Grupos de estudo**

Os grupos de estudo foram assim divididos:

- GRUPO CONTROLE SEM VITAMINA C (G-1)
- GRUPO CONTROLE COM VITAMINA C (G-2)
- GRUPO DE HIPÓXIA SEM VITAMINA C (G-3)
- GRUPO DE HIPÓXIA COM VITAMINA C (G-4)

### 3.7. Experimentos:

Os queratinócitos cultivados, logo que atingiram a confluência total das 40 garrafas foram divididos nos quatro grupos acima descritos e assim distribuídos:

<b>Grupos de experimento</b>	<b>Número de garrafas</b>
Grupo 1 – Controle sem VITAMINA C	10
Grupo 2 – Controle com VITAMINA C	12
Grupo 3 – Hipóxia	12
Grupo 4 – Hipóxia com VITAMINA C	14
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>

### 3.8. Método estatístico

Para avaliarmos possíveis diferenças entre os grupos previamente definidos, tanto para a variável DHL quanto para a variável MDA usamos o teste não paramétrico para “k” amostras independentes de Kruskal-Wallis, complementado quando necessário pelo teste de comparações múltiplas.

O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05 (5%).

Quando a estatística calculada apresentou significância usamos asterisco (\*) para caracterizá-la, caso contrário, isto é, não significante usamos NS.

As médias foram calculadas e apresentadas a título de informação.

Não se calculou desvio-padrão pois, usando-se métodos não paramétricos estamos pré-supondo que as variáveis em causa não se comportam como curva de Gauss e, portanto, não há sentido em seu cálculo.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Dosagem de DHL**

Os resultados da dosagem de DHL nas amostras dos quatro grupos de estudo, constituídos de grupo controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, suas respectivas médias e resultados estatísticos são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Dosagem de DHL nas amostras das garrafas dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, respectivas médias e resultados estatísticos.

Controle	Controle com vitamina C	Hipóxia	Hipóxia com vitamina C
16,91	7,39	76,47	3,59
2,82	7,41	55,15	10,56

	13,50	5,80	64,71	10,69
	19,59	12,44	49,21	14,25
	6,22	9,93	25,47	4,56
	5,64	11,59	52,72	9,93
	5,77	5,26	54,23	11,15
	5,03	5,93	59,57	9,76
	7,19	6,83	68,56	6,18
	9,62	5,88	69,68	7,99
		6,18	58,73	10,69
		6,37	44,91	9,89
				9,23
				10,58
<hr/>				
Média	9,23	7,58	56,62	9,22

Teste de KRUSKAL-WALLIS

$X^2$  Calc = 27,433

Comparações significantes:

- Controle (G1) menor que Hipóxia (G3);
- Controle com vitamina C (G2) menor que Hipóxia (G3);
- Hipóxia com vitamina C (G4) menor que Hipóxia (G3).

## 4.2. Dosagem do MDA

Os resultados da dosagem de MDA nas amostras dos quatro grupos de estudo, constituídos de grupo controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, as respectivas médias e resultados estatísticos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Dosagem de MDA nas amostras das garrafas dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C, respectivas médias e resultados estatísticos.

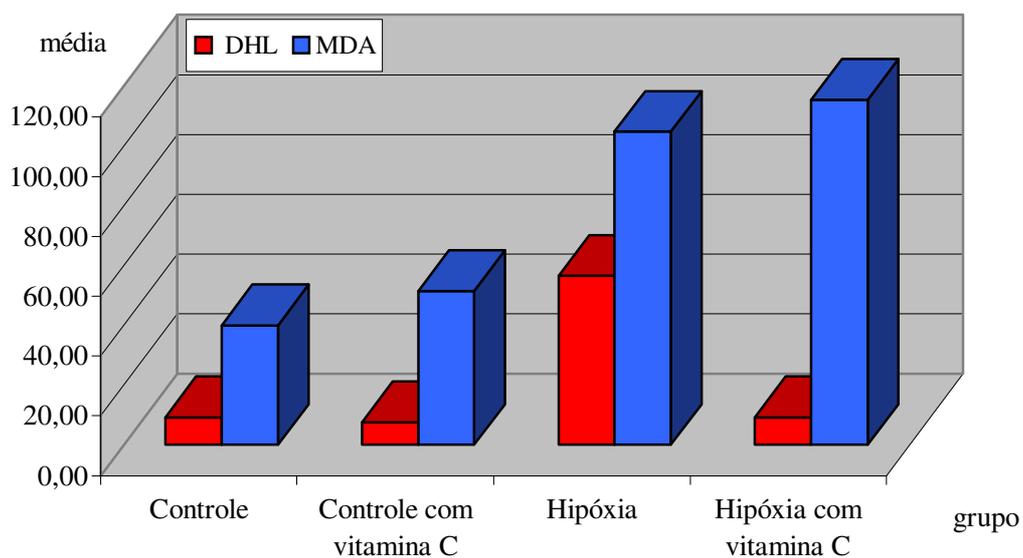
	Controle	Controle com vitamina C	Hipóxia	Hipóxia com vitamina C
	14,00	127,00	56,00	99,00
	71,00	56,00	141,00	123,00
	56,00	56,00	141,00	198,00
	71,00	28,00	183,00	71,00
	14,00	14,00	28,00	42,00
	14,00	28,00	14,00	42,00
			28,00	42,00
			169,00	254,00
			183,00	169,00
Média	40,00	51,50	104,78	115,56

Teste de KRUSKAL-WALLIS

$X^2$  Calc = 6,289 NS

Os resultados encontrados referentes dosagens de DHL e do MDA foram analisados através das médias de cada grupo, as quais foram demonstrados no gráfico 1.

**Gráfico 1-** Médias das dosagens de DHL e do MDA dos grupos controle, controle com vitamina C, hipóxia e hipóxia com vitamina C.



## 5. DISCUSSÃO

O conhecimento dos elementos que podem influenciar o comportamento biológico dos queratinócitos é de grande importância para a manutenção da homeostase do meio interno, seja por promover um melhor processo cicatricial mais próximo do ideal, seja pelo controle de doenças a ele relacionadas. Na cicatrização de feridas os queratinócitos constituem-se em um dos mais ativos grupos de célula, promovem a re-epitelização por complexas etapas que envolvem estímulos inflamatórios, proliferação, adesão, migração, maturação celular e produção de fatores de crescimento que irão atuar sobre as próprias células epiteliais ou em células da derme subjacente (LIANCUN et al, 1996).

No tratamento de queimaduras extensas, por vezes o paciente não apresenta áreas doadoras suficientes para a retirada de enxertos de pele. GREEN et al (1979) realizaram transplantes de células epidérmicas humanas cultivadas em camundongos atímicos e obtiveram epiderme humana nesses animais, o que estimulou o uso clínico de células cultivadas.

Em 1984, GALLICO et al descreveram o uso de queratinócitos autólogos cultivados em duas crianças vítimas de queimaduras que atingiam

mais de 95% da superfície corpórea, relatando boa epitelização, mas sem referência de resultados em longo prazo.

WOODLEY et al (1988) chamou atenção para o fato de que a ausência de derme nas queimaduras de terceiro grau compromete o resultado final dos enxertos autólogos cultivados, que se apresentam frágeis, suscetíveis a formação de bolhas e escaras.

Com isso, vários substitutos dérmicos passaram a ser estudados, procurando resolver a falta de resistência dos enxertos de queratinócitos e mantendo uma barreira epidérmica eficiente (GRAGNANI,1999).

Melhorado o problema da resistência tecidual e da eficiência da barreira epidérmica, ainda persistem dificuldades pela ocorrência freqüente de bolhas, provavelmente pela inadequada adesão na junção dermo-epidérmica. Ao nosso ver, o uso clínico de queratinócitos cultivados ainda encontra-se restrito a vítimas com perdas de extensas áreas de cobertura cutânea e devem estar associados ao uso de substitutos dérmicos. GRAGNANI (1999) demonstrou que a associação de substituto dérmico (derme acelular humana) com enxerto de queratinócitos humanos cultivados permite a formação de uma barreira epidérmica eficiente. Este trabalho foi muito importante não apenas pela metodologia aplicada para a comprovação da eficiência da barreira dermo-epidérmica, mas também por trazer uma conclusão fundamental para a

aplicabilidade clínica dos enxertos de queratinócitos humanos cultivados sobre derme acelular.

Apesar de ainda persistirem problemas a serem solucionados, referentes a aplicabilidade clínica das culturas de queratinócitos, seu uso como instrumento para pesquisa do comportamento biológico das células epiteliais tem sido de grande importância. Inúmeros autores têm utilizado estas culturas celulares para estudo de citocinas produzidas por células epiteliais (ou que nela agem), receptores de membrana, proliferação, migração e diferenciação celular, atuação gênica, mecanismos de apoptose e necrose, dentre outros.

### **5.1. O MODELO EXPERIMENTAL**

Os modelos experimentais de pesquisa sobre necrose têm evoluído nas últimas décadas. Inicialmente, a inviabilidade clínica de um determinado tecido era justificada principalmente por motivos anatômicos, levando os pesquisadores a se dedicarem a dissecções em cadáver para um aprofundamento nos conhecimentos da anatomia vascular dos retalhos (FERREIRA, 1986 a,b,c). A evolução do conhecimento anatômico permitiu a diminuição de necroses em um grande número de retalhos, sem entretanto

impedí-la. Com o objetivo de diminuir estas ocorrências, os estudos passaram a ser realizados para um melhor conhecimento da fisiologia vascular e de aspectos hemodinâmicos dos tecidos. Enquanto os estudos anatômicos eram realizados predominantemente em cadáveres, aqui se fez necessário a participação de seres vivos para se tentar alcançar as conclusões desejadas. Animais de pequeno porte como cães, porcos, coelhos e principalmente ratos auxiliaram em importantes descobertas (GOMES, 1993; ASHOORI, 1994; DUARTE, 1996; HUFFENBAECHER, 1996; LIANCUN, 1996; SANTOS, 1996; ABLA, 1997; GOMES, 1997; CYNROT, 1999; FABIAN, 2000; OKAMOTO, 2001).

Na medida em que a medicina foi evoluindo para encontrar explicações sobre os processos bioquímicos de morte celular, estes modelos experimentais em animais passaram a não ser a melhor opção. Ao se pesquisar a ação de uma determinada droga sobre a necrose tecidual em um animal, mostrou-se difícil a comprovação específica sobre qual dos constituintes do tecido a droga realizava seu efeito (vasos, nervos, mesênquima, etc). Os conhecimentos a respeito das culturas de tecido em laboratório vem permitindo estudos mais específicos da ação de drogas sobre cada um destes constituintes celulares, sendo hoje uma importante ferramenta de trabalho nos principais centros mundiais de produção de conhecimento em Cirurgia Plástica e Dermatologia.

Modelos experimentais com frações de constituintes celulares (membrana, mitocôndria, núcleo) também têm se mostrado eficiente para estudo de sistemas específicos.

No nosso meio, estudos sobre viabilidade de tecidos têm seguido esta mesma trajetória. Trabalhos anatômicos e clínicos de grande importância sobre vascularização de retalhos fácio-cutâneos (FERREIRA, 1986a,b,c) foram seguidos de estudos em animais e recentemente em cultura de células.

GOMES (1993) desenvolveu estudo em ratos, mostrando o importante papel da nicotina sobre retalhos isquêmicos. Este trabalho trouxe grande contribuição por sua aplicabilidade, pois concluiu que a interrupção do fumo nos períodos pós-operatórios diminui significativamente a chance de ocorrência de necroses. Porém, como este estudo foi realizado em retalhos, não foi possível estabelecer o nível da agressão relativo da nicotina sobre os diversos constituintes do retalho. Devido à importância do tabagismo em nossa sociedade, achamos que novos estudos em cultura de células ainda devam ser realizados, para a busca de drogas que diminuam os efeitos nocivos da nicotina.

CYMROT (1999) realizou o mesmo retalho no rato para estudar o comportamento do estresse oxidativo e a defesa oxidante no pós-operatório, concluindo que o nível de MDA no soro aumentou significativamente entre

pós-operatório imediato, 3º dia pós-operatório e 7º dia pós-operatório. A avaliação da capacidade antioxidante total no soro não apresentou diferença, sendo porém observado diminuição significativa das defesas antioxidantes no interior dos retalhos com o decorrer do tempo pós-operatório. Este trabalho foi importante por observar não apenas a agressão oxidativa (pelo MDA), como também o comportamento das defesas antioxidantes nos retalhos cutâneos.

Dentro desta linha de estudo, OKAMOTO (2001) estudou o estresse oxidativo nos retalhos isquêmicos no rato na fase aguda (até uma hora da elevação do retalho), concluindo que a produção de radicais livres é maior nas fases mais precoces após o ato cirúrgico. Este trabalho veio comprovar a necessidade de atuação precoce com drogas antioxidantes para se evitar necroses cutâneas causadas por isquemia agudas.

DUARTE (1996) demonstrou efeito do DMSO na diminuição da necrose em retalhos isquêmicos do dorso de ratos, creditando esta melhora de viabilidade tecidual a sua ação antioxidante. HUFFENBAECHER (1996) estudou o manitol e ABLA (1997) estudou a N-acetilcisteína como antioxidantes no mesmo modelo experimental. Estes modelos experimentais foram importantes no estabelecimento de drogas que possam diminuir a necrose tecidual por isquemia, mas merecendo ainda novas etapas para estabelecimento do padrão de consumo das defesas antioxidantes. Além disso,

o estudo destas drogas em cultura de células poderia trazer resultados mais específicos quanto à sua ação sobre os queratinócitos.

DUARTE (2001) prosseguiu nos estudos de DMSO, demonstrando que o mesmo é capaz de diminuir a peroxidação lipídica em cultura de queratinócitos humanos submetidos a hipóxia. Achamos que esta continuidade de trabalho foi bastante esclarecedora a respeito do papel do DMSO nas culturas de queratinócitos, devendo ainda ser estudado o comportamento das defesas antioxidantes na presença de DMSO.

SANTOS (1996) descreveu a redução da necrose em retalhos isquêmicos de ratos, submetidos aos efeitos da vitamina C, tendo entretanto observado um aumento significativo da peroxidação lipídica no interior dos retalhos. Resultados semelhantes foram obtidos por ABLA (1997). Este resultado discrepante da melhora da viabilidade dos retalhos com o uso de antioxidantes, apesar da maior produção de radicais livres observada nos estudos de SANTOS (1996) e ABLA (1997), nos intrigou, levando ao prosseguimento desta linha de estudos. Diferentemente, ASHOORI (1994) demonstrou a relação de dependência entre o nível de peroxidação lipídica e o grau de necrose dos retalhos, resultados semelhantes aos obtidos por DUARTE (1996) e HUFFEMBAECHER (1996). Consideramos que estas

diferenças encontradas deverão ser explicadas com estudos mais específicos dos fenômenos oxidativos em culturas de células.

Estudando drogas que pudessem diminuir o espasmo dos vasos coronarianos, KIYOTAKA et al (1998) demonstrou que a vitamina C possui potente efeito anti-vasoconstricção. Assim sendo, a diminuição da necrose observada por SANTOS (1996), creditada aos efeitos celulares antioxidantes da vitamina C, podem ter ocorrido também pela inibição do vasoespasmo. Com estes conhecimentos, demos prosseguimento ao nosso estudo, excluindo a ação vascular da vitamina C, em modelo experimental de cultura de queratinócitos humanos, submetidos à privação de um componente nutricional: o oxigênio e com suplementação de outro componente: a vitamina C.

### **5.1.1. Cultura de queratinócitos**

Neste estudo, utilizamos o modelo de cultura descrito por GREEN et al (1979) e revisado em 1985, que se mostrou satisfatório. Neste modelo, o cultivo inicia-se pela semeadura de fibroblastos da linhagem 3T3-J2 que foram gentilmente cedidos por HOWARD GREEN. Após atingir um crescimento adequado, foram adicionados os queratinócitos (anteriormente

isolados) que se proliferaram e se agruparam em colônias de maneira constante e semelhante nas diversas garrafas, o que possibilitou a realização dos experimentos em condições bastante parecidas para posterior comparação.

O momento que elegemos para realização dos experimentos foi quando as culturas atingiram uma confluência bastante próxima do total da superfície das garrafas. Esta confluência era facilmente observada pela pouca existência de espaços não ocupados pelos queratinócitos e pela ausência praticamente total de fibroblastos (que foram desaparecendo a medida que as colônias foram se confluindo).

A escolha da fase de confluência poderia ser: pré-confluente (espaços abundantes entre as colônias), confluentes (praticamente ausência de espaços entre as colônias) e pós-confluentes (além de não existir espaços entre as colônias, os queratinócitos já começam a se apresentar em várias camadas). A fase pré-confluência foi descartada porque poderíamos ter um número de fibroblastos ainda grande e os resultados alcançados não poderiam ser imputados ao comportamento exclusivo dos queratinócitos. A fase pós-confluente também foi descartada já que estas colônias, ao confluírem passam a se estratificar em diversas camadas e diferenciam-se, podendo assumir comportamento diferente (talvez menos sensíveis a hipóxia). Assim, optamos pelas culturas em fase intermediária, que chamamos de confluentes.

FALANGA et al (1991) utilizou padronização semelhante quanto à confluência de fibroblastos em seus estudos. Ao final dos experimentos consideramos a escolha adequada, propondo que novos estudos devam ser realizados com as culturas de células epiteliais em fase pós-confluência para comparação com os resultados aqui obtidos.

Não observamos ocorrência de contaminações.

### **5.1.2. A privação de oxigênio**

A preocupação com a boa nutrição dos tecidos acompanha praticamente a história da medicina. Patologias que hoje têm sua fisiopatologia bem estabelecida pelos conhecimentos dos fenômenos da isquemia, com ou sem re-perfusão, como as obstruções vasculares dos diversos territórios da anatomia humana têm sido objeto de muitos estudos por parte de pesquisadores. Indivíduos idosos com doenças vasculares e má perfusão dos membros inferiores são freqüentemente afetados por úlceras cutâneas de difícil

cicatrização. Retalhos ou enxertos podem ser necessários para fechamento dessas lesões.

A hipóxia está relacionada a diversos fatores que podem dificultar a cicatrização de feridas, tais como diminuição da proliferação de fibroblastos, da produção do colágeno (HERRICK et al, 1996) e da angiogênese (DETMAR et al, 1997).

Enquanto a hipóxia pode dificultar o processo de cicatrização, altas concentrações de oxigênio (câmara hiperbárica) têm sido descritas como elemento útil na resolução de feridas e integração de enxertos (COELHO, 2000).

De maneira oposta, O'TOOLE (1998) demonstrou que queratinócitos cultivados apresentam maior capacidade de migração quando submetidos a hipóxia gasosa. A proliferação celular também mostrou-se aumentada em culturas de queratinócitos submetidos à hipóxia gasosa (LIANCUN, 1996). Estes achados mostram-se aparentemente contraditórios com a experiência clínica de que tecidos melhor perfundidos com oxigênio acabam por cicatrizar mais rapidamente. Devemos lembrar que os fenômenos que ocorrem na epiderme (queratinócitos) podem mesmo depender menos do oxigênio, pois este é um tecido avascular (DETMAR et al, 1997). Assim, os efeitos benéficos da hipóxia sobre a migração e proliferação dos queratinócitos podem não ser

mais importantes, *in vivo*, que os efeitos deletérios da hipóxia sobre os demais grupos de células (dérmicas, vasculares, inflamatórias, etc) atuantes na cicatrização das feridas. Além disso, estudos em culturas não levam em consideração a influência da proliferação bacteriana que ocorre nas úlceras isquêmicas *in vivo*. Por outro lado, FABIAN et al (2000) estudou a influência do oxigênio hiperbárico (HBO) e a pressão subatmosférica (VAC) em feridas isquêmicas da orelha de coelhos e observou que o HBO não aumentou a epitelização e a formação de tecido de granulação. O curativo VAC aumentou a epitelização e a formação de tecido de granulação. Estes resultados do HBO são controversos com outros trabalhos da literatura, demonstrando que novos estudos sobre a ação do oxigênio nos diversos constituintes da pele devam ser realizados.

Vários modelos de privação de oxigênio têm sido utilizados, mas os mais freqüentes realizam a substituição gasosa do ambiente onde as células se encontram. Esta privação pode ser realizada na estufa onde são mantidas as garrafas, conforme FALANGA et al (1991), HERRICK et al (1996) e O'TTOLE et al (1997) ou nas próprias garrafas como IANNONE et al (1993) e DURÃO JUNIOR (1999).

A substituição gasosa nas estufas impede sua utilização simultânea para outros experimentos. Como grupos de pesquisadores normalmente usam a

mesma estufa para manutenção de suas culturas celulares, somente centros que possuem vários destes equipamentos podem realizar este modelo. Quando a substituição gasosa é feita diretamente nas garrafas em que as células são cultivadas, pode-se obter uma diminuição significativa da presença de oxigênio com custos relativamente baixos. Em seu estudo, DURÃO JUNIOR (1999) demonstrou que com este método a  $pO_2$  no líquido de cultura fica em torno de 35mmHg. Assim, chamamos de hipóxia e não anóxia, o estresse oxidativo que ocasionamos. Consideramos que a hipóxia realizada no presente estudo foi suficiente para promover uma significativa agressão celular evidenciada pela liberação de DHL para o meio extracelular.

O tempo de hipóxia foi definido por projeto piloto realizado previamente e que consideramos adequado.

Vale ainda discutir outros efeitos da hipóxia sobre os queratinócitos, como os estudados por O'TTOLE et al (1997). Este trabalho demonstrou que a hipóxia aumentou a mobilidade, a produção de colagenase tipo IV e a produção de proteínas relacionadas a lamelopodia (ezrim, radixim e moesim) pelos queratinócitos. Assim achamos que o modelo de substituição gasosa pode ser útil em outros estudos da atividade de queratinócitos.

### 5.1.3. A vitamina C

Dentre as várias substâncias com ação anti-oxidante enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase) e não enzimáticas (beta-caroteno, glutathione, o  $\alpha$ -tocoferol e a vitamina C) (TEBBE et al, 1997) escolhemos a vitamina C por ser uma substância não produzida pelo metabolismo humano, ter pouca toxicidade, baixo custo e fácil uso na prática clínica.

KANEKO et al (1993) utilizou derivado lipofílico da vitamina C como antioxidante. Este estudo foi interessante pois este derivado teria maior presença na camada lipídica da membrana celular, onde predominantemente ocorre a peroxidação lipídica. Porém os resultados observados pelos autores, com relação a diminuição do estresse oxidativo, foram pouco efetivos.

A dose utilizada de 50 $\mu$ g/ml de vitamina C foi obtida a partir de trabalhos da literatura (PONEC, et al 1997). Outros autores ainda utilizaram doses bastante diferentes: LIEBLER et al (1986) 0,1 a 1,0 mM; DARR et al (1993) 200 $\mu$ M e 1 mM; KANEKO et al (1993) 50 $\mu$ M e 500 $\mu$ M; STEWART et al (1996) 0,4 ou 0,8  $\mu$ g/ml; TEBBE et al (1997)  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$ M; GHOSH et al (1997) 20 $\mu$ M.

Como visto, existe grande variação nas doses utilizadas de vitamina C nos diversos trabalhos da literatura, muitos dos quais fizeram uso de várias concentrações na busca do efeito mais adequado. Em consequência disto, achamos que a dose ou concentração ideal não está definitivamente aceita e trabalhos futuros ainda deverão estabelecê-la. De posse destes dados da literatura, tivemos que decidir qual a dose a ser utilizada neste estudo e seguimos a proposta por PONEC et al (1997) pois a concentração obtida de vitamina C ( $250\mu\text{M}$ ) é a mais próxima ao que deve ser encontrada no plasma humano (LEVINE et al, 1998).

SAVINI et al (2000) demonstrou que a vitamina C sofre processo ativo de penetração no interior da célula e que o tempo para se alcançar o maior nível intracelular é de cerca de seis horas. Além disso, o DHA (a forma oxidada da vitamina C) também apresenta uma penetração ativa e alcança o maior patamar intracelular em cerca de trinta minutos. Após penetrar na célula o DHA sofre ação enzimática de óxido-redução voltando a formar vitamina C.

Com estes dados de literatura definimos em nosso protocolo pela colocação da vitamina C oito horas antes da hipóxia, permitindo assim o tempo necessário para sua penetração para o espaço intracelular. Além disso, voltamos a colocar um meio enriquecido com vitamina C trinta minutos antes da hipóxia para permitir sua presença no espaço extracelular durante a

hipóxia. Como demonstraram DREHER et al (1999) este é um evento bastante rápido e a vitamina C deve estar presente em altas concentrações para evitar sua rápida depleção por ocasião da injúria. Assim, no momento da hipóxia, esperamos ter tido uma adequada concentração de vitamina C tanto nos espaços extracelular como no intracelular. Consideramos que com este protocolo conseguimos os efeitos antioxidantes nos momentos desejados.

Estes estudos de SAVINI (2000) referentes ao transporte transmembrana da vitamina C enfraquecem teorias de que o meio intracelular estaria isolado dos efeitos oxidativos da vitamina C, conforme sugerido por GOTO e TANAKA (1981). Neste trabalho os autores observaram forte inibição da enzima Na, K-ATPase na presença de vitamina C por provável ligação de radicais livres ao grupo sulfidrílica desta enzima. A explicação proposta pelos autores para não ocorrência significativa desta inibição nos seres vivos, seria pela separação física da vitamina C (extracelular) da enzima (intracelular) pela membrana plasmática. Acreditamos que novos trabalhos deverão esclarecer as ações intracelulares da vitamina C, como tentaram fazê-lo FUJIMOTO et al (1982) ao estudarem seus possíveis efeitos nas mitocôndrias de células hepáticas de ratos.

A maioria dos autores que utilizam a vitamina C como anti-oxidante em culturas de células, adicionam também quelantes de ferro (deferroxamina) ao

meio de cultura (FUJIMOTO et al, 1982; IANNONE et al, 1993; MUKHOPADHYAY et al, 1993; DARR et al, 1993; MUKHOPADHYAY e CHATTERJEE, 1994; MUKHOPADHYAY et al, 1995; GHOSH et al, 1997). Isto se deve ao fato de que metais contaminantes podem estar presentes na preparação de constituintes do meio e acabem servindo como doadores de elétrons e, por esta razão, atuam como agentes pró-oxidantes. Neste trabalho, optamos pela não adição deste quelante por três motivos principais: primeiro porque trabalho anterior realizado por SANTOS (1996) com modelo experimental *in vivo* de necrose cutânea em ratos, utilizando a vitamina C (sem uso de quelantes de ferro) foi possível observar uma redução significativa das áreas de necrose no grupo de tratamento (com vitamina C) apesar do aumento da peroxidação lipídica medida pela dosagem de MDA. Gostaríamos de observar se este comportamento se mantém em estudo celular. A segunda razão foi porque este trabalho se destina a ser o precursor de outros estudos dentro do mesmo tema e assim servirá como referência inicial para posterior evolução no estudo dos mecanismos de morte celular e suas relações com a vitamina C. Finalmente, porque no metabolismo dos seres vivos não é possível o isolamento do ferro e da vitamina C. Diferentemente dos estudos laboratoriais controlados, a co-existência destes elementos, ainda que em pequenas quantidades, é uma realidade, sem que isto leve a danos severos à

vida dos organismos. FUJIMOTO et al (1982) até sugerem que esta co-existência seja importante para que ocorra uma entrada mais rápida de vitamina C para o interior da célula. Assim, o modelo de estudo que propusemos se diferencia da maioria dos estudos laboratoriais da literatura, mas se aproxima da realidade bioquímica das células.

#### **5.1.4. Marcadores de dano celular**

Vários estudos têm dedicado atenção a diferentes etapas do metabolismo celular que podem ser alvo de dano da agressão sofrida por uma célula. Quantificação do ATP celular, dosagem de cálcio, métodos colorimétricos de avaliação de viabilidade celular (Azul de Tripam, Acridin Orange), estudos de mecanismos de apoptose/necrose (eletroforese de DNA em gel de agarose), ciclo celular (citometria de fluxo), mecanismos oxidativos celulares (produção de MDA ou TBARS, Ressonância Paramagnética de Spins), entre outros.

Optamos pela quantificação da liberação de DHL pelos queratinócitos como método indicador do nível de agressão celular e pela dosagem do MDA como método de avaliação do estresse oxidativo. Outros autores escolheram o DHL foi escolhido como marcador de agressão como IANNONE (1993),

STEWART (1996), TEBBE (1997) e DURÃO JR (1999) enquanto KANEKO (1993) e BHATNAGAR (1994) utilizaram o azul de tripam.

Já em relação a peroxidação lipídica quase todos os autores utilizam como marcador o método do ácido tiobarbitúrico (MDA ou TBARS), com exceção de IANNONE (1993) fez uso da espectroscopia de ressonância de spins (RSP). A RSP é um método de estudo mais caro e exige aparelhagem específica, sendo possível a demonstração da formação de radicais livres por gráficos. O método do ácido tiobarbitúrico consiste de reações químicas, com baixo custo e fácil realização, que determinam a formação dos TBARS (reagentes do ácido tiobarbitúrico) cujo elemento mais freqüente é o malonaldeído (MDA). Estes TBARS são subprodutos da peroxidação lipídica de membranas plasmáticas.

Ao final dos estudos, consideramos que os métodos escolhidos inicialmente mostraram-se adequados aos objetivos propostos, salientando que novas etapas desta pesquisa se fazem necessárias para o entendimento do comportamento do consumo das defesas antioxidantes dos queratinócitos.

## **5.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **5.2.1. Dosagens de DHL**

Os resultados obtidos demonstram que a vitamina C foi capaz de diminuir de maneira discreta e não significativa a quantidade de DHL liberado, quando comparados os grupos controle com e sem vitamina C.

Com a realização da hipóxia, os valores de DHL aumentaram cerca de seis vezes, demonstrando a efetividade da agressão causada pelo mecanismo de hipóxia proposto. Assim, durante a fase experimental pudemos confirmar os achados observados no projeto piloto, de que a hipóxia de 30 minutos foi suficiente para causar um alto nível de agressão celular. Achamos que este modelo de hipóxia mostrou-se válido e pode ser utilizado por outros pesquisadores interessados no estudo de substâncias que atuem na morte celular de queratinócitos submetidos a hipóxia, porém novos trabalhos devem ser realizados para determinação mais correta do tempo em que estas células começam a apresentar aumento da liberação de DHL. Outro fator que vale ser discutidos é a correlação deste achado com a prática clínica, onde frequentemente permitimos que tecidos permaneçam em isquemia por horas ou dias (isquemia em baixa temperatura), sem que possamos notar a perda de

viabilidade destes tecidos. Aachamos que a quantificação do DHL se destina a mensurar a agressão celular, que não necessariamente leva a morte celular. Mesmo em um enxerto de pele parcial existe a presença de parte da derme com seus respectivos constituintes, que podem apresentar diferente sensibilidade a isquemia.

Os resultados obtidos no grupo tratado com vitamina C e submetido a hipóxia observamos uma redução significativa dos níveis de DHL, que se mostraram próximos dos valores do grupo controle, indicando que a vitamina C foi eficaz em reverter os efeitos da agressão induzida pela hipóxia. Estes resultados são concordes com os observados por TEBBE (1997) que obteve redução de 45% na liberação de DHL no grupo submetido aos efeitos da vitamina C quando comparados ao grupo controle. Assim, podemos verificar que as células submetidas a hipóxia sofrem menor agressão quando na presença de vitamina C.

### **5.2.2. Dosagens do MDA**

A observação dos dados relativos às dosagens do MDA nos grupos controle e controle com vitamina C mostrou que a simples adição de vitamina

ocasionou um aumento não significativo da peroxidação lipídica nestas amostras.

Quando comparamos as dosagens de MDA do grupo submetido a hipóxia aos grupos controle (com e sem vitamina C), vemos um significativo aumento da peroxidação lipídica, sugerindo que o modelo de retirada de oxigênio foi efetivo na produção do estresse oxidativo.

A análise dos valores do MDA do grupo submetido a hipóxia e que receberam vitamina C mostra novamente um grande aumento, porém não significativo, da produção de radicais livres em relação aos grupos controle (com e sem vitamina C) e ao grupo de hipóxia. Estes achados são inversos aos obtidos por DUARTE (2001) que observou redução significativa do MDA em queratinócitos cultivados e submetidos ao DMSO. SHIMMRA et al (1999) também obtiveram diminuição dos radicais livres pelo DMSO em células corneanas submetidas a laser *excimer*. A piora na produção de radicais livres nos grupos que receberam vitamina C pode ser interpretada pelo fato de que a vitamina C deve ter atuado como um agente pró-oxidante, possivelmente pela presença de metais contaminantes nos meios de cultura. Por não termos utilizado quelantes para inativar estes metais, podemos interpretar que provavelmente a vitamina C tenha atuado favorecendo a produção de radicais livres. Como os trabalhos sobre o assunto usam rotineiramente quelantes de

ferro, não é possível uma comparação direta dos dados por nós obtidos com os encontrados nas referências da literatura. Entretanto KANEKO et al (1993) também observou melhora na proteção celular ao estresse oxidativo quando células endoteliais foram expostas ao hidroperóxido do ácido linoleico (agente oxidante) e a vitamina C (antioxidante). Quando o agente antioxidante foi trocado por derivados lipofílicos de ácido ascórbico, seus efeitos protetores foram efetivos mas pouco intensos. Estes resultados nos conduzem a um questionamento sobre a real influência da solubilidade do agente antioxidante sobre a membrana lipídica celular.

### **5.2.3. Comparação dos valores do DHL e do MDA**

A observação dos gráficos comparativos do DHL com MDA nos diversos grupos mostrou que apesar do aumento dos valores de MDA em todos os grupos que receberam vitamina C, este aumento não se refletiu na piora da viabilidade dos queratinócitos medido pelo DHL. Ao contrário disso, todos os grupos que receberam vitamina C apresentaram diminuição da permeabilidade das membranas celulares a esta enzima, sendo capaz de praticamente anular os efeitos deletérios da hipóxia com o retorno das dosagens de DHL a valores próximos aos dos grupos controle. Quando

comparamos os nossos resultados com os obtidos por TEBBE et al (1997), observamos semelhanças com relação aos efeitos dose-dependente da vitamina C quanto à diminuição da agressão celular (medida pelo DHL) e resultados diversos quanto ao estresse oxidativo (MDA). Entretanto, como agente oxidante (UVA) e as doses de vitamina C foram diferentes, não é possível realizarmos comparações absolutas de valores. Ainda com relação a esta publicação, achamos que em futuros trabalhos devemos incluir pesquisas sobre a liberação de citocinas pelos queratinócitos, assim como a realizada por estes autores. Estes resultados aparentemente contraditórios de melhora da viabilidade celular apesar do aumento da produção de radicais livres nos leva a suposição de algumas hipóteses. Podemos interpretar que a vitamina C diminui a vulnerabilidade dos queratinócitos perante a hipóxia por mecanismo não esclarecido, sendo necessários novos estudos para melhor esclarecimento dos mecanismos de morte celular. Outra interpretação, agora dentro das teorias de oxidologia seria de que ao estimular a produção de radicais livres a vitamina C tenha sido transformada em DHA, que possui uma rápida penetração para o interior das células. Após esta etapa, por ação enzimática, DHA pode ter gerado vitamina C em maiores quantidades no espaço intracelular onde, de alguma maneira pode ter atuado como agente protetor celular.

Apesar da aparente contradição entre a diminuição da lesão celular mostrada pela dosagem de DHL e o aumento da agressão por radicais livres evidenciada pela dosagem do MDA obtida com o uso da vitamina C, estes achados estão de acordo com o que observamos no estudo *in vivo* em estudo anterior (SANTOS, 1996). Neste último, a vitamina C diminuiu clinicamente a necrose dos retalhos cutâneos apesar do aumento da produção de radicais livres. Assim sendo, a diferença entre achados benéficos da vitamina C (diminuição de necrose tecidual e aumento da viabilidade celular) e os efeitos possivelmente deletérios da estimulação da formação de radicais livres permanecem sem uma adequada explicação, exigindo maiores estudos nas áreas de lesão celular e seus mecanismos oxidativos.

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa de transplante de tecidos da disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, onde vários trabalhos têm dedicado especial atenção aos fenômenos de isquemia e necrose tecidual. As conclusões aqui obtidas, apesar de aparentemente contraditórias, estão em conformidade com os achados recentes de alguns pesquisadores, porém permanecendo sem uma explicação definitiva. Assim passamos por esta etapa dos estudos com a impressão de uma efetiva contribuição aos conhecimentos atuais a respeito dos queratinócitos e da oxidologia, mas nos vemos obrigados

a prosseguir em novas pesquisas referentes à influência da vitamina C nos processos de apoptose e necrose celular.

## **6. CONCLUSÕES**

O presente estudo nos permitiu as seguintes conclusões:

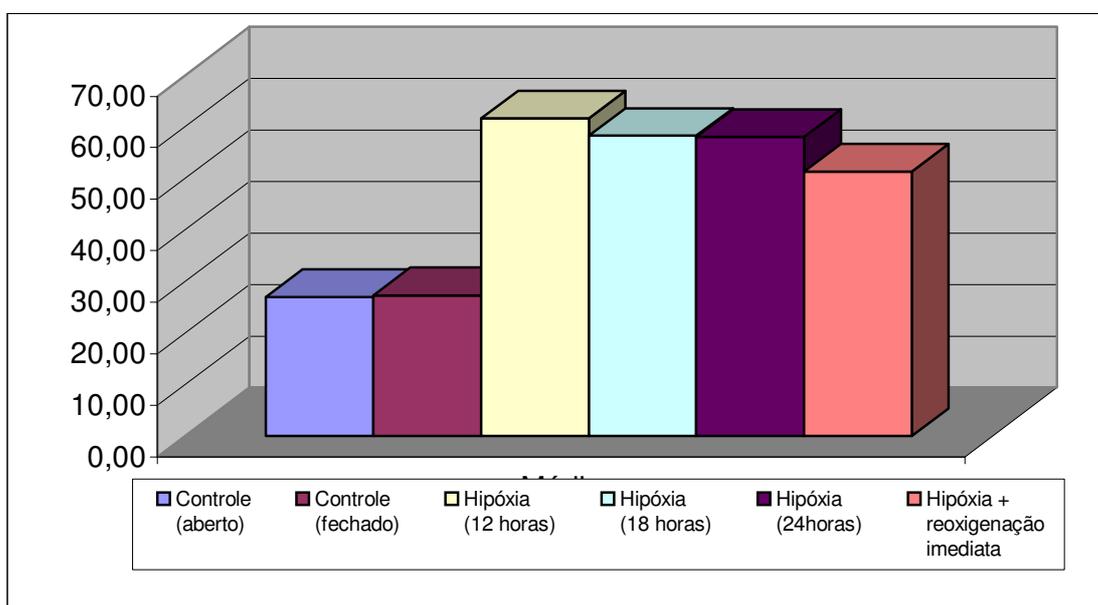
- A vitamina C diminuiu a lesão nos queratinócitos humanos cultivados e submetidos à hipóxia;
  
- A vitamina C aumentou de maneira não significativa o estresse oxidativo nestes queratinócitos.

## **7. ANEXO**

Tabela : Média, mediana e desvio padrão das dosagens de DHL(%).

	Controle (aberto)	Controle (fechado)	Hipóxia (12 horas)	Hipóxia (18 horas)	Hipóxia (24horas)	Hipóxia + reoxigenação imediata
Média	27,00	27,34	61,69	58,29	58,07	51,36

**Dosagem de DHL (%) em cultura de queratinócitos submetidos a hipóxia de 30 minutos, 12, 18 e 24 horas.**



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABLA LEF. Efeito da N-acetil-L-cisteína sobre a necrose dos retalhos cutâneos em ratos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.

AMES BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science 1983;221:1256-1264.

AMES B N, SHIGENAG MK, HAGEN T M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7915-7922.

ASHOORI F, SUZUKI S, ZHOU JH, ISSHIKI N, MIYACHI Y. Involvement of lipid peroxidation in necrosis of skin flaps and its suppression by ellagic acid. *Plast Reconstr Surg* 1994;94:1027-37.

BARCLAY T L The use of fasciocutaneous flaps on the arm and trunk. In: VIII International Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 1983; Montreal. Transactions. Montreal; 1983;35:127-32.

BATHNAGAR A. Biochemical mechanism of irreversible cell injury caused by free radical-initiated reactions. *Mol Cell Biochem* 1994;137:1603-7.

BISSETT D, CHARTERJEE R, HANNON D. Photoprotective effect of superoxide scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photochem Photobiol* 1990;7:56-62.

BUETTNEER GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arc Biochem Biophys* 1993;300:535-43.

CARR A, FREI B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J* 1999;13:1007-24.

CERUTTI PA. Prooxidant states and tumor production. *Science* 1985;227:375-81.

CHAKRABARTY S, NANDI A, MUKHOPADHYAY CK, CHATTERJEE I B. Protective role of ascorbic acid against lipid peroxidation and myocardial injury. *Mol Cell Biochem* 1992;111:41-7.

COELHO RP. Estudo morfológico e morfométrico do enxerto de pele, no rato, com e sem oxigenoterapia hiperbárica [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2000.

CYMROT M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;1999.

DARR D, COMBS S, PINNELL S. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. Arch Biochem and Biophys 1993;307:331-5.

DEL MAESTRO RF. An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand 1980;492:153-68.

DETMAR M, BROMN LF, BERSE B, JACKMAN RW, ELICKER BM, DVORAK HF, CLAFFEY KP. Hipoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. J Invest Dermatol 1997;108:263-8.

DREHER F, DENIG N, GABARD B, SCHWINDT DA, MAIBACH HI. Effect of topical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. Dermatology 1999; 198(1):52-5.

DUARTE IS. Efeito do Dimetil sulfóxido na necrose da porção distal de retalhos cutâneos randômicos em ratos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;1996.

DUARTE IS. Estresse oxidativo e uso de DMSO em queratinócitos cultivados submetidos à privação de glicose e hipóxia gasosa [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2001.

DURÃO JR MS. Os efeitos dos fatores de crescimento EGF, IGF-1 ou HGF sobre células MCDK privadas de glicose e submetidas a hipóxia gasosa [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;1999.

FABIAN TS, KAUFMAN HJ, LETT ED, THOMAS JB, RAWL DK, LEWIS PL, SUMMITT JB, MERRYMAN JI, SCHAEFFER D, SARGENT LA, BURNS RP. The evaluation of subatmospheric pressure and hyperbaric oxygen in ischemic full-thickness wound healing. *The Am Surg* 2000;66:1136-43.

FALANGA V, QIAN SW, DANIELPOUR D, KATZ MH, ROBERTS AB, SPORN MB. Hypoxia up regulates the synthesis of TGF- $\beta$ 1 by human dermal fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology* 1991;97:634-7.

FERREIRA LM. Contribuição ao estudo da irrigação fasciocutânea da perna [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina]; 1985.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J, RAMOS RR.

Reparação do terço distal da perna. F Med (BR) 1986a;92(5):317.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J, RAMOS RR.

Reparação de lesões axilares com retalho fasciocutâneo tóraco-dorsal da perna. F Med (BR) 1986b;93(4):247.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J, RAMOS RR. Retalho fasciocutâneo axial na reparação das perdas de substância da perna. F Med (BR) 1986c;93(4):261-4.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J. Retalho fasciocutâneo de base distal: estudo anatômico e aplicações clínicas nas lesões do terço inferior da perna e tornozelo. Rev Bras Ortop 1987a;22 (5):127-31.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J. Fascíte necrotizante de joelho e coxa: reparação com retalho fasciocutâneo. F Med (BR) 1987b;94 (6):377-9.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J. Retalho fasciocutâneo supraclavicular: estudo anatômico e aplicações clínicas. F Med (BR) 1987c;95 (5-6):303-6.

FERREIRA LM, ANDREWS JM, LAREDO FILHO J. Transplante homólogo de membro. Rev Assoc Med Bras 1995;41(2):151-7.

FREI B, STOCKER R, ENGLAND L, AMES BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. Adv Exp Med Biol 1989;264:155-63.

FUCHS J, FUFLEJT ME, ROTHFUSS LM, WILSON DS, CARCAMO F, PARKER L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. J Invest Dermatol 1989;93:769-73.

FUJIMOTO Y, MATSUI M, FUJITA T. The aculation os ascorbic acid and iron in rat liver mitochondria after lipid peroxidation. Japan J Pharmacol 1982;32:397-9.

FUKUZAWA K, CHIDA H, TOKUMURA A, TSUKATANI H.

Antioxidative effect of  $\alpha$ -tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid- $\text{Fe}^{2+}$ -induced lipid peroxidation. Arch Biochem and Biophys 1981;206:173-80.

GHOSH MK, MUKHOPADHYAY M, CHATTERJEE IB. NADPH-initiated cytochrome P450-dependent free iron-independent microsomal lipid peroxidation: specific prevention by ascorbic acid. Mol Cell Biochem 1997;166:35-44.

GOMES HFC. Efeito da nicotina na perfusão de retalhos cutâneos randômicos em ratos [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina;1993.

GOMES HFC. Efeito da N-acetil-cisteína sobre a viabilidade de retalhos cutâneos randômicos após a administração de nicotina no rato [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.

GOMES HFC, BUENO PCS, SCARDOELI CAC, PERCÁRIO S,  
LANDMAN MRL, FERREIRA LM. Effect of N-acetylcysteine in random  
skin flap after administration of nicotine, in the rat. Fomean (BR)  
1998;117:209-11.

GOTO K, TANAKA R. Ascorbic acid inhibition of Na,K-adenosine  
triphosphatase of rat forebrain without peroxidation of membrane lipids. Brain  
Research 1981;207: 239-44.

GRAGNANI FILHO A. Formação de stratum corneum in vitro e in vivo no  
enxerto de queratinócitos cultivados e derme acelular humana: estudo  
histológico e da capacitância elétrica superficial [tese]. São Paulo:  
Universidade Federal de São Paulo; 1999.

GREEN H, KEHINDE O, THOMAS J. Growth of cultured human epidermal  
cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci USA  
1979;76:5665-9.

GREEN H. Procedure for growing human keratinocytes into epithelia suitable  
for grafting. Protocolo do laboratório de Howard Green, Harvard Medical  
School, Boston, MA 1985;1-15.

GREEN H. Cultured cells for the treatment of disease: The successful growth of human skin cells in culture has made it possible for restore epidermis after severe burns and other forms of damage. *Scientific American* Nov 1991:96-102.

HAERTSCH PA. The surgical plane in the leg. *Brit J Plast Surg* 1981;34:464-9.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 2<sup>o</sup> ed. Oxford: Claredon Press; 1989. p872.

HALLIWELL B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad Res* 1996;25:439-54.

HERRICK SE, IRELAND GW, SIMON D, MC COLLUM CN, FERGUSON MWJ. Venous ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both normal and hypoxic conditions. *J Invest Dermatol* 1996;106:187-93.

HUFFENBAECHER R. Efeito do manitol na diminuição da necrose distal de retalhos cutâneos randômicos em ratos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;1996.

IANNONE A, MARCONI A, ZAMBRUNO G, GIANNETTI A, VANNINI V, TOMASI A. Free Radical Production During Metabolism of Organic Hydroperoxides by Normal Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1993; 101:59-63.

KANEKO T, KAJI K, MATSUO M. Protective Effect of Lipophilic Derivates of Ascorbic Acid on Lipid Peroxide-Induced Endothelial Injury. *Arch Biochemistry and Biophysics* 1993;304:176-80.

KUGIYAMA K, MOTOYAMA T, HIRASHIMA O, OHGUSHI M, SOEJIMA H, MISUMI K, KAWANO K, MIYAO Y, YOSHIMURA M, OGAWA H, MATSUMURA T, SUGIYAMA S, YASUE H. Vitamin C attenuates abnormal reactivity in spasm coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *JACC* 1998;32:103-9.

LEVINE M, WANG Y, RUMSEY SC. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 1998;395(6699):231; discussion p232.

LIEBLER DC, KLING DS, REED DJ. Antioxidant protection phospholipid bilayers by  $\alpha$ -tocopherol. *J Biol Chem* 1986;261:12114-19.

LYKKESFELD TJ, LOFT S, NIELSEN JB, POULSEN HE. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *Am J Clin Nutr* 1997;65:959-63.

MAY JM, COBB CE, MENDIRATTA S, HILL KE, BURK RF. Reduction of ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998;273:23039-45.

MUKHOPADHYAY M, MUKHOPADHYAY CK, CHATTERJEE IB. Protective effect of ascorbic acid against lipid peroxidation and oxidative damage in cardiac microsomes. *Mol Cell Biochem* 1993;126:69-75.

MUKHOPADHYAY CK, GHOSH MK, CHATTERJEE IB. Ascorbic acid prevents lipid peroxidation and oxidative damage of proteins in guinea pig extrahepatic tissue microsomes. *Mol Cell Biochem* 1995;142:71-8.

O`TOOLE E A, MARINKOVICH MP, PEAVEY CL, AMIEVA MR  
FURTHMAYR H, MUSTOE TA, WOODLEY DT. Hypoxia increases human keratinocyte mobility on connective tissue. *J Clin Invest* 1997;100:2881-91.

OKAMOTO RH. Estresse oxidativo local e sistêmico, na fase aguda, em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2001.

PERCÁRIO S, VITLA ACC, JABLONGA F. Dosagem de malonaldeído (MDA). *News Lab* 1994;2:46-50.

PONEC M, WEERHEIM A, KEMPENVITAMINA CR J, MULDER A, GOORIS GS, BOUWSTRA J, MOMMVITAMINA CS AM. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol* 1997;109:348-55.

SANTOS LLR. Efeito da vitamina C na viabilidade do retalho cutâneo em rato [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1996.

SANTOS LLR, CASTILHO LM, FERREIRA LM, HOCHBERG J, CRUZ RG, TOLEDO SR. Vitamin C effect on flap necrosis an experimental study in rats. In: 68<sup>th</sup> Scientific Meeting of American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons; 1999 Oct 23-27; New Orleans. Proceedings. New Orleans: ASPRS; 1999; 22:334-6.

SAVINI I, DUFLOT S, AVIGLIANO L. Dehydroascorbic acid uptake in human keratinocyte cell line (HaCaT) is glutathione-independent. J Biochem 2000;345:665-72.

SHIMMURA S, MASUMIZU T, URAYAMA K, SHIMAZAKI J, VISENMIYAJIMA H, KOHNO M, TSUBOTA K. Excimer laser-induced hydroxyl radical formation and keratocyte death in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:1245-9.

STADTMAN ER, OLIVER CN. Metal catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. J Biol Chem 1991;266:2205-8.

STEWART MS, CAMERON GS, PENCE BC. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative to DNA of Mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1996;106:1086-9.

TAMARIZ E, MARSCH-MORENO M, CASTRO-MUÑOZLEDO F, TSUTSUMI V, KURI-HARCUCH W. Frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes enhance healing of full-thickness wounds in mice. *Cell Tissue Res.* 296:575-585,1999.

TEBBE B, WU S, GEILEN CC, EBERLE J, KODELJA V, ORFANOS CE. L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 $\alpha$  and II-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 1997;108:302-6.

VERA JC, RIVAS CI, FISCHBARG J, GOLDE DW. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 1993; 364(6432):79-82.

WELLS WW, JUNG C. Regeneration of vitamin C. In: Parcker L e Fuchs J, editor. *Vitamin C in Health and Disease*. New York: 1997. p.109-21.

WINKLER BS, ORSELLI SM, REX TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 1994;17(4)333-49.

WU L, PIERCE GF, GALIANO RD, MUSTOE TA. Kertinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. *Arch Surg* 1996;131:660-6.

YOHN JJ, NORRIS DA, YRASTORZA DG, BRUNO IJ, LEFF JA, HAKE SS, REPINE JE. Disparate antioxidant enzyme activities in culture human cutaneous fibroblasts, kertinocytes, and melanocytes. *J Invest Dermatol* 1991;97:405-9.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Alberts B. Fundamentos da biologia celular. 1.ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999. 757p.

Bussab WO, Morettin PA. Estatística Básica. 4.ed. São Paulo: Atual Editora; 1987. 321p.

Dicionário Aurélio eletrônico 2000 [CD-ROM]. São Paulo: Nova Fronteira; 2000. Sumário.

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

Freshney RI. Culture of animals cells: A manual of basic technique. 3.ed. New York: Wiley-Liss; 1994. 486p.

Herani MLG. Normas para apresentação de dissertações e teses. Reimpressão Mar/1993. São Paulo: Bireme-Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde; 1990. 45p.

Holander M, Wolfe DA. Nonparametric statistical methods. New York: John Wiley e Sons; 1973. 503p.

Jones GE. Human cell culture protocols. 1.ed. Ottawa: Humana Press; 1996. 545p.

Neter J, Wasserman W, Kutner MH. Applied Linear Statistical Models. 3.ed. Homewood: Irwin; 1990. 1127p.

Olszewer E. Clínica Ortomolecular. 1.ed. São Paulo: Roca; 2000. 393p.

Olszewer E. Tratado de Medicina Ortomolecular. 2.ed. São Paulo: Nova Linha Editorial; 1997. 487p.

Rother ED, Braga MER. Como elaborar sua tese: Estrutura e referências. São Paulo; 2001. 86p.

Siegel S. Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento). São Paulo: Mac Graw-Hill Ltda; 1975. 350p.

Smith JW. Plastic Surgery. 4.ed. London: Little, Brown and Company; 1991. 1439p.

Vieira RM. A composição e a edição do trabalho científico: dissertações, monografias e teses. 1.ed. São Paulo: Editora Lovise; 1995. 174p.

Winer BJ. Statistical Principles in Experimental Designs. 2.ed. New York: McGraw-Hill; 1971. 907p.

## ABSTRACT

These studies were aimed at verifying the effects of the Vitamin C in cultured human keratinocytes in response to hypoxia, considering oxidative metabolism or stress conditions. The method was based on the isolation and culture of human keratinocytes in 40 bottles, that were divided in four groups: control group, vitamin C control group, hypoxia and hypoxia along with vitamin C.

The keratinocytes were under hypoxia by the replacement of the gas inside the bottles for a mixture composed by 95% of N<sub>2</sub> and 5% of CO<sub>2</sub> for 30 minutes. The results were evaluated by the cell aggression (through level of DHL) and the oxidative stress (through level of MDA).

All in all, it was possible to conclude that vitamin C was able to decrease in a significant way the cell aggression by hypoxia, having, although, worsened the oxidative stress (not significant).