

**GABRIELA SOARES SILVA BRITO**

**VITAMINA C NO ESTRESSE OXIDATIVO  
INDUZIDO PELO  $H_2O_2$  EM  
QUERATINÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS**

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

**São Paulo**

**2009**

Gabriela Soares Silva Brito	Vitamina C no Estresse Oxidativo Induzido pelo $H_2O_2$ em Queratinócitos Humanos Cultivados	MESTRADO	2009
-----------------------------	--	----------	------

**GABRIELA SOARES SILVA BRITO**

**VITAMINA C NO ESTRESSE OXIDATIVO  
INDUZIDO PELO  $H_2O_2$  EM  
QUERATINÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS**

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

**ORIENTADOR: Prof. ALFREDO GRAGNANI**

**CO-ORIENTADORES: Prof. LUIZ FELIPE ABLA**

**São Paulo**

**2009**

Brito, Gabriela S S.

**Vitamina C no Estresse Oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em Queratinocitos Humanos Cultivados.** Cultura de Células./ Gabriela Soares Silva Brito -- São Paulo, 2009.  
x, 137f.

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

Título em inglês: Vitamin C in oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured human keratinocytes

1. L-ascorbic acid. 2. Hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 3. Oxidative stress.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

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

**TITULAR: PROFa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

**DEDICATÓRIA**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais  
**Rosival Siqueira Brito e Maria de Lourdes Soares Brito,**  
pelo amor incondicional e dedicação para me fazer melhor  
nos desafios da vida.  
Certamente são minhas razões de viver.*

*A meu namorado e amigo **Rafael de Freitas,** por sua  
cumplicidade, companheirismo, compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**



## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço à **Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células da Pele, pela oportunidade de realizar esse trabalho na Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina.

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

Ao **PROF. LUÍZ EDUARDO FELIPE ABLA**, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, por sua colaboração nesse trabalho.

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

Ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ)** pela concessão da bolsa de estudos, como apoio financeiro.

Ao **Prof. REINALDO SALOMÃO**, Professor Titular da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo, pela oportunidade de utilizar o equipamento de Citometria de Fluxo, essenciais para a realização desse trabalho.

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

À **Profa. MÔNICA DUAILIBI**, Professora Afiliada da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo e à **Profa. REGINA OKAMOTO**, Professora Adjunta da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela correção deste trabalho.

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

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

Ao Doutorando **ANTONIO CARLOS ALOISE**, por sua amizade, colaboração e apoio.

Ao Mestrando **DR. JORGE MANUEL**, por seu incentivo, dedicação, amigo fiel e sincero, por sua colaboração primordial a realização desse trabalho.

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

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

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

**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

## EPÍGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."*

**(Bertolt Brecht )**

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	5
AGRADECIMENTOS.....	vii
EPÍGRAFE.....	xi
SUMÁRIO .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
RESUMO .....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVO.....	5
3. LITERATURA.....	7
4. MÉTODOS .....	20
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÃO .....	46
8. REFERÊNCIAS.....	48
NORMAS ADOTADAS.....	56
ABSTRACT.....	58
APÊNDICES.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
ANEXOS .....	60
FONTES CONSULTADAS .....	64

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Variação da intensidade de fluorescência pelo kit MTT no decorrer do tempo por grupo..... 30
- Figura 2. Média do percentual de células positivas para Anexina e PI por grupo (\* NS) sem significância estatística..... 32
- Figura 3. Média dos valores da intensidade de fluorescência, unidades arbitrárias, por grupo .  $p= 0,0001$ . ..... 33
- Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Indicador não definido.**



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- °C            Graus Celsius
- μm            Micrômetro
- ml            Mililitro
- cm<sup>2</sup>           Centímetro Quadrado
- UI            Unidades Internacionais
- mg            Miligramas
- M            Molar
- mM           Milimolar
- μM            Micromolar
- rpm           Rotações por Minuto
- l            Litro
- AA            Ácido Ascórbico
- ACH           Acetilcolina
- B-gal           Beta - galactosidase
- DHA            Ácido Dehidroascórbico
- DCFH           *Dichlorofluorescin diacetate*
- DMEM           *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio Eagle,  
Modificação Dulbecco

- ERTO Entidades Reativas Tóxicas do Oxigênio
- ERN Entidades Reativas do Nitrogênio
- Eros Espécies Reativas ao Oxigênio
- GSH Glutathiona
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de Hidrogênio
- HacaT Queratinócitos Imortalizados
- KGF Fator de Crescimento de Queratinócitos
- KHN Queratinócitos Humanos Cultivados
- LOOH Ácido linoleico
- MDA Malonaldeído
- NAC N-acetil-cisteína
- NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- O<sub>2</sub> Oxigênio
- PBS *Phosphate-Buffer Saline* – Salina Tamponada com Fosfato
- RL Radicais Livres
- SIPS Senescência Induzida Pelo Estresse
- SOD Superóxido Dismutase

**RESUMO**

## RESUMO

**Introdução:** Nas últimas 4 décadas, o envolvimento das Espécies Reativas de Oxigênio (Eros) como o  $H_2O_2$ , o superóxido e o radical hidroxila, tem sido demonstrado em diversas condições clínicas como nas queimaduras e inflamações. A vitamina C, possui um agente antioxidante, ter pouca citotoxicidade e ser de fácil uso na prática clínica foi utilizada nesse estudo como agente antioxidante na exposição ao  $H_2O_2$ . **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da Vitamina C em culturas de queratinócitos humanos submetidos ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio. **Método:** O método constitui-se no isolamento e cultivo de queratinócitos humanos em quatro grupos: controle, vitamina C,  $H_2O_2$ , Vitamina C +  $H_2O_2$ . Os queratinócitos foram submetidos ao estresse oxidativo suplementação de  $H_2O_2$  ao meio de cultura por 2 horas. Foram avaliados a apoptose celular e a liberação de radicais livres por citometria de fluxo, senescência celular pelo kit Senescência e a proliferação pelo kit MTT. **Resultados:** Os resultados demonstraram que o peróxido de hidrogênio aumentou a apoptose, senescência celular pelos queratinócitos e que a vitamina C não inibiu a agressão celular de maneira significativa. Quanto à produção de radicais livres o grupo Vitamina C produziu maior quantidade quando associada ao  $H_2O_2$ . **Conclusão:** Assim, concluímos que a vitamina C não apresentou efeito protetor nos queratinocitos humanos cultivados.



## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas 4 décadas, o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROS), como o peróxido de hidrogênio, o superóxido e o radical hidroxila, tem sido demonstrado em diversas condições clínicas. São sintetizados nas mitocôndrias durante o metabolismo energético, e sua superprodução está associada às doenças cardiovasculares, reações inflamatórias e desordens degenerativas relacionadas ao processo de envelhecimento (KEHRER, 1993).

No metabolismo normal, as EROS são inativadas por antioxidantes naturais, como a glutatona, a superóxido dismutase e a catalase. Quando estas substâncias não são capazes de neutralizar as EROS ou inibir sua produção ocorre um desequilíbrio entre pró e antioxidantes. Esta situação é conhecida como estresse oxidativo (SIES, 1991)

Algumas condições podem gerar estresse oxidativo nas células, como a exposição aguda ou crônica à radiação ultravioleta (UV), desidratação, lesão mecânica, mudanças na temperatura ambiente ou insultos endógenos como inflamação e hipóxia.

Um exemplo de agressão que reúne várias condições implicadas no estresse oxidativo é a queimadura que dependendo da extensão, profundidade e gravidade da perda da cobertura cutânea pode levar a conseqüências inaceitáveis do ponto de vista hemodinâmico e funcional (DIKER-COHEN, KOREN, RAVID, 2006).



Os queratinócitos têm papel fundamental na regeneração da pele por serem os principais responsáveis pela formação de todas as camadas da epiderme. Seu cultivo em laboratório é de importância fundamental para a investigação da citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo, dos distúrbios mitocondriais gerados e das alterações no potencial antioxidante intracelular, entre outros (BERENDJI *et al.*, 1999).

Diversos antioxidantes têm sido amplamente estudados, como a vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, dimetilsulfóxido (DMSO), entre outros. A vitamina C é um antioxidante potente conhecido por proteger os tecidos da lesão oxidativa (McARDLE *et al.*, 2004).

A sobrecarga das células com vitamina C reduz a morte por oxidação, inibe a apoptose induzida pelo receptor FAS (ou CD95 ou Apo-1) e confere proteção ao genoma através da supressão das EROS intracelulares (PEREZ-CRUZ, CARCAMO, GOLDE, 2003). É um cofator enzimático envolvido na síntese do colágeno e carnitina e postula-se que a mesma esteja envolvida na redução mitocondrial de tocoferol e citocromo férrico c (PACKER, SLATER, WILLSON, 1979).

No entanto, alguns trabalhos demonstram que a vitamina C pode apresentar um efeito pró-oxidante dependendo de sua concentração e associação a outras substâncias. Com isso, torna-se de extrema importância um maior esclarecimento dos seus efeitos anti e pró-oxidantes nas células submetidas às agressões oxidativas (PROTEGGENTE *et al.*, 2000).

Portanto, a vitamina C foi utilizada no estudo como suplemento ao meio de cultura e será observada sua ação frente à produção do estresse oxidativo determinado pelo peróxido de hidrogênio.

**OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a ação da vitamina C em queratinócitos humanos cultivados submetidos ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**LITERATURA**

### 3. LITERATURA

GREEN, KEHINDE, THOMAS (1979) afirmaram que com o desenvolvimento da cultura de queratinócitos humanos, tornou-se possível o uso de pequenos fragmentos de pele para obter-se grandes extensões de epitélio estratificado, bastante semelhante à epiderme normal e que, portanto poderia ser utilizado para reparar lesões epidérmicas extensas. Descreveram os pontos importantes da cultura de queratinócitos, que as células epidérmicas podem ser transferidas para múltiplos subcultivos com a co-cultura de fibroblastos de rato da linhagem NIH-3T3, que uma célula semeada na garrafa de cultura inicia uma colônia, e as várias colônias dentro da garrafa confluem para formar uma lâmina de queratinócitos epitélio. Também que a multiplicação dos fibroblastos dérmicos presentes no fragmento original de pele é controlada pela ação inibitória das células NIH- 3T3 e da suplementação de soro fetal bovino a 10%. Que as células epidérmicas cultivadas apresentam à microscopia eletrônica as características histológicas principais dos queratinócitos, e por fim que as células mantêm o número diplóide de cromossomos.

BUETTNER (1993) relatou que o radical ascorbil, reage com outro radical idêntico formando vitamina C e ácido dehidrascórbico (DHA). Além disso, a vitamina C pode ser regenerada pela reação entre o radical ascorbil e DHA, por dois mecanismos diferentes relacionados à dependência enzimática. Os sistemas enzima-dependente são catalizados

pela semi-dehidroascorbato redutase (NADH-dependente) e pela tireodoxina redutase (NADPH-dependente). Como sistemas não enzimáticos podem ser citados o GSH e o ácido lipóico.

KANEKO, KAJI, MATSUO (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 o alfa-tocoferol e quatro derivados lipofílicos da vitamina C como antioxidantes. A viabilidade celular foi avaliada por azul de tripam. Os autores observaram que as células incubadas com concentrações de 50 $\mu$ M e 500  $\mu$ M de vitamina C por 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 alfa-tocoferol também não houve diminuição do dano oxidativo, sendo que quando a vitamina C foi substituída por seus derivados lipofílicos, ficou demonstrado o efeito sinérgico na diminuição do estresse oxidativo.

IANNONE *et al.* (1993) estudaram a formação de radicais livres em queratinócitos humanos frescos ou cultivados, submetidos à hipóxia e a vários peróxidos como, 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, DHL e espectroscopia da ressonância-spin de elétrons (RSP) para avaliação dos radicais livres. A ativação intracelular de radicais livres pode ser demonstrada pelos agentes hidrofílico e membrana-impermeável ao ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfônico (DBNBS) e agentes lipofílicos, membrana permeável. Os radicais livres reagem com marcadores DBNBS ou POBN que são facilmente identificáveis por espectroscopia ESR. Os resultados mostraram não haver diferenças entre células epiteliais frescas e cultivadas quanto à formação dos radicais livres. O experimento em que o agente pró-oxidante Cum-OOH foi utilizado em altas concentrações (25 mM) determinou 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 grande dano aos queratinócitos foi possível detectar radical metil RSP, pelo marcador DBNBS, membrana impermeável. Em baixas concentrações de Cum-OOH (1mM) e t-but-OOH em altas (25 mM) e baixas concentrações (1mM) 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 extracelular foi detectada por DBNBS. O peróxido de benzoila não evidenciou a formação de radicais livres. Já nos experimentos em que os queratinócitos foram submetidos à hipóxia, a produção do radical metil foi significativamente aumentada, apesar de não terem sido demonstradas mudanças na viabilidade celular e na agressão celular.

MUKHOPADHYAY, GHOSH, CHATTERJEE (1995) realizaram estudo do estresse oxidativo na peroxidação lipídica e na oxidação protéica de microsomas de células cardíacas de porquinhos-da-índia. Neste estudo

o estresse oxidativo foi induzido de duas maneiras diferentes, uma 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  $100 \mu\text{M}$  e avaliados pela peroxidação lipídica por meio da formação de hidroperóxido lipídico-LOOH e de MDA, e pelo dano protéico através da eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato poliacrilamida-SDS-PAGE. A deferroximina foi utilizada como 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, a vitamina E, a glutathione, o ácido úrico, a tiourea, o manitol e a histidina não foram efetivas na ausência do quelante de ferro. A produção de MDA e de LOOH não foi prevenida, e teve um aumento de 25% e 30%, respectivamente, sendo explicado pelo autor 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 porquinhos também foi totalmente inibido pela vitamina C, independentemente se o estresse oxidativo foi iniciado pelo oxigênio ou pelo NADPH. Os autores sugerem ainda que os resultados podem ser usados para o homem, pois os porquinhos-da-índia, assim como os seres humanos não produzem vitamina C.

WU *et al.* (1996) realizaram o modelo experimental de isquemia em orelhas de 40 coelhos por meio da ligadura de dois ou três pedículos vasculares da orelha, e hipóxia gasosa em cultura de queratinócitos e fibroblastos. As garrafas de cultura foram colocadas em estufa com



concentração de oxigênio de 3,5% por 48 a 72 horas. Em cada uma das orelhas 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 queratinócitos (KGF). Os autores observaram que na concentração de 1 $\mu\text{g}$  não houve melhora da cicatrização e que nas doses de 5, 30 e 40 $\mu\text{g}$  houve um aumento significativo da cicatrização. Com 30 $\mu\text{g}$ , a camada da epiderme foi três vezes mais espessa do que o grupo controle com solução salina. Houve também maior formação de tecido de granulação em todos os grupos tratados com KGF, sendo maior no que recebeu 40 $\mu\text{g}$  e avaliado no 10º dia pós-operatório. A cultura de fibroblastos e queratinócitos apresentaram maior proliferação celular e a produção de fator de crescimento transformante (TGF), tido como estimulador da proliferação de queratinócitos e fibroblastos, agente angiogênico e promotor da deposição de matriz extracelular, quando os meios de cultura foram suplementados com KGF e que esse fator de crescimento promoveu maior proliferação celular quando as culturas foram submetidas à hipóxia gasosa.

BLADIER *et al.* (1997) demonstraram que dependendo da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , fibroblastos expostos a estas concentrações poderiam sofrer um processo predominantemente de senescência celular (50 a 100 $\mu\text{M}$ ), senescência e apoptose (200  $\mu\text{M}$ ) e apoptose (300 a 400  $\mu\text{M}$ ).

NARENDRA & MUKHOPADHYAY (1997) avaliou a incubação de linfócitos humanos e fibroblastos com ascorbato de sódio em diferentes concentrações: 25,50 e 100 $\mu\text{M}$ . Através da eletroforese constatou que os fibroblastos foram mais sensíveis a clivagem do DNA na concentração de

50 $\mu$ M, concentração semelhante a do nível plasmático de Acido Ascórbico em seres humanos. Concluíram que fisiologicamente doses de ascorbato de sódio podem clivar o DNA por sua dose dependência em fibroblastos. A concentração de 50  $\mu$ M não possui efeito sobre a citotoxicidade das células, sugere-se essa concentração para possível efeito benéfico no tratamento do câncer.

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 alta concentração. A ausência de mecanismos que reciclem a vitamina C pode determinar seu rápido consumo e depleção com a conseqüência perda da capacidade de defesa antioxidante das células.

SAVINI *et al.* (2000) realizaram estudos referentes ao transporte e reciclagem da vitamina C em queratinócitos humanos da linhagem HaCaT. A vitamina C transportada para o interior da célula por um sistema co-transportador Na<sup>+</sup>-dependente, atinge o patamar máximo em cerca de seis horas após sua adição ao meio de cultura. A vitamina C ao entrar em contato com o radical livre irá 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 outro sistema transportador NA<sup>+</sup>-independente e mediado positivamente por transportadores de hexose. Esta entrada de DHA é bastante rápida, atingindo seu patamar máximo cerca de trinta minutos após o início do processo. Ao penetrar na célula, o DHA sofrerá a ação de mecanismos enzimáticos, provavelmente por mais de uma

enzima com atividade redox, que acaba por regenerar vitamina C a partir de DHA.

GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA (2002) estudaram o restabelecimento da barreira epidérmica avaliada pela medida da capacitância elétrica superficial (SEC) da epiderme em enxerto composto de queratinócitos humanos 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 e 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 dez dia 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 baixo o valor da SEC como antes da enxertia, sugerindo que a interface ar-líquido favoreceu a diferenciação do enxerto composto *in vitro*. Os autores concluíram 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.

ARMENI *et al.* (2004) avaliaram a proteção do agente Parsol 1789 (*tert-butyl-4-methoxydibenzoyl methane*) em queratinócitos humanos imortalizados à exposição citotóxica do UVA. Avaliaram a viabilidade

celular por meio do Iodeto de Propídeo e Anexina V, o estresse oxidativo através dos níveis de hidroperóxido. Concluíram pelos resultados obtidos que a exposição à radiação UVA diminui a concentração de proteínas, aumenta a liberação DHL e a apoptose, mostrou-se que esse composto não protege os queratinócitos a exposição de UVA nas condições experimentais.

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

ZULIANI *et al.* (2005) relataram que a pele é um dos tecidos mais expostos a várias causas externas de estresse gerando as EROS, e associada à produção endógena de EROS causando alterações em queratinócitos e contribuindo para a fotocarcinogênese e envelhecimento. Recentes evidências sugerem que existe uma suscetibilidade a apoptose, dependente

da diferenciação dos queratinócitos. Os autores estudaram a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em queratinócitos normais de acordo com a sua diferenciação. Células basais indiferenciadas possuem maior sensibilidade do que as células suprabasais à morte induzida pelo peróxido de hidrogênio, e a apoptose em queratinócitos humanos ocorreu por diferentes vias dependente do estado de diferenciação celular.

REVIERE *et al.* (2006) realizaram um estudo sobre o efeito da vitamina C e os danos oxidativos do DNA, incubando as células com dehidroascórbico e em seguida expondo as células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O DNA danificado foi analisado por eletroforese. Os resultados mostraram que a presença de ascorbato nas células quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 M), resultou em uma notável sensibilização aos danos celulares.

CLIMICO *et al.* (2007) verificaram a fotoproteção dos princípios ativos de compostos fenólicos (ROE) e ácido ascórbico na exposição dos queratinócitos humanos cultivados, avaliando a apoptose e a sinalização celular. Concluíram que o ROE com o ácido ascórbico é potencialmente capaz de reprimir a indução do estresse oxidativo por UVB, especialmente na inflamação.

HEYKE *et al.* (2007) estudaram os dois transportadores sódio dependentes de vitamina C (SVCT1 e SVCT2) por meio da expressão gênica, analisaram a expressão a função dos SVCTS, em células da pele saudável humana e células com lesão tecidual exposta ao UVB. A SVCT1 foi encontrada principalmente nas células da epiderme expressa pelos

queratinócitos e mostrou-se responsável pelo transporte de vitamina C. Na exposição de UVB os queratinócitos diminuíram o transporte de SVCT1 responsável pelo transporte de ácido ascórbico e SVCT2 responsável pelo compartimento do transporte de ácido ascórbico. Concluíram que o nível ácido ascórbico diminuiu na exposição ao UVB, e assim diminuiu o estresse oxidativo *in vitro*.

JIN *et al.* (2007) realizaram um estudo que visou explorar o estresse oxidativo em queratinócitos humanos cultivados induzidos pela irradiação UVB e o efeito protetor de antioxidantes nutricionais. As células foram submetidas ao UVB *in vitro* e foi avaliado: a medida de EROS, atividade de enzimas antioxidantes, morte celular na presença ou ausência da suplementação com vitamina C. Constataram que a redução de EROS foi acompanhada pelo aumento da atividade da catalase e superóxido dismutase em momentos diferentes. As vitaminas C e E protegeram contra o efeito das EROS. Concluíram que as vitaminas C e E, diminuíram a necrose, sendo promissoras contra os danos induzidos pelo UVB nas células da pele.

WAY *et al.* (2007) relataram que o ácido ascórbico está presente nas membranas celulares e assim protege as células contra os danos oxidativos. Os efeitos intracelulares foram investigados através de dois marcadores do estresse oxidativo,  $F^2$  *isoprostanos* e Azobis dicloridrato (AAPH). Concluíram que o nível de ascorbato reduziu o ascorbato na membrana, mas aumentou o ascorbato intracelular, quando adicionados ácido ascórbico ao meio de cultura. Esse estudo demonstrou a importância do

aumento de nível de ascorbato intracelular para a proteção celular quando submetidos ao estresse oxidativo.

DUARTE & JONES (2007) investigaram as concentrações de Ácido Ascórbico (AA) no metabolismo do ferro, uma vez que o AA aumenta a absorção de ferro nas enzimas celulares sobre a indução ao peróxido de hidrogênio. Por meio de eletroforese mostrou o aumento do nível de ferro intracelular e o aumento da expressão de dois genes com receptores de ferritina e transferrina. Apresentaram as evidências de uma união nanoantioxidante do ácido ascórbico em células humanas aumenta e melhora a disponibilidade mediada por danos ferro dependentes. Concluíram que o AA pode exacerbar os efeitos deletérios de metais in vivo e promover lesão tecidual em situações associadas com elevada produção de EROS.

CAO *et al.* (2008) relataram que a proteína Kinase (AMPK), é ativada salientando a desnaturação do ATP, e o possível envolvimento de AMPK com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem levar ao envelhecimento celular. Foi observado que o AMPK serve como sinalizador negativo contra a ação dos raios UV e contribui para o efeito pró-apoptótico da AMPK na exposição por UV ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos queratinócitos da pele. Além disso, a ativação da AMPK ativa as proteínas de ácidos graxos em células apoptóticas. Concluíram que na exposição por UVB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a AMPK desempenha importante papel na sinalização dos queratinócitos, contribuindo para o fotoenvelhecimento e ao câncer de pele.

WAG *et al.*(2009) investigaram o mecanismo envolvido no processo de envelhecimento dos queratinócitos humanos (HacaT) e queratinócitos primários de epiderme (HEKA) irradiados por ultravioleta (UVB). As células foram repetidamente expostas a nível citotóxico de UVB. Avaliaram a senescência pela beta-galactosidase, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo. Por meio da técnica de *Westem Blot*, verificaram o nível de RNAm e transcriptase reversa da telomerase. Concluíram que o estresse induzido por senescência prematura nos queratinócitos HacaT e HEKA pode estar associado com o aumento dos níveis de estresse oxidativo, não relacionado com o encurtamento dos telômeros.



## **MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

### 4.1. DESENHO DA PESQUISA

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP sob o número 1216/07 (Anexo 1). Foi utilizada linhagem de queratinócitos primários; provenientes de fragmento de pele desprezado em ato operatório de paciente submetido à postectomia realizada no Hospital São Paulo após a assinatura do termo de consentimento livre e informado ao responsável pela criança (Anexo 2).

### 4.2. AMOSTRA

Os queratinócitos cultivados foram divididos em 4 grupos: **grupo Controle, grupo Vitamina C, grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e grupo Vitamina C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

No grupo controle utilizou-se apenas o meio para queratinócitos. No grupo Vitamina C foi adicionada ao meio de cultura para queratinócitos 50 µM de vitamina C (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) por 6 horas, sendo o meio aspirado, a garrafa lavada com DMEM [sem suplementos (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA)] e substituído por meio para queratinócitos. No grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado 150 µM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no meio de cultura para queratinócitos por 2 horas, sendo o meio aspirado, a garrafa lavada com DMEM (sem suplementos) e substituído por meio para queratinócitos. No grupo Vitamina C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado ao meio de cultura para

queratinócitos 50  $\mu$ M de vitamina C por 6 horas, sendo o meio aspirado, a garrafa lavada com DMEM e substituído com meio para queratinócitos adicionado 150 $\mu$ M de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por 2 horas, sendo o meio aspirado, a garrafa lavada com DMEM (sem suplementos) e substituído por meio para queratinócitos. As garrafas dos grupos descritos permaneceram em incubadora úmida a 37°C, com CO<sub>2</sub> a 5%.

### **4.3. PROCEDIMENTO**

#### *4.3.1. Cultivo de queratinócitos*

Os fragmentos de pele desprezados em ato operatório foram acondicionados em tubos cônicos de 50 ml contendo meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 100UI/ml penicilina e 100  $\mu$ g/ml estreptomicina, armazenadas a 4°C e encaminhadas para posterior preparo no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica.

Os queratinócitos foram cultivados segundo o protocolo de GREEN e RHEINWALD (1979) e adaptado para nosso laboratório por GRAGNANI, MORGAN e FERREIRA (2002, 2004).

Para a cultura dos queratinócitos ser iniciada foi necessário manter os fibroblastos de rato de linhagem NIH-3T3 em cultura, os quais formaram uma camada denominada sustentadora. O desenvolvimento e a manutenção da camada sustentadora iniciou-se pelo uso da alíquota congelada de células NIH-3T3 para gerar um estoque fresco. O preparo das células NIH-3T3 foi iniciado com o crescimento dessas células em garrafas de cultura

de 150 cm<sup>2</sup> na densidade de 5x 10<sup>6</sup> células por garrafa com meio para fibroblastos NIH-3T3.

O meio para cultura dos fibroblastos NIH-3T3 foi constituído do meio EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM) [alta taxa de glicose ( 4,5 g/l), L-glutamina (584 mg/l ), piruvato de sódio (110 mg/l)] (SIGMA Chemical Company, St Louis, MO, EUA), com soro benzeno (BCS) a 10% (suplementado com ferro), e Penicilina/Estreptomicina (100UI/ml-100µg/ml). O pH foi ajustado para 7.2. A troca do meio foi realizada a cada dois dias .

Cerca de 18 horas antes do início do isolamento dos queratinócitos, os fibroblastos NIH-3T3 foram tripsinizados e transferidos para garrafas de 75cm<sup>2</sup> (densidade de 1x10<sup>6</sup> células) com 10 ml de meio de cultura. Foram conservadas em uma incubadora com CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C.

Quando estes fibroblastos atingirem cerca de 50% de confluência, procedeu-se a inibição da proliferação dessas células por meio da mitomicina C. Para isso, foi acrescida em cada garrafa 15 µg/ml de mitomicina C, somados aos 10 ml de meio de cultura para NIH-3T3. Após 2 horas, a mitomicina foi removida, e procedeu-se a lavagem das células com DMEM 3 vezes. Então, foi colocado o meio de cultura para queratinócitos sem fator de crescimento epidérmico, 2 horas antes da semeadura dos queratinócitos.

A cultura primária de queratinócitos iniciou-se com a suspensão isolada de células de um fragmento de espessura total de pele humana, sendo picotada em fragmentos muito pequenos para sofrerem a ação enzimática.

Após, foi utilizada a tripsina (0,25%) para iniciar a separação entre as células do fragmento, em um frasco agitador pré-aquecido com tripsina e versene. Após 30 minutos, foi retirado o sobrenadante da solução e o mesmo foi centrifugado.

As células foram ressuspensas em 3 ml do meio de cultura para queratinócitos e este material foi semeado em garrafas de cultura já preparadas com a camada sustentadora de NIH-3T3, mantidas numa incubadora úmida de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Foi feita avaliação diária quanto à presença de contaminação de fibroblastos humanos e a troca do meio de cultura foi feita a cada 2 dias. Quando as garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> apresentaram com confluência das colônias de 80%, as células foram submetidas à ação de tripsina e retiradas das garrafas. O material celular foi centrifugado e as células foram ressuspensas em meio de cultura e semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, previamente preparadas com fibroblastos NIH-3T3.

Estas garrafas foram mantidas em uma incubadora úmida de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C, avaliadas diariamente quanto à presença de contaminação e realizada a troca do meio de cultura a cada 3 dias.

O meio de cultura de queratinócitos se constituiu por uma mistura 3:1 de DMEM e meio F12 de HAM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 10%; 24 mg de adenina preparada fresca diluindo-se em 20 ml da solução DMEM:F12 de HAM com concentração final de  $1,8 \times 10^{-4}$ M; 1ml de toxina do cólera com concentração final de  $10^{-10}$ M; 2 ml de penicilina/estreptomicina 100 UI/ml – 100 µg/ml; 2 ml de hidrocortisona com concentração final de 0,4 µg/ml; 1 ml concentração final de  $2 \times 10^{-9}$ M; 1,3 ml de insulina humana com concentração final de 5 µg/ml. O pH foi

ajustado em 7,2. A solução foi esterilizada com filtro 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenada a 4 °C.

#### *4.3.2. Subcultivo de queratinócitos*

Os queratinócitos deveriam atingir a confluência em doze dias, mas para evitar a inibição por contato (célula-célula), realizou-se o subcultivo dos queratinócitos no décimo dia.

O meio da garrafa de cultura foi aspirado, lavado com 10 ml de solução PBS contendo 5mM de EDTA [dissódico ácido tetraacético (etilenodinitrilo)( (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA)] denominada Versene, e mantido em incubadora por cinco minutos para a retirada dos fibroblastos NIH-3T3. A garrafa foi lavada novamente com versene, aspirado e adicionado 10 ml de tripsina e mantido por 5 minutos em incubadora úmida a 37 °C. A seguir foi neutralizada a ação da tripsina com 10 ml de meio para queratinócitos sem EGF, centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. As células foram ressuspensas em meio de queratinócitos sem EGF, contadas e subdivididas em garrafas de 75  $\text{cm}^2$  (contendo a camada sustentadora de NIH 3T3).

Foram iniciados os experimentos quando as garrafas apresentaram confluência celular de 80%. Todos os experimentos foram realizados entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagens em triplicatas.

#### *4.3.3. Subcultivo de queratinócitos*

##### *MTT*

O ensaio para viabilidade celular utilizando o MTT, previamente descrito por MOSMANN em 1983, consiste na conversão de um sal tetrazólico em cristais insolúveis de formazan por meio das desidrogenases

presentes nas mitocôndrias de células viáveis. Estes cristais de formazan são insolúveis em água e têm uma coloração púrpura, que pode ser dissolvido em solução de isopropanolol acidificado. A solução de coloração púrpura formada pode ser analisada por fotometria.

Foram semeadas  $1,5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços contendo 100 µl de meio para queratinócitos e mantidas em incubadora úmida a 37°C, com CO<sub>2</sub> a 5%, por 24 horas respeitando cada grupo. Foram estimuladas conforme descrito anteriormente e 24 horas depois, 10µl do reagente MTT foi adicionado aos poços de cada grupo, experimentos realizados em triplicata, incubado por 4 horas a 37°C. A seguir, foram adicionados 100µL da solução 0,04 M de HCl em isopropanol, por 15 minutos em temperatura ambiente.

A leitura da densitometria óptica foi feita utilizando o leitor de microplacas para teste de ELISA (ANTHOS 2010, EUA) (calibrado em 590 µm). A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento. O mesmo procedimento foi realizado diariamente por 7 dias.

#### 4.3.4. Senescência Celular

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

As células foram semeadas em placas de 24 poços numa densidade de 25.000 células por poço, 36 horas antecedentes à exposição de vitamina C e peróxido de hidrogênio conforme descrito anteriormente. O kit para

detecção da senescência foi aplicado 24 horas após a exposição ao peróxido de hidrogênio, sendo determinada a população de células senescentes pela contagem de 2.500 células por poço. A proporção de células positivas para a enzima beta-galactosidase foi dada como a percentagem do número total de células contadas em cada poço.

#### *4.3.5. Citometria de Fluxo*

##### *Apoptose*

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

Os queratinócitos de todos os grupos foram avaliados por citometria de fluxo 24 horas depois do estímulo pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos grupos que assim o receberam e também os que não receberam .

Para realização desse experimento, as células foram tripsinizadas e ressuspendidas em PBS, sendo centrifugadas a 800 rpm por 6 minutos. As células foram distribuídas em quatro tubos contendo 250.000 células/ml em 1 ml do tampão para anexina, (kit de anexina V - BD Pharmingen, San Jose/CA/USA) conforme orientação do fabricante.

No primeiro tubo permaneceram somente as células, sem marcação, no segundo tubo as células foram marcadas com 5 µl de Anexina V, no



terceiro tubo as células foram marcadas com 10 µl de PI, e no quarto tubo as células foram marcadas com 5 µl de Anexina V e 10µl de PI.

Após a marcação as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 300 µl do tampão para anexina e levados para a leitura no citômetro de fluxo [FACsCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, EUA)] com 4 canais. A análise dos dados foi feita no próprio aparelho utilizando o programa CELL QUEST .

#### *Produção de Radicais livres*

Para a detecção da produção de radicais livres foi utilizado o Diacetato Dichlorofluorescein (DCFH-DA), da Molecular Probes® (solução estoque 25 mM feita a partir de 28,35 mg de DCFH-DA em 2 ml de etanol, mantida congelada a -20°C, protegida da luz).

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

Os queratinócitos foram semeados em quatro garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, respeitando cada grupo. Após 24 horas da aplicação do peróxido, as garrafas de todos os grupos foram lavadas com PBS duas vezes, foram adicionados 25 mM de DCFH-DA no meio de cultura e as garrafas, incubadas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 800 rpm por 6 minutos, ressuspendidas em 500 µl de PBS e levadas para a leitura no citômetro de

fluxo FACs Calibur. A leitura dos dados foi realizada através do programa CELL QUEST.

#### *4.3.6. Método Estatístico*

A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de **ANOVA** para variáveis ou para comparações em 3 ou mais grupos utilizou-se o teste de **Tukey**. A significância estatística foi dada para  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

#### 5.1.1. MTT

A média do percentual de intensidade de fluorescência no decorrer do tempo medida pelo kit MTT nos grupos Controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Vitamina C e Vitamina C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta-se na figura 1 e determina a variação da proliferação celular nestes grupos.

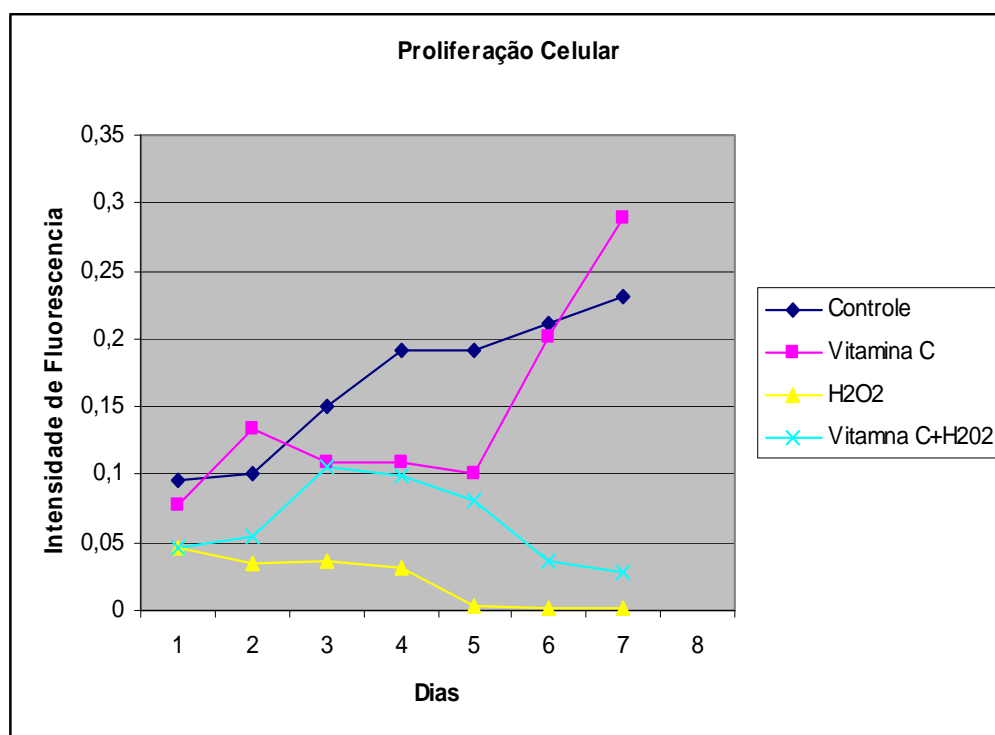


Figura 1. Variação da intensidade de fluorescência pelo kit MTT no decorrer do tempo por grupo.

## 5.2. SENESCÊNCIA

A figura 4 demonstra a média da percentagem de população celular senescente nos diferentes grupos. Houve diferença significativa entre os grupos  $H_2O_2$  e Vit C +  $H_2O_2$ .  $p=0,0007$ .

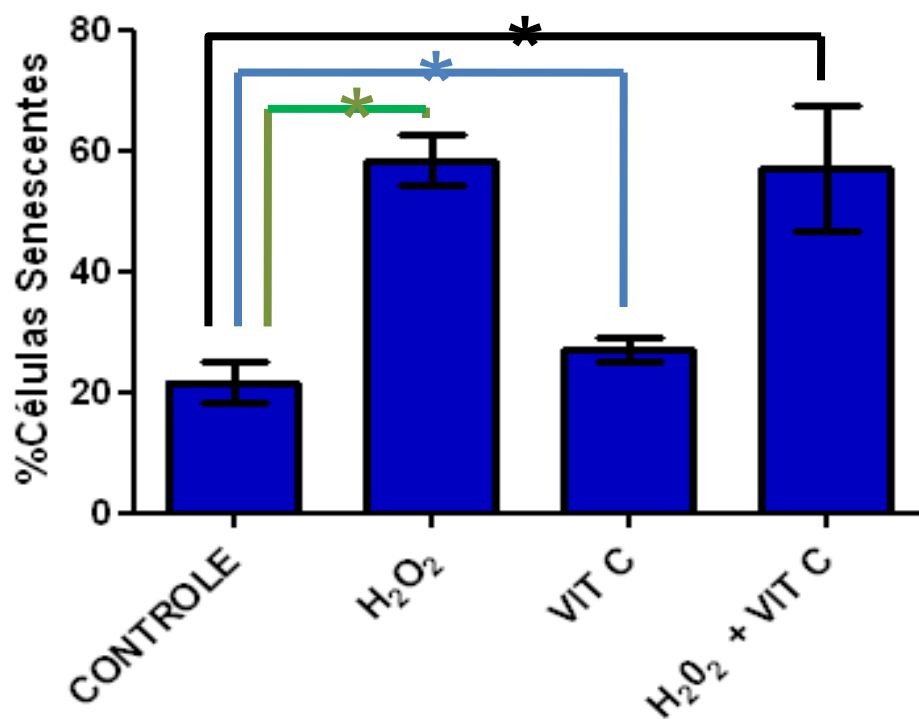


Figura 4. Médias da percentagem de queratinócitos senescentes por grupo.

### 5.3. APOPTOSE

Na figura 2 observa-se a média do percentual de células positivas para Anexina e PI no grupo controle e em cada um dos grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos.

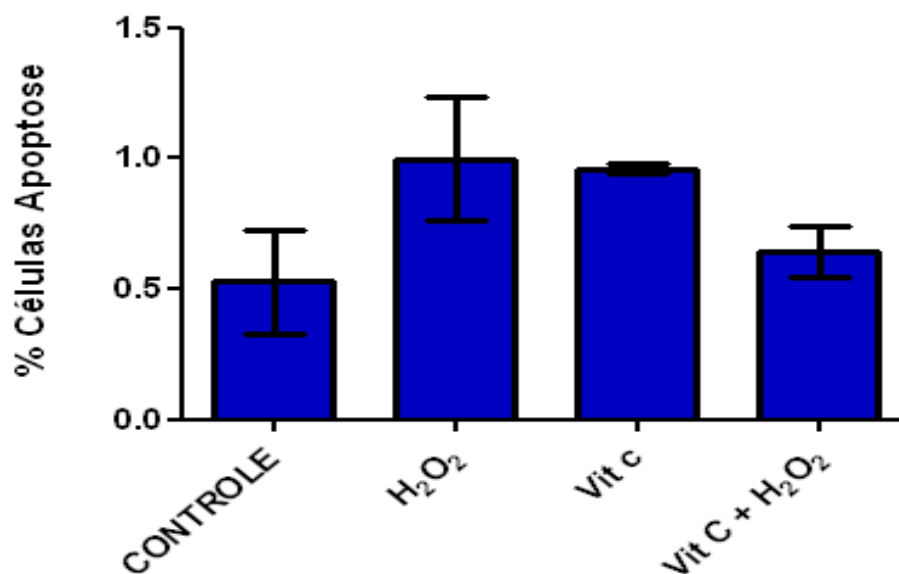


Figura 2. Média do percentual de células positivas para Anexina e PI por grupo (\* NS) sem significância estatística.

#### 5.4. PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Na figura 3 observam-se os valores da intensidade média de fluorescência transmitidas por DCFH-DA, emitidas pelos queratinócitos nas diferentes condições estudadas. Houve diferença significativa entre todos os grupos.  $p=0,0001$

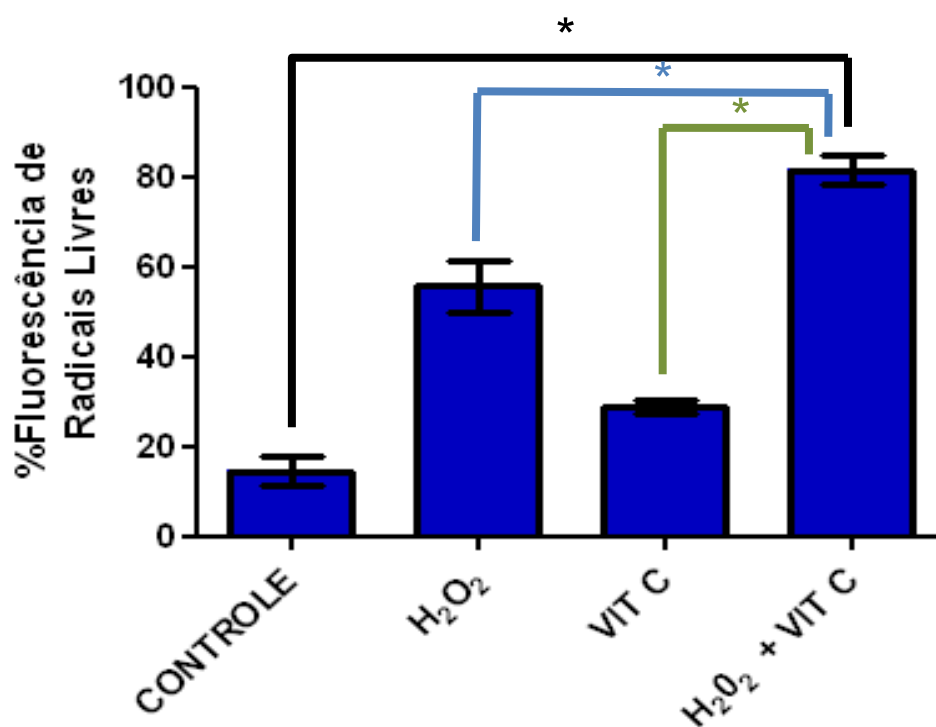


Figura 3. Média dos valores da intensidade de fluorescência, unidades arbitrárias, por grupo .  $p= 0,0001$ .

**DISCUSSÃO**



## 6. DISCUSSÃO

O tratamento ideal para pacientes queimados é a cobertura precoce das feridas, mas é limitado nos grandes queimados pela indisponibilidade de áreas doadoras de enxerto cutâneo parcial de pele (NANCHAHAL, DOVER, OTTO, 2002).

O cultivo epidérmico, como estabelecido por GREEN (1979), foi utilizado clinicamente na cobertura de lesões de pele de grande extensão, com pequenas áreas doadoras autólogas. Este procedimento deu origem a possibilidade de construção de uma pele artificial usando células vivas. HATA (2007) descreveu uma cobertura permanente para feridas obtida pelo cultivo de queratinócitos.

Métodos de cultivos de queratinócitos em série podem fornecer grandes quantidades de células epidérmicas, que possuem potencial de restaurar a função de barreira vital da epiderme em defeitos extensos da pele, como queimaduras (COULOMB *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de produtos para a regeneração da pele é um campo da engenharia de tecidual. Especialmente nas grandes queimaduras e nas feridas crônicas, os produtos existentes são insuficientes para promover a cicatrização ou prevenir a formação de uma cicatriz. (MIDDELKOOP *et al.*, 2004).

Os queratinócitos são principais responsáveis pela formação de todas as camadas da epiderme e têm papel fundamental em sua regeneração. O

cultivo de queratinócitos em laboratório foi descrito para a investigação da citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo, para o estudo dos distúrbios gerados nas mitocôndrias e para análise das alterações no potencial antioxidante intracelular, entre outros (TAKEYAMA, 2002; BERENDIJI *et al.*, 1999; GARDNER *et al.*, 1997).

WOODLEY *et al.* (1988) chamaram a 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. No entanto, ainda persistem dificuldades pela ocorrência frequente de bolhas, provavelmente pela inadequada adesão na junção dermo-epidérmica. O uso clínico de queratinócitos cultivados ainda encontra-se restrito às 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 queratinócitos humanos cultivados permite a formação de uma barreira epidérmica eficiente. Este trabalho trouxe aplicabilidade clínica dos enxertos de queratinócitos humanos cultivados sobre derme acelular.

Um progresso na cultura de queratinócitos humanos foi relatado se agora é possível obter quantidades grandes de epitélio cultivado de uma pequena biópsia da pele dentro de 3-4 semanas após a queimadura. (ATIYEH & COSTAGLIOLA .2007)

A pele humana, de pacientes queimados é exposta a inúmeros estresses externos, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), que

somados aos radicais de oxigênio endógenos, causam alterações nos queratinócitos e contribuem, em parte, para a fotocarcinogênese e para o envelhecimento cutâneo (ZULIANI *et al.*, 2005).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é uma espécie de EROs formado em maior quantidade pela tentativa de desintoxicação de agentes exógenos e penetra facilmente pela membrana celular danificando as biomoléculas. No presente estudo, o  $H_2O_2$  foi escolhido para promover o estresse oxidativo nos queratinócitos, pois culturas primárias de queratinócitos indiferenciados mostram que a exposição ao  $H_2O_2$  induz a morte celular (por falha das mitocôndrias). Evidências recentes também sugerem uma suscetibilidade na diferenciação para apoptose em células expostas ao  $H_2O_2$  (ZULIANI *et al.*, 2005).

Nas últimas 4 décadas, o envolvimento das EROs como o  $H_2O_2$ , o superóxido e o radical hidroxila, tem sido demonstrado em diversas condições clínicas (CHAN *et al.*, 1999). São sintetizados nas mitocôndrias, durante o metabolismo energético, e sua superprodução está associada às doenças cardiovasculares, reações inflamatórias e desordens degenerativas relacionadas ao processo de envelhecimento (KEHRER, 1993).

O  $H_2O_2$  tem baixa reatividade biológica comparada a dos outros EROS combinada com sua capacidade de cruzar membranas e difundir-se do local em que foi gerado, o que o torna uma molécula sinalizadora adequada. Em estudos funcionais diferentes concentrações de  $H_2O_2$  podem levar a diferentes índices de apoptose (RICHTER *et al.*, 1995).

BLADIER *et al.* (1997) expuseram uma cultura primária de fibroblastos a diferentes concentrações de  $H_2O_2$  por 24 horas, observaram que as células poderiam ser induzidas predominantemente à senescência em concentrações entre 50 e 100  $\mu M$ ; induzidas à apoptose entre 300 e 400

$\mu\text{M}$ , e à necrose em concentrações maiores que  $500 \mu\text{M}$ . Nos queratinócitos deste estudo a dose de  $150 \mu\text{M}$  por duas horas, foi determinada como ideal para indução da senescência celular e apoptose, não havendo necessidade de utilizar-se diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

No presente estudo foi verificada a liberação de radicais livres induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela evidência de que há liberação destas moléculas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  promove a agressão à membrana lipídica, ao DNA e a outros componentes das células (MUKHOPADHYAY, GHOSH, CHATTERJEE, 1995; KIRUTHIGA *et al.*, 2007).

As substâncias com ação antioxidante podem ser enzimáticas como a superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase, e não enzimáticas, como o beta-caroteno, a glutathione, o  $\alpha$ -tocoferol e a vitamina C. Neste estudo a vitamina C foi escolhida como potencial agente antioxidante por ser uma substância não produzida pelo metabolismo humano, o que não interferiria na concentração final desta substância num cultivo celular primário e por ter pouca toxicidade, baixo custo e fácil uso na prática clínica (TEBBE *et al.*, 1997).

A dose utilizada de  $50\mu\text{g/ml}$  de vitamina C foi baseada nos achados de PONEC *et al.* (1997) e DUARTE, GRAGNANI, FERREIRA (2004) que afirmaram que nesta concentração há um efeito anti-oxidativo quando estudaram a exposição a radiação ultra-violeta como fator oxidante. ANTHONY (2002) relatou que a partir de  $150 \mu\text{M}$  a concentração de vitamina C se torna citotóxica. O tempo de exposição à vitamina C foi de 6 horas anterior à agressão para que o nível intra-celular onde se espera haver apenas o efeito anti-oxidante da vitamina C seja alcançado, conforme SAVINI, DUFLOT, AVIGLIANO (2000).

Para a realização da cultura de células foi utilizado o modelo de cultura de queratinócitos publicado por RHEINWALD & GREEN (1975). A metodologia de cultura de queratinócitos humanos empregada no presente trabalho foi revisada e adequada por GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA (2002, 2004).

Diversos autores descreveram técnicas de isolamento de queratinócitos para otimização dos protocolos de cultivos estabelecidos, como MARCELO & TONG (1983), BOYCE *et al.* (1992) e HIREL *et al.* (1994). Neste estudo para o isolamento de queratinócitos, utilizou-se fibroblastos da linhagem NIH-3T3 gentilmente cedidos por Jeffrey Morgan (PROVIDENCE, MA, EUA). Os experimentos foram realizados quando os queratinócitos atingiram a subconfluência, facilmente observada pela existência de espaços não ocupados pelos queratinócitos e pela presença de fibroblastos, para que não perdessem seu potencial de proliferação

No presente estudo a avaliação da toxicidade de reagentes, avaliando a viabilidade celular, e também mensuração da proliferação celular nos queratinócitos cultivados em todos os grupos foram estabelecidos pelo método MTT, cuja eficiência foi assegurada por estudos como o de CHAN *et al.* (1999) e KOSTORYS *et al.* (2003). Este teste permite que a leitura celular seja feita sem a realização de qualquer procedimento de lavagem ou remoção celular do fundo do poço e assim é amenizada a variabilidade entre as amostras. Além disso, JACKSON *et al.* (1994) relataram que a manipulação da monocamada de célula, outro método de avaliação da proliferação celular pode acarretar em danos às estruturas de adesão e depleção no metabolismo das células.

A citotoxicidade observada no grupo Controle e no grupo Vitamina C foi semelhante, notando-se um aumento da atividade mitocondrial em

ambos os grupos a partir do quinto dia. Nota-se que nos grupos tratados com  $H_2O_2$  ficaram sem atividade mitocondrial, sinal indireto de morte celular, embora um número pequeno de células ainda estivesse viável. A partir do terceiro dia o grupo vitamina C +  $H_2O_2$  teve um aumento na viabilidade e a partir do quinto dia elas continuaram sem atividade mitocondrial e sua curva de proliferação foi inibida. Já no grupo  $H_2O_2$  a atividade mitocondrial não foi recuperada. (figura 1)

A medida da senescência permite a perda do potencial de proliferação celular quando há encurtamento dos telômeros, fenômeno biológico que decodifica o envelhecimento da célula. As células somáticas normais, invariavelmente, após um número limitado de mitoses ou em resposta a diversos estímulos originados de estresse oxidativo, entram em um estágio irreversível de contenção da sua capacidade de crescimento conhecido como senescência celular ou senescência replicativa (CAMPISI, 2005). Células senescentes podem permanecer viáveis por longo período de tempo em cultura (WEIN & WU, 2001). Vários desses estudos foram monitorados através da pesquisa de um marcador fisiológico de senescência, a b-galactosidase associada à senescência (b-gal AS) cuja expressão diferencia células senescentes de células quiescentes ou tumorais (KATAKURA, 2006). A detecção do marcador fisiológico, b-gal AS, para senescência é uma ferramenta com um potencial para o monitoramento e qualificação de linhagens celulares.

Neste estudo percebeu-se um aumento significativo da senescência entre o no grupo Vit C +  $H_2O_2$  em relação ao grupo Controle e ao grupo vitamina C. Foi observado que os queratinócitos, quando expostos ao  $H_2O_2$ , aumentaram significativamente a percentagem de células senescentes pelo aumento da enzima b- gal, utilizada neste método de quantificação. Esses

dados corroboram com a teoria de que as células quando submetidas ao estresse oxidativo, podem provocar a indução da senescência induzida pelo estresse (SIPS). BLAZIC & BRAJAC (2006) defenderam que a SIPS desempenha papel crucial na reparação descontrolada do tecido, e pode ser mesmo o principal fator causador para a formação da cicatrização.

A medida da senescência pela enzima b-gal é indireta, e para mensurar objetivamente a senescência a deficiência dos telômeros, o ciclo celular e marcadores de diferenciação epidérmica precisam ser avaliados (TOUSSAINT, MEDRANO, VON ZGLINICKI, 2000; BERTRAND *et al.*, 2002; BLAZIC & BRAJAC, 2006; CAO *et al.*, 2008; WAG, 2009).

Para a avaliação da apoptose dos queratinócitos primariamente cultivados foi utilizada a citometria de fluxo, tendo como marcadores a Anexina V (AV) e o Iodeto de Propídeo (PI), conforme NICOLETTI *et al.* (1991) e VERMES (1995). A escolha desta combinação de marcadores se baseia no fato de que esta a AV possui alta afinidade pela fosfatidilserina, uma proteína intranuclear que no momento de lesão celular irreversível se torna um marcador de superfície da célula. Isto ocorre tanto nos estágios iniciais da apoptose quanto nas células em necrose. A diferença entre estes dois processos é que na apoptose, a membrana celular se mantém intacta, enquanto na necrose ocorre a perda da integridade da membrana celular e esta se torna permeável, tornando possível a reação entre o PI e o DNA nuclear (TAIT *et al.*, 2004).

O PI foi utilizado para verificar a integridade da membrana plasmática no ensaio da apoptose com AV. Ele é um corante vital fluorescente que cora DNA e não cruza a membrana plasmática de células viáveis ou nos estágios iniciais da apoptose, pois nestas células a integridade da membrana plasmática é mantida. Nos estágios finais da

apoptose ou de células não viáveis, a membrana plasmática se torna permeável, permitindo assim, a entrada do PI nestas células. A AV se liga às células nos estágios iniciais da apoptose e continua ligada até a morte da célula. Assim, na avaliação da citometria de fluxo, as células positivas para Anexina V são consideradas células em apoptose, as positivas tanto para Anexina V e quanto para Iodeto de Propídio são células em necrose, e as que são negativas para ambos são células viáveis.

Neste estudo foi verificado as células com positividade para o marcador anexina do grupo  $H_2O_2$  foi maior (0,99%) em relação ao grupo vitamina C +  $H_2O_2$  (0,64%), conforme figura 2. Sugere-se que dessa forma a vitamina C protegeu a membrana plasmática sem significância. ANTHONNY (2002) sugeriu que concentrações de vitamina C menores que a utilizada no presente estudo, ao se encontrar com o  $H_2O_2$ , podem proteger as células do estresse oxidativo no processo apoptótico, porém a mensuração intracelular da vitamina C seria o padrão ouro para controle do potencial oxidativo ou anti-oxidativo da vitamina C.

Para a mensuração de radicais livres produzidos pelo  $H_2O_2$ , a citometria pode ser considerada conveniente e mais prática que outras técnicas bioquímicas como ELISA e fluorímetro. Pela metodologia citométrica elimina-se a necessidade de separação prévia das células, o que *per se*, ativa a explosão oxidativa celular. A produção de EROs expressa na geração de  $H_2O_2$  das células estimuladas pode ser monitorada quantitativamente por citometria de fluxo usando o reagente 2'7'diacetato de diclorofluoresceína, DCFH-DA (HASUI *et al.*, 1989; HIPLER *et al.*, 2002).

O diacetato 2'7'diclorofluoresceína (DCFH) é uma sonda fluorescente empregada em citômetro de fluxo com o objetivo de avaliar a



produção de radicais livres no ambiente intra e extracelular, por sua especificidade pelo  $H_2O_2$ , porém ele também é oxidado por outros EROs como o radical hidroxila. Sua forma diacetato tem a propriedade de se difundir através da membrana celular, sendo enzimaticamente hidrolisada por esterases intracelulares a DCFH (ARMENI *et al.*, 2004).

A utilização dessa sonda fluorescente é possível detectar células fluorescentes derivadas pelo aumento do estresse oxidativo intracelular através da liberação dos radicais livres. O DCFH –DA que não é fluorescente, facilmente penetra na célula e essas são clivadas por esterases e emite fluorescência. Ao quantificar essa fluorescência é obtido o grau de estresse oxidativo nas células (HEMPEL *et al.*, 1999; ARMENI *et al.*, 2004).

Esse experimento foi realizado 24 horas após a agressão com  $H_2O_2$  para que houvesse a produção de radicais livres necessárias, detectadas pelo DCFH-DA. No gráfico 2, o grupo Vitamina C +  $H_2O_2$  teve um aumento significativo na produção de radicais livres em relação ao grupo Vitamina C e ao grupo  $H_2O_2$ . Esse resultado corrobora com estudos de LOKE (2006) e HEIKE (2007), que descreveram que a vitamina C associada ao  $H_2O_2$  é convertida em ácido dehidroáscorbico, que é um agente oxidante e conseqüentemente acarreta aumento na produção de radicais livres em fibroblastos humanos cultivadas (IANNONE *et al.*, 1993; CATANI *et al.*, 2005) e no presente estudo tal ação da associação de  $H_2O_2$  e vitamina C também foi observada nos queratinócitos humanos cultivados primariamente.

Os resultados aqui nesse trabalho obtidos, apesar de aparentemente contraditórios, estão em conformidade com os achados recentes da literatura. Assim passamos por esta etapa dos estudos com a impressão de uma contribuição aos conhecimentos atuais a respeito dos queratinócitos humanos cultivados, submetidos ao estresse oxidativo, a prosseguir em novas pesquisas referentes à influência da vitamina C. Assim temos como perspectivas realizar estudo semelhante com a mensuração de dosagens diferentes de vitamina C, avaliação das dosagens de vitamina c intracelular. Realização desse estudo com a metodologia semelhante com queratinocitos humanos cultivados de pacientes normais e de pacientes queimados.

**CONCLUSÃO**

## **7. CONCLUSÃO**

A dosagem de 50 mg de vitamina C não protegeu os queratinócitos humanos cultivados submetidos ao estresse oxidativo pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## **REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4 ed. New York: Garland Science; 2002:501-5.

Anthony R, Smith, FV, Hagen M. Vitamin C matters: increased oxidative stress in cultured human aortic endothelial cells without supplemental ascorbic acid. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006:2071–79.

Armeni T, Damiani E, Battino M, Principato. Lack of in vitro protection by a common sunscreen ingrediente on UVA- induced cytotoxicity in keratinocytes. *Toxicology*. 2004;203:165-78.

Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns*. 2007;33(4):405-13.

Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Kroncke KD. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide mediated stress. *Free Rad Biol Med*. 1999;27:773-80.

Bertrand-Vallery V, Boilan E, Ninane N, Demazy C, Friguet B, Toussaint O, Poumay Y, Debaq-Chainiaux F. Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). *Biogerontology*. 2009;:72-78.

Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I. Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ*. 1997;8(5):589-98.

Blazit TM, Brajac I. Defective induction of senescence during wound healing is a possible mechanism of keloid formation. *Med Hypotheses*. 2006;66(3):649-52.

Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alfa tocopherol, and ascorbate. *Biochem Biophys*. 1993;300:535-3.

Campisi J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Immunology*. 2005; 120(4): 513-522.

Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, Tamakloe T, Chu WM, Guan KL, Wan Y. AMP-activated protein kinase contributes to UV – and H2O2- induced apoptosis in human skin keratinocytes. *J Biol Chem*. 2008;283(43): 28897-908.

Catani MV, Savini I, Rossi A, Aviliano L. Biological Role of Vitamin C in Keratinocytes. *Nutrition*. 2005;158(43):81-98.

Chan CP, Jeng JH, Hsieh CC, Lin CL, Lei D, Chang MC. Morphological alterations associated with the cytostatic effects of citric acid on cultured human. *J Endod*. 1999;25(5):354-8.

Climico F, Cristani M, Saija A, Bonina FP, Virgili F. Protective effects of a red orange extract on UVB- induced damage in human keratinocytes. *Biofactors*. 2007;30(2): 129-38.

Coulomb B, Friteau L, Baruch J, Guilbaud J, Chretien-Marquet B, Glicenstein J, Lebreton-Decoster C, Bell E, Dubertret L. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(7):1891-903.

Diker-Cohen T, Koren R, Ravid A. Programmed cell death of stressed keratinocytes and its inhibition by vitamin D: The role of death and survival signaling pathways. *Apoptosis*. 2006;11(4):519-34.

Dreher F, Denig N, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI. Effect of tropical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. *Dermatology*. 1999;198(1):52-5.

Duarte IS, Gragnani A, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide and oxidative stress on cultures of human keratinocytes. *The Canadian Journal of Plastic Surgery*. 2004;12(1):13-6.

Duarte TL, Jones GDD, Vitamin C modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Biocentry*. 2007;14:216-21.

Gallico III GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *New Engl J Med*. 1984;311(7):448-51.

Gardner A, Xu FH, Fady C, Sarafian T, Tu YP. Evidence against the hypothesis that BCL-2 inhibits apoptosis through an antioxidant effect. *Cell Death Differ*. 1997;4:487-96.

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; 1999:46.

Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Differentiation and barrier formation of a cultured composite skin graft. *Journal of BurnCare & Rehabilitation*. 2002;23(2):26-31.

Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Experimental model of cultured skin graft. *Acta Cir Bras*. 2004;19:(supl.)4-10.



Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:65-9.

Hata K. Current issues regarding skin substitutes using living cells as industrial materials. *J Artif Organs*. 2007;10(3):129-32.

Hempel LS, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol*. 1999;27:146-159.

Heike Steiling a, Karin Longet a, Angus Moodycliffe a, Robert Mansourian a, Emmanuelle Bertschy a, Hans Smola a,1, Cornelia Mauch b, Gary Williamson. Sodium-dependent vitamin C transporter isoforms in skin: Distribution, kinetics, and effect of UVB-induced oxidative stress. 2007;43(5):752-762

Hipler C, Wolina U, Denning D. Fluorescence Analysis of Reactive Oxygen Species(EROS) Generated by Six Isolates of *Aspergillus Fumigatus*. *BMG Labtechnologies*. 2002;40:105-106.

Iannone A, Marconi A, Zabruno 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.

Jin GH, Liu Y, Jin SZ, Liu XD, Liu SZ. UVB induced stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. 2007;46(1):61-8.

Kaneko T, Kaji K, Matsuo M. Protective effect of lipophilic derivatives of ascorbic acid on lipid peroxide-induced endothelial injury. *Arch Biochem Biophys*. 1993;304:176-80.

Katakura Y. Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(5):1076-81.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23:21-48.

Kostoryz E, Eick JD, Chappelow CC, Glaros AG. In vitro effect of light-cure dental from LPS unstimulated macrophages. *J Biomed Mat*. 2003;65:89-94.

Loke WM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Croft KD. Augmentation of monocyte intracellular ascorbate in vitro protects cells from oxidative damage and inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(3):1039-43.

McArdle F, Rhodes LE, Parslew RA, Close GL, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ. Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(5):1270-75.

Middelkoop E, van den Bogaerdt AJ, Lamme EN, Hoekstra MJ, Brandsma K, Ulrich MM. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials*. 2004;25(9):1559-67.

Mukhopadhyay CK, Ghosh Mk, Chatterjee IB. Ascorbic acid prevents lipid peroxidation and oxidative damage of proteins in guinea pig extrahepatic tissue microsomes. *Moll Cell Biochem*. 1995;142:71-78.

Nanchahal J, Dover R, Otto WR. Allogeneic skin substitutes applied to burns patients. *Burns*. 2002;28(3):254-57.

Narendra KS, Mukhopadhyay S. Adaptive control using neural networks and approximate models. *IEEE Trans Neural Netw*. 1997;8(3):475-85.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271-79.

Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature (London)*. 1979;278:737-78.

Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood*. 2003;102:336-43.

Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris G S, Bouwstra J, Mommaas M. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1997;109(3):348-55.

Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277:535-40.

Rivière J, Ravanat JL, Wagner R. Ascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radical biology & Medicine*. 2006;40:2071-2079.

Santos LLR, Gragnani A, Ferreira LM, Duarte, IS, Silva RG. Vitamin C and oxidative stress on cultured human keratinocytes. *The Canadian Journal of Plastic Surgery*. 2004;12(1):17-19.

Savini I, Duflot S, Avigliano L. Dehydroascorbic acid uptake in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is glutathione-independent. *Biochem J*. 2000;345:665-72.

Sies H, ed. *Oxidative Stress*. San Diego: Academic Press; 1991.

Sobral CS, Gragnani A, Morgan J, Ferreira LM. Inhibition of proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* by KGF in an experimental burn model using human cultured keratinocytes. *Burns*. 2007;33(5):613-20.

Steiling H, Longet K, Moodycliffe A, Mansourian R, Bertschy E, Smola H, Mauch C, Williamson G. Sodium-dependent vitamin C transporter isoforms in skin: Distribution, kinetics, and effect of UVB-induced oxidative stress. 2007;43(5):752-762.

Steiling H, Longet K, Moodycliffe A, Mansourian R, Bertschy E, Smola H, Mauch C, Williamson G. Sodium-dependent vitamin C transporter isoforms in skin : Distribution, kinetics, and effect of UVB-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(5):752-62.

Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, Tanaka T. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Experiment Cell Res*. 2002; 274:16-24.

Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 2000;35(8):927-45.

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

Way Mun Loke , Julie M. Proudfoot, Allan J. McKinley, Kevin D. Croft . Augmentation of monocyte intracellular ascorbate in vitro protects cells from oxidative damage and inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commum*.2007;345(3):1039-43.

- Wang YN, Wu W, Peng GP, Fang H. Telomerase expression is not involved in aging process of human keratinocytes induced by UVB irradiation. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009;38(3):283-8
- Wein LM, Wu JT. Estimation of replicative senescence via population dynamics model of cells in culture. *Exp Gerontol*. 2001;36(10):79-88.
- Wu L, Pierce GF, Galiano RD, Mustoe TA. Keratinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. *Arch Surg*. 1996;13:660-66.
- Yilmaz S, Yilmaz E. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative-antioxidative status in rats exposed to irradiation. *Toxicology*. 2006;222(1-2):1-6.
- Zhang S, Ong CN, Shen HM. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer Lett*. 2004;211(2):175-88.
- Zuliani T, Denis V, Noblesse E, Schnebert S, Andre P, Dumas M, Ratinaud MH. Hydrogen peroxide-induced cell death in normal human keratinocytes is differentiation dependent. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(3):307-16.

## **NORMAS ADOTADAS**

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

**ABSTRACT**

## **ABSTRACT**


This study aimed to evaluate the effect of vitamin C in cultured human keratinocytes subjected to oxidative stress by hydrogen peroxide. The method is based on the isolation and cultivation of human keratinocytes into four groups: control, vitamin C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vitamin C, keratinocytes were subjected to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for two hours. We evaluated the apoptosis and the release of free radicals by flow cytometry, cellular senescence by MTT kit and proliferation by MTT kit. The results showed that hydrogen peroxide increased the apoptosis, cellular senescence by keratinocytes and that vitamin C did not inhibit cellular injury in a significant Polish. The production of free radicals, the group, Vitamin C produced a greater amount when associada to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, we conclude that vitamin C had no effect on antioxidant cultured human keratinocytes .



**ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo 1- Comitê de Ética: 1216/07

	Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina	Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo
	São Paulo, 31 de agosto de 2007 CEP 1216/07	
<p> <b>Smolai 51(8)</b>          Pesquisador(a) GABRIELA SOARES SILVA BRITO          Co-Investigadores: Gabriela Soares Silva Brito, Alfredo Gagnani Filho (orientador)          Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo          Patrocinador: Recursos Próprios.       </p>		
<b>PARCER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL</b>		
<p>         Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Radicais livres, senescência e apoptose de queratinócitos humanos cultivados submetidos ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o uso das vitaminas C e E e do KGF".       </p>		
<p> <b>CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:</b> cultura de células  <b>RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:</b> sem risco.  <b>OBJETIVOS:</b> Avaliar a ação da vitamina C, da vitamina E e do KGF na produção de radicais livres, na senescência e na apoptose de queratinócitos humanos cultivados submetidos ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  <b>RESUMO:</b> Será realizada cultura de queratinócitos humanos provenientes de pacientes submetidos a postectomia realizada no Hospital São Paulo ou do Hospital Estadual de Diadema. O fragmento de pele utilizado é desprezado nas cirurgias, sendo utilizado após obtenção do termo de consentimento. Os queratinócitos cultivados serão suplementados com ácido ascórbico ou tocoferol e KGF, 24 horas antecedentes à agressão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Será determinada a viabilidade e apoptose das células por citometria de fluxo, utilizando iodo de propídio e anexina V. A senescência será avaliada com anticorpo anti-citokeratina 14, 15, 16 e 19, determinando a perda da função principal do queratinócito. Para avaliar a produção de ROS no ambiente intra e extracelular será utilizada uma sonda fluorescente DCFH.       </p>		
<p> <b>FUNDAMENTOS E RACIONAL:</b> O KGF é um fator de crescimento produzido por fibroblastos da derme que estimula a proliferação de queratinócitos. Este estudo visa avaliar a ação de antioxidantes vitamina C e E e KGF sobre queratinócitos cultivados in vitro submetidos ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.       </p>		
<p> <b>MATERIAL E MÉTODO:</b> Estudo in vitro, utilizando cultura primária de células. Estão descritos os procedimentos e metodologia empregada.       </p>		
<p> <b>TCLE:</b> Será aplicado TCLE para obtenção do material a ser utilizado na cultura de células.       </p>		
<p> <b>DETALHAMENTO FINANCEIRO:</b> sem financiamento externo.       </p>		
<p> <b>CRONOGRAMA:</b> 18 meses.       </p>		
<p> <b>OBJETIVO ACADÊMICO:</b> Mestrado       </p>		
<p> <b>ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:</b> 30/9/2008 e 30/9/2009       </p>		
<hr/> <p>         Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04033-062 - São Paulo / Brasil          Tel.: (011) 5571-1062 - 5529 7192       </p>		



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

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

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

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

## **Anexo 2**

### **Termo de Consentimento livre e Esclarecido**

#### **Título: VITAMINAS C e E e KGF NO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EM QUERATINOCITOS HUMANOS CULTIVADOS.**

Essas informações estão sendo fornecidas para você e para seu representante legal (caso necessário) para participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a resposta do tecido proveniente de úlceras das pernas a uma determinada substância, denominada de plasma rico em plaquetas.

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

Não há benefício direto para o participante deste projeto. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que as vitaminas C e E, e a substância TGF-β1 poderiam proteger fibroblastos de um certo tipo de ação lesiva provocada pela água oxigenada. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício com a utilização das vitaminas C e E, e da substância TGF-β1.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Jorge Manuel que pode ser encontrado no endereço Rua Pedro de Toledo, 725, Telefone 55716579. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br).

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente; O paciente terá direito a ser informado sobre os resultados do estudo, tão logo eles sejam obtidos. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

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

Como pesquisador, comprometo-me a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:

“Eu \_\_\_\_\_, autorizo participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.----

-----

Assinatura do responsável paciente /representante legal

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## **FONTES CONSULTADAS**

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

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

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