

Ácido ascórbico intracelular diminui a indução à senescência celular, mas não a apoptose em fibroblastos expostos a concentrações subtóxicas de H₂O₂

Intracellular ascorbic acid reduces the induction of cellular senescence, but not apoptosis in fibroblasts exposed to sub toxic concentrations of H₂O₂

Jorge Manuel¹, Alfredo Gragnani², Lydia Masako Ferreira³

RESUMO

Introdução: As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o metabolismo normal das células, tendo funções fisiológicas, como a sinalização celular. Porém, em uma situação que leve o organismo à produção exagerada de EROs, temos o chamado estresse oxidativo, que tem ação deletéria às células, podendo levar a apoptose ou senescência celular. A vitamina C é um dos principais agentes antioxidantes do organismo, atuando em todas as formas de estresse oxidativo. **Método:** Isolamento e cultivo de fibroblastos humanos dérmico em seis grupos: controle, Vitamina C +, Vitamina C -, H₂O₂, Vitamina C + H₂O₂, Vitamina C - H₂O₂. Os fibroblastos foram submetidos ao estresse oxidativo pela suplementação de H₂O₂ ao meio de cultura por 2 horas. Foram avaliadas proliferação pelo MTT, senescência celular pela marcação da enzima beta-galactosidase, apoptose celular e liberação de radicais livres por citometria de fluxo. **Resultados:** O peróxido de hidrogênio aumentou significativamente a senescência celular e a apoptose nos fibroblastos, enquanto a vitamina C diminuiu significativamente a indução a senescência celular somente no estado intracelular. **Conclusões:** O ácido ascórbico não protegeu os fibroblastos humanos dérmicos cultivados contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂. O ácido ascórbico intracelular levou à diminuição da indução à senescência celular.

DESCRIPTORIOS: Ácido ascórbico. Estresse oxidativo. Apoptose. Senescência celular. Fibroblastos.

ABSTRACT

Introduction: Reactive oxygen species (ROS) are produced during normal metabolism of cells, with physiological functions such as cell signaling. But in a situation that causes the body to ROS overproduction, we have the so-called oxidative stress, which has deleterious effects on cells, leading to apoptosis or cellular senescence. Vitamin C is one of the main antioxidants in the body, working in all forms of oxidative stress. **Methods:** Isolation and culture of human dermal fibroblasts in six groups: control, + Vitamin C, - Vitamin C, H₂O₂, H₂O₂ + Vitamin C, H₂O₂ - Vitamin C. The fibroblasts were subjected to oxidative stress by supplements H₂O₂ to the culture medium for 2 hours. Were evaluated by MTT proliferation assay, cellular senescence by marking the enzyme beta-galactosidase, apoptosis and release of free radicals by flow cytometry. **Results:** Hydrogen peroxide significantly increased cellular senescence and apoptosis in fibroblasts, while vitamin C decreased significantly the induction of cellular senescence, just in the intracellular state. **Conclusions:** Ascorbic Acid did not protect cultured human dermal fibroblasts against oxidative stress induced by H₂O₂. Ascorbic acid has led to decreased intracellular induction of cellular senescence.

KEYWORDS: Ascorbic acid. Oxidative stress. Apoptosis. Cell aging. Fibroblasts.

1. MD. Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
2. MD, PhD. Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina/ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
3. MD, PhD, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina/ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: Prof. Alfredo Gragnani
Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Vila Clementino - São Paulo, SP, Brasil - CEP 04024-002
E-mail: alfredogf@ig.com.br
Artigo recebido: 6/11/2011 • Artigo aceito: 24/2/2012

Dentre todos os constituintes celulares, o DNA nuclear é considerado o mais importante, exercendo controle sobre as demais estruturas e organelas. Logo, qualquer dano em sua estrutura, em uma única fita de DNA ou na dupla fita, é prontamente reconhecido pela célula e desencadeia uma resposta celular conhecida como Resposta ao DNA-Danificado (RDD)¹. O RDD teria a função principal de impedir que um DNA danificado seja transmitido a células-filhas, pela interrupção da duplicação celular, permitindo que os esforços se concentrem no reparo do DNA danificado, visando manter a integridade genômica.

Dependendo da intensidade da lesão, o dano ao DNA pode ser reparado, e a célula entra logo em um novo ciclo celular. Porém, se o dano for mais intenso, pode ser desencadeada a apoptose, definida como um modelo de morte celular utilizada por organismos pluricelulares em uma diversidade de situações, cuja função é a de remover células danificadas de uma maneira irreversível². Ainda, além da apoptose, a RDD pode levar a célula a um estado irreversível de parada de proliferação celular, conhecido como senescência celular, no qual as células não respondem ao estímulo de crescimento, e demonstram alterações características em suas propriedades citológicas e bioquímicas e em seu perfil de expressão genética^{3,4}. Não se conhece o fator determinante para que a célula sofra apoptose ou senescência celular, mas esses fatores podem estar relacionados ao tipo e à intensidade da agressão e tipo celular^{1,5,6}.

Um dos principais agentes causadores de danos ao DNA são as espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja produção ocorre, principalmente, no interior das mitocôndrias. As EROs estão envolvidas em processos celulares normais, como sinalização celular e a proliferação; porém, quando em excesso, as EROs causam danos celulares que são relacionados a numerosas doenças, como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, inflamatórias, diabetes, câncer e envelhecimento⁷. O dano provocado pelas EROs ao DNA estaria também relacionado com o processo de envelhecimento e com a formação de neoplasias⁸. O acúmulo de DNA danificado pelas EROs é uma causa de senescência e de apoptose⁹.

A fim de diminuir as ações prejudiciais das EROs, o organismo possui mecanismos intrínsecos para a remoção das EROs, como enzimas removedoras de EROs, as superóxido dismutase, catalase, peroxidase, entre outras, proteínas que sequestram íons metálicos de transição, como ferritina, transferrina, peptídeos de baixo peso molecular e cofatores (glutationa, NADPH, tireodoxina), e agentes sequestradores de radicais livres que são adquiridos na dieta (tocoferol e vitamina C, entre outros)^{10,11}.

A função da vitamina C como protetora contra o dano causado ao DNA pelo estresse oxidativo é controversa. Muitos trabalhos

apontam para um efeito protetor da vitamina C em leucócitos¹²⁻¹⁴, enquanto outros sugerem não haver efeito protetor, ou mesmo um efeito pró-oxidante¹⁵⁻¹⁷.

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

MÉTODO

Cultivo de Fibroblastos

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

As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas numa mistura gasosa de dióxido de carbono a 5%, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias. Entre o 5º e 7º dia, foi observada migração de fibroblastos sobre a placa, atingindo a confluência de 80% por volta do 15º dia. Culturas secundárias foram realizadas por meio da tripsinização, sendo as células distribuídas em garrafas de 75 cm². Ao atingir a quarta passagem, as células foram utilizadas nos procedimentos ou congeladas em nitrogênio líquido para utilização posterior. Apenas células entre a quarta e a nona passagem foram utilizadas nos experimentos.

Suplementação com o Ácido Ascórbico

Foi utilizado o Ascorbato de Sódio (L-ascorbic acid, sodium salt, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) nos experimentos. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, e diluídas no meio próprio de cultivo para fibroblastos, na concentração de 100 µM. Foram incubadas 6 horas antes da exposição ao H₂O₂, e por duas horas junto com o H₂O₂, sendo o meio trocado em seguida. Foi tomado o cuidado de manter o pH próximo a 7,4.

Divisão dos Grupos

Os fibroblastos cultivados foram divididos em seis grupos:

- Controle: utilizou-se apenas o meio para fibroblastos;
- Vitamina C (-): as células foram expostas à concentração de 100 μM de ácido ascórbico por seis horas;
- Vitamina C (+): as células foram expostas à concentração de 100 μM de ácido ascórbico por seis horas, sendo o meio trocado por um novo contendo a mesma concentração de ácido ascórbico por mais duas horas;
- H_2O_2 : as células foram expostas à concentração de 150 μM de H_2O_2 por duas horas.
- Vitamina C (-) e H_2O_2 : as células foram expostas inicialmente à concentração de 100 μM de ácido ascórbico por seis horas, e posteriormente a 150 μM de H_2O_2 ;
- Vitamina C (+) e H_2O_2 : as células foram expostas inicialmente à concentração de 100 μM de ácido ascórbico por seis horas, sendo o meio trocado por outro contendo ácido ascórbico (100 μM) e H_2O_2 (150 μM).

Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada utilizando o MTT, previamente descrito por Mosmann¹⁸. As 2,5 células de cada grupo foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços. Foram distribuídas 2,5 x 10³ células por poço contendo 100 μl de meio para fibroblastos e mantidas em incubadora úmida a 37°C, com CO₂ a 5%, por 24 horas. As células foram expostas ao ácido ascórbico e/ou H_2O_2 , conforme descrito anteriormente, e 24 horas depois, 10 μl do reagente MTT (0,5 mg/ml) foi adicionado aos poços de cada grupo incubado por 4 horas a 37°C. A seguir, o conteúdo foi aspirado e 100 L da solução 0,04 M de HCl em isopropanol foram adicionados e mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente.

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

Avaliação da Senescência Celular

Para a avaliação da senescência foi realizada a marcação da enzima beta-galactosidase (*Senescence Detection Kit*, Cat -JM-K320-250, MBL® Int Corp., MA, EUA). As células foram colocadas em garrafas de 25 cm² e, quando atingiram uma confluência de 80%, foram expostas ao ácido ascórbico e/ou H_2O_2 . Vinte e quatro horas após, as células foram distribuídas em placas de 24 poços, em concentração de 5000 células por poço. A marcação da enzima beta-galactosidase foi realizada 48 horas após, sendo contadas 300 células por poço e estabelecendo-se a porcentagem de células senescentes¹⁹.

Avaliação da Apoptose

Para a avaliação da apoptose das células, foram utilizados o iodeto de propídeo (PI) e a anexina V (AV) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) no citômetro de fluxo FACSClibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, EUA)^{20,21}.

A avaliação ocorreu 24 horas depois da exposição ao ácido ascórbico e/ou H_2O_2 . 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/EUA), 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 10 μl 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. 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 diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

Os fibroblastos foram semeados em garrafas de 75 cm², nos grupos descritos anteriormente. Após a aplicação da vitamina C ou do H_2O_2 , ou de ambos, as células foram suspensas em 800 μl de PBS. Para utilizar o DCFH-DA, uma solução estoque de 25 mM foi mantida congelada a -20°C, protegida da luz, utilizando-se como solvente álcool absoluto (etanol). No momento de ser utilizada, essa solução foi descongelada, e 25 μl foram diluídos em 2,05 ml de PBS, criando-se uma solução final de DCFH-DA. No momento do uso, 200 μl dessa solução final foi adicionada a cada grupo (volume final de 1000 μl), deixado em repouso protegido da luz e a uma temperatura de 37°C por 30 minutos, e levadas para a leitura no citômetro de fluxo FACs Calibur. A leitura dos dados foi realizada com o uso do programa CELL QUEST.

Método Estatístico

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

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

RESULTADOS

Proliferação Celular

A curva de proliferação celular obtida pode ser observada na Figura 1, observando-se a formação de dois padrões de curvas de crescimento, um formado pelos grupos em que houve a exposição ao H_2O_2 , e outro em que não houve essa exposição.

Senescência

A Figura 2 demonstra a média da porcentagem de população celular senescente nos diferentes grupos.

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

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

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

Os grupos Vitamina C (+) H_2O_2 e Vitamina C (-) H_2O_2 não apresentaram diferença estatística entre si; porém, o primeiro não teve diferença estatística com o grupo H_2O_2 , enquanto o grupo Vitamina C (-) H_2O_2 apresentou diferença.

Apoptose

Na Figura 3, observa-se a média do percentual de células positivas para anexina e negativas para o iodeto de propídeo em cada um dos grupos estudados. Houve diferença significativa somente entre o grupo Controle e os demais grupos.

Produção de Radicais Livres

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

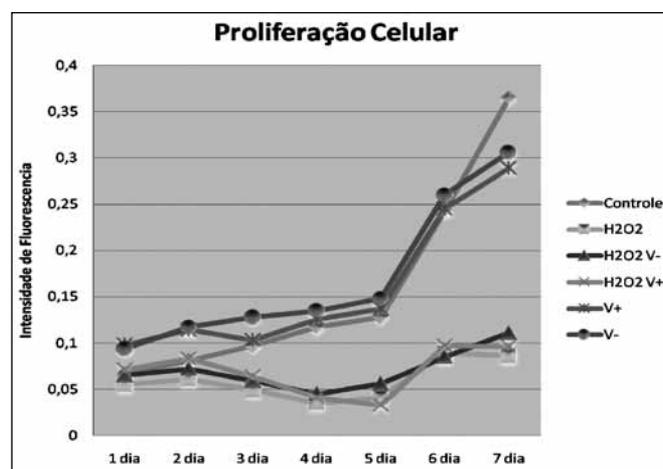


Figura 1 – Variação da intensidade de fluorescência pelo MTT no decorrer do tempo por grupo.

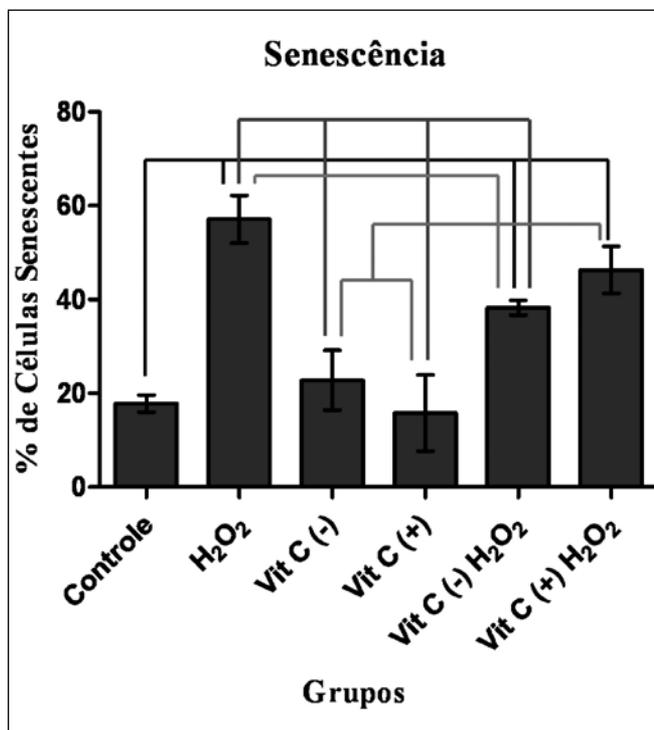


Figura 2 – Médias da porcentagem de fibroblastos senescentes por grupo, assinalando-se a diferença estatística entre os mesmos.

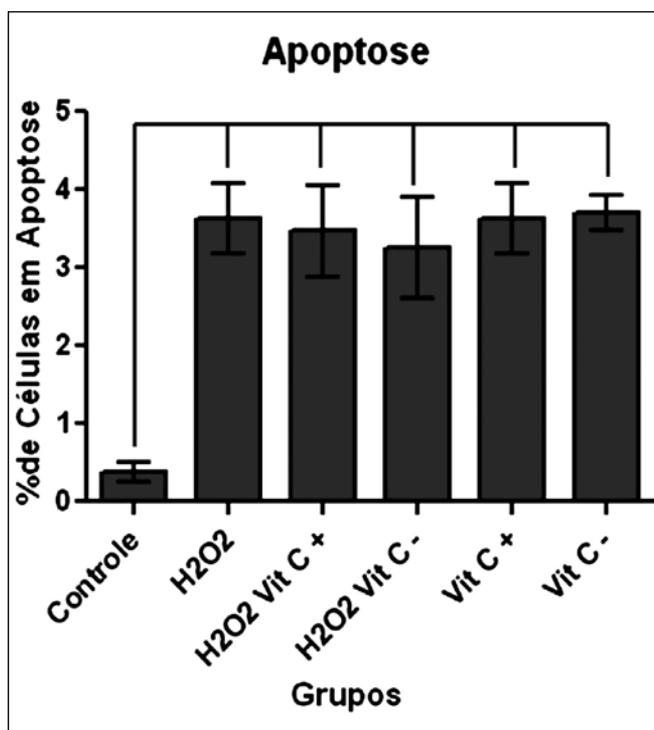


Figura 3 – Média do percentual de células positivas para Anexina e negativas para PI, por grupo, havendo diferença estatística somente entre o grupo controle e os demais grupos.

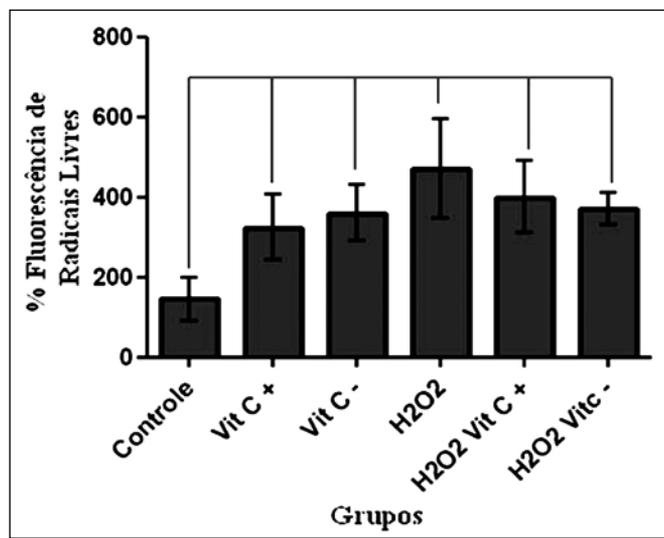


Figura 4 – Média dos valores da intensidade de fluorescência, unidades arbitrárias, por grupo.

DISCUSSÃO

As células do corpo humano estão frequentemente expostas às ações das EROs, que são provenientes de várias origens, tanto externas como internas, sendo a última oriunda principalmente do metabolismo do organismo. Assim, a produção de EROs e sua consequente reação com as várias moléculas do organismo, como proteínas, lipídios e o DNA, ocorre de uma maneira inevitável nos organismos aeróbios. Em baixas concentrações, as EROs desempenham importantes funções fisiológicas, como a sinalização celular²², enquanto que grandes concentrações de EROs apresentam efeito danoso às células, levando ao denominado estresse oxidativo, danificando estruturas moleculares, como proteínas, lipídios e DNA^{23,24}, e que está relacionado com o desenvolvimento de várias doenças, como aterosclerose, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas^{7,8}, além do envelhecimento²³.

A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente solúvel em água, necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno²⁵, e é um importante antioxidante no plasma humano, eliminando radicais livres e protegendo contra a peroxidação lipídica²⁶. Ele é amplamente distribuído em todos os tecidos do corpo, e recicla outros antioxidantes, como a vitamina E e a glutatona²⁷. Ascorbato, a forma predominante da vitamina C no pH fisiológico, é um eficiente doador de elétrons em muitas reações biológicas, capazes de substituir moléculas altamente reativas e danosas, pelo radical livre ascorbato (RLA)²⁸. O ascorbato (A) rapidamente passa por duas consecutivas reações reversíveis de perda de elétrons, gerando inicialmente o RLA, e após nova perda de elétron, o dehidroascorbato (DHA). O RLA é um radical livre pouco reativo, com potencial de redução baixo em

relação com outros radicais livres, o que torna o ascorbato um eficiente doador de elétrons, neutralizando a ação de radicais livres de maior reatividade por um de menor intensidade¹⁰.

Porém, essa função protetora da vitamina C contra o estresse oxidativo, anulando os efeitos deletérios dos radicais livres, é ainda um assunto muito controverso na literatura. De um lado, há trabalhos que demonstram um efeito protetor da suplementação da vitamina C^{13,29}, e que sua ausência levaria a um aumento do estresse oxidativo³⁰. De outro lado, há trabalhos que sugerem um efeito pró-oxidante da vitamina C, levando a danos no DNA nuclear^{9,10,28,31}.

O mecanismo de dano ao DNA induzido pela vitamina C e pelo H_2O_2 provavelmente envolve a reação dos íons Fe^{2+} ou Cu^+ com o H_2O_2 ³², levando a formação de radicais hidroxilas, que parecem estar relacionados diretamente com o mecanismo de dano ao DNA.

Utilizamos a dosagem de $100\mu M$, pois é a que mais se aproxima da concentração fisiológica do plasma sanguíneo de $80\mu M$ ³³, e o tempo de exposição das células à vitamina C foi de seis horas, pois, após esse período, as células expostas à concentração de $100\mu M$ de vitamina C atingem sua concentração máxima^{28,30}. Com essas informações foi construído um modelo de estudo para avaliar a ação da vitamina C quando em sua concentração intracelular máxima e em sua concentração extracelular fisiológica.

Os experimentos foram realizados quando os fibroblastos atingiram confluência de 80%, facilmente observada pela existência de poucos espaços não ocupados pelos fibroblastos, evitando-se o estado de pós-confluência para que não ocorresse uma marcação falso-positiva para a enzima beta-galactosidase, identificadora de células senescentes. Apesar dessa enzima ser utilizada como marcador da senescência celular, ela se torna presente, também, em cultura de células pós-confluentes, ainda não senescentes^{19,34-36}. Ainda, cultivos celulares com baixa confluência também apresentam número aumentado de células marcadas com a enzima beta-galactosidase³⁷.

A coloração da enzima beta-galactosidase foi utilizada como forma de identificação de células senescentes, com estudos prévios, confirmando essa metodologia^{19,35,38,39}. O grupo exposto ao H_2O_2 , mas que apresentava a vitamina C somente intracelular, teve diferença estatística quando comparado ao grupo H_2O_2 , demonstrando possível efeito protetor contra o estresse oxidativo da vitamina C em sua forma intracelular, evitando a formação de células senescentes. Aumento do estresse oxidativo já havia sido observado em cultivos celulares privados do ácido ascórbico³⁰.

No estudo da apoptose, mesmo nos grupos em que foi utilizado somente o ácido ascórbico, houve indução à formação da apoptose, o que pode ser explicado pela formação de H_2O_2 pela auto-oxidação do ácido ascórbico *in vitro*, levando a estresse oxidativo^{28,40}, e consequente lesões no DNA nuclear das células³¹. O uso de formas mais estáveis de ácido ascórbico, que não se

auto-oxidam no meio de cultura celular, permite o uso de concentrações maiores de ácido ascórbico, além de se adequar melhor ao estudo de culturas celulares com baixa concentração de células^{28,39}.

Não está claro o motivo pelo qual algumas células podem se recuperar da agressão pelo estresse oxidativo e entrar novamente no ciclo celular, enquanto outras não recuperam mais a capacidade proliferativa, entrando num estado de senescência celular definitivo, e por último, células que sofrem apoptose. Uma possibilidade pode ser a heterogeneidade do dano causado no DNA pela exposição ao H₂O₂. Um fator determinante conhecido é o tipo celular, sabendo-se que fibroblastos tendem a desenvolver mais o processo de senescência celular, enquanto leucócitos tendem a apresentar apoptose⁶. A natureza e a intensidade do dano também parecem ser importantes^{5,41}; porém, a maioria das células é capaz de ambos.

O dano causado ao DNA pelo estresse oxidativo muda de intensidade dependendo do tipo celular. As células Jurkat parecem ser seis vezes mais sensíveis do que células HL-60 ao dano ao DNA provocado pela associação de H₂O₂ e ascorbato. O motivo para tal diferença de resposta entre dois tipos celulares parece ser a concentração intracelular de mecanismos antioxidantes⁹, como a glutatona, cuja concentração intracelular é menor daquela encontrada em células HL-60⁴². Células cancerosas parecem ser mais sensíveis aos efeitos tóxicos do H₂O₂ do que células normais, possibilitando potencial tratamento para o câncer o uso de vitamina C⁴³.

Os resultados obtidos neste estudo abrem perspectivas para novos projetos relacionados ao estresse oxidativo e antioxidantes.

CONCLUSÃO

A vitamina C não protege os fibroblastos humanos dérmicos cultivados contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂. A vitamina C intracelular levou à diminuição da indução à senescência celular.

REFERÊNCIAS

- d'Adda di Fagnana F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):512-22.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
- Ishikawa F. Cellular senescence as a stress response. *Cornea*. 2006;25(10 Suppl 1):S3-S6.
- Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*. 2003;22(18):2805-11.
- Campisi J, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729-41.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004;567(1):1-61.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(17):7915-22.
- Rivière J, Ravanat JL, Wagner JR. Ascorbate and H₂O₂ induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(12):2071-9.
- Duarte TL, Lunec J. When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res*. 2005;39(7):671-86.
- Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-62.
- Lenton KJ, Therriault H, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):607-13.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*. 1999;13(9):1007-25.
- Moller P, Loft S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat Res*. 2004;551(1-2):79-81.
- Podmore DI, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998;392(6676):559.
- Poulsen HE, Weimann A, Salonen JT, Nyyssönen K, Loft S, Cadet J, et al. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature*. 1998;395(6699):231-2.
- Moller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen HE. Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr*. 2004;43(5):267-75.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Zdanov S, Remacle J, Toussaint O. Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1067:210-6.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271-9.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1163-82.
- Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1105-12.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izacovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
- Darr D, Combs S, Pinnell S. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1993;307(2):331-5.
- Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(24):9748-52.
- Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res*. 2001;475(1-2):29-35.
- Duarte TL, Almeida GM, Jones GD. Investigation of the role of extracellular H₂O₂ and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicol Lett*. 2007;170(1):57-65.
- Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, et al. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol*. 1997;109(3):348-55.
- Smith AR, Visioli F, Hagen TM. Vitamin C matters: increased oxidative stress in cultured human aortic endothelial cells without supplemental ascorbic acid. *FASEB J*. 2002;16(9):1102-4.
- Singh NP. Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutat Res*. 1997;375(2):195-203.

32. Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1997;272(31):19095-98.
33. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007;21(2):111-27.
34. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A Biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363-7.
35. Fripiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhães JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2531-7.
36. Fripiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(10):1334-46.
37. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 2000;257(1):162-71.
38. Fripiat C, Chen QM, Remacle J, Toussaint O. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol.* 2000;35(6-7):733-45.
39. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):361-73.
40. Duarte TL, Jones GD. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(8):1165-75.
41. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.
42. Sané AT, Cantin AM, Paquette B, Wagner JR. Ascorbate modulation of H₂O₂ and camptothecin-induced cell death in Jurkat cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;54(4):315-21.
43. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(38):13604-9.

Trabalho realizado no Laboratório de Cultivo de Células da Disciplina Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.