



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RHANA EVANGELISTA SALAZAR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO, CURCUMINA E  
RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS**

VITÓRIA, ES

2023

**RHANA EVANGELISTA SALAZAR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO, CURCUMINA E  
RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA, ES

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S159a Salazar, Rhana Evangelista, 1995-  
Avaliação dos efeitos do Ácido ascórbico, Curcumina e Resveratrol em culturas de células-tronco mesenquimais / Rhana Evangelista Salazar. - 2023.  
58 f. : il.

Orientadora: Flavia de Paula.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Antioxidantes. 2. Cultura de células. I. de Paula, Flavia.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**RHANA EVANGELISTA SALAZAR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO, CURCUMINA E  
RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada no dia 28 de fevereiro de 2023

**Profa. Dra. Flavia de Paula**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**(Orientadora)**

**Profa. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera**  
**(membro interno)**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Prof. Dr. Carlos Magno da Costa**  
**Maranduba (membro externo)**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora**

VITÓRIA, ES

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Ata da 215ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente RHANA EVANGELISTA SALAZAR, realizada às 14:00h do dia vinte e oito de fevereiro do ano dois mil e vinte e três (28/02/2023), na sala de webconferência do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação intitulada “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO, CURCUMINA E RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS”. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio do link <https://meet.jit.si/pgbiotecologiaufes>. A presidente da Banca, Profª. Drª. Flavia de Paula (orientadora), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Profª. Drª. Flavia Imbroisi Valle Errera, Universidade Federal do Espírito Santo - examinadora interna; Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, Universidade Federal de Juiz de Fora - examinador externo, e passou a palavra para a aluna que apresentou a sua proposta de dissertação. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda APROVADA na defesa de Mestrado. Eu, Flávia de Paula, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Vitória, 28 de fevereiro de 2023.

Profª. Drª. Flavia de Paula - orientadora  
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª. Drª. Flavia Imbroisi Valle Errera - examinadora interna  
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - examinador externo;  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente

CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA

Data: 08/03/2023 08:05:24-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
FLAVIA DE PAULA - SIAPE 2441743  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 07/03/2023 às 14:29

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/663255?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
FLAVIA IMBROISI VALLE - SIAPE 2305782  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 07/03/2023 às 15:17

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/663309?tipoArquivo=O>

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo amor, sustento e força para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Lúcia e Rivelino, por serem minha base.

Aos meus irmãos, Lucas, Lorena, Laila e Kleber por serem os meus maiores amigos.

Ao Estevão, por me acalmar nos dias difíceis e estar ao meu lado neles todos.

Aos meus amigos, principalmente Denize e Deborah, aos amigos do trabalho voluntário no Maanaim e a todos que de alguma forma estiveram ao meu lado durante o curso.

À toda equipe do NGHМ. Pessoas com quem aprendo todos os dias. Especialmente à Dra. Flávia de Paula pela orientação, a Dra. Maria Trancoso pelo trabalho e pela amizade, à Dra. Debora Dummer por todo apoio e auxílio em diversos momentos, à Dra. Raquel Reis, por todo cuidado e toda ajuda. Aos professores Carlos e Maria Do Carmo, pela disponibilidade que sempre apresentaram para contribuir com essa pesquisa e as alunas Iasmini Galter e Suiany Gervásio, pela ajuda e colaboração.

Aos componentes da banca. Dra. Flávia e Dr. Carlos, por aceitarem o convite para participar da minha defesa.

À Universidade Federal do Espírito Santo, e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o curso, e a todos os servidores que de alguma forma contribuíram para minha formação. A todos os professores que conheci durante o curso, pela dedicação e por todo conhecimento passados.

As instituições e programa de fomento à pesquisa como SECTI, Decit/SCTIE/MS, SESA/ES, PPSUS, FAPES, UFES e em especial ao CNPQ, pelo financiamento dessa e de tantas pesquisas, que contribuem para o crescimento científico no país e pela bolsa de mestrado.



## EPÍGRAFE

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muita, nos aproxima.” (Louis Pasteur)*

## RESUMO

SALAZAR, R.E. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO, CURCUMINA E RESVERATROL EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**. 2023. 58f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Substâncias antioxidantes tem sido utilizadas frequentemente para fins terapêuticos, pois atuam em células como substâncias antienvhecimento, e ajudam a manter o equilíbrio redox da célula, auxiliando na homeostase celular e contribuindo para a integridade das células. O ácido ascórbico, a curcumina e o resveratrol são substâncias encontradas em fontes naturais de fácil acesso e são amplamente conhecidas por seu potencial antioxidante. Essas substâncias podem ser utilizadas como coadjuvantes aos tratamentos de doenças. Na busca por substâncias com potencial bioterapêutico destacam-se experimentos *in vitro* com células-tronco mesenquimais (CTM) que podem evidenciar efeitos benéficos ou tóxicos ao nível celular. Uma doença de etiologia genética que causa predisposição a fraturas e deformidades ósseas é a Osteogênese Imperfeita (OI). Geralmente, pacientes com OI apresentam falhas na síntese de colágeno tipo I, componente proteico importante do tecido ósseo. Assim, este estudo buscou avaliar se o tratamento *in vitro* de CTM com ácido ascórbico, curcumina e resveratrol influenciam a viabilidade celular em experimentos *in vitro* de pacientes com OI e controles. Por meio do método de MTT, que avalia viabilidade celular, CTM obtidas de tecido adiposo de pacientes com OI e de controles foram tratadas com ácido ascórbico (10, 25, 50, 100 e 200µg/mL), curcumina (0,05, 0,01, 0,3, 0,5 e 0,8µg/mL) e resveratrol (6,25, 12,5, 25, 50 e 100µM/mL) e analisadas após 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparação de Tukey. Em geral, os resultados sugerem que o ácido ascórbico, a curcumina e o resveratrol interferem de forma positiva na viabilidade celular de CTM nas concentrações estudadas. Os resultados apoiam o desenvolvimento de pesquisas destas substâncias como potenciais bioterapêuticos no tratamento adjuvante da OI.

Palavras-chave: Antioxidantes. Bioterapêuticos. Cultura Celular. Osteogênese Imperfeita.

## ABSTRACT

SALAZAR, R. E. **EVALUATION OF THE EFFECTS OF ASCORBIC ACID, CURCUMIN AND RESVERATROL ON MESENCHYMAL STEM CELL CULTURE.** 2023. 58f. Dissertation (Master in Biotechnology) – Postgraduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Antioxidant substances have often been used for therapeutic purposes, as they operate in cells as anti-aging substances, and help maintain the cell's redox balance, aiding in cell homeostasis and ensuring cell integrity. Ascorbic acid, curcumin and resveratrol are found in easily accessible natural sources and are widely known for their antioxidant potential. These substances can be used as adjuvants in disease treatments. In the search for substances with biotherapeutics potential, *in vitro* experiments with mesenchymal stem cells (MSC) stood out, which can show powerful or toxic effects at the cellular level. A disease of genetic etiology that predisposes to fractures and bone deformities is Osteogenesis Imperfecta (OI). In most cases, patients with OI have failures in the synthesis of type I collagen, an important protein component of bone tissue. Thus, this study sought to assess whether *in vitro* treatment of MSC with ascorbic acid, curcumin and resveratrol affected cell viability in *in vitro* experiments of patients with OI and controls. By means of the MTT method, which evaluates cell viability, transient MSC of adipose tissue from patients with OI and controls were treated with ascorbic acid (10, 25, 50, 100 and 200 $\mu$ g/mL), curcumin (0.05, 0.01, 0.3, 0.5 and 0.8 $\mu$ g/mL) and resveratrol (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu$ M/mL) and analyzed after 24, 48 and 72 hours. The results were statistically analyzed by the one-way ANOVA test, followed by the Tukey comparison test. In general, the results suggest that ascorbic acid, curcumin and resveratrol positively interfere with MSC cell viability in concentrated concentrations. The results support the development of research on these substances as potentially biotherapeutics in the adjuvant treatment of OI.

Keywords: Antioxidants. Biotherapeutics. Cell culture. Osteogenesis imperfecta.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido ascórbico (ATTIA <i>et al.</i> , 2020).....	22
Figura 2: Estrutura da Curcumina (KOTHA & LUTHRIA, 2019).....	24
Figura 3: Estrutura do trans-resveratrol (MENG <i>et al.</i> , 2021).....	26
Figura 4: Metabolismo do MTT em formazan (Sigma Aldrich, 2023).....	35

### GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	38
Gráfico 2: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	38
Gráfico 3: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	39
Gráfico 4: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	42
Gráfico 5: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	42
Gráfico 6: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	43
Gráfico 7: : Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	45
Gráfico 8: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	45
Gráfico 9: Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AA	Ácido Ascórbico
AD	Autossômica Dominante
Akt	Proteína quinase B
ATP	Adenosina Trifosfato
BMP1	Proteína Morfogenética Óssea 1
CAT	Catalase
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
CD90	Grupo de diferenciação 90 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 90</i> )
CD10	Neprilisina
CD45	Proteína tirosina fosfatase
CD34	Grupo de diferenciação 34 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i> )
CD14	Grupo de diferenciação 14 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 14</i> )
CD7	Grupo de diferenciação 7 (do inglês <i>Cluster of Differentiation 7</i> )
CD11b	Integrina alfa M
CD19	Antígeno de linfócitos B
COL1A1	Gene do Colágeno tipo I, alfa I
COL1A2	Gene do Colágeno tipo I, alfa II
CREB3L1	Proteína de ligação de elemento responsivo 3 como 1 (do inglês <i>CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1</i> )
CRTAP	Gene da Proteína Associada à Cartilagem (do inglês <i>Cartilage-Associated Protein</i> )
DHA	Dehidroascorbato
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESCs	Células tronco embrionárias
FDA	Administração de Alimentos e Medicamento (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )
FKBP10	Gene da FK506 proteína de ligação 10
GP	Glutationa Peroxidase
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa

HEINSG	Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina
IL-6	Interleucina 6
iPSCs	Células-tronco Pluripotentes Induzidas
LEPRE	Receptor de Leptina
MBTPS2	Protease do local-2 do fator de transcrição ligado à membrana
MSCs	Células-tronco Mesenquimais
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF-kB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2
OCT-4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 BMP1
OI	Osteogênese Imperfeita (do inglês <i>Osteogenesis Imperfecta</i> )
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Porcentagem de erro
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PLGA	Ácido Polilático-co-glicólico
PLOD2	Procolágeno-Lisina,2-Oxoglutarato 5-Dioxigenase 2
PPIB	Peptidilprolil isomerase B
PSCs	Células-tronco Pluripotentes
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
SERPINF1	Família Serpin F Membro 1
SERPINH1	Família Serpin H membro 1
SPARC	Proteína secretada, ácida, rica em cisteína
SP7	Fator de transcrição SP7
SOD	Superóxido Dismutase
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
SVCT	Proteínas transportadoras de vitamina C dependentes de sódio
TMEM38B	Canal catiônico intracelular trimérico tipo B
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
WNT1	Família de sites de integração MMTV tipo Wingless, membro 1

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Células tronco mesenquimais .....	15
2.2 Radicais Livres e estresse oxidativo .....	17
2.3 Antioxidantes .....	19
2.4 Ácido ascórbico.....	21
2.5 Curcumina .....	23
2.6 Resveratrol .....	25
2.7 Formação e Desenvolvimento Ósseo .....	26
2.8 Osteogênese Imperfeita .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
4.1 Coleta de material biológico.....	32
4.2 Processamento da amostra e tecido adiposo e cultura celular .....	32
4.3 Determinação da concentração dos antioxidantes .....	33
4.4 Avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT .....	34
4.5 Análise dos Resultados.....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>48</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Células-tronco mesenquimais (CTMs, do inglês, *Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) são células multipotentes, com capacidade de autorenovação e podem ser obtidas de diversos tecidos como medula óssea, cordão umbilical, placenta, pólipos endometriais, tecido adiposo, derme, líquido sinovial, entre outros. Sua disponibilidade e possibilidade de extração em abundância, tornam o uso das MSCs favorável em estudos clínicos e terapia celular (DING; SHYU; LIN, 2011; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

A cultura celular é uma técnica largamente utilizada em estudos pré-clínicos e auxiliam na avaliação da segurança e eficácia de potenciais bioterapêuticos que poderão ser utilizados no tratamento e prevenção de doenças (AOKI *et al.*, 2016; GHILARDI *et al.*, 2020).

Como o processo inflamatório, presente na etiologia de várias doenças, pode ser influenciado pelo estresse oxidativo, o estudo de antioxidantes apresenta grande visibilidade na busca de potenciais produtos terapêuticos. Os antioxidantes são substâncias que inibem ou reduzem a oxidação, atuando contra os radicais livres e prevenindo seus danos.

A ação de substâncias antioxidantes pode auxiliar reduzindo a ocorrência de processos inflamatórios no organismo, ajudando não só no envelhecimento saudável como também na prevenção de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (NEHA *et al.*, 2019). Em função destas potencialidades, os antioxidantes são amplamente estudados em diversas áreas como na farmacologia, indústria de cosméticos e indústria alimentícia (ZEHIROGLU & SARIKAYA, 2019). Entre os diversos antioxidantes, destacam-se aqueles encontrados em alimentos naturais como o Ácido Ascórbico, Curcumina e Resveratrol.

O Ácido Ascórbico (AA), também conhecido como Vitamina C, é uma vitamina essencial não sintetizada pelo corpo humano, sendo retirada de fontes naturais e



suplementos, e tendo sua ingestão recomendada de 75mg para mulheres e 90mg para homens, em adultos, com aumento da concentração em casos de tabagismo. Sendo importante para a função dos leucócitos, para o metabolismo de proteínas e na produção de neurotransmissores. Além disso, desempenha papel chave na produção do colágeno, um dos principais constituintes dos ossos (HART *et al.*, 2015).

A Curcumina é um composto químico extraído do açafrão - *Curcuma longa L.* (Zingiberaceae). Diversos estudos têm destacado o uso da curcumina no tratamento de doenças, como câncer de próstata, Doença de Alzheimer, Parkinson e diabetes. Entre os principais efeitos encontrados da Curcumina na literatura estão sua ação potencial como anticancerígena e anti-inflamatória. A *Food and Drug Administration* (FDA) considera este composto seguro para consumo humano (BRASIL, 2015; VOLLONO *et al.*, 2019).

O Resveratrol (trans-3,4,5-trihydroxystilbene), é um polifenol natural, biologicamente ativo, amplamente estudado por suas atividades biológicas, especialmente sua relação com o sistema imunológico. O Resveratrol atua na regulação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune. O uso do Resveratrol tem sido relatado com efeitos benéficos no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, na prevenção de doenças como a diabetes e obesidade e na redução da velocidade de progressão de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (MALAGUARNERA, 2019).

O estresse oxidativo também tem papel relevante em doenças ósseas. Mudanças no estado redox podem interferir no processo de remodelação óssea. Espécies reativas de oxigênio podem induzir a apoptose de osteoblastos e osteócitos, o que dificulta a mineralização óssea e osteogênese e propicia a osteoclastogênese, podendo levar ao aumento da perda óssea. A ação de antioxidantes reduz a atividade dos osteoclastos e contribui para a ativação da diferenciação dos osteoblastos e contribuindo com a mineralização óssea (DOMAZETOVIC *et al.*, 2017). Assim, antioxidantes são compostos em potencial na busca de novos bioterapêuticos no tratamento de doenças ósseas.

Entre as doenças ósseas de grande relevância em unidades de saúde de atendimento a crianças e adolescentes, destaca-se a *Osteogenesis Imperfecta* (OI). Esta doença de etiologia genética que surge, em geral, devido à deficiência na síntese de colágeno tipo I, principal constituinte da matriz óssea, pode causar fraturas recorrentes e deformidades ósseas, com necessidade frequente de internações, resultando no comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e grandes gastos públicos com correções das fraturas e deformidades esqueléticas (SILLENCE *et al.*, 1979; MARINI *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi identificar se o Ácido ascórbico, a Curcumina e o Resveratrol interferem com a viabilidade de células-tronco mesenquimais em cultura *in vitro* em células de pacientes com OI e indivíduos que não possuem OI. Os resultados desta pesquisa auxiliarão na investigação destes compostos como potenciais substâncias utilizadas para tratamento paliativo da OI.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Células tronco mesenquimais**

As CTMs têm sido amplamente utilizadas na terapia celular, considerando sua capacidade celular de proliferação, diferenciação e autorrenovação, com relevante papel na medicina regenerativa e pesquisa clínica. Essas células são empregadas tanto na reparação e regeneração de tecidos lesados, como proporcionando uma base para os estudos de mecanismos de ação de substâncias e desenvolvimento de novas técnicas de terapia celular (SHARIFI *et al.*, 2019).

Quanto a capacidade de diferenciação, segundo ZAKRZEWSKI *et al.* (2019), as células-tronco podem ser classificadas em:

a) Totipotentes, aquelas que podendo se diferenciar em qualquer tipo celular, como no caso da célula do zigoto;

b) Pluripotentes, as que podem formar todos os tipos celulares encontradas nas camadas germinativas (exceto estruturas extraembrionárias);

c) Multipotentes, as que são capazes de se diferenciar um grupo limitado de tipos celulares, se especializando em linhagens celulares específicas como as células-tronco hematopoéticas, que se diferenciam em diferentes células sanguíneas,

d) Oligopotentes, estreitando mais ainda sua capacidade de diferenciação numa linhagem celular, um exemplo são células-tronco mieloides, que podem se diferenciar em glóbulos brancos, mas não se diferenciam em glóbulos vermelhos e

d) Unipotentes, as que só se diferenciam apenas um tipo de célula, como no caso dos dermatócitos.

As células-tronco pluripotentes podem ser geradas artificialmente a partir de células somáticas de um organismo por meio de técnicas criando células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Atualmente, as iPSCs possuem grande utilidade na ciência por permitir o cultivo de tipos celulares de difícil obtenção para pesquisa, como, por exemplo, células do Sistema Nervoso Central (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

As células-tronco são responsáveis pela reposição tecidual ou regeneração de lesões em pequenas proporções do organismo. Assim, em geral, ao longo do tempo, uma fração da população de células-tronco de um tecido sofre diferenciação em um tipo celular específico para reparo tecidual. O processo de diferenciação das células-tronco pode ser regulado por fatores externos, como contato com células vizinhas e secreção química dos tecidos subjacentes e internos, como sinais de expressão gênica (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

A manutenção da população de células-tronco de um tecido por meio da multiplicação celular é controlada e varia de acordo com cada órgão do organismo, na medula óssea, por exemplo, a divisão de células-tronco ocorre constantemente, enquanto em outros órgãos, como no pâncreas, ocorre em resposta a condições fisiológicas específicas (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

Quanto a origem de obtenção de células-tronco, elas podem ser classificadas em:

- a) Embrionárias (ESCs), aquelas obtidas da massa celular interna do blastocisto ou
- b) Adultas, aquelas obtidas a partir de material biológico pós-natal, como cordão umbilical, placenta, isoladas de tecido adiposo, medula óssea, entre outros. Um grupo importante de células-tronco multipotentes obtidas após o nascimento são as células-tronco mesenquimais (MSCs). Elas se destacam por poderem se diferenciar em células da linhagem mesodérmica, endodérmica e ectodérmica, como condrócitos, adipócitos, miócitos, osteoblastos, tenócitos, hepatócitos, células neuronais e gliais (DING *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2022).

Diferentes tipos celulares possuem proteínas de superfície celular específicas e perfil de expressão de citocinas que podem ser utilizadas para caracterizar a origem e o tipo celular de culturas isoladas. As MSCs, por exemplo, formam culturas aderentes a plástico, apresentam células com morfologia semelhante a de fibroblastos, sendo caracterizadas por expressar os marcadores CD73, CD90 e CD10 e por possuírem ausência de expressão de CD45, CD34, CD14, CD7, CD11b e CD19. Além disso, as MSCs expressam fatores de transcrição como o fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (OCT-4) e da proteína homeobox NANOG (MISHRA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022). O destino celular das células derivadas de MSCs é definido por diversas interações célula-célula, célula-matriz e seu programa transcricional (MACHADO; TELLES; NASCIMENTO, 2013; LIU *et al.*, 2022).

As Células-tronco e técnicas de cultura celular em experimentos *in vitro* são ferramentas úteis em estudos que investigam a segurança e eficácia de novos compostos terapêuticos, como aqueles utilizados no combate ao estresse oxidativo.

## 2.2 Radicais Livres e estresse oxidativo

Radicaís livres são qualquer átomo, molécula ou íon que contém um ou mais elétrons desemparelhados em suas camadas de valência (Halliwell & Gutteridge, 1989). Esses elétrons livres são instáveis, altamente reativos, sendo gerados no

processo de oxidação, sendo nocivos ao nosso organismo quando em abundância. A geração de radicais livres sofre efeito de fatores ambientais como exposição a radiação, poluentes, metabolização de subprodutos farmacológicos metabolizados e etc. (NEHA *et al.*, 2019).

O aumento da formação de radicais livres é conhecido como estresse oxidativo, e também está relacionado à diminuição da concentração de substâncias antioxidantes, onde o nível dessas substâncias está em desequilíbrio com a alta produção desses radicais, perturbando o equilíbrio redox celular. O estresse oxidativo pode alterar estruturas moleculares e modular as funções de ácidos nucleicos, lipídios e proteínas e sua gravidade está relacionada a doenças cardiovasculares e câncer. O processo de envelhecimento também é caracterizado por aumento do estresse oxidativo no organismo (PISOSCHI; POP, 2015; DOMAZETOVIC *et al.*, 2017; NEHA *et al.*, 2019).

Entre os radicais livres, estão as espécies reativas de oxigênio (ROS), produtos do metabolismo do oxigênio. Que podem ser gerados, de forma endógena ou exógena. A produção endógena pode ser acidental, quando sua geração ocorre durante o processo de formação de ATP, na respiração celular, ou pode ser induzida, como ocorre no processo de fagocitose por meio da ativação dos sistemas NADPH oxidase (Nox). Sua geração exógena ocorre por exposição a patógenos, produtos químicos e radiações ultravioleta (MARCHI, 2012; NATHAN, 2013). Além de ROS, existem espécies reativas de nitrogênio, ferro, cobre e enxofre. Entre as espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão o óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio (PISOSCHI; POP, 2015).

Na família de ROS, as moléculas mais relevantes são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH), pertencentes ao processo de sinalização redox, envolvido na proliferação celular. A quantidade de ROS interfere no comportamento das células, em níveis reduzidos pode induzir a parada do ciclo celular, em concentrações elevadas pode ativar uma resposta de defesa, e em condições de níveis excessivos pode ativar a cascata pró-apoptótica, levando em casos extremos a necrose (CERQUENI *et al.*, 2021).

O efeito de ROS em diferentes órgãos provoca consequências específicas. No tecido ósseo, por exemplo, interfere no comportamento das células, na estrutura do tecido e na composição da matriz extracelular. O aumento do estresse oxidativo neste tecido contribui para o catabolismo ósseo, podendo ser intensificado por diversos fatores como: alimentação inadequada, predisposição genética, tabagismo, envelhecimento, etc.

O implante de tecidos ósseos *in vivo* gera estresse oxidativo, estando assim, ROS associadas a resposta e sucesso de implantes ósseos. Estudos demonstraram que a adição de polifenóis no local do implante melhoraram a integração do biomaterial ósseo, apontando a modulação do estresse oxidativo como um aspecto relevante na eficácia de implantes (CERQUENI *et al.*, 2021).

Assim, a suplementação de substâncias antioxidantes é indicada para reduzir o dano dos radicais livres ao organismo (ATTIA *et al.*, 2020).

### **2.3 Antioxidantes**

Substâncias antioxidantes são aquelas que têm potencial de neutralizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que causam danos às células e ao material genético. Podem ser de origem sintética ou naturais, endógenos e exógenos, enzimáticos ou não enzimáticos, e ainda lipossolúveis ou hidrossolúveis (NEHA *et al.*, 2019; ZEHIROGLU & SARIKAYA, 2019).

Os antioxidantes naturais são provenientes, em sua maioria, de procedência vegetal, especialmente de frutas e vegetais de cor vermelha, laranja e roxa. Microrganismos e alguns tecidos animais também são fontes de antioxidantes naturais. Nos vegetais, sua atividade está relacionada à espécie de origem, às condições de crescimento da planta e aos métodos de extração e processamento. Entre os antioxidantes naturais mais conhecidos temos os tocoferóis e tocotrienóis, ácido ascórbico, flavonóides, carotenóides e ácidos fenólicos (NEHA *et al.*, 2019; ZEHIROGLU & SARIKAYA, 2019).

Antioxidantes sintéticos são utilizados principalmente pela indústria alimentícia para estabilizar os alimentos, entre eles estão compostos fenólicos, como ésteres de ácido gálico ou hidroxianisole butilado e hidroxitolueno butilado (PISOSCHI; POP, 2015).

Como exemplo de antioxidantes enzimáticos pode-se citar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GP), urato, ascorbato, glutathione (GSH), flavonóides, tocoferóis, carotenóides e ubiquinol. Entre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se as vitaminas, cofatores enzimáticos, minerais, peptídeos, ácidos fenólicos e compostos nitrogenados (ZEHIROGLU & SARIKAYA, 2019).

Os antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GP) compõem o sistema de defesa antioxidante endógeno da célula, que mantém o equilíbrio do estado redox. Aliados a eles, antioxidantes exógenos obtidos pelo consumo de alimentos como frutas, vegetais, grãos integrais, legumes e ácidos graxos como ômega-3, suplementos alimentares como vitaminas (A, C, E), polifenóis, licopeno e resveratrol auxiliam no potencial antioxidante da célula. Entre os principais antioxidantes exógenos estão as vitaminas C e E, carotenóides e compostos fenólicos (PISOSCHI; POP, 2015).

Os antioxidantes possuem significativa influência em vários órgãos do organismo, como no tecido ósseo. Estudos evidenciam uma relação entre a ingestão de antioxidantes e sua atuação benéfica no metabolismo e saúde do tecido ósseo (DOMAZETOVIC *et al.*, 2017). No processo de remodelação óssea, os osteoclastos eliminam o tecido ósseo velho ou danificado, e os osteoblastos substituem por um novo tecido.

O estresse oxidativo, prejudica a relação osteoclasto/osteoblasto, ativando a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos, conseqüentemente aumentando a reabsorção óssea e causando um desequilíbrio que pode levar a doenças ósseas metabólicas e distúrbios do sistema esquelético.

ROS induzem a morte celular de osteoblastos e osteócitos, favorecendo a osteoclastogênese e em altos níveis, diminuem ou impedem a atuação dos osteoclastos, afetando a mineralização e formação óssea, causando a diminuição da massa óssea. Por outro lado, os antioxidantes têm ação contrária, reduzindo a diferenciação e atividade de osteoclastos e aumento a diferenciação dos osteoblastos, contribuindo positivamente para a osteogênese (DOMAZETOVIC *et al.*, 2017).

Entre os antioxidantes de interesse observados em alimentos utilizados pela população destacam-se o Ácido ascórbico, a Curcumina e o Resveratrol.

## 2.4 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (Fig., 1), ácido L-ascórbico, ou vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel conhecida por seu papel antioxidante. A vitamina C pode ser encontrada em muitas frutas e vegetais como: laranja, kiwi, morango, pimenta vermelha e verde, brócolis, tomate, repolho, batata, etc. Além disso, é suplementado em cereais, sucos e multivitaminas. Sua deficiência está classicamente relacionada ao escorbuto, com sintomas que incluem fraqueza, cansaço, diminuição da resistência a infecções e hemorragias (HART *et al.*, 2015).

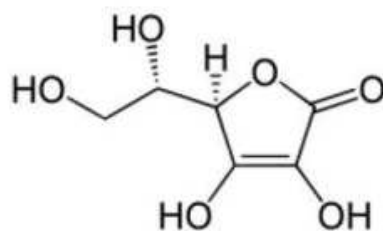


Figura 1: Estrutura química do ácido ascórbico (ATTIA *et al.*, 2020).

O ácido ascórbico é absorvido no intestino delgado distal, tendo sua concentração plasmática rigorosamente regulada por absorção, acúmulo tecidual e



reabsorção renal, raramente excedendo  $100\mu\text{mol/L}$ . Quando ingerida em maiores concentrações, a Vitamina C não metabolizada é excretada na urina e nas fezes, apresentando baixa toxicidade. Em casos de excesso de vitamina C, podem ocorrer sintomas como diarreia, náusea e cólicas abdominais inerentes ao efeito osmótico da vitamina não absorvida no trato gastrointestinal (HART *et al.*, 2015).

Proteínas transportadoras de vitamina C dependentes de sódio (SVCT) controlam a maior parte da absorção, distribuição e recaptção renal da vitamina C, co-transportando sódio de ascorbato através das membranas celulares. Nossos órgãos possuem uma distribuição distinta de SVCTs, sendo um dos fatores da distribuição desigual de vitamina C no organismo (LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2019).

O ascorbato é a forma aniônica ativa da vitamina C, que reage com radicais livres e têm potencial antioxidante. Durante seu metabolismo, o ascorbato sofre oxidação, perdendo um elétron e formando o radical ascorbila, um radical relativamente não reativo. Dois radicais ascorbil reagem e foram como produto dessa interação, uma molécula de ascorbato e uma de dehidroascorbato (DHA). O DHA pode ser reduzido a ácido ascórbico pelo sistema enzimático citosólico tioltransferase, se não for reduzido, é degradado e eliminado pela urina. Humanos não podem sintetizar o ascorbato por não possuírem a L-gulonolactona oxidase funcional, enzima que participa da última etapa da síntese de ascorbato (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; MORITZ *et al.*, 2020).

Estudos a nível celular demonstraram que a Vitamina C é capaz de induzir a formação de osteoblastos e osteoclastos. No entanto, em altas doses pode aumentar o estresse oxidativo levando a célula à morte. Pesquisas em animais demonstraram que a deficiência de Vitamina C aumentou a formação de osteoclastos, prejudicando a formação óssea e em sua suplementação prevenir a perda óssea (CHIN; IMA-NIRWANA, 2018).

O ascorbato compõem o ciclo catalítico de enzimas que participam da síntese de colágeno, como lisil e prolihdroxilase e procolágeno-prolina 3-dioxigenase

(MORITZ *et al.*, 2020). A vitamina C atua na síntese e metabolismo de outras vitaminas e aminoácidos. Como a tirosina, ácido fólico, lisina e triptofano. Atua na regeneração da vitamina E, que age na proteção das membranas celulares e auxilia na absorção de ferro pelo organismo (ATTIA *et al.*, 2020; MORITZ *et al.*, 2020).

A dose e frequência da administração do ácido ascórbico influenciam seu mecanismo de ação e metabolismo. Em baixas concentrações, pode diminuir as concentrações de ROS, ou neutralizar ROS já formadas, cessando o estresse oxidativo e diminuindo os efeitos dos radicais livres nas células. O ácido ascórbico também regula a expressão de Ki67, marcador conhecido para o câncer de mama, desempenhando papel na regressão do crescimento de tumores pancreáticos, mamários, pulmonares, renais e hepáticos. Em concentrações altas, pode levar as células cancerígenas a apoptose (ATTIA *et al.*, 2020).

## 2.5 Curcumina

Curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona), é um composto ativo retirado do rizoma da *Curcuma longa L.* (Cúrcuma), que corresponde a 77% da sua composição, enquanto os outros curcuminóides, Demetoxicurcumina e Bisdemetoxicurcumina correspondem a 17% e 3-6%, respectivamente. A curcumina é um polifenol (Fig.2), que apresenta coloração amarelada, sendo originária da Índia, e posteriormente cultivada em várias partes do mundo (BRASIL, 2015; KOTHA & LUTHRIA, 2019).

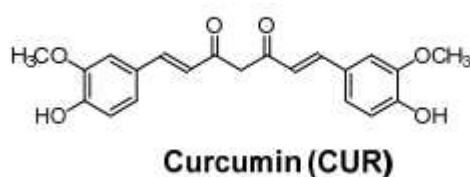


Figura 2: Estrutura da Curcumina (KOTHA & LUTHRIA, 2019).

Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaios clínicos, têm demonstrado que a curcumina possui inúmeras atividades benéficas ao organismo: atividade anticâncer, antioxidante,

antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antidepressiva, antiestresse, neuroprotetora, hepatoprotetora, cardioprotetora, quimiopreventiva, na cicatrização de feridas, entre outras, auxiliando em doenças como câncer de próstata, Doença de Alzheimer, Parkinson, diabetes, e doenças ósseas como osteoporose e osteopenia (BRASIL, 2015).

A maior parte da curcumina ingerida não é metabolizada pelo nosso organismo, sendo excretada nas fezes. A parte absorvida da curcumina é convertida em metabólitos hidrossolúveis, glicuronídeos e sulfatos.

O metabolismo microbiano, por meio de um processo NADPH dependente, reduz a curcumina para dihidrocurcumina e tetrahidrocurcumina. A curcumina e seus derivados são conjugados com um monoglucuronídeo, formando curcumina-glucuronídeo, di-hidrocurcumina glucoronósido, tetra-hidrocurcumina glucuronósido e sulfato/glucuronósido misto (JAGER, *et al.*, 2014).

A curcumina é uma substância com baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade, o que dificulta seu uso em pesquisas terapêuticas. Demonstrando características metabólicas de primeira passagem, com metabólitos que tem atividade metabólica reduzida e que podem ser rapidamente eliminados.

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram o potencial antioxidante da curcumina. A curcumina age sobre os radicais superóxidos, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio formados por macrófagos, aparentemente tendo sua ação antioxidante relacionada a um aumento na degradação de hemoglobina e pela inibição da peroxidação lipídica. A curcumina pode aumentar a ativação do fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), pode proteger a hemoglobina de processos oxidativos, e além disso, restringir a ação da óxido nítrico sintase dos macrófagos (ALABDALI *et al.*, 2021).

Além disso, pesquisas evidenciaram que a curcumina é pouco absorvida quando administrada oralmente, levando a administração conjunta com outras substâncias que aumentam sua biodisponibilidade, como piperina, encapsulamento

com ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e ciclodextrina, entre outras. Essas formulações com outras substâncias, também são aplicadas via tópica e intravenosa. Em pesquisas com ratos, a administração intravenosa de curcumina mostrou níveis séricos maiores se comparados a sua ingestão oral, e a via tópica também apresentou melhor bioatividade (KOTHA & LUTHRIA, 2019; VOLLONO *et al.*, 2019).

## 2.6 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trans-trihidroxiestilbeno) é um polifenol que pertence à família do estilbeno. É encontrado principalmente na uva e vinho, porém também pode ser encontrado em frutas vermelhas, ervilhas, bagas, amendoim etc. É sintetizado em diversas plantas em resposta a estresses ambientais, e é conhecido por diversas atuações no organismo, entre elas, ação antioxidante, neuroprotetora, antiinflamatória, anticancerígena e antienvhecimento (GALINIAK; AEBISHER; BARTUSIK-AEBISHER, 2019; MALAGUARNERA, 2019).

O resveratrol existe como dois isômeros geométricos cis e trans e sua forma trans-resveratrol (Fig. 3), mais estável e mais utilizado para fins terapêuticos, possui três grupos hidroxilas, que atuam na eliminação de radicais livres, inibindo o aumento da geração de ROS, inibindo a distribuição anormal das mitocôndrias e a peroxidação lipídica (GALINIAK; AEBISHER; BARTUSIK-AEBISHER, 2019).

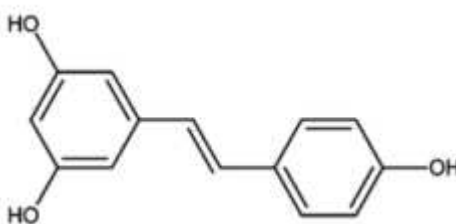


Figura 3: Estrutura do trans-resveratrol (MENG *et al.*, 2021).

Quando ingerido oralmente, apenas uma pequena concentração de resveratrol é encontrada na corrente sanguínea e nos tecidos do corpo, sendo altamente absorvido pelas células do intestino. Nos enterócitos, sua absorção ocorre por difusão

passiva ou transporte mediado por carreadores pela membrana apical, onde é metabolizado em glicuronídeos ou sulfatos de resveratrol. Cerca de 90% do resveratrol atinge o cólon, e é submetido a fermentação intestinal. Os metabólitos polifenólicos são metabolizados pelo fígado, sendo metilados, glucoronizados ou sulfatados, e após esses processos, penetram a circulação sistêmica atingindo os tecidos. O resveratrol ou seus metabólitos podem retornar ao intestino delgado através da bile ou serem excretados na urina (MENG *et al.*, 2021).

Pesquisas demonstraram que o resveratrol é pouco tóxico e a exposição a concentrações entre 700 e 1000 mg/kg peso corporal por dia, não expressaram efeitos toxicológicos, apresentando segurança em ensaios clínicos com 5g/dia. Apesar da rápida absorção via oral, apresenta baixa solubilidade em água (<0,05 mg/ml) devido a sua estrutura enzimática (ZHANG *et al.*, 2021).

O resveratrol interage com diversas vias bioquímicas, como a) na via NF- $\kappa$ B, envolvida com resposta imune a infecções; b) via IGF-1R/Akt/Wnt e via de sinalização da p53, relacionadas com desenvolvimento celular e tumorigênese; c) via PI3K/Akt, associada com a proliferação, diferenciação e crescimento celular; d) regula a sinalização de IL-6 e TNF- $\alpha$ , envolvidas com parâmetros inflamatórios, e) fosforila STAT1/STAT3, que agem como fatores de transcrição, entre outros.

Como antioxidante, o resveratrol pode atuar aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como GPx, glutathione S-transferase e glutathione reductase ou retirando radicais livres, diminuindo a incidência de lesões no DNA e da peroxidação lipídica nas membranas celulares (ZHANG *et al.*, 2021).

## **2.7 Formação e Desenvolvimento Ósseo**

O osso é composto por células e matriz extracelular. Sua composição básica inclui fibras de colágeno mineralizadas, proteínas não colágenas, minerais e água. As células do tecido ósseo, incluem os osteoblastos, responsáveis pela formação do osso, os osteoclastos, que participam da reabsorção óssea, os osteócitos que participam da sinalização celular e células de revestimento. A matriz óssea é 60%

inorgânica e 40% orgânica. A parte inorgânica é composta por diversos íons como bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, fluorita, zinco, bário e estrôncio, sendo os principais cálcio e fosfato. A parte orgânica é composta principalmente por colágenos, sendo o principal o colágeno tipo I (NARAYANAN *et al.*, 2019; BLACK; TADROS, 2020).

Os ossos respondem a estímulos metabólicos, físicos e endócrinos, estando em constante processo de reabsorção e renovação. São responsáveis pelo sustento da nossa locomoção, pela proteção dos nossos órgãos internos, participam da hematopoiese e armazenam metais e íons como chumbo, cálcio e fosfato (BROWN; LAURENCIN, 2020).

O osso pode ser formado por via intramembranosa e endocondral. Na formação intramembranosa, células progenitoras mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e na formação endocondral, as células progenitoras mesenquimais primeiramente se diferenciam em condrócitos, que formam um molde cartilaginoso que será mineralizado e substituído por osso (BROWN; LAURENCIN, 2020).

O osso passa continuamente por um processo de remodelação óssea, que ocorre simultaneamente à formação óssea, de forma dinâmica. O processo de remodelação envolve uma gama de fatores de crescimento e vias de sinalização. Os osteoclastos, são as células de reabsorção óssea e os osteoblastos as células que formam o osso (SOHAIL *et al.*, 2018).

## **2.8 Osteogênese Imperfeita**

A Osteogênese imperfeita (OI), também conhecida como “doenças dos ossos de vidro”, é uma doença genética, com prevalência de 1:15-20.000 recém-nascidos, caracterizada por fragilidade óssea, susceptibilidade a fraturas e deformidades na coluna vertebral e membros. Pacientes com OI também podem apresentar esclera azulada, dentinogênese imperfeita, audição comprometida dentre outras disfunções, com sintomas que se manifestam desde o período intrauterino até as diferentes fases do desenvolvimento (MARINI *et al.*, 2017; MOEKTI *et al.*, 2021).

A maioria dos casos de OI são causados devido a mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* que sintetizam as cadeias polipeptídicas da molécula de colágeno tipo I, principal proteína dos ossos, tendões e pele. Aproximadamente 15% dos casos ocorrem devido a mutações em outros genes, como naqueles relacionados com a formação e mineralização óssea, entre eles *LEPRE*, *SERPIN*, *WNT*, *BMP*, *IFITM* (MOEKTI *et al.*, 2021).

A OI possui ampla variabilidade clínica, com casos desde assintomáticos, ou com sintomas leves, até casos letais intra-útero e grande heterogeneidade genética, mais de 15 genes distintos estão relacionados com OI. A identificação de diversos genes mutados nesta doença permitiu a classificação dos pacientes de acordo com o gene mutado em cada família. Atualmente, a OI é dividida em XIII tipos.

Os tipos de OI de I a IV ocorrem devido a mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* e possuem herança autossômica dominante (AD). A classificação de OI de I a IV se baseia na gravidade da doença. Pacientes com OI tipo I possuem sintomas leves, como: pequeno número de fraturas durante a vida com poucas deformidades dos membros, esclera azulada, e em alguns casos perda auditiva e dentinogênese imperfeita, sem alteração na estatura. Os casos com letalidade intra-uterina ou pós-natal são classificados como OI tipo II. Exames de ultrassonografia no período gestacional indicam diversas anormalidades ósseas como problemas de mineralização, membros largos, enrugados e cortinados, costelas finas e frisas, angulação de ossos longos, e etc na OI tipo II.

Os casos graves e não letais ao nascimento de OI são classificados como OI tipo III. Os pacientes com este tipo de OI, em geral, sofrem grande número de fraturas ao longo da vida e desenvolvem graves deformidades ósseas, bem como apresentam baixa estatura, esclera azulada e dentinogênese imperfeita. A OI tipo IV é caracterizada por casos de severidade moderada entre os tipos I (leve) e III (grave).

Enquanto os tipos de OI de I a IV são causados por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* os tipos de OI de V-XIII são causados por mutações em outros genes relacionados, na maioria dos casos, com herança autossômica recessiva. A OI tipo V, é causada por mutação no gene *IFITM5*. Achados radiológicos de pacientes

com esta forma de OI mostram calcificação da membrana interóssea do antebraço, deslocamento da cabeça do rádio e formação de calo hiperplásico.

A OI tipo VI, está associada a mutações no gene *SERPINF1* e causam sintomas como deformidades esqueléticas de moderadas a graves e fraturas vertebrais por pressão, com ausência de dentinogênese imperfeita. Pacientes com OI tipo VII, causada por mutações no gene *CRTAP*, apresentam fraturas congênitas, esclera azulada, deformação do quadril e membros inferiores e desenvolvem osteopenia.

Pacientes com OI tipo VIII, causado por mutações no gene *P3H1*, apresentam deformidades ósseas graves, esclera normal e ausência de dentinogênese imperfeita. OI tipo IX está associada a mutações no gene *PPIB* e apresenta deformidades severas e esclera acinzentada. OI tipo X é causado por mutações no gene *SERPINH1* e tem como sintomas deformidade esquelética severa, esclera azulada, dentinogênese imperfeita, anormalidades na pele e hérnia inguinal.

OI tipo XI é causado por alterações no gene *FKBP10* é apresenta deformidades esqueléticas variando de leve a severa, esclera normal ou acinzentada e contraturas congênitas. OI tipo XII está relacionada a mutações nos genes *PLOD2* e *BMP1*, apresentando deformidades ósseas (leve-grave) e podendo apresentar contraturas progressivas e hérnia umbilical.

OI tipo XIII ocorre por mutações no gene *SP7*. Pacientes com este tipo de OI apresentam deformidades esqueléticas severas com atraso da erupção dentária e hipoplasia facial. OI tipo XIV ocorre por mutações no gene *TMEM38B*. Pacientes com este tipo de OI apresentam deformidades ósseas severas e esclera normal ou azulada. Pacientes com OI tipo XX, causada por mutação no gene *WNT1*, apresentam deformidades esqueléticas graves, esclera normal e possíveis defeitos neurológicos.

Pacientes com OI tipo XVI, causado por mutações no gene *CREB3L1*, apresentam deformidades ósseas severas. Pacientes com OI tipo XVII, causado por mutações no gene *SPARC*, apresentam fragilidade óssea progressiva. Pacientes com OI tipo XVIII, causada por mutações no gene *MBTPS2*, apresentam deformidade



esquelética moderada a grave, esclera ligeiramente azulada, escoliose e deformidades peitorais (MARINI *et al.*, 2017; MOEKTI *et al.*, 2021).

O diagnóstico de OI geralmente é feito com base nos aspectos clínicos e exames radiológicos do paciente, considerando o histórico familiar. Nos exames clínicos os pacientes com OI apresentam parâmetros metabólicos e bioquímicos normais, com exceção do tipo IV, onde pode ocorrer aumento da fosfatase alcalina. O diagnóstico molecular é mais preciso, porém ainda pouco acessível a maioria dos pacientes e sistemas de saúde (SAM & DHARMALINGAM, 2017).

O tratamento da OI ocorre via tratamentos das fraturas e deformidades esqueléticas e terapias que visam mitigar a fragilidade óssea, prevenir o aparecimento de deformidades, diminuir dores e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com uso de medicamentos, intervenções cirúrgicas, fisioterapia e terapias experimentais de reposição celular, gênicas e com hormônios de crescimento (SAM & DHARMALINGAM, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade de células-tronco mesenquimais tratadas com ácido ascórbico, curcumina e resveratrol para verificar a segurança destes compostos do ponto de vista da proliferação celular, direcionando estudos futuros destes compostos como potenciais bioterapêuticos no tratamento paliativo da Osteogênese Imperfeita.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter cultura de células-tronco mesenquimais a partir de amostras de tecido adiposo de pacientes com OI e controles não afetados;
- Definir concentrações de ácido ascórbico, curcumina e resveratrol para tratamento de células-tronco mesenquimais em cultura e
- Avaliar se o tratamento de células-tronco mesenquimais com ácido ascórbico, curcumina e resveratrol influenciam a viabilidade celular em experimentos *in vitro* de amostras de pacientes com OI e controles.

## **4 METODOLOGIA**

Este estudo foi realizado no Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (NGHM-UFES) e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos sob o número do parecer CAAE: 2.171.595. Somente foram incluídos na pesquisa os indivíduos que concordaram em participar do estudo por meio do Termo de Consentimento de Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento.

### **4.1 Coleta de material biológico**

Amostras de tecido adiposo (5-10 mm), foram coletados de pacientes dos hospitais Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HEINSG) Vitória/ES e Hospital Estadual Dório Silva (HDS) Serra/ES, obtidas em cirurgias ortopédicas de correção realizadas com indicação médica prévia e coleta de amostras sem que houvesse prejuízo ao paciente.

Foram obtidas amostras de 4 participantes, duas amostras de pacientes e duas amostras de controles (indivíduos que não possuem OI). As amostras GP13 e GP14 desta pesquisa foram obtidas de pacientes com diagnóstico clínico e radiológico de OI que fazem tratamento hospitalar. Como controles (indivíduos que passaram por cirurgias ortopédicas, mas, não apresentam OI) esta pesquisa contou com as amostras GC90 e GC92.

### **4.2 Cultura celular**

Para a preparação e desenvolvimento da cultura de células, a partir de um fragmento do tecido adiposo foi utilizado o protocolo descrito por Zuk *et al.* (2001) e Zuk *et al.* (2002). O fragmento de tecido adiposo coletado foi lavado extensivamente com tampão, phosphate-buffered saline (PBS). As células lavadas foram tratadas com 0,075% de colagenase em PBS por 30 minutos a 37°C. Após essa etapa a colagenase foi inativada por meio de cultivo DMEM suplementado com 10% (v/v) soro

fetal bovino e posteriormente as células foram centrifugadas por 10 min a uma velocidade de 1200 xg para obtenção do precipitado celular (*pellet*). O *pellet* foi ressuspensionado em 160 mM de NH<sub>4</sub>Cl e deixado em temperatura ambiente por 10 min. Após esta etapa, as células foram ressuspensionadas e logo após incubadas *overnight* por 37°C/5% CO<sub>2</sub> em um meio controle contendo DMEM, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) de antibióticos e antimicóticos. Após a incubação, as células foram lavadas extensivamente com PBS.

Após realizada a cultura primária a partir do tecido coletado, as células foram expandidas, utilizando as mesmas condições de cultura citadas previamente. Em seguida, as culturas foram tratadas com antioxidantes. Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio de MTT pós-tratamento nas passagens 1-6 de cultura celular.

#### **4.3 Determinação da concentração dos antioxidantes**

Foram selecionados 3 antioxidantes: ácido ascórbico, resveratrol e curcumina. A concentração utilizada de cada um deles neste experimento foi escolhida de acordo com a descrição abaixo.

As concentrações de ácido ascórbico foram baseadas nos resultados nos trabalhos de Brigelius-Flohé; Flohé, 1996 e Le Nihouannen *et al.*, 2010. Para o Ácido ascórbico foram avaliadas as concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200µg/mL.

As concentrações de Curcumina foram baseadas na revisão feita por Kotha & Luthria, 2019 e no resultado de MTTs anteriores, em que a concentração de curcumina acima de 10µg/mL foi tóxica para as células, matando todas as células do experimento. Assim, para a Curcumina as concentrações foram utilizadas foram de 0,05, 0,01, 0,3, 0,5 e 0,8µg/mL.

As concentrações de Resveratrol utilizadas para o experimento foram escolhidas de acordo com Erdman *et al.*, 2012. Para o Resveratrol 6,25, 12,5, 25, 50 e 100µM/mL.

As concentrações escolhidas todos os antioxidantes (ácido ascórbico, resveratrol e curcumina) foram obtidas de acordo com sugestões da literatura. Foram utilizadas também concentrações próximas aquelas sugeridas pela literatura, de forma que no total, foram realizadas exposições a 5 concentrações de cada antioxidante nas culturas celulares tratadas.

#### 4.3.1 Condições de tratamento das culturas celulares com agentes antioxidantes

O tratamento das culturas celulares foi realizado em 5 concentrações específicas para cada antioxidante (ácido ascórbico, resveratrol e curcumina) e em triplicatas para cada amostra. As culturas foram avaliadas em 24, 48 e 72 horas para todos os antioxidantes, após início do tratamento.

#### 4.4 Avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT

Esta metodologia é baseada na metabolização do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Invitrogen™, pelas mitocôndrias das células viáveis, essas células contêm enzimas oxidorreduções dependentes de NAD(P)H que reduzem o MTT em formazan (Fig. 4).

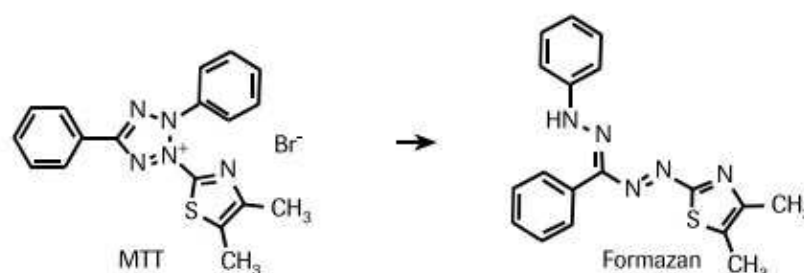


Figura 4: Metabolismo do MTT em formazan (Sigma Aldrich, 2023).

Foram plaqueadas 500 células/poço para cada indivíduo estudado em triplicata, em duas placas de 96 wells com meio de cultivo. Após o período de 24h o meio de cultivo foi removido e foi adicionado o meio com os antioxidantes e os seus respectivos diluentes. O teste de MTT foi realizado após 24, 48 e 72h de exposição aos antioxidantes Resveratrol e Ácido ascórbico. As culturas foram expostas a curcumina durante 24h, após esse período o meio contendo o antioxidante foi retirado e substituído pelo meio sem tratamento, devido ao seu possível efeito tóxico em maiores quantidades, que inviabilizaria os experimentos. Amostras de controle sem tratamento receberam o meio DMEM, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) de antibióticos e antimicóticos.

Para cada dia de leitura, após o período de incubação, o meio de cultivo (com e sem tratamento) foi removido e foi adicionado meio DMEM puro acrescido com 10 µL de MTT.

Após essa etapa, as placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas por 4 horas em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, a solução com MTT foi removida e foi acrescentado as placas 100 µL de DMSO por poço e novamente a placa foi incubada por 1 hora, envolta em papel alumínio.

Após essa incubação, a placa foi lida no espectrofotômetro a absorvância de 570nm. Feita a leitura, os dados foram analisados, comparando as médias dos resultados entre as concentrações e condições estudadas.

#### **4.5 Análises dos Resultados**

A viabilidade celular das células-tronco mesenquimais foi avaliada em cada tratamento no comprimento de onda de 570nm. Os resultados desses experimentos foram expressos em média ± PE dos valores de absorvância de quatro amostras, duas de pacientes com OI (GP13 e GP14) e duas de controles, caracterizado por indivíduos que não apresentavam OI (GC90 e GC92). Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparação de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do MTT refletem a quantidade de células viáveis em cultura, considerando que esse teste é utilizado para medir a atividade metabólica da célula, onde a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

Assim, o cálculo da viabilidade celular foi realizado através da média dos valores de absorvância (valores brutos da absorvância estão contidos no anexo I) das triplicatas para cada concentração dos tratamentos de acordo com (WANG *et al.*, 2011), onde

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Média da abs. dos tratamentos}}{\text{Média da abs. das células não tratadas}} \times 100$$

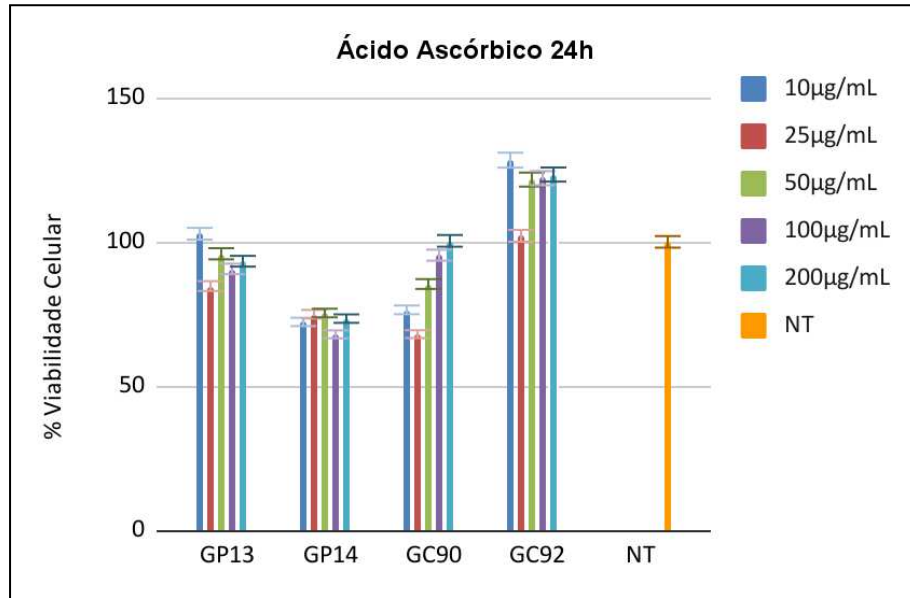
A viabilidade celular nesse estudo reflete os dados da absorvância entre as células de pacientes e controles com os três antioxidantes, divididas pela absorvância das células sem tratamento. Além disso, na interpretação dos resultados, as porcentagens acima de 100% (porcentagem de viabilidade das células não tratadas), indicam que as células sofreram estímulo de crescimento. Foram realizadas comparações entre as médias dos resultados obtidos entre as amostras por meio do teste de Tukey.

Neste estudo consideramos que os benefícios do ácido ascórbico, curcumina e resveratrol às células estão relacionados, entre outros, ao efeito antioxidante dessas substâncias, que permitiria a maior sobrevivência dessas células, aumentando sua viabilidade celular. No entanto, essa relação não é conclusiva, considerando os diversos efeitos dessas substâncias ao nível celular e a metodologia utilizada que se aplica a proliferação celular e não diretamente a atividade antioxidante dessas substâncias. Entretanto, sua condição antioxidante é altamente descrita na literatura, sendo as três substâncias largamente conhecidas como potenciais antioxidantes.

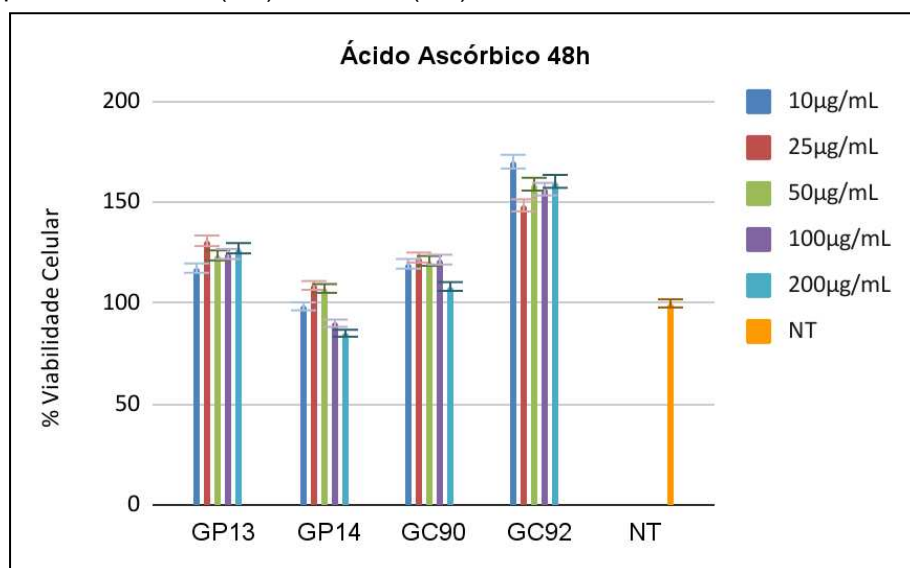
## 5.1 Ácido Ascórbico

Os resultados obtidos após tratamento das células com ácido ascórbico em 24, 48 e 72 horas estão representados nos gráficos 1, 2 e 3, respectivamente.

**Gráfico 1:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).

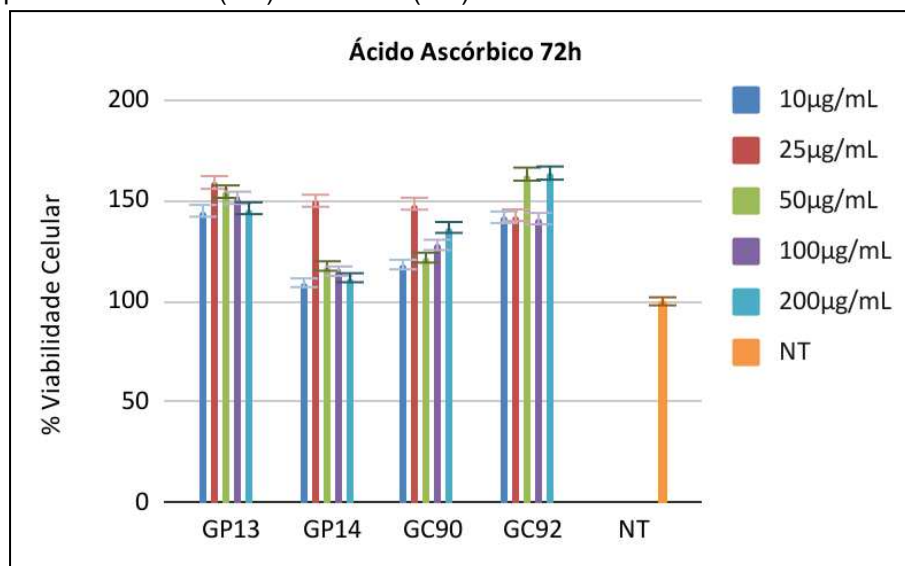


**Gráfico 2:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).





**Gráfico 3:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com ácido ascórbico em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



Em 24h de tratamento, a maioria das culturas das amostras expostas ao ácido ascórbico (GP14, GP13 e GC90) tiveram redução da viabilidade celular em comparação às células não tratadas (Gráfico 1). Quando esse perfil de comportamento celular ocorre após modificação de um meio de cultura, é provável que as células em cultura precisem se adaptar às mudanças do meio para se adaptarem ao novo composto. Outra possibilidade, seria que esse período inicial de 24h pode representar o tempo necessário para metabolização do ácido ascórbico.

Em geral, no tratamento com ácido ascórbico, todas as amostras apresentaram aumento da viabilidade celular em 48h e 72h, em comparação às porcentagens das células não tratadas (Gráficos 2 e 3). Assim, apesar de em um primeiro momento as taxas de viabilidade celular reduzirem, após 48h ocorreu a estimulação da proliferação celular, o que pode ter relação com o tempo de metabolização do ácido ascórbico, ou ainda, ser resultado dos mecanismos enzimáticos presentes nas células responsáveis por manter a concentração de ácido ascórbico intracelular.

Entre as peculiaridades das amostras estudadas, foi observado que o controle GC92 apresentou alta viabilidade ao ácido ascórbico em 24h, se comparado às demais amostras, diferença estatisticamente significativa. Este resultado pode estar refletindo a melhor condição metabólica dessas células.

Além disto, a amostra do paciente GP14 foi aquela com menor resposta ao tratamento, possivelmente, devido às limitações metabólicas associadas à doença. Porém, mesmo assim, ainda obteve um resultado maior que 100% de viabilidade em 48 e 72h. Em 72h, os pacientes e controles apresentaram estimulação da proliferação celular.

O paciente GP13 obteve melhor resposta que o paciente GP14 em todos os tempos de exposição ao ácido ascórbico, diferença estatisticamente significativa. Isso pode sugerir melhor condição da integridade celular desse paciente e que para esse paciente o efeito do tratamento foi muito benéfico, considerando seu comportamento de aumento da viabilidade celular semelhante aos controles.

Diversos estudos apontam que o ácido ascórbico está relacionado a muitas respostas celulares em diferentes células do nosso organismo, e modulação de processos celulares que envolvem síntese (como ocorre com o colágeno), proliferação e diferenciação celular, tendo efeito dose-dependente (HATA, 1996).

Nossos resultados colaboram com a literatura que descreve a estimulação da proliferação celular pelo ácido ascórbico em diferentes células mesenquimais, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos.

Estudos com osteoblastos bovinos primários *in vitro*, com tratamentos de 25, 10, 200, 300, 400 e 500µg/ml, demonstraram que com a adição de até 200µg/ml de ácido ascórbico ocorreu aumento no número de células em todos os meios, porém, nas concentrações acima de 200µg/ml não ocorreu a proliferação celular, apontando para o efeito citotóxico do AA nas células em grandes concentrações (URBAN et al., 2012).

O ascorbato, forma aniônica do ácido ascórbico, demonstrou ter efeito positivo sobre o crescimento celular e sobre a manutenção da viabilidade celular, em células de fibroblastos humanos (CHEPDA et al., 2001).

Esse efeito também foi visto no trabalho de Takamizawa et al., utilizando 0.25 a 1 mM de AA em células MG-63 (células de osteossarcoma humano), onde o ácido ascórbico demonstrou estimular o crescimento celular, e inibir ou não afetar o crescimento conforme a dose de AA e em casos de aumento no  $O_2$  *in vitro* (TAKAMIZAWA *et al.*, 2004).

Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, tratadas com L-ascorbato-2-fosfato, demonstraram aumento na proliferação celular quando expostas a uma concentração de 250  $\mu$ M, no mesmo estudo concentrações de 500  $\mu$ M levaram a morte celular (CHOI *et al.*, 2008).

O ácido ascórbico pode, ainda, modular a proliferação e a diferenciação celular, como foi mostrado na indução da diferenciação de queratinócitos (SAVINI *et al.*, 2002); na promoção da diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas (WANG *et al.*, 2006); na promoção da diferenciação de células-tronco embrionárias em cardiomiócitos (SATO *et al.*, 2006); na estimulação da síntese de colágeno em fibroblastos da pele humana (YAMAMOTO *et al.*, 1992), etc.

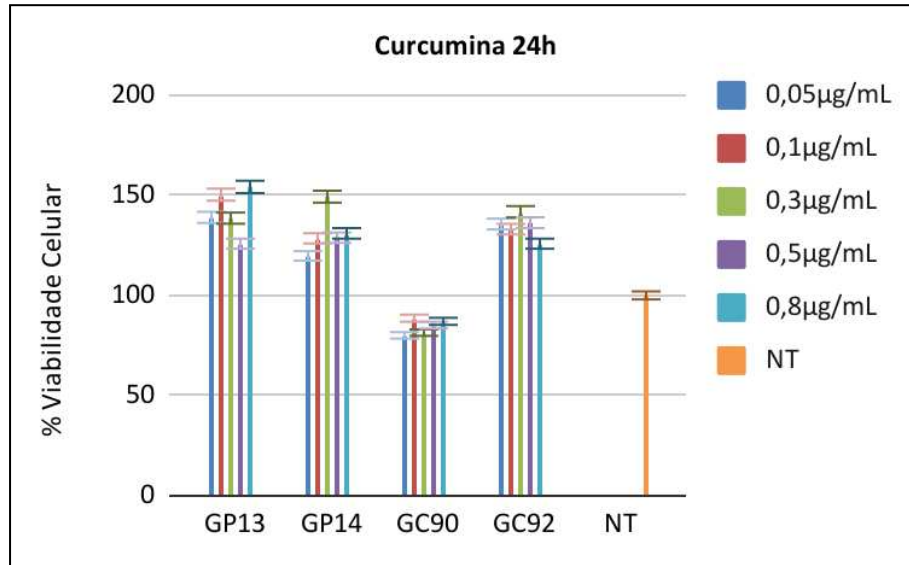
Por outro lado, altas doses de ácido ascórbico podem ter ação citotóxica, aumentando o estresse oxidativo nas células. Assim, podem ser utilizadas para diminuir a proliferação celular, principalmente em pesquisas com células cancerígenas (CASCIARI *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2010).

Os nossos resultados sugerem que apesar de em um primeiro momento (após 24h de tratamento) as taxas de proliferação reduzirem, após 48h e 72h esses valores ultrapassam a viabilidade de células não tratadas. Sugerindo que o ácido ascórbico possui potencial bioterapêutico para ser investigado no tratamento paliativo da OI.

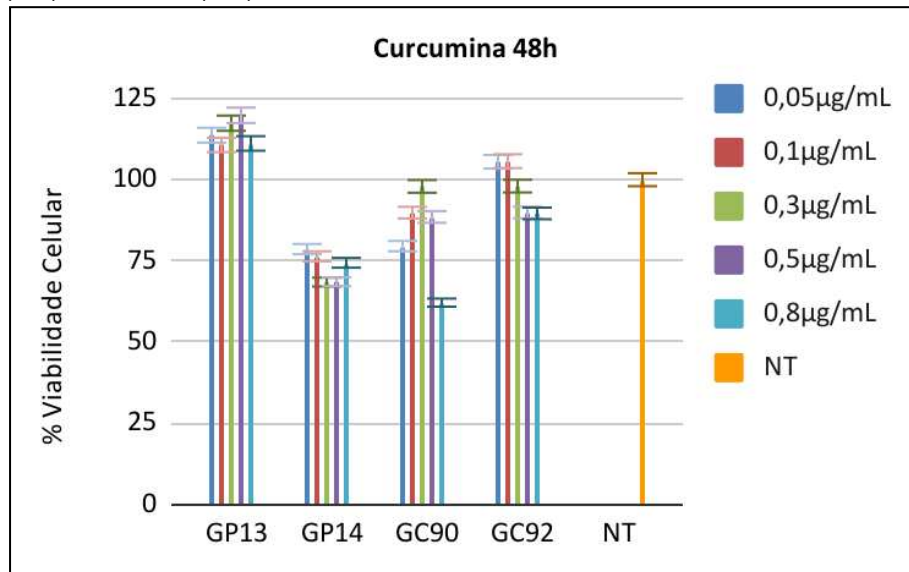
## **5.2 Curcumina**

Os resultados obtidos após tratamento das células com curcumina em 24, 48 e 72 horas estão representados nos gráficos 4, 5 e 6, respectivamente.

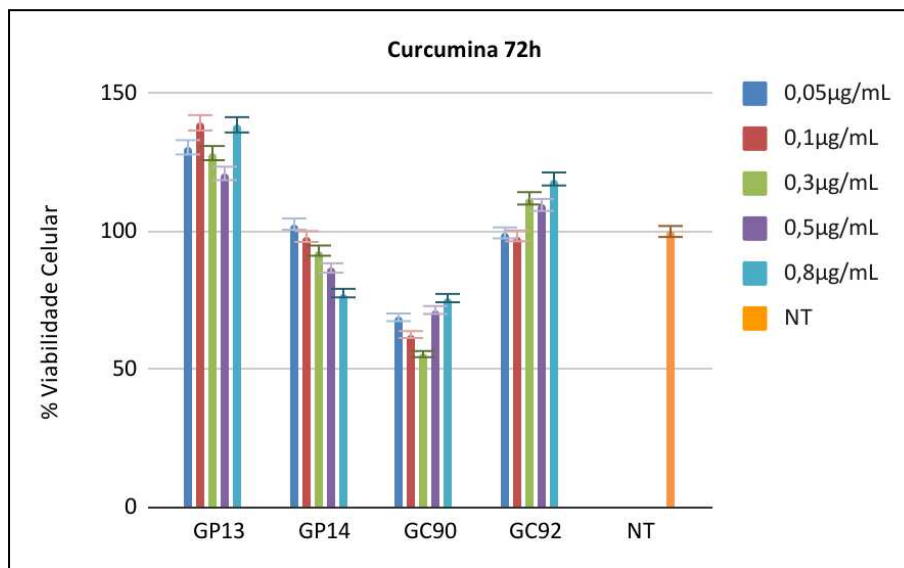
**Gráfico 4:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



**Gráfico 5:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



**Gráfico 6:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com curcumina em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



Para a curcumina, o tratamento em 24h teve relevante efeito benéfico, com aumento da viabilidade celular comparado a células não tratadas para as amostras tanto de pacientes GP13 e GP14, como do controle GC92. Contudo, o tempo de exposição da curcumina nas culturas causou uma queda na viabilidade celular, o que pode estar relacionado a pouca solubilidade e biodisponibilidade da curcumina, a ação reduzida dos seus metabólitos e ainda, a sua rápida eliminação.

Para as amostras de pacientes, a cultura GP13 teve uma resposta melhor, com diferença estatisticamente significativa em 48 e 72h, se comparada a GP14.

Essa diferença pode ter ocorrido pois a OI é uma doença com ampla heterogeneidade genética e os pacientes podem apresentar diferentes variações moleculares, de forma que o efeito antioxidativo seja mais importante em alguns tipos de OI do que em outros. Outra hipótese que pode explicar as diferenças de resposta da curcumina entre as culturas dos pacientes é que a menor taxa de resposta ao tratamento de GP14 pode refletir um estado de maior comprometimento da saúde deste indivíduo, assim, mesmo na presença de compostos terapêuticos a recuperação celular se torna mais lenta em relação a amostras mais saudáveis.

Essas diferenças únicas também podem explicar as variações observadas de resposta à curcumina entre as culturas de controles GC92 em relação a GC90 em 24 e 72h.

A exposição das células após 48h de tratamento das culturas provocou uma diminuição de viabilidade celular em relação às células não tratadas em aproximadamente 20%, o que pode ser explicado pela tentativa das células na presença do antioxidante em ajudar na recomposição tecidual reprimindo a proliferação celular.

Kim *et al.*, também realizaram estudos com a curcumina em pré-adipócitos 3T3-L1, e os resultados mostraram que em baixas concentrações a curcumina exibe um efeito estimulador sobre o crescimento celular, sendo tóxica em altas concentrações nessas células (KIM *et al.*, 2011).

As propriedades antioxidantes da curcumina foram demonstradas em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. Estudos com células epiteliais pigmentares da retina humana, demonstraram que o tratamento com 0–20  $\mu\text{mol/l}$  de curcumina durante 12h, inibiu a formação de ROS induzida pela alta ingestão de glicose, diminuiu p-AKT e p-mTOR (RAN *et al.*, 2019). Estudos em ovário de camundongos por imunofluorescência, com 100mg/kg em 6, 12 e 33 semanas demonstraram que a curcumina aumentou GHS, SIRT-1 e SIRT-3 e diminuiu o estresse oxidativo e a apoptose (AZAMI *et al.*, 2020).

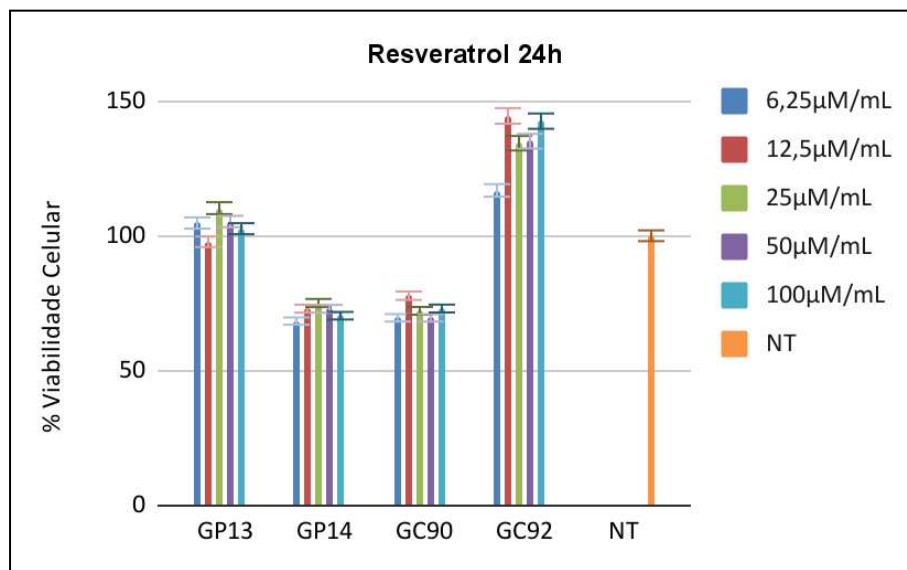
Estudos para a Doença de Alzheimer com imunocitoquímica e microscopia confocal demonstraram que a curcumina conserva a estrutura celular da anormalidade (MORALES *et al.*, 2017). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que derivados da curcumina eliminam radicais livres. Esses efeitos da curcumina como antioxidantes geram melhores condições de sobrevivência dessas células, contribuindo para o aumento ou manutenção da proliferação celular (JOHN; DEVI; BALACHANDRAN, 2018).

Nossos resultados sugerem que os efeitos benéficos da curcumina são observados em 24h de exposição e que a exposição prolongada pode levar a efeitos prejudiciais quanto à proliferação celular. Assim, a curcumina deve ser estudada com cautela na busca de bioterapêuticos para o tratamento da OI.

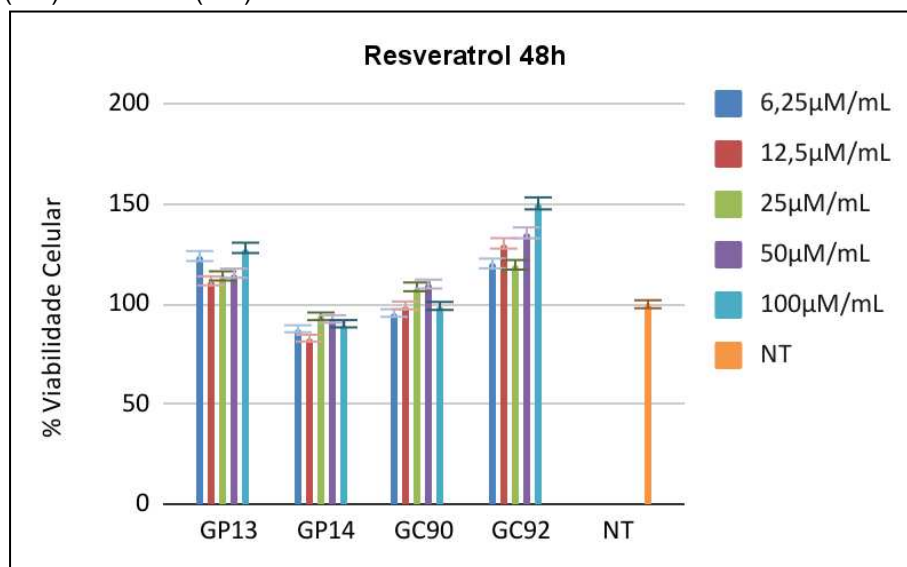
### 5.3 Resveratrol

Os resultados obtidos após tratamento das células com resveratrol em 24, 48 e 72 horas estão representados nos gráficos 7, 8 e 9, respectivamente.

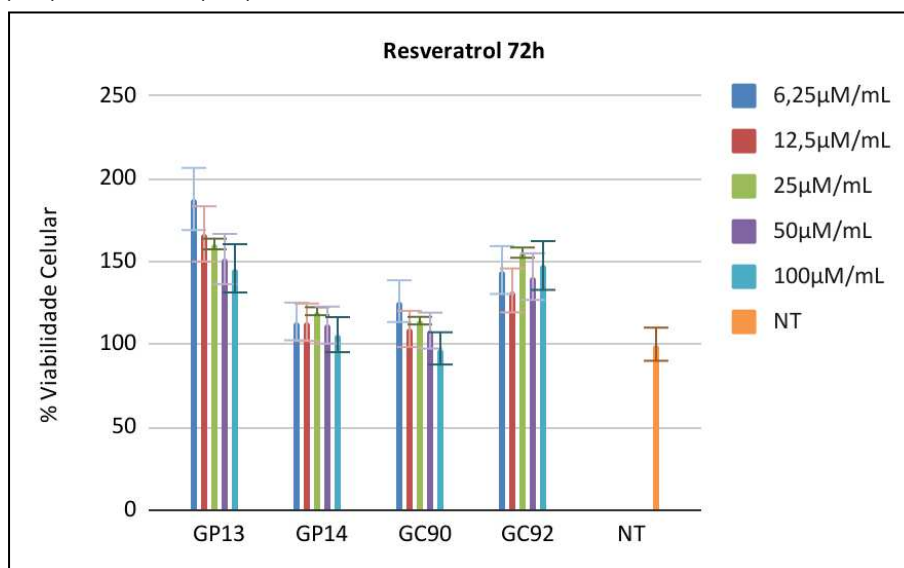
**Gráfico 7:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 24h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



**Gráfico 8:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 48h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



**Gráfico 9:** Porcentagem de viabilidade celular no tratamento com resveratrol em 72h, para as amostras tratadas e não tratadas (NT) de pacientes com OI (GP) e controles (GC).



A viabilidade celular se manteve boa após tratamento com resveratrol em todos os tempos aumentando de forma crescente até 72h, o que também pode estar relacionado ao tempo de metabolismo da substância no organismo.

As amostras de GP13 e GC92 apresentaram resultados melhores que GP14 e GC90 para o resveratrol. Para a condição de GP13 e GP14 o resveratrol trouxe bons resultados, considerando a célula de um paciente com OI.

As amostras GP14 e GC90 avaliadas em 24h de exposição tiveram o mesmo comportamento, melhorando a viabilidade em 48h e mantendo em 72h. Isso pode indicar que o acúmulo celular de atividade antioxidante poderia auxiliar na homeostase celular, conseqüentemente, melhorando a sobrevivência das células.

Diversos estudos demonstram que a ação do resveratrol aumentando a proliferação celular, condizente com os resultados dessa pesquisa.



Estudos com células osteoblásticas MC3T3-E1 com concentrações de  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$ M, demonstraram que o resveratrol aumenta a síntese de DNA, além de estimular a diferenciação dos osteoblastos (MIZUTANI *et al.*, 1998) . Esse resultado também foi demonstrado em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, onde as concentrações ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$ M), estimularam a proliferação celular e a diferenciação osteoblástica (DAI *et al.*, 2007).

Estudos com células-tronco mesenquimais humanas demonstraram que em baixas concentrações (0,1 mM), o resveratrol promoveu a auto-renovação celular, reduzindo a taxa de senescência e aumentando a proliferação celular, em contrapartida, concentrações mais altas (5 ou 10 mM) promoveram inibição da renovação celular, aumentando significativamente a taxa de senescência celular (PELTZ *et al.*, 2012).

Em um estudo com macrófagos transformados, células T derivadas de tumor e células de carcinoma epidermóide, baixas concentrações de resveratrol (5  $\mu$ M), estimularam a proliferação celular, enquanto altas concentrações (50  $\mu$ M), inibiram a proliferação dessas células (SHAITO *et al.*, 2020).

Ainda, estudos *in vivo* em camundongos demonstraram que o resveratrol promove a proliferação de células mamárias (ZHA *et al.*, 2021)

Por outro lado, existem estudos que sugerem que o resveratrol possui ação antiproliferativa, auxiliando na inibição da progressão do ciclo celular, levando células cancerígenas a apoptose (ESTROV *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2018).

Os nossos resultados sugerem que, apesar das variações individuais, em geral, o resveratrol melhora as taxas de proliferação celular de culturas em experimentos *in vitro*, principalmente após tratamento com 72h, indicando que ele possui potencial bioterapêutico para ser investigado no tratamento paliativo da OI.

Em síntese, todos os antioxidantes utilizados nos tratamentos favoreceram a manutenção ou melhoria nos níveis de viabilidade celular, demonstrando que mesmo as células dos pacientes (não saudáveis), obtiveram alguma vantagem metabólica. Isso é benéfico considerando que essas substâncias são de consumo acessível e podem facilmente ser incluídas na rotina farmacológica ou na dieta desses pacientes, levando-se em consideração seu efeito dose-dependente e pesquisas que avaliem a segurança e confiabilidade do uso dessas substâncias considerando diferentes patologias e condições clínicas e metabólicas.

## **6 CONCLUSÕES**

Concluimos, por meio dos resultados e análises realizadas, que o ácido ascórbico, a curcumina e o resveratrol, em geral, interferem positivamente na proliferação celular das células-tronco mesenquimais e que poderiam trazer efeitos benéficos aos pacientes, apontando caminho para novas pesquisas dessas substâncias como tratamento paliativo para a OI.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados desta pesquisa ajudaram na busca de compostos bioterapêuticos que poderão ser utilizados no tratamento da OI. Assim, como perspectiva futura para esta linha de estudo, sugere-se que sejam avaliados os mecanismos de ação antioxidante dos compostos testados, bem como realizar estudos de diferenciação e expressão gênica para inferir se a atividade antioxidante dessas substâncias está promovendo melhora na condição óssea dos pacientes com OI.

## 8 REFERÊNCIAS

ALABDALI, A. *et al.* Antioxidant activity of Curcumin. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 12, p. 6741-6746, 2021.

ATTIA, M. *et al.* An overview of the antioxidant effects of ascorbic acid and alpha lipoic acid (in liposomal forms) as adjuvant in cancer treatment. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 359, 2020.

AOKI S.; TAKEZAWA T.; SUGIHARA H.; TODA S. Progress in cell culture systems for pathological research. **Pathol Int.** 66(10):554-562. 2016.

AZAMI, S. H. *et al.* The antioxidant curcumin postpones ovarian aging in young and middle-aged mice. Reproduction, **Fertility and Development**, v. 32, n. 3, p. 292-303, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monografia da Espécie Curcuma longa L. (CURCUMA). Brasília, 2015.

BLACK, J. DJ.; TADROS, B. J. Bone structure: from cortical to calcium. **Orthopaedics and Trauma**, 2020.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Ascorbic acid, cell proliferation, and cell differentiation in culture. **Subcellular Biochemistry: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology**, p. 83-107, 1996.

BROWN, J. L.; LAURENCIN, Cato T. Bone tissue engineering. In: **Biomaterials Science**. Academic Press, 2020. p. 1373-1388.

CASCIARI, J. J. *et al.* Cytotoxicity of ascorbate, lipoic acid, and other antioxidants in hollow fibre in vitro tumours. **British journal of cancer**, v. 84, n. 11, p. 1544-1550, 2001.

CERQUENI, G. *et al.* Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 130, p. 112433, 2021.

CHEPDA, T. *et al.* Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 37, n. 1, p. 26-30, 2001.

CHIN, K.-Y.; IMA-NIRWANA, S. Vitamin C and bone health: evidence from cell, animal and human studies. **Current drug targets**, v. 19, n. 5, p. 439-450, 2018.

CHOI, K.-M. *et al.* Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 105, n. 6, p. 586-594, 2008.

DAI, Z. *et al.* Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. **Phytomedicine**, v. 14, n. 12, p. 806-814, 2007.

DING, D.; SHYU, W.; LIN, S. Mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011.

DOMAZETOVIC, V. *et al.* Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209, 2017.

DU, J. *et al.* Mechanisms of Ascorbate-Induced Cytotoxicity in Pancreatic Cancer Ascorbate and Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 509-520, 2010.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, Garry R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.

ERDMAN, C. P. *et al.* Effects of resveratrol on enrichment of adipose-derived stem cells and their differentiation to osteoblasts in two- and three-dimensional cultures. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 6, n. S3, p. s34-s46, 2012.

ESTROV, Z. *et al.* Resveratrol blocks interleukin-1 $\beta$ -induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 987-995, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. Clarendon. 1989.

GALINIAK, S.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. Health benefits of resveratrol administration. **Acta biochimica polonica**, v. 66, n. 1, p. 13-21, 2019.

GHILARDI, N. *et al.* 30 Years of biotherapeutics development—what have we learned?. **Annual Review of Immunology**, v. 38, p. 249-287, 2020.

HART, A. *et al.* The role of vitamin C in orthopedic trauma and bone health. **Am. J. Orthop**, v. 44, p. 306-311, 2015.

Hata R. Regulation of gene expression and cell differentiation by ascorbic acid (vitamin C). In: Muramatsu T, editor. Gene expression and nutrition. **Research Signpost**, Trivandrum, 1996, p. 1–23.

JÄGER, R. *et al.* Comparative absorption of curcumin formulations. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2014.

JOHN, J.; DEVI, R. S.; BALACHANDRAN, S. A comparative study on the antioxidant properties of curcuminoids and its rubrocurcumin analogues. **Bulletin of Pure & Applied Sciences-Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 121-125, 2018.

KIM, J.H. *et al.* Curcumin stimulates proliferation, stemness acting signals and migration of 3T3-L1 preadipocytes. **International journal of molecular medicine**, v. 28, n. 3, p. 429-435, 2011.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019.

LE NIHOUANEN, D. *et al.* Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1336-1343, 2010.

LI, X. *et al.* Resveratrol inhibits the proliferation of A549 cells by inhibiting the expression of COX-2. **OncoTargets and therapy**, p. 2981-2989, 2018.

LIU, J. *et al.* Mesenchymal stem cells and their microenvironment. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 429, 2022.

LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. The pharmacokinetics of vitamin C. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2412, 2019.

MACHADO, C. V.; TELLES, P. D. S.; NASCIMENTO, I. L. O. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, p. 62-67, 2013.

MALAGUARNERA, L. Influence of resveratrol on the immune response. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 946, 2019.

MARCHI, S. *et al.* Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. **Journal of signal transduction**, v. 2012, 2012.

MARINI, J., FORLINO, A., BÄCHINGER, H. *et al.* Osteogenesis imperfecta. **Nat Rev Dis Primers** 3, v. 3, n. 17052, p. 1-19, 2017.

MENG, T. *et al.* Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 229, 2021.

MISHRA, V. K. *et al.* Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1145, 2020.

MIZUTANI, K. *et al.* Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 3, p. 859-863, 1998.

- MOEKTI, R. S. *et al.* Molecular genetics of osteogenesis imperfecta. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2021. p. 012074.
- MORALES, I. *et al.* The natural product curcumin as a potential adjuvant in Alzheimer's treatment. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 60, n. 2, p. 451-460, 2017.
- MORITZ, B. *et al.* The role of vitamin C in stress-related disorders. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 85, p. 108459, 2020.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 11, p. e54-e54, 2013.
- NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 349-361, 2013.
- NARAYANAN, A. *et al.* Regulation of Runx2 by microRNAs in osteoblast differentiation. **Life sciences**, v. 232, p. 116676, 2019.
- NEHA, K. *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.
- PELTZ, L. *et al.* Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37162, 2012.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.
- RAN, Z. *et al.* Curcumin inhibits high glucose-induced inflammatory injury in human retinal pigment epithelial cells through the ROS-PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 2, p. 1024-1031, 2019.
- SAM, J. E.; DHARMALINGAM, M. Osteogenesis imperfecta. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 21, n. 6, p. 903, 2017.
- SATO, H. *et al.* Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 342, n. 1, p. 107-112, 2006.
- SAVINI, I. *et al.* Characterization of keratinocyte differentiation induced by ascorbic acid: protein kinase C involvement and vitamin C homeostasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 2, p. 372-379, 2002.
- SILLENCE, D.I.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of medical genetics**, v. 16, n. 2, p. 101-116, 1979.
- SHAITO, A. *et al.* Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 2084, 2020.

SHARIFI, S. *et al.* Stem cell therapy: curcumin does the trick. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 11, p. 2927-2937, 2019.

SOHAIL, A. *et al.* Role of key players in paradigm shifts of prostate cancer bone metastasis. **Cancer management and research**, v. 10, p. 1619, 2018.

TAKAMIZAWA, S. *et al.* Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. **Cell biology international**, v. 28, n. 4, p. 255-265, 2004.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

URBAN, Kent *et al.* An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. **Head & face medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2012.

VOLLONO, L. *et al.* Potential of curcumin in skin disorders. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2169, 2019.

WANG, Y. *et al.* Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3265-3273, 2006.

YAMAMOTO, I. *et al.* Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **The Journal of nutrition**, v. 122, n. 4, p. 871-877, 1992.

ZEHIROGLU, C.; SARIKAYA, O. S. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 11, p. 4757-4774, 2019.

ZHA, C. *et al.* Resveratrol promotes mammary cell proliferation and antioxidation capacity during pregnancy and lactation in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 450-463, 2021.

ZHANG, L.-X. *et al.* Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 143, p. 112164, 2021.

ZAKRZEWSKI, W. *et al.* Stem cells: past, present, and future. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2019.

ZUK, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. **Mol. Biol. Cell.**, v.13, p.4279-4295, 2002.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.



## ANEXOS

## Anexo 1 - Dados de Absorbância MTT

Ácido Ascórbico GP13 24h				Ácido Ascórbico GC90 24h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,3182	0,2909	0,3326	10	0,3714	0,3835	0,3990
25	0,2556	0,2600	0,2605	25	0,3511	0,3360	0,3400
50	0,2683	0,3083	0,3018	50	0,3792	0,4775	0,4323
100	0,2709	0,2732	0,2863	100	0,4990	0,5289	0,4120
200	0,3069	0,246	0,3017	200	0,4554	0,4369	0,6223
Ácido Ascórbico GP14 24h				Ácido Ascórbico GC92 24h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,2604	0,2022	0,1997	10	0,6621	0,7763	0,4982
25	0,2323	0,2325	0,2218	25	0,5359	0,4955	0,5095
50	0,2455	0,2308	0,2141	50	0,5781	0,5670	0,6899
100	0,2382	0,1985	0,1860	100	0,6300	0,5155	0,6971
200	0,2311	0,2185	0,2232	200	0,6458	0,7040	0,5115

Ácido Ascórbico GP13 48h				Ácido Ascórbico GC90 48h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,4420	0,4275	0,4357	10	0,4922	0,5651	0,5182
25	0,4341	0,5373	0,4846	25	0,5748	0,5342	0,5076
50	0,4869	0,4452	0,4432	50	0,4855	0,5728	0,5367
100	0,5128	0,4117	0,4590	100	0,4495	0,5851	0,5689
200	0,5020	0,4935	0,4192	200	0,4747	0,5067	0,4463
Ácido Ascórbico GP14 48h				Ácido Ascórbico GC92 48h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,3907	0,3821	0,3221	10	0,7204	0,7812	0,7417
25	0,4193	0,4139	0,3765	25	0,6874	0,6334	0,6367
50	0,4159	0,3944	0,3831	50	0,6605	0,7016	0,7340
100	0,2991	0,3730	0,3298	100	0,7171	0,6249	0,7216

200	0,2964	0,3226	0,3278	200	0,6224	0,7101	0,7815
-----	--------	--------	--------	-----	--------	--------	--------

Ácido Ascórbico GP13 72h				Ácido Ascórbico GC90 72h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,5261	0,4715	0,3523	10	0,5498	0,4329	0,3695
25	0,5540	0,4854	0,4414	25	0,6584	0,4458	0,5934
50	0,5175	0,4560	0,4649	50	0,6219	0,3663	0,4032
100	0,4774	0,4294	0,5033	100	0,6215	0,5168	0,3252
200	0,5004	0,4586	0,4025	200	0,6176	0,5368	0,4085
Ácido Ascórbico GP14 72h				Ácido Ascórbico GC92 72h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,3415	0,3639	0,3117	10	0,4061	0,6286	0,5860
25	0,4439	0,4948	0,4574	25	0,5394	0,4935	0,5996
50	0,2986	0,4199	0,3759	50	0,5909	0,5079	0,7667
100	0,3537	0,3817	0,3355	100	0,5053	0,4701	0,6374
200	0,3326	0,3585	0,3495	200	0,6847	0,6054	0,5816

Curcumina GP13 24h				Curcumina GC90 24h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,4180	0,4308	0,4244	0,05	0,3684	0,4169	0,4223
0,1	0,4918	0,4048	0,4805	0,1	0,4159	0,4112	0,5105
0,3	0,4307	0,4652	0,3738	0,3	0,4610	0,3718	0,3950
0,5	0,4025	0,3459	0,4044	0,5	0,4995	0,3938	0,3920
0,8	0,3750	0,5830	0,4545	0,8	0,3975	0,4954	0,4205
Curcumina GP14 24h				Curcumina GC92 24h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,3497	0,3678	0,3792	0,05	0,6378	0,6834	0,7261
0,1	0,3287	0,4215	0,4272	0,1	0,6369	0,6948	0,6768
0,3	0,4692	0,4630	0,4360	0,3	0,6769	0,8322	0,6305
0,5	0,4346	0,3806	0,3650	0,5	0,8045	0,6534	0,5997
0,8	0,3977	0,3942	0,4082	0,8	0,6243	0,5827	0,6920

Curcumina GP13 48h				Curcumina GC90 48h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,4151	0,4289	0,4194	0,05	0,3698	0,3404	0,3381
0,1	0,4326	0,3884	0,4094	0,1	0,3652	0,4273	0,3917
0,3	0,4051	0,4690	0,4306	0,3	0,3582	0,5846	0,3478
0,5	0,4135	0,4615	0,4565	0,5	0,3917	0,4680	0,3069
0,8	0,4195	0,4380	0,3778	0,8	0,3007	0,2957	0,2223
Curcumina GP14 48h				Curcumina GC92 48h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,3009	0,2876	0,2854	0,05	0,4352	0,4245	0,5305
0,1	0,2929	0,2860	0,2702	0,1	0,4699	0,4261	0,4971
0,3	0,2479	0,2800	0,2333	0,3	0,3900	0,4601	0,4417
0,5	0,2696	0,2518	0,2408	0,5	0,3598	0,3612	0,4636
0,8	0,2996	0,2761	0,2512	0,8	0,3341	0,4358	0,4111

Curcumina GP13 72h				Curcumina GC90 72h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,4285	0,3719	0,4150	0,05	0,2875	0,2394	0,2602
0,1	0,3946	0,4793	0,4244	0,1	0,2751	0,2243	0,2165
0,3	0,3859	0,4116	0,3984	0,3	0,1804	0,2291	0,2250
0,5	0,3501	0,3745	0,4027	0,5	0,2456	0,2854	0,2864
0,8	0,3852	0,4371	0,4692	0,8	0,3191	0,2843	0,2636
Curcumina GP14 72h				Curcumina GP92 72h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
0,05	0,3407	0,3098	0,3056	0,05	0,4002	0,3658	0,3712
0,1	0,3271	0,2961	0,2910	0,1	0,4335	0,3580	0,3334

0,3	0,2960	0,3153	0,2551	0,3	0,4975	0,3666	0,4164
0,5	0,2792	0,2767	0,2518	0,5	0,4836	0,3543	0,4154
0,8	0,2977	0,2522	0,1730	0,8	0,5359	0,4573	0,3677

Resveratrol GP13 24h				Resveratrol GC90 24h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,3111	0,3070	0,3415	6,25	0,3099	0,3878	0,3513
12,5	0,2914	0,2913	0,3129	12,5	0,3417	0,3556	0,4758
25	0,3284	0,3337	0,3480	25	0,3215	0,3820	0,3854
50	0,3077	0,3145	0,3422	50	0,3293	0,3272	0,3928
100	0,2982	0,3364	0,3055	100	0,3085	0,3719	0,4208
Resveratrol GP14 24h				Resveratrol GC92 24h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,2219	0,1854	0,2185	6,25	0,6227	0,6006	0,5400
12,5	0,2244	0,2425	0,2012	12,5	0,7524	0,7659	0,6623
25	0,2273	0,2469	0,2131	25	0,6644	0,7454	0,6178
50	0,2317	0,2217	0,2142	50	0,7789	0,6674	0,5926
100	0,2013	0,2309	0,2120	100	0,7182	0,8423	0,5912

Resveratrol GP13 48h				Resveratrol GC90 48h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,4508	0,4590	0,4683	6,25	0,4232	0,4304	0,4057
12,5	0,4405	0,3798	0,4201	12,5	0,4284	0,4360	0,4449
25	0,3803	0,4478	0,4400	25	0,4306	0,4868	0,5141
50	0,3980	0,4146	0,4703	50	0,4235	0,5196	0,5065
100	0,4463	0,4878	0,4889	100	0,4064	0,4432	0,4566
Resveratrol GP14 48h				Resveratrol GC92 48h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,3211	0,2967	0,3570	6,25	0,5362	0,5258	0,5230
12,5	0,3120	0,2708	0,3396	12,5	0,5354	0,6108	0,5711

25	0,3390	0,3623	0,3426	25	0,4833	0,4654	0,6272
50	0,3685	0,3511	0,3094	50	0,5945	0,5894	0,6025
100	0,3491	0,3093	0,3442	100	0,6756	0,6738	0,6307

Resveratrol GP13 72h				Resveratrol GC90 72h			
	Absorbância				Absorbância		
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,6242	0,5741	0,5501	6,25	0,4864	0,4638	0,4913
12,5	0,5649	0,5074	0,4796	12,5	0,4354	0,4354	0,3785
25	0,5555	0,4596	0,4801	25	0,4536	0,4242	0,4288
50	0,5604	0,4208	0,4293	50	0,5046	0,4425	0,2905
100	0,4855	0,5103	0,3622	100	0,4935	0,3173	0,3039
Resveratrol GP14 72h				Resveratrol GC92 72h			
[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3	[ ] µg/ml	Abs1	Abs2	Abs3
6,25	0,3422	0,3587	0,3587	6,25	0,5718	0,5164	0,5677
12,5	0,3599	0,3320	0,3632	12,5	0,5132	0,5350	0,4668
25	0,3693	0,3718	0,3761	25	0,5302	0,6354	0,6105
50	0,3726	0,2964	0,3703	50	0,4197	0,6067	0,5843
100	0,3169	0,3362	0,3324	100	0,4899	0,5337	0,6635

Foram feitas médias dos valores de absorvância das triplicatas das células não tratadas nas placas dos pacientes e dos controles, os valores se encontram na tabela abaixo:

Placas	PACIENTES	CONTROLES
24h	0,3054	0,5031
48h	0,3704	0,4392
72h	0,3104	0,3811