

Instituto Superior Ciências da Saúde – Norte



**Influência da vitamina C no processo de
reparação dos tecidos periodontais após
exodontia.**

Maria Laura Barbedo Garcia Feio de Azevedo

Gandra, Julho de 2010

Instituto Superior Ciências da Saúde – Norte



Influência da vitamina C no processo de reparação dos tecidos periodontais após exodontia.

Dissertação apresentada no Instituto Superior Ciências da Saúde - Norte, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia Oral.

Orientador: Professor Doutor Fernando Ferreira

Maria Laura Barbedo Garcia Feio de Azevedo

Julho de 2010

Dedicatória

Aos meus pais, a quem devo o meu nome, muito do que sou e o que vou deixar como semente: muito obrigada!

Agradeço-vos todo o carinho e amor. À vossa constante presença e ao vosso implícito apoio dado desde o início quando o projecto ainda gatinhava. Vocês foram os responsáveis pela concretização deste projecto e agradeço terem partilhado comigo.

A minha irmã, por sua vez, merece vários agradecimentos simplesmente por ser a melhor do mundo e porque o seu amor acompanha-me sempre!

Dedico a tese aos meus pais e irmã que são as pessoas mais importantes da minha vida e que graças a eles sou feliz.

Agradecimentos

Os projectos que nos ocupam o tempo, a cabeça e o coração, valem sempre muito para quem está connosco nesse caminho, com quem partilhamos ideias, dias e noites de trabalho, nervosismos, cansaço e paixão. É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, orientador da tese, agradeço o apoio, incentivo, a partilha do saber, as valiosas contribuições que deu para o trabalho e a disponibilidade constante demonstrada em todas as fases que levaram à concretização desta tese. Acima de tudo, obrigada por continuar a acompanhar-me nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica. Estas palavras tornam-se demasiado pequenas para agradecer tudo o que tem feito por mim.

Um agradecimento especial ao Dr. Fernando Figueira, pelo enorme interesse e disposição em colaborar sempre que solicitada a sua ajuda.

Agradeço à coordenação do Mestrado de Cirurgia Oral toda a colaboração que sempre se dispuseram a dar-me.

Aproveito também para agradecer ao Instituto Superior Ciências da Saúde - Norte e à Direcção do Curso de Medicina Dentária por terem cooperado na realização deste estudo e por participarem na minha formação científica.

Agradeço ao laboratório de Anatomia Patológica da Cespú em geral e em particular à Dra Fernanda Garcês e à Mestre Sara Ricardo por terem contribuído directamente nesta investigação. Só com a vossa extrema competência, mobilização e capacidade de trabalho em equipa foi possível realizar este estudo.

A todos o meu sincero e profundo agradecimento!

Índice Geral

Dedicatória	III
Agradecimentos	V
Índice Geral	VII
Índice Figuras	XI
Índice Gráficos	XV
Siglas e Abreviaturas	XVII
Resumo	XIX
Abstract	XXI
1 Introdução	1
1.1 Evolução Histórica	2
1.2 Fisiologia	5
1.2.1 Fisiologia da Vitamina C	5
1.2.2 Fisiologia do Colagénio	8
1.2.3 Fisiologia dos Fibroblastos	18
1.3 Aplicações Clínicas	25
1.3.1 Patologia Oral	25
1.3.2 Patologia Extra - Oral	27
1.3.3 Cicatrização e Regeneração	41
2 Objectivos e Hipóteses	49
3 Material e Métodos	51
3.1 População de Estudo	52
3.2 Metodologia	53
3.3 Processamento da amostra para Microscopia Óptica	54
3.4 Processamento da amostra para Microscopia Electrónica	55

3.5	Processamento dos tecidos em Histoquímica	56
3.5.1	Coloração de Hematoxilina – Eosina	56
3.5.2	Tricrómio de Masson Especial	58
3.5.3	Van Gieson	60
3.6	Técnica de Imuno - Histoquímica	61
4	Resultados	64
5	Discussão de resultados	86
6	Conclusão	90
7	Bibliografia	92
8	Anexos	106

Índice de Figuras

	Página
Figura nº 1 – Hematoxilina Eosina. 100x: Papilas conjuntivas de paciente sem prescrição de vitamina C.	68
Figura nº 2 – Tricrómio de Masson. 100x: Alterações do epitélio num paciente sem prescrição de vitamina C.	68
Figura nº 3 – Hematoxilina Eosina. 100x: Células epiteliais bem diferenciadas num paciente com prescrição de vitamina C.	69
Figura nº 4 – Hematoxilina Eosina. 100x: Histodiferenciação conjuntiva, num paciente com prescrição de vitamina C.	69
Figura nº 5 – Tricrómio de Masson. 100x: Diferentes camadas do epitélio, num paciente com prescrição de vitamina C.	70
Figura nº 6 – Tricrómio de Masson. 100x: Transição epitélio-conjuntivo, num paciente com prescrição de vitamina C	70
Figura nº 7 - Hematoxilina Eosina. 100x: Invaginações conjuntivas no epitélio, num paciente com prescrição de vitamina C.	71
Figura nº 8 – Tricrómio de Masson. 100x: Aspectos da transição celular num paciente sem prescrição de vitamina C.	71
Figura nº 9 – Vimentina. 100x: Aspectos de imunomarcação das fibras do tecido conjuntivo.	72
Figura nº 10 – Tricrómio de Masson. 100x: Diferenciação celular num paciente com prescrição de vitamina C.	72
Figura nº 11 – Alfa-actina. 100x: Forte marcação perivascular e moderadamente intersticial num paciente com prescrição de vitamina C	73
Figura nº 12 – Hematoxilina Eosina. 100x: Células superficiais picnóticas, num paciente com prescrição de vitamina C	73
Figura nº 13 – Hematoxilina Eosina. 100x: Ninhos de células conjuntivas num paciente com prescrição de vitamina C.	74
Figura nº 14 – Hematoxilina Eosina. 100x: Ninhos de células conjuntivas num paciente com prescrição de vitamina C.	74
Figura nº 15 – Hematoxilina Eosina. 100x: Ninhos de células conjuntivas maduras num paciente com prescrição de vitamina C.	75
Figura nº 16 – Alfa-actina. 200x: Pormenor da marcação perivascular num paciente com prescrição de vitamina C	75
Figura nº 17 – Tricrómio de Masson. 100x: Ninhos de células conjuntivas maduras num paciente com prescrição de vitamina C.	76
Figura nº 18 – Desmina. 100x: Imunomarcação das fibras tipo elástico ao nível do tecido conjuntivo da submucosa.	76

Figura nº 19 – Hematoxilina Eosina. 100x: Boa diferenciação celular, com inúmeros fibroblastos, num paciente com prescrição de vitamina C.	77
Figura nº 20 – Hematoxilina Eosina. 100x: Ninhos de células conjuntivas, muitas delas indiferenciadas, num paciente com prescrição de vitamina C.	77
Figura nº 21 – Hematoxilina Eosina. 100x: Ninhos de células conjuntivas, num paciente com prescrição de vitamina C.	78
Figura nº 22 – Tricrómio de Masson. 100x: Ninhos de células conjuntivas, num paciente sem prescrição de vitamina C.	78
Figura nº 23 – Alfa-actina. 200x: Forte marcação em células de tipo mioepitelial, num paciente com prescrição de vitamina C.	79
Figura nº 24 – Alfa-actina. 200x: Marcação extensa em células do tecido conjuntivo, num paciente com prescrição de vitamina C.	79
Fig. 25 – Alfa-actina. 100x: Discreta marcação do conjuntivo, num paciente sem prescrição de vitamina C.	80
Fig. 26 – Alfa-actina. 100x: Discreta marcação do conjuntivo, num paciente sem prescrição de vitamina C.	80
Fig. 27 – Alfa-actina. 100x: Discreta marcação do conjuntivo, num paciente sem prescrição de vitamina C.	81
Fig. 28 – Alfa-actina. 200x: Discreta marcação do conjuntivo, num paciente sem prescrição de vitamina C	81
Fig. 29 – Microscopia Electrónica. 14 000x: Colagénio em feixes. Cortes transversal e longitudinal.	82
Fig. 30 – Microscopia Electrónica. 80 000x: Granulado citoplasmático.	82
Fig. 31 – Microscopia Electrónica. 10 000x: Fibroblasto.	83
Fig. 32 – Microscopia Electrónica 3 000x: Fibroblastos.	83
Fig. 33 – Microscopia Electrónica. 7 200x: Fibroblasto.	84
Fig. 34 – Microscopia Electrónica. 2 700x: Colagénio em estreita relação com as células adjacentes.	84
Fig. 35 - Microscopia Electrónica. 5 000x: Colagénio em feixes. Cortes transversal e longitudinal.	85
Fig. 36 - Microscopia Electrónica. 4 000x: Riqueza em Retículo Endoplasmático Rugoso.	85

Índice de Gráficos

	Página
Gráfico 1 – Distribuição segundo o género do paciente	52
Gráfico 2 – Distribuição segundo a idade do paciente	53

Siglas e Abreviaturas

AA = ácido ascórbico

AA2P = L-ácido ascórbico 2- fosfato

Alfa- SMA = alfa-actina de músculo liso

DNA = ácido desoxirribonucleico

FGFb = factor de crescimento do fibroblasto básico

FGFs = factor de crescimento do fibroblasto

GLUTs = transportadores de glicose

GMCSF = factores estimulantes da colónia de granulócitos e macrófagos

GULO= oxidase gulonolactona

LDL = lipoproteínas de baixa densidade

MEC = matrix extracelular

MMPs = matrizes de metaloproteinases

PDGFs = factores de crescimento derivados da plaqueta

PMN = polimorfonucleares neutrófilos

RNA-m = ácido ribonucleico mensageiro

ROS = espécies reactivas de oxigénio

TGFb = factor de crescimento transformador beta

TIMPs = inibidor tecidual de metaloproteinases

VSMCs = células musculares lisas vasculares

Resumo

A reparação de tecidos moles passa por uma complexa série de eventos que estão relacionados e que envolvem acções tanto físicas como químicas.

Há muito que o papel do ácido ascórbico (AA) tem sido reconhecido, sobretudo a partir do século XVI quando o escorbuto começou a ser prevenido com sumo de frutas cítricas.

O principal objectivo deste estudo foi avaliar a influência da vitamina C no processo de regeneração dos tecidos periodontais após extracção dentária e avaliar a pertinência da sua utilização na prática clínica.

Para a realização deste estudo foram seleccionados, aleatoriamente, vinte e dois indivíduos de raça caucasiana e com área de residência no Norte de Portugal. Foram distribuídos em dois grupos com regimes terapêuticos distintos. Num dos grupos os pacientes foram medicados com vitamina C e iniciaram medicação 20 dias antes da cirurgia (Grupo A); no outro grupo os pacientes não foram medicados com vitamina C (Grupo B). Observou-se no grupo A uma formação correcta de tecido conjuntivo, com padrão histológico organizado, ou seja, uma completa estruturação de todo o tecido. Neste grupo verificou-se um aumento significativo do número de camadas do epitélio, uma boa diferenciação celular e uma submucosa rica em células de tipo mioepitelial, nomeadamente miofibroblastos. Ao nível imunohistoquímico, observou-se uma marcação significativa de alfa-actina.

No âmbito do estudo agora realizado, o uso da vitamina C parece conduzir a uma boa dinâmica da reparação tecidular.

A continuação destes estudos é de grande pertinência no sentido de se elaborarem estratégias terapêuticas futuras no âmbito da reparação dos tecidos com aplicação directa em cirurgia oral.

Abstract

The repair of soft tissue undergoes a complex series of events that are related and involve both physical and chemical actions.

It's been long ago since the role of ascorbic acid (AA) has been recognized, especially since the sixteenth century when scurvy was prevented with the juice of citrus fruits.

The main objective of this study was to evaluate the influence of vitamin C in the regeneration process of periodontal tissue after tooth extraction and assess the appropriateness of its use in clinical practice.

For this study were selected, at random, twenty-two individuals of Caucasian race and with residence in the northern area of Portugal. They were divided into two groups with different treatment regimens. In one group the patients were treated with vitamin C and begun medication 20 days before surgery (Group A), in the other group the patients were not treated with vitamin C (Group B). It was observed in group A the right training of connective tissue, with histological organized adra, ie, a complete structuring of the tissue. In this group there was a significant increase in the number of layers of the epithelium, a good cell differentiation and a submucosa rich in myoepithelial cell types, including myofibroblasts. At the immunohistochemical level, we observed a significant dial of alpha-actin.

Under the study now accomplished, the use of vitamin C seems to lead to a good dynamic of tissue repair.

The continuation of these studies is of great relevance in order to develop future therapeutic strategies in the context of tissue repair with direct application to oral surgery.

1 - Introdução

1.1 Evolução Histórica

A vitamina C (ácido ascórbico) está intimamente ligada ao escorbuto, uma doença resultante da deficiência de vitamina, conhecida desde o tempo das Cruzadas. Os sintomas do escorbuto estão associados a um defeito na síntese de colagénio e incluem a dificuldade na cura de feridas, defeitos na formação dos dentes e ruptura dos capilares levando a petéquias e equimoses (Verrax, 2008).

Relatos encontrados em papiros antigos demonstram que desde 1515 A.C. os egípcios tinham conhecimento do escorbuto. Gregos e romanos tiveram as suas forças militares dizimadas pela doença. Os marinheiros que permaneciam a bordo por longos períodos, sem renovar os seus suprimentos alimentares, morriam de escorbuto (Azulay, 2003).

No final da Idade Média, o escorbuto tornou-se epidémico no norte e centro da Europa. Entretanto, foi em meados do século XVIII, com as grandes e longas viagens marítimas, responsáveis pelo aumento significativo dessa afecção, que a importância da vitamina C ficou evidente (Azulay, 2003).

James Lind demonstrou que o sumo de frutas cítricas frescas curava o escorbuto. O agente activo era um novo derivado da glicose (a forma enólica de 3-oxo-L-gulofuranolactona), que foi isolada e designada pela primeira vez de “ácido hexurónico” pelo médico húngaro Szent-Gyorgyi. Alguns anos mais tarde, Szent-Gyorgyi descreveu a actividade anti-escorbútica deste composto e deu-lhe o nome trivial de ácido ascórbico para designar a sua função na prevenção do escorbuto (Verrax, 2008).

Provocado pela deficiência de vitamina C no organismo, o escorbuto desencadeia manifestações hemorrágicas (petéquias, equimoses, sangramento das gengivas), edema nas articulações, fadiga, tonturas, anorexia, alterações cutâneas, infecções e morte. James Lind, médico escocês da Marinha Britânica, foi o primeiro a correlacionar a alta morbidade e mortalidade dos marinheiros ingleses com a deficiência da vitamina C (Verrax, 2008).

A deficiente formação de colagénio devido ao estilo de vida inadequado entre os marinheiros, cuja dieta era reduzida em frutas e legumes, foi, durante

séculos, um problema devastador em viagens marítimas. Após 10 semanas no mar, entre 1497-1499, na sua viagem para a Índia contornando o sul de África, Vasco da Gama descreveu que um grande número de marinheiros foi atacado por inchaços, sangramentos gengivais e cutâneos, perda de dentes seguindo-se de enfraquecimento posterior e morte. Durante uma circum-navegação ao mundo em 1740-1744, onde nove dos dez marinheiros sucumbiram ao escorbuto, George Anson observou que “as cicatrizes das velhas feridas, cicatrizadas há muitos anos, eram forçadas a abrir novamente”. James Lind, que em 1747 foi o primeiro a descobrir o efeito benéfico das frutas cítricas no escorbuto, observou úlceras cutâneas ocorrendo da abertura espontânea da pele previamente danificada e o aparecimento de feridas após um trauma mínimo. Estas descrições estão de acordo com o significado etimológico do escorbuto sendo "uma doença que rompe a barriga". Na verdade, este é o significado exacto do nome dinamarquês "skørbug", tendo a mesma origem no Centro e Sul Alemão tal como o nome Inglês "scurvy" (Sørensen, 2006).

Em 1747, estudos clínicos recomendam a ingestão de sucos cítricos no tratamento do escorbuto após a realização do primeiro estudo controlado de que se tem notícia na Medicina. Comparados grupos de tratamento foi comprovado que o grupo que recebeu duas laranjas e um limão por dia melhorou drasticamente da doença no período de uma semana. Os resultados da experiência realizada foram publicados em 1753. Em 1795 tornou-se obrigatória, na Marinha Britânica, a ingestão diária de sumos de frutas cítricas (Azulay, 2003).

Em 1911, o bioquímico polaco Casimir Funk utilizou pela primeira vez o termo vitamina para se referir a certas substâncias alimentares imprescindíveis à saúde. Funk descobriu a niacinamida, o factor anti beribéri, e criou a expressão *vital amin* (amina vital), que deu origem à palavra vitamina. Em 1919 Drummond propôs chamar o factor antiescorbútico de "C". Em 1928, o cientista húngaro Albert von Szent- Gyorgyi (1893-1986) descobriu e isolou o factor antiescorbuto em vários alimentos, denominando-o vitamina C. Pouco depois Waugh e King identificaram o mesmo agente antiescorbútico de Szent no sumo do limão. Hirst e Haworth, em 1933, anunciaram a estrutura química da

vitamina C e sugeriram, em conjunto com Szent-Gyorgyi, a mudança do nome para ácido ascórbico, por inferência às suas propriedades antiescorbúticas. No mesmo ano de 1933, Reichstein e colaboradores publicam as sínteses do ácido D-ascórbico e do ácido L-ascórbico, que ainda hoje formam a base da produção industrial da vitamina C. Conseguiram comprovar que o ácido ascórbico sintetizado possui a mesma actividade biológica da substância natural. Em 1937, Haworth (Química) e Szent-Gyorgyi (Medicina) são agraciados com o Prémio Nobel pelos seus trabalhos relacionados com a vitamina C (Azulay, 2003).

Eliminado no presente momento, o escorbuto já não constitui um perigo para a saúde, depois de compreendida a importância da ingestão de vitamina C devido às suas propriedades antiescorbúticas, sendo um co-factor essencial na biossíntese de colagénio e necessário para a manutenção da vida humana (Sørensen, 2006).

Foram, entretanto, as pesquisas do químico americano Linus Pauling (1901-1994), a quem também foi atribuído o Prémio Nobel, que popularizaram a vitamina C. Pauling e seus colaboradores recomendavam mega doses da vitamina para o combate de resfriados, gripes e outras viroses, bem como na prevenção do cancro e outras doenças degenerativas (Verrax, 2008; Azulay, 2003).

Historicamente, um estilo de vida impróprio com uma ingestão incorrecta de vitamina C tem sido associado à má cicatrização como uma manifestação clínica de escorbuto (Sørensen, 2006).

Entretanto, na actualidade, evidências crescentes ao longo das últimas décadas sugerem que o estilo de vida moderno, principalmente o consumo de tabaco, juntamente com características biológicas como a idade avançada e o sexo masculino, são certamente, factores que podem prejudicar o equilíbrio entre a formação e a degradação do colagénio (Sørensen, 2006).

1.2 Fisiologia

1.2.1 Fisiologia da Vitamina C

A vitamina C ($C_6H_8O_6$), também conhecida como ácido ascórbico (AA) ou ascorbato quando ionizado é um sólido, branco, estável, inodoro e solúvel em água (Lima, 2009; Blee, 2002). É sintetizada por todos os animais, excepto os seres humanos, macacos, porquinhos-da-índia, morcegos, e várias espécies de aves (Deruelle, 2008; Blee, 2002).

Biologicamente, o ácido ascórbico é sintetizado a partir da glicose numa série de passos catalisados por enzimas (Deruelle, 2008).

Esta produção ocorre na via do ácido hexurónico do fígado ou dos rins, devido à actividade de uma enzima específica: a oxidase gulonolactona (Verrax, 2008) que foi danificada e parou de funcionar (Deruelle, 2008). Os humanos perderam essa capacidade, como resultado de uma série de mutações inactivadoras do gene que codifica a oxidase gulonolactona (GULO), uma enzima chave na via de biossíntese da vitamina C. Estima-se que estes eventos mutacionais tenham ocorrido há cerca de 40 milhões de anos atrás, tornando todas as espécies de descendentes, incluindo os humanos, deficientes de ácido ascórbico (Li, 2007). A causa deste dano genético é desconhecida, embora tenha sido sugerido que foi devido a exposição à radiação. Atendendo a uma hipótese anterior, o gene pode ter sido transformado por um vírus, foi proposto especificamente um retrovírus (Deruelle, 2008).

Uma vez que os seres humanos (assim como outros primatas, cobaias e algumas espécies de morcegos) têm falta desta enzima, eles não podem sintetizar ácido ascórbico, e, portanto, nestas espécies, têm de encontrar uma fonte dietética obrigatória de vitamina C de modo a manter as reservas do corpo, nomeadamente nos frutos e produtos hortícolas. Essa é a razão pela qual o ácido ascórbico é uma vitamina para os humanos (Verrax, 2008; Blee, 2002).

A vitamina C é um micronutriente hidrossolúvel necessário para várias funções biológicas (Duarte e Lunec, 2005) e é considerada o mais importante antioxidante solúvel no plasma humano e em células de mamíferos que dispõem de mecanismos para a reciclar e acumular contra um gradiente de concentração, sugerindo que esta também pode ter importantes funções intracelulares (Duarte e Lunec, 2005); actua como um antioxidante e como um co-factor na síntese de colagénio, carnitina, e norepinefrina. Além disso, estudos recentes têm mostrado que o ácido ascórbico pode regular a diferenciação de células embrionárias em alguns tipos de células (Sato, 2006).

A vitamina C é necessária para a manutenção do tecido conjuntivo normal, para a cicatrização de feridas e para a remodelação óssea devido à presença de colagénio na matriz orgânica (Freitas R.M., 2010; Deruelle, 2008). A sua principal função é a hidroxilação do colagénio, uma proteína fibrilar que oferece resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos (Nelson e Cox, 2005). O ácido ascórbico é essencial para estimular os fibroblastos dérmicos (Azulay, 2003), e a biossíntese de catecolaminas. É um antioxidante capaz de neutralizar as espécies reactivas de oxigénio (Nelson e Cox, 2005) e é fundamental para a defesa imunológica (Azulay, 2003). A vitamina C é geralmente encontrada na pele humana, mas perde-se rapidamente nos processos inflamatórios (Lima, 2009).

A vitamina C serve como uma enzima ou co-factor para muitas reacções bioquímicas, sendo a mais conhecida a reticulação do colagénio. Também é necessária para a biossíntese de carnitina no músculo e para a síntese de neurotransmissores, incluindo a dopamina e a serotonina (Freitas R.M., 2010; Blee, 2002). Foi sugerido que pode ser útil na produção em larga escala de neurónios para tratamento clínico futuro. Assim, a produção de neurónios dopaminérgicos a partir de células embrionárias pode ser uma importante fonte de células para a terapia de substituição de células em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson. A este respeito, a vitamina C também mostrou aumentar o rendimento dos neurónios dopaminérgicos diferenciados in vitro dos precursores do sistema nervoso central embrionário de ratos. Este efeito não pode ser substituído por nenhum outro antioxidante,

sugerindo um novo papel para a vitamina C, independentemente das suas propriedades antioxidantes (Duarte e Lunec, 2005).

A vitamina C está envolvida na degradação do colesterol, na síntese da tiroxina, no metabolismo de aminoácidos e na absorção de ferro (Deruelle, 2008; Blee, 2002). Na verdade, a vitamina C supera o efeito inibidor de quelantes de metal forte que reduzem a biodisponibilidade de ferro (Verrax, 2008). Foi demonstrado que contém anticarcinogénicos reforçadores da imunidade (Blee, 2002). Pode extinguir espécies reactivas aquosas, desempenha um papel importante no sistema de defesa antioxidante, na imunocompetência¹⁶ e no reforço da resistência à infecção. Numerosos estudos têm demonstrado que a suplementação com vitamina C reforça o sistema imunológico, evita danos no DNA, e diminui significativamente o risco de uma grande variedade de patologias, tais como cancros, doenças crónicas e degenerativas (Deruelle, 2008).

A absorção de vitamina C ocorre principalmente no intestino delgado através de um transportador de ascorbato de sódio chamado *Sodium-dependent vitamin C Transporter-type 1* (SVCT1). Este transportador também está presente nos túbulos renais proximais, onde serve para reabsorver ascorbato filtrado. O ascorbato circula no sangue a 30-60 µM, mas as suas concentrações na maioria das células são consideravelmente mais elevadas. Isto deve-se ao seu transporte activo por outra isoforma de transportador de ascorbato, denominado o SVCT2 (produto do gene de Slc23a2). O SVCT2 está presente na maioria dos tecidos do corpo, incluindo o cérebro, pulmão, fígado, no músculo cardíaco e esquelético (Aguirre, 2008).

As concentrações plasmáticas de ácido ascórbico são limitadas a cerca de 120 µM devido à saturação da absorção, captação nos tecidos, e insuficiência de reabsorção completa no rim (Aguirre, 2008).

O aumento do teor de ácido ascórbico nas células endoteliais é realizado através dos transportadores de glicose – DHA, produzidos localmente a partir de ácido ascórbico extracelular enquanto se dá a explosão respiratória, seguido de imediata redução intracelular de ácido ascórbico. Este processo é o

mecanismo presente na aquisição e reciclagem de vitamina C, evitando a sua perda irreversível (Montecinos V., 2007).

A vitamina C extracelular é um componente fulcral do mecanismo antioxidante que protege as células endoteliais do stress oxidativo. Assim, a interacção das células endoteliais com as células activadas submetidas a explosão respiratória pode não resultar necessariamente numa disfunção endotelial na presença de vitamina C nos compartimentos intracelular e extracelular, tendo em vez disso um efeito positivo três vezes maior eliminando, em simultâneo, espécies reactivas de oxigénio, evitando a perda de vitamina C oxidada e aumentando o ácido ascórbico intracelular. Isto é, as células humanas endoteliais adquirem e mantêm elevadas concentrações intracelulares de ácido ascórbico através de uma combinação de mecanismos de sobreposição com impacto directo na interacção com os glóbulos e a sua resistência contra o stress oxidativo. Investigações levadas a cabo, apresentam provas definitivas da cooperação funcional da vitamina C ao providenciar células endoteliais de forte defesa antioxidante (Montecinos V., 2007).

1.2.2 Fisiologia do Colagénio

O colagénio é um já bem caracterizado polímero natural e um conhecido substrato para a adesão, crescimento e diferenciação celular. (Liao H., 2009) Tem sido mencionado como essencial para a proliferação de vários tipos de células; (Maehata Y., 2007) qualifica-se como um excelente material para a cicatrização de feridas devido às suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis (Gopinath D., 2004). O colagénio é uma das longas proteínas fibrosas estruturais que existe nos tecidos conectivos (Maehata Y., 2007).

Parece ser a melhor matriz actualmente disponível para a regeneração de tecidos e órgãos. O colagénio é geralmente tratado, pelos beneficiários nos quais é colocado, como um “auto” tecido e está sujeito aos processos biológicos fundamentais de degradação e integração do tecido em tecidos de

acolhimento adjacentes, quando deixado no seu estado natural. Para além das suas desejáveis propriedades estruturais, o colagénio tem propriedades funcionais. Isto é, especialmente, o caso dos materiais naturais reconstituídos, insolúveis e altamente purificados, que, devido à sua excelente biodisponibilidade e incorporação “natural” no tecido do hospedeiro, parecem ser mais favoráveis do que os materiais de colagénio quimicamente preparados (Ruszczak Z., 2003).

Todos os colagénios fibrilares são constituídos por três cadeias polipeptídicas enroladas em torno de si próprias numa configuração de tripla hélice (Fisher G. J., 2008; Maehata Y., 2007).

Feixes de colagénio e fibras de colagénio são os principais componentes da matriz extracelular, que servem muitas funções, como a prestação de apoio e fixação para as células e tecidos separando-os uns dos outros (Choi H., 2008). É a proteína mais abundante no corpo humano (Dioguardi F.S., 2008). A sua resistência à tracção e a sua flexibilidade são o resultado de uma complexa estrutura molecular; carrega um peso estrutural tão grande como o dos tecidos conjuntivos de qualquer órgão parenquimatoso (como o fígado, rins, intestinos, pulmões e coração) ou como da matriz proteica do esqueleto e suas respectivas estruturas (ossos, dentes, cartilagens, tendões e ligamentos), ou forma a matriz fibrosa da pele e vasos sanguíneos (Dioguardi F.S., 2008). Embora existam cerca de vinte tipos de colagénio, a sua composição é bastante semelhante; em cada três aminoácidos um é glicina, o mais pequeno de todos os aminoácidos. A composição monótona dos peptídeos de colagénio não se limita apenas à recorrência absolutamente regular do resíduo de glicina, mas também é acompanhado, nas seguintes duas posições, chamadas posições X e Y, por uma posição Y muito frequentemente ocupada por hidroxiprolina, em até 50% dos casos, e hidroxilisina, na maioria das sequências restantes. Estes aminoácidos são típicos das estruturas de colagénio e muito raramente são encontrados em outras proteínas (Maehata Y., 2007). Numa fase inicial e fundamental, com o oxigénio molecular como substrato e a vitamina C como co-factor essencial, os aminoácidos prolina e lisina são hidroxilados em hidroxiprolina e hidroxilisina, que fazem ligações de

hidrogénio em cadeia que estabiliza a tripla hélice do procolagénio (Silva J.V.L., 2010). Após a formação, as fibras são remodeladas e orientadas num padrão ordenado de apoio na resistência do tecido à tracção. Uma das características mais interessantes da síntese de colagénio reside no facto de a hidroxiprolina ou a hidroxilisina serem o metabolito alvo da prolina e da lisina, o que significa que é possível que tenham de ser descartados uma vez que a estrutura do colagénio se torna velha e precisa de ser renovada. Isto deve-se ao facto de que para obter um desempenho físico-químico máximo, devem ser inseridas no recém-formado propeptídeo, prolina e lisina recentes. Somente após a síntese da cadeia precursora completa, uma hidroxilase especificamente dependente de vitamina C, agindo estereologicamente (isto é, activada por partes específicas da molécula) sobre a posição Y, é activada para os anexar a uma fracção de OH. Isto é fundamental para uma cascata de eventos, o que permite uma reacção para formar laços inter e intramoleculares apertados, envolvendo três peptídeos em fibrilas e apertando-os solidamente nas unidades de colagénio complexo. A glicina posicionada entre quaisquer três aminoácidos permite a formação de uma estrutura helicoidal, entrelaçada com dois outros peptídeos numa estrutura superhelicoidal, muito semelhante à estrutura de uma corda. As pequenas diferenças nos aminoácidos impulsionados pela regularidade das sequências em qualquer peptídeo permitem distinguir cerca de trinta e três variações genéticas deles (subunidades), e os diferentes tipos de colagénio, identificados por um algarismo romano, diferem no tipo de subunidades. Como exemplo geral, o tipo de colagénio mais abundante, denominado tipo I, que está presente na pele, ossos, tendões, vasos sanguíneos, e na córnea, tem uma composição da cadeia tripla formada por duas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$. O colagénio tipo II é composto de três cadeias $\alpha 1$ e é quase exclusivamente encontrado na cartilagem. O colagénio tipo III, um homotrímero da cadeia $\alpha 1$, é encontrado principalmente nos tecidos embrionários e nos vasos sanguíneos, mas também está presente em vários órgãos, embora a sua quantidade seja muito menor do que o colagénio do tipo I ou do tipo II (Maehata Y., 2007).

O colagénio tipo V está altamente expresso durante o desenvolvimento de tecidos e reparação de feridas, mas a sua função exacta ainda não está esclarecida; a sua ligação às células afecta várias funções celulares básicas e altos níveis de colagénio V alteram a organização estrutural e a rigidez da matriz extracelular (MEC). Recentes estudos, sugerem que este tipo de colagénio desempenha um papel essencial na modificação do comportamento das células durante o desenvolvimento e a remodelação, quando estão presentes tecidos muito moles (Breuls R.G.M., 2009).

O colagénio tipo V é um membro da subfamília fibrilar do colagénio e é um componente menor da matriz extracelular (MEC) no tecido conjuntivo. Em tecido saudável, constitui cerca de 1-5% do teor total de colagénio. Apesar do colagénio tipo V estar geralmente enterrado dentro de fibras de colagénio tipo I, as células ligam-se ao colagénio tipo V, quando este se torna transitoriamente disponível durante a remodelação extra-celular. Estudos *in vitro* indicam que o colagénio tipo V pode afectar a morfologia celular, a cinética do crescimento, a síntese e migração de proteínas. Foi relatado recentemente que o colagénio tipo V está altamente expresso numa ampla variedade de tecidos em desenvolvimento (Breuls R.G.M., 2009; Roulet M., 2006). durante a inflamação e a cicatrização de feridas. Alguns tecidos doentes também mostram um aumento nos níveis deste colagénio em comparação com os seus pares saudáveis, tanto em termos da quantidade total expressa como na percentagem do conteúdo total de colagénio. Por exemplo, um aumento nos níveis de colagénio tipo V é observado na pele e tumores do cólon, em placas ateroscleróticas, e em tecido cicatricial. Estes resultados sugerem que este colagénio desempenha um papel importante na modelagem e remodelação da matriz extracelular (MEC). Isto está relacionado com o papel do colagénio tipo V na regulação do diâmetro das fibras de colagénio tipo I durante fibrilogénese (Breuls R.G.M., 2009).

A proliferação de células endoteliais está unicamente associada à síntese de colagénio tipo IV. Isto relaciona-se provavelmente com o facto de o colagénio tipo IV, ser necessário tanto para a formação da membrana basal como para a

adesão de células endoteliais, o que não acontece com o colagénio tipo I e III (Montecinos V., 2007).

Os aminoácidos são moléculas originais porque são o único substrato realmente necessário para promover a síntese de qualquer proteína. A adequação do tipo e número de aminoácidos necessários para a síntese de proteínas pode ser previsto com base na qualidade e quantidade de aminoácidos presentes em cada proteína. A síntese de colagénio é, portanto, mantida de forma eficiente somente quando os aminoácidos específicos estão continuamente disponíveis e estão presentes numa relação específica (Dioguardi F.S., 2008).

A vitamina C é um nutriente essencial para a biossíntese do colagénio. É vital para o funcionamento das células, e isso é particularmente evidente no tecido conjuntivo (Azulay M.M., 2003). Para funcionar efectivamente como um antioxidante (ou um pró-oxidante), devem ser mantidos no corpo níveis relativamente altos desta vitamina. A instabilidade da vitamina C, combinada com a sua relativamente fraca absorção intestinal e pronta excreção do corpo, reduz a disponibilidade fisiológica desta vitamina (Li Y., 2007).

O papel do ácido ascórbico (AA) no metabolismo do tecido conjuntivo é já reconhecido há muito tempo, mas, sobretudo a partir do século XVI, quando o escorbuto começou a ser prevenido com sumo de frutas cítricas, isso ficou mais evidente. A vitamina C é um co-factor essencial para a enzima propil-hidroxilase, e portanto, também para a produção de colagénio, juntamente com o ião ferroso e o ácido succínico. Como co-factor, previne a oxidação do ferro e, protege as enzimas contra a auto-inactivação (Maehata Y., 2007).

Estudos conduzidos com cultura de fibroblastos de pele humana demonstraram que o ácido ascórbico estimula a síntese de colagénio especificamente aumentando os níveis de RNA-m para três diferentes cadeias pró-alfa, codificadas por genes que estão localizados em três cromossomas distintos (Azulay M.M., 2003).

O mecanismo pelo qual o ácido ascórbico actua na síntese de colagénio é complexo e ainda não totalmente esclarecido. Recentemente ficou

demonstrado que a vitamina C tópica aumenta o nível de RNA-m do colagénio tipo I e III, enzimas de conversão e o inibidor tecidual das metaloproteínas matriciais do tipo I, na derme humana. As proteínas da matriz do tecido conjuntivo são degradadas por várias proteases, principalmente as metaloproteínas, entre as quais se destacam as collagenases intersticiais, que intercedem no passo inicial da degradação do colagénio (Azulay M.M., 2003).

Esse efeito não estaria relacionado à propriedade de co-factor, do ácido ascórbico, nas reacções de hidroxilação envolvendo a síntese de colagénio, mas sim mediante transcrição genética. A mensuração dessa actividade revelou aumento das cadeias pró-alfa 1 e pró-alfa 2 de quatro vezes e da pró-alfa1 de três vezes, na presença de ácido ascórbico sem aumento na actividade transcritora de genes não colagénicos (Azulay M.M., 2003).

Na pele, os colagénios tipos I e III contribuem com 85 a 90% e 8 a 11%, respectivamente do colagénio total sintetizado. A lisil e a prolil hidroxilases são enzimas férricas e catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos de colagénio, e essas modificações permitem a formação e estabilização do colagénio de tripla hélice, e sua subsequente secreção no espaço extracelular como procolagénio. O procolagénio, é então transformado em tropocolagénio, e finalmente fibras de colagénio são formadas por um rearranjo espacial espontâneo das moléculas tropocolagénicas. Consequentemente, a hidroxilação é uma fase crítica na biossíntese de colagénio, uma vez que regula a formação da tripla hélice, da excreção do procolagénio e do *cross-linking* do tropocolagénio. Assim, promove a síntese de uma trama de colagénio madura e normal por meio da perfeita manutenção da actividade das enzimas lisil e propil hidroxilases. Além de actuar como importante co-factor para as enzimas já citadas, tem-se verificado que a vitamina C regula também a síntese de colagénio tipo I e III, pelos fibroblastos dérmicos humanos (Azulay M.M., 2003).

Alguns estudos recentes demonstram que, embora a capacidade proliferativa e a síntese de colagénio sejam idade-dependentes, o ácido ascórbico é capaz de

estimular a proliferação celular, bem como a síntese de colagénio pelos fibroblastos dérmicos, independente da idade do paciente. O ácido ascórbico foi capaz de vencer a capacidade proliferativa reduzida dos fibroblastos dérmicos de indivíduos idosos (78-93 anos), assim como aumentar a síntese de colagénio em níveis similares aos de células de recém-nascidos (três a oito dias de vida). Sendo assim, uma vez que o ácido ascórbico é capaz de superar a proliferação diminuída dos fibroblastos dérmicos e, ao mesmo tempo, induzir a síntese de colagénio tipos I e III, ele mostra-se vantajoso e benéfico no processo de cicatrização (Azulay M.M., 2003).

Na parede abdominal, como ocorre com outros tecidos, as fibras de colagénio danificadas estão a ser reparadas num processo contínuo e controlado de proliferação e remodelação. Se o processo de degradação é, por alguma razão excessivo, a estrutura do tecido de suporte da parede abdominal que depende em grande parte do conteúdo do colagénio maduro, torna-se atenuada e a força biomecânica do tecido conjuntivo diminui, predispondo ao desenvolvimento da hérnia. Algumas matrizes de metaloproteinases (MMPs) e proteases de serina são caracterizadas como colagenases que, especificamente, degradam o colagénio. Para além de manter a integridade estrutural das fibras de colagénio, clivam proteínas específicas, permitindo que os macrófagos e os fibroblastos perfurem através do emaranhado de colagénio para a reparação dos tecidos. Este processo é regulado pelo inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMPs) para limitar danos durante a degradação. Das principais colagenases, a colagenase do fibroblasto (MMP-1) desempenha um papel distinto na eliminação de procolagénios defeituosos durante a formação de novas fibras de colagénio, uma vez que as colagenases de neutrófilos (MMP-8, MMP-9) são secretadas como resultado de uma resposta inflamatória e são especialmente importantes na fase inflamatória da cicatrização de feridas. As proteinases derivadas de neutrófilos como a colagenase e a elastase têm sido motivo de interesse específico, pois acredita-se que elas desempenham um papel fundamental em distúrbios tecido-destrutivos, como o enfisema pulmonar e aneurismas da aorta. É provável que a hérnia da parede abdominal seja também uma desordem tecido-destrutiva, como sugerido por

Cannon e Read, considerando os níveis mais altos de actividade de degradação da elastina e os mais baixos níveis de inibidores de protease em pacientes com hérnia inguinal directa (Sørensen L.T., 2006).

O tecido conjuntivo da derme, fornece um suporte estrutural para a vascularização da pele, anexos, e epiderme, que são vitais para a sua função. O colagénio tipo I é, de longe, a mais abundante proteína estrutural da pele humana e as fibras de colagénio fragmentadas são uma característica própria da idade na pele humana *in vivo*. Esta fragmentação prejudica gravemente as propriedades mecânicas da pele, e as funções das células que residem dentro da derme (Fisher G.J., 2009).

A tripla hélice solúvel, chamada de procolagénio, é montada dentro dos fibroblastos. O procolagénio é secretado a partir dos fibroblastos, e os terminos do peptídeo são removidos por duas enzimas no espaço extracelular. A remoção das extremidades produz colagénio, que se reúne espontaneamente (isto é, amadurece) em fibras grandes que são enzimaticamente cruzadas. Esta ligação cruzada, é necessária para um suporte estrutural normal. O colagénio tipo I sofre um colapso natural por degradação enzimática. Esta degradação na pele humana, é extremamente lenta.

Os seres humanos expressam apenas quatro enzimas (colagenases) capazes de iniciar o colapso do colagénio tipo I (Fisher G.J., 2008; Page-McCaw A., 2007). Estas colagenases são membros de uma família de enzimas de degradação da matriz proteica chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs) (Fisher G.J., 2008; Lapière C.M., 2005). Estas são responsáveis pela degradação fisiológica de várias proteínas extracelulares (Fisher G.J., 2008). Das quatro colagenases expressas em humanos, somente a colagenase intersticial (MMP-1) está envolvida no volume normal do colagénio da pele. Na pele jovem e saudável, a expressão da MMP-1 é excessivamente baixa, perto do limite de detecção pelo método de medição mais sensível. Uma vez clivado por MMP-1, o colagénio fragmenta-se. O colagénio fragmentado passa por uma maior degradação por outros membros da família de metaloproteinases da matriz (MMP), chamados gelatinases, que também estão expressos em níveis

muito baixos na pele normal. Além disso, a pele exprime inibidores naturais destas metaloproteinases da matriz (MMPs) chamados inibidores de tecido das metaloproteinases da matriz (TIMP), que actuam também de modo a retardar o colapso do colagénio. Assim, o colagénio tipo I na pele humana é muito estável, exigindo cerca de 30 anos, em média, para se submeter a substituição (Fisher G.J., 2008).

Esta taxa lenta de decréscimo do colagénio tipo I permite a acumulação de alterações dependentes da idade que prejudicam as suas funções. Estas alterações incluem a formação de novas ligações cruzadas derivadas dos açúcares (Fisher G.J., 2008; Monnier V.M., 2005). É importante referir que estas ligações cruzadas não são capazes de ser repartidas de forma eficiente e removidas durante o lento processo normal do *turn-over* mediado pelas metaloproteinases da matriz (MMP), causando acumulação de colagénio fragmentado dentro da matriz extracelular da pele. As ligações cruzadas impedem a completa remoção dos fragmentos de colagénio. Os fragmentos não podem ser reparados ou incorporados em fibras de colagénio recentemente produzidas e, portanto, causam defeitos na matriz tridimensional do colagénio. Estes defeitos comprometem a integridade estrutural e mecânica da derme e, assim, destroem e alteram a sua função (Fisher G.J., 2008).

Os fibroblastos estão evolutivamente programados para produzir a matriz de colagénio, que é o principal componente estrutural do tecido conjuntivo. Os fibroblastos que produzem e organizam a matriz de colagénio não se conseguem anexar a colagénio fragmentado. A perda de anexação impede os fibroblastos de receberem informações mecânicas do seu apoio, e entram em colapso (Fisher G.J., 2008).

A matriz extracelular (MEC) dérmica é responsável pela capacidade elástica e de resistência da pele (Azulay M.M., 2003).

A elasticidade é fundamental para uma produção normal equilibrada de colagénio e de enzimas de degradação do colagénio (Fisher G.J., 2008).

Clinicamente, este dano manifesta-se em atrasos na cicatrização, numa redução da vascularização e em pele fina. A falha das normais interações

funcionais entre as células cutâneas e o seu micro ambiente na matriz extracelular está subjacente a estas alterações fenotípicas dependentes da idade (Fisher G.J., 2009; Varani J., 2006).

Os danos à matriz extracelular de colagénio na derme podem ser observados tanto a nível histológico como ultraestrutural. Na derme jovem, intacta, bem organizada, as fibras de colagénio são muito abundantes. Uma análise bioquímica quantitativa revela que a quantidade de colagénio fragmentado na derme humana in vivo é 4.3 vezes maior em idosos (80 anos) comparada com a dos jovens (21 a 30 anos) (Fisher G.J., 2009).

O volume normal de colagénio é mediado por metaloproteinases (MMPs), uma família de proteinases contendo zinco que degrada especificamente proteínas da matriz extracelular que compõem o tecido. A família de genes humanos de metaloproteinases (MMPs) consiste em mais de vinte membros, com diferentes especificidades estruturais e de substrato. As metaloproteinases (MMPs) estão envolvidas numa variedade de processos fisiológicos e patológicos relacionados com o volume da matriz extracelular, com a cicatrização de feridas, a angiogénese, o cancro e o seu desenvolvimento (Fisher G.J., 2009; Page – MacCaw A., 2007).

Na pele humana, os níveis de metaloproteinases (MMP-1) aumentam com a idade, provavelmente contribuindo para a formação de fibrilas de colagénio fragmentadas e desorganizadas na derme (Fisher G.J., 2009; Fisher G.J., 2002; Varani J., 2000).

1.2.3 Fisiologia dos Fibroblastos

Os fibroblastos são células mesenquimais omnipresentes que normalmente se encontram no estroma de muitos tecidos (Phan S.H., 2008). Os fibroblastos estão evolutivamente programados para produzir a matriz de colagénio, que é o principal componente estrutural do tecido conjuntivo (Masseno APB, 2010; Fisher G. J., 2008).

Há mais de 30 anos atrás os miofibroblastos foram identificados no tecido de granulação da ferida como células fibroblásticas que apresentam um importante dispositivo de feixes de microfilamentos contrácteis (Hinz B., 2006). A presença de miofibroblastos é considerada característica de tecidos submetidos a contracção (Castella L.F., 2010). Um dos passos iniciais da cicatrização das feridas é a infiltração de fibroblastos na área danificada onde proliferam e se diferenciam em miofibroblastos de cicatrização que desempenham um papel preponderante na formação neodermal e na contracção. O aumento da proliferação de fibroblastos, por sua vez, activa a produção de colagénio (Masseno APB, 2010; Gopinath D., 2004) contribui para a reconstituição de uma matriz extracelular (MEC) rica em colagénio e promove a cicatrização da ferida por contracção (Castella L.F., 2010; Hinz B., 2006; Tomasek et al., 2002). Os fibroblastos iniciam a contracção da ferida, mas os proto-miofibroblastos e os miofibroblastos maduros são, de longe, as células mais importantes neste processo e a fonte predominante de colagénio tipo I, de citocinas inflamatórias/fibrogénicas em lesões fibróticas, e transmitem propriedades mecânicas aos tecidos afectados (Zhou Y., 2010; Phan S.H. 2008; Van Beurden, 2005).

Os miofibroblastos são caracterizados pelo seu citoesqueleto, que contém alfa-actina de músculo liso (Buss D.G., 2010; Van Beurden, 2005). Além disso, o seu mecanismo contráctil contém feixes de microfilamentos de actina e proteínas contrácteis associadas. Pensa-se que este mecanismo contráctil seja a grande força geradora de elementos envolvidos na contracção da ferida (Buss D.G., 2010; Van Beurden, 2005).

Não há nenhum marcador que indique que este é um tipo de células distinto, o que representa, em parte, a relativa falta de informações sobre a sua origem, função e principalmente, se faz parte de uma população homogênea de células distintas, ou um conglomerado de subpopulações distintas. Contudo, há amplas evidências a sugerir que é importante no desenvolvimento (e presumivelmente na regeneração) e manutenção celular, cicatrização de feridas, lesões de tecidos e reparação/remodelação/fibrose (Phan S.H., 2008).

O marcador de miofibroblastos mais comumente utilizado é a neo-expressão de alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) em fibras de stress, o que só ocorre num ambiente mecanicamente stressado em conjunto com a acção do factor de crescimento transformador beta (TGF β) e a variante da ligação de fibronectina ED-A (FN) (Masseno APB, 2010; Hinz B., 2006).

Os miofibroblastos estão presentes nos órgãos com uma alta capacidade de remodelação, como os rins, os pulmões e o ligamento periodontal (Gabbiani, 1994, 1998; Desmouliere A. e Gabbiani G., 1996, Lorena D., 2002; Tomasek, 2002), ou durante o aumento da remodelação, como no crescimento, desenvolvimento, respostas inflamatórias e na contracção das feridas em cura. Em tecidos com uma baixa actividade de remodelação, quase nenhuns miofibroblastos estão presentes como é o caso na derme sadia (Masseno APB, 2010; Van Beurden, 2005).

Os fibroblastos têm receptores na superfície celular chamados integrinas, que se ligam especificamente às proteínas da matriz, incluindo o colagénio tipo I. As integrinas alcançam a membrana celular, e a anexação à matriz faz com que se aglomerem e formem complexos com a actina do citoesqueleto no interior da célula. Assim, as integrinas ligam a matriz (fora da célula) ao citoesqueleto (dentro da célula) para formar adesões focais. Os complexos de adesão focal servem ambas as funções: reguladora e mecânica, que estão inexoravelmente ligadas. A formação de complexos de adesão focal activam cascatas de transdução de sinais intracelulares que regulam o metabolismo dos fibroblastos, incluindo o equilíbrio entre a produção de colagénio tipo I e sua degradação pelas matrizes metaloproteinases (MMPs). As adesões focais

também fornecem pontos de ligação que permitem que os fibroblastos se espalhem, o que é necessário para a sobrevivência, função e crescimento. A anexação à matriz permite que o mecanismo do citoesqueleto intracelular dos fibroblastos (microfilamentos) aplique uma tracção mecânica sobre a matriz de colagénio intacta. O mecanismo do citoesqueleto, que reside no lado interno da membrana de superfície do fibroblasto e em todo o citoplasma, está fisicamente interligado a integrinas e usa esta ligação para puxar a rede de fibras de colagénio. As propriedades estruturais inerentes da rede de colagénio intacta da pele jovem oferecem resistência à tracção, criando deste modo tensões mecânicas dentro da matriz de colagénio e dos fibroblastos. O contrabalançar da tracção para o interior e da tracção para o exterior, ambas provenientes da anexação de fibroblastos a colagénio intacto, estabelece uma tensão dinâmica dentro dos fibroblastos e da matriz de colagénio (Jiang Z.T., 2010). Esta tensão dinâmica mecânica controla a forma dos fibroblastos (ou seja, a elasticidade) e a sua função. Os fibroblastos evoluíram de forma a regular a síntese de colagénio e outras proteínas da matriz extracelular, em resposta à tensão mecânica. O aumento da tensão mecânica estica os fibroblastos, o que coordenadamente aumenta a produção de colagénio e diminuem a produção de colagenase. Esta regulação do teor de tecido conjuntivo pela tensão mecânica é facilmente observada durante o desenvolvimento, quando o crescimento do órgão é acompanhado pela expansão concomitante do tecido conjuntivo. Além disso, a expansão da pele para determinados procedimentos cirúrgicos depende da capacidade dos fibroblastos para produzirem mais matriz extracelular em resposta ao estiramento mecânico. Infelizmente, o inverso também é verdadeiro. A redução da tensão mecânica provoca o colapso dos fibroblastos na derme, o que coordenadamente reduz a produção de colagénio e aumenta a produção de matrizes metaloproteinases (MMPs). Este estado de tensão mecânica reduzida, que faz com que os fibroblastos entrem em colapso, surge como um resultado directo da fragmentação do colagénio. A fragmentação do colagénio reduz a elasticidade dos fibroblastos e resulta num aumento do stress oxidativo e da expressão de metaloproteinases (MMP-1). Este mecanismo auto-

perpetuador da degradação da matriz extracelular, com insuficiência contínua da estrutura e função da pele (Fisher G.J., 2009).

A fragmentação do colagénio provoca perda de pontos de ligação para as integrinas e prejudica a capacidade das fibras de colagénio para oferecer resistência mecânica contra as forças contrácteis do citoesqueleto (ou seja, a tracção exercida por microfilamentos de actina e miosina) pelos fibroblastos. Com a perda da anexação à matriz e da resistência mecânica, não se forma adesão focal, e os fibroblastos são incapazes de gerar tracção interna. Na ausência de tensão mecânica os fibroblastos colapsam. Uma vez iniciada, esta mudança de equilíbrio em direcção à degradação tecidual do colagénio é perpétua e interminável, levando a uma pele fina, frágil, deficiente em colagénio como se observa nos idosos (Fisher G. J., 2008).

Na derme humana de jovens, os fibroblastos aparecem achatados e espalhados, e estão em contacto íntimo com inúmeras fibras de colagénio intactas (Fisher G. J., 2009). Em contraste, na derme humana envelhecida, os fibroblastos têm uma aparência desmoronada, com pouco citoplasma, e falta de associação directa com fibras de colagénio fragmentado (Fisher G. J., 2008; Varani J., 2006).

Uma função normal dos fibroblastos na derme requer interacções adequadas com fibras de colagénio, e essas interacções não podem ser alcançadas quando as fibras estão fragmentadas. Pouco se sabe sobre o impacto da fragmentação das fibras de colagénio sobre a função dos fibroblastos, e o papel que as interacções alteradas fibroblastos/colagénio desempenham na pele humana (Fisher G. J., 2009). Resultados obtidos demonstraram que a fragmentação do colagénio provoca perda de alongamento, o que resulta em elevados níveis de oxidantes. É actualmente desconhecido o (s) mecanismo (s) pelo qual a perda de elasticidade (ou tensão mecânica) resulta num aumento do stress oxidativo nos fibroblastos. A tensão mecânica tem um impacto numa infinidade de processos celulares incluindo a transdução de sinal, a expressão genética e o metabolismo (Fisher G. J., 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que os fibroblastos orais possuem uma maior capacidade de causar uma contração da estrutura (malha) de colagénio do que os fibroblastos dérmicos (Sukotjo et al., 2003; Stephens et al., 1996, 2001). Diferentes subpopulações de fibroblastos também estão presentes nos tecidos orais e dérmicos. Os fibroblastos intra-orais geralmente apresentam uma capacidade de remodelação maior do que a dos fibroblastos dérmicos (Stephens, 2001). Assim, a cicatrização de feridas orais difere da cicatrização de feridas cutâneas em vários aspectos (Van Beurden H.E., 2005).

Os factores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) têm um amplo espectro mitogénico para diversos tipos de células presentes no local da ferida, incluindo fibroblastos e queratinócitos. Estimulam a proliferação de várias células de origem mesodérmica, ectodérmica, e também endodérmica. Além dos seus efeitos mitogénicos, os factores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) também regulam a migração e diferenciação das suas células-alvo, mostrando ser citoprotectores assim como auxiliam na sobrevivência das células. Estudos demonstraram numerosos efeitos dos factores de crescimento do fibroblasto (FGFs) *in vivo*, o que sugere um papel desses factores de crescimento na cicatrização de feridas (Filho A.M.D., 2007).

Vários estudos têm demonstrado um efeito benéfico de muitos factores de crescimento, por exemplo, factores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs), factores de crescimento dos fibroblastos (FGFs), e o factor estimulante das colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) sobre o processo de cicatrização, tanto em modelos animais como também em pacientes sofrendo de infecção e diferentes tipos de distúrbios de cicatrização. (Filho A.M.D., 2007). Têm ainda demonstrado que o factor de crescimento dos fibroblastos (FGF β) actua na matriz extracelular, estimulando a angiogénese e a fibrogénese, a migração de fibroblastos, aumentando a resistência à tracção (ou tensão) e reduzindo o tempo de cicatrização de feridas infectadas (Filho A.M.D., 2007). A aplicação tópica de factores beta de crescimento dos fibroblastos (FGF β) e seu anti-factor, em feridas infectadas da pele de ratos, revelou que a infecção altera o tempo de regeneração, atrasando a cicatrização das feridas abertas, como foi observado em animais infectados sem tratamento

tópico com factor básico de crescimento do fibroblasto (FGFb), onde o tempo médio de cura foi de 21,5 dias. Quando as feridas infectadas foram topicamente tratadas com factor básico de crescimento do fibroblasto (FGFb), o tempo médio de remodelação foi de 12,8 dias (Filho A.M.D., 2007).

Numa investigação dirigida a fracturas ósseas, a fixação externa é um método biomecânico de imobilização dos mesmo para permitir que a fractura cicatrize, o qual é realizado colocando hastes ou parafusos no osso em ambos os lados da fractura (Wang X., 2009). Uma abordagem alternativa e, talvez, mais satisfatória poderia ser a melhoria da cicatrização das feridas na superfície do pino para integrar os pinos no tecido da pele circundante e nos tecidos moles e ósseos subjacentes (Wang X., 2009).

Recentemente, a infecção provocada pelo parafuso tem sido mais eficazmente impedida por uma camada de composto do factor de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2)-apatita do que por uma camada de apatita revestindo os pinos de fixação externa (Wang X., 2009; Mutsuzaki H., 2008).

A adição de um outro reagente biologicamente activo ao FGF-2 seria eficaz para melhorar ainda mais as integrações dos parafusos no osso e dos parafusos na pele (Wang X., 2009).

Por essa razão foi introduzido neste estudo outro reagente biologicamente activo, o ácido ascórbico, que é eficaz para acelerar a reparação óssea (Wang X., 2009; Soheili Majd E., 2003). O objectivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma camada de revestimento que possa melhorar a pele, tecidos moles e integração óssea e, portanto, potencialmente reduzir a taxa de infecção.

Os efeitos das camadas de composto AsMg-apatita e de composto AsMg-FGF-2-apatita foram avaliadas *in vitro*, utilizando células fibroblásticas NIH3T3 e células osteoblásticas MC3T3-E1, respectivamente (Wang X., 2009).

As camadas de compostos foram depositadas consumindo os iões de cálcio e de fosfato nas soluções de fosfato de cálcio supersaturadas. Os grupos de carboxila e de hidroxila das moléculas de AsMg e FGF-2 podem ligar-se aos iões de cálcio nas soluções supersaturadas de fosfato de cálcio e no fosfato de

cálcio em crescimento (Wang X., 2009). Assim, os montantes da FGF-2 precipitado diminuíram. A adição de ascorbato à camada composta de FGF-2-apatita aumentou a proliferação e a expressão genética de células de colagénio fibroblástico NIH3T3 in vitro, o que seria benéfico para a melhoria da integração parafuso/pele (Wang X., 2009). Por outro lado, o ácido ascórbico na camada composta de AsMg-FGF-2-apatita (F4A20) neutralizou o efeito inibidor do FGF-2 na expressão genética do colagénio tipo I nas células NIH3T3, que, deste modo, mostraram um aumento na expressão do gene de colagénio tipo I, em comparação com a camada composta de FGF-2-apatita (F4A0). O ácido ascórbico mostrou estimular a síntese de colagénio em culturas de fibroblastos dérmicos através da estimulação da expressão dos genes do colagénio para as cadeias $\alpha 1$ (I), $\alpha 2$ (I), $\alpha 1$ (III) e $\alpha 1$ (IV) (Wang X., 2009).

1.3 Aplicações Clínicas

1.3.1 Patologia Oral

Actualmente, é bem aceite que a periodontite é uma doença multi-factorial causada por um desequilíbrio entre factores ambientais, tais como os patógenos periodontais, e a defesa do hospedeiro. Os mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser influenciados por factores genéticos, hormonais e de nutrição. No que diz respeito a este último, especialmente a vitamina C tem recebido uma considerável atenção na literatura periodontal uma vez que a sua deficiência absoluta resulta na condição clínica conhecida como escorbuto (Amaliya, 2007).

Embora os primeiros estudos em animais tenham mostrado que a deficiência de vitamina C leva a bolsas mais profundas e maior destruição periodontal, a maioria dos primeiros estudos epidemiológicos não encontraram nenhuma relação entre os níveis plasmáticos de vitamina C e o grau de doença periodontal. Em contrapartida, estudos epidemiológicos mais recentes têm demonstrado uma relação significativa entre a vitamina C e a condição periodontal. Vogel & Wechsler (1979) concluíram num grupo de pacientes com periodontite, que a ingestão diária de vitamina C era significativamente menor do que a dos indivíduos de controlo. Os resultados do presente estudo revelaram uma pequena, mas estatisticamente significativa associação inversa entre os níveis plasmáticos de vitamina C e a severidade da periodontite. A correlação negativa entre os níveis plasmáticos de vitamina C com a gravidade da perda de inserção pode ser explicada principalmente pela constatação de que indivíduos com deficiência de vitamina C tiveram maior perda de inserção à sondagem em comparação com aqueles com depleção ou valores plasmáticos normais de vitamina C (Amaliya, 2007).

Há várias explicações biológicas plausíveis sobre como a vitamina C pode afectar os tecidos periodontais. Por exemplo, a deficiência de vitamina C pode resultar numa falta de formação de colagénio num aumento da permeabilidade

da mucosa gengival e numa reduzida função dos neutrófilos. A discussão sobre a função da vitamina C na doença periodontal é prejudicada pelos resultados dos estudos que têm investigado o papel da suplementação de vitamina C. Parfitt & Hand (1963) descobriram que uma dose diária de 500mg de vitamina C não teve efeito sobre a saúde gengival, apesar do facto da saúde gengival dos indivíduos, no início do estudo, ser pobre e os níveis plasmáticos de vitamina C serem baixos. Não foi encontrado nenhum efeito da suplementação de vitamina C no desenvolvimento da gengivite experimental por Vogel et al. (1986), quando estava a ser consumida uma dose diária de 1500 mg. Por outro lado, estudos experimentais sobre depleção e suplementação de vitamina C mostraram uma relação directa entre a inflamação gengival e o status de vitamina C. Num estudo recente, verificou-se que pacientes com periodontite são caracterizados por níveis plasmáticos de vitamina C abaixo do normal e que o consumo de toranja reduziu o número de sangramento do sulco, mas não a profundidade de sondagem (Amaliya, 2007; Staudte H., 2005). O melhoramento da saúde gengival, como mostra esse estudo, foi provavelmente devido à suplementação de vitamina C através de toranjas. Resultados recentes também indicaram que as frutas cítricas são mais eficazes para aumentar os níveis plasmáticos de vitamina C, em comparação com altas doses de suplementos. No presente estudo, foram encontradas grandes variações em relação aos níveis plasmáticos de vitamina C (Amaliya, 2007). A constatação de que quase metade da população do estudo tinha valores plasmáticos de vitamina C óptimos foi surpreendente, uma vez que o teor de vitamina C dos alimentos parece ser bastante baixo e também a frequência de consumo médio por mês de nutrientes contendo vitamina C ser baixa (Amaliya, 2007).

Por exemplo, foi demonstrado que em infecções por *Helicobacter pylori*, os níveis plasmáticos de vitamina C também são inferiores ao esperado em função da ingestão de vitamina C (Woodward M., 2001). Park *et al.* (2003) encontraram uma correlação negativa entre os níveis de vitamina C no sangue e o grau de inflamação activa e crónica da mucosa gástrica. *Helicobacter pylori* tem mostrado potencializar a explosão oxidativa de leucócitos

polimorfonucleares (PMN), o que é acompanhado por uma considerável produção de metabólitos de oxigénio reactivo. Park *et al.* (2003) sugeriram que a vitamina C, na microcirculação da mucosa gástrica, é usada para limpar os metabólitos de oxigénio reactivo de polimorfonucleares (PMN). A vitamina C é considerada a primeira linha de defesa contra os danos dos radicais livres de oxigénio no corpo. Supõem-se que um mecanismo semelhante ocorre nos tecidos periodontais. Assim, a variação individual na extensão da infecção periodontal pode contribuir para as diferenças nos níveis plasmáticos de vitamina C. Outra explicação poderia ser que a biodisponibilidade varia entre indivíduos. A biodisponibilidade é uma medida de eficiência de absorção no trato gastrointestinal de, por exemplo, vitamina C. A vitamina C é imediatamente transportada através das membranas celulares por duas proteínas transportadoras de vitamina C dependentes do sódio (Stratakis, 2000) e para ambos os genes, as variações genéticas têm sido demonstradas (Eck, 2004). Curiosamente, num recente estudo, as variações genéticas nestes dois genes estavam relacionadas com o nascimento prematuro (Erichsen, 2006), uma condição que também tem sido associada à periodontite (Amaliya, 2007; Moliterno 2005). Em conclusão, o presente estudo demonstrou que, nesta população privada de cuidados odontológicos regulares, os baixos níveis plasmáticos de vitamina C estavam relacionados com uma maior perda de inserção periodontal (Amaliya, 2007).

1.3.2 Patologia Extra – oral

O ácido ascórbico tem um efeito anti-inflamatório e cicatrizante em feridas de pele; isto verificou-se num estudo realizado em que este participou em todas as fases de cicatrização, caracterizando-se por um menor número de macrófagos, um maior número de neovasos, uma maior proliferação de fibroblastos, produção de fibras de colagénio mais grossas e mais organizadas. Assim, o efeito anti-inflamatório do ácido ascórbico observado nas feridas de ratos pode estar relacionada com os seus efeitos antioxidantes, uma vez que o ácido

ascórbico participa nos processos de oxirredução celular, sendo responsável pela transformação dos radicais livres de oxigénio em formas inertes (Nelson e Cox, 2005; Naidu, 2003). A aplicação tópica de ácido ascórbico na ferida também mantém a integridade das paredes dos vasos sanguíneos (Azulay, 2003), aumenta o número de neovasos e melhora o fornecimento de sangue para a ferida, o que aumenta a proliferação e a viabilidade das células envolvidas no processo de cicatrização. Os vasos sanguíneos recém-formados mostraram uma estrutura anatómica normal em exames microscópicos e foram aparentemente integrados numa arquitectura vascular saudável (Lima C.C., 2009; Kirsten S., 2004).

Os glóbulos brancos têm exigências específicas de vitamina C no combate à infecção e armazenam quantidades elevadas desta vitamina, mesmo quando os níveis no plasma circundante são baixos. Um aumento na ingestão de vitamina C induziu simultaneamente um aumento na concentração de vitamina C no plasma e nos leucócitos. De facto, a vitamina C tem sido definida como um estimulante da função dos leucócitos, especialmente do movimento de neutrófilos e monócitos (Deruelle F., 2008; Maggini S., 2007).

A vitamina C protege as células endoteliais do stress oxidativo neutralizando os efeitos das espécies oxidativas e diminuindo as interacções entre células endoteliais e os glóbulos (Montecinos V., 2007). As células endoteliais que revestem as paredes dos vasos sanguíneos são continuamente expostas a oxidantes biológicos de origem endógena e exógena, incluindo superóxido e peróxido de hidrogénio gerado na mitocôndria, LDL oxidada, e peróxidos e ácidos hipoclorosos gerados por reacções inflamatórias em áreas de aterosclerose. As células endoteliais interagem com os glóbulos, tais como os neutrófilos, numa interacção que é muito maior em condições inflamatórias e tem sido classicamente associada com a diminuição da viabilidade das células endoteliais. Dados recentes revelam o importante papel das interacções entre as células de defesa do hospedeiro e as células endoteliais, a partir da perspectiva do potencial antioxidante das células endoteliais. A interacção dos neutrófilos com as células endoteliais e a associada explosão oxidativa têm

sido vistas classicamente como um mecanismo que conduz à diminuição da sobrevivência da célula endotelial (Montecinos V., 2007; Tsukimori K., 2005).

A suplementação de vitamina C mostrou melhorar os índices de muitas das respostas imunitárias humanas, tais como a actividade de hipersensibilidade antimicrobiana, a proliferação de linfócitos e quimiotaxia. A concentração de vitamina C é alta nos neutrófilos activados e nos macrófagos (Deruelle F., 2008; May J.M., 2005). Por outro lado, em pessoas mais velhas (70 anos), que se sabe terem reduzidas concentrações de plasma e de leucócitos com a suplementação de vitamina C (500 mg/dia por 1 mês) aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T. Em relação a pessoas saudáveis, pacientes com maiores concentrações de ácido ascórbico (1 g/dia), os glóbulos brancos do sangue tornaram-se mais activos e puderam mover-se mais rapidamente em direcção à infecção ou inflamação (Deruelle F., 2008).

Em relação às doenças cardiovasculares, Takahashi *et al.*, exibiram recentemente uma ampla gama de compostos para identificar uma substância química que estimule a diferenciação de células embrionárias cardíacas e descobriram que o ácido ascórbico aumenta significativamente a eficiência da diferenciação das células embrionárias. Passier *et al.* demonstraram que a adição de ácido ascórbico aumentou o número de batimento em células embrionárias humanas. Em consonância com estes relatórios, verificaram também que o ácido ascórbico aumentou significativamente a diferenciação de células cardíacas embrionárias de uma maneira dose - dependente. Curiosamente, observou-se que, para alcançar uma diferenciação eficaz, o ácido ascórbico deve ser adicionado durante a fase inicial de diferenciação e não durante a fase tardia. Esta descoberta indica que o ácido ascórbico influencia o início da diferenciação de células embrionárias cardíacas. Esta conclusão foi apoiada por Tsuneto *et al.*, que referiram que o ácido ascórbico promove uma osteoclastogénese mais forte em células embrionárias, quando este é adicionado durante os primeiros 4 dias do que quando é adicionado durante os últimos 4 dias. Uma vez que tanto os cardiomiócitos como os osteoclastos são derivados de células mesodérmicas, estes resultados sugerem que o ácido ascórbico pode afectar o início do desenvolvimento

mesodérmico. O mecanismo de diferenciação cardíaca reforçada do ácido ascórbico permanece desconhecido. No presente estudo, mostramos claramente que a síntese de colagénio induzida pelo ácido ascórbico foi necessária para a diferenciação de células cardíacas embrionárias. Esta conclusão foi apoiada por Baharvand et al., que reportaram recentemente que os cardiomiócitos derivados de células embrionárias cultivados na matriz extracelular secretada de fibroblastos amadureceram mais rapidamente, sugerindo que os componentes da matriz estão envolvidos na diferenciação cardíaca e no crescimento de cardiomiócitos. Os cardiomiócitos estão rodeados por uma membrana basal composta de colagénio tipo VI, laminina, fibronectina e diversos proteoglicanos; estes são normalmente sintetizados pelos cardiomiócitos. O espaço extracelular no coração é ocupado por várias outras moléculas; as moléculas predominantes são colagénio intersticial do tipo I e III. Assim, o colagénio e outras proteínas da matriz extracelular podem constituir o “nicho” no qual os cardiomiócitos existem. De facto, foi relatado que os fenótipos dos cardiomiócitos são alterados com base na composição e orientação da matriz extracelular. Além disso, várias linhas de evidência indicam que a matriz extracelular desempenha um papel na regulação e diferenciação de células embrionárias cardíacas. Estudos sobre células embrionárias deficientes em β 1-integrina revelaram um atraso na diferenciação cardíaca; isto foi demonstrado pela manifestação tardia de genes cardíacos específicos e dos potenciais de acção. Uma vez que a matriz extracelular transmite os sinais através das integrinas, alguns tipos de matrizes extracelulares como o colagénio podem ser necessárias para a diferenciação de células embrionárias cardíacas. Em conclusão, o ácido ascórbico aumenta a diferenciação de células embrionárias em cardiomiócitos através da regulação da síntese de colagénio. Em particular, a fase inicial da diferenciação cardíaca foi preferencialmente reforçada pela vitamina C. Estes resultados sugerem o potencial do ácido ascórbico na modificação da diferenciação de células embrionárias cardíacas e fornecem novas perspectivas sobre os mecanismos envolvidos neste processo (Sato H., 2006).

A doença cardiovascular aterosclerótica, especialmente quando associada a doenças como a diabetes e a hipertensão, continua a ser a assassina número um de homens e mulheres nos Estados Unidos. Embora os resultados de inúmeros estudos clínicos tenham definitivamente demonstrado que a redução do colesterol em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), retarda o início e abranda a progressão da aterosclerose (LaRosa *et al.*, 1999), a sua contínua alta prevalência indica que são necessárias novas abordagens para combater esta doença. Uma área de interesse crescente é que o stress oxidativo contribui para a aterosclerose.

A aterosclerose é hoje considerada uma doença inflamatória da parede dos vasos sanguíneos, caracterizada nos estágios iniciais pela disfunção endotelial, recrutamento e activação de monócitos / macrófagos, diferenciação e migração das células musculares lisas vasculares (VSMCs) para mais tarde formar o volume da placa aterosclerótica (Hansson, 2005; Ross, 1999). Embora a inflamação dê início à doença, é provável que o stress oxidativo propague e agrave a lesão (Stocker & Keaney, 2004).

Os pacientes de hemodiálise são propensos a deficiências de vitamina C, que constitui o antioxidante não enzimático mais abundante no sangue, uma vez que, os antioxidantes estão envolvidos na patogénese da aterosclerose. Este estudo conclui que baixos níveis plasmáticos de vitamina C prevêm resultados cardiovasculares adversos entre os pacientes em hemodiálise de manutenção. Estudos futuros deveriam abordar o potencial efeito protector de uma adequada suplementação de vitamina C. O estado nutricional desempenha um papel importante na patogénese da aterosclerose. Em particular, é sugerido que a deficiência de vitaminas antioxidantes exerce efeitos deletérios sobre o sistema vascular e está associada com o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares. Foi colocada a hipótese de que os antioxidantes podem retardar o crescimento de placas vasculares opondo-se à peroxidação lipídica ou à modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mas o papel exacto dos antioxidantes na prevenção de eventos vasculares como a ruptura da placa, a vasoconstrição ou a trombose continua por ser elucidado (Deicher R., 2005).

Os níveis plasmáticos de vitamina C dos pacientes em diálise e com insuficiência renal crónica são inferiores quando comparados com indivíduos saudáveis (Deicher R., 2003; Locatelli F., 2003), e têm sido relatadas com frequente associação a quantidades elevadas de vários produtos de (per) oxidação ou a deficiências nos antioxidantes (Deicher R., 2005).

Notavelmente, a vitamina C, administrada durante a diálise com membranas de celulose não-modificadas impediram incrementos de peroxidação lipídica. Um recente estudo, controlado por placebo em pacientes de hemodiálise (Tarnag D.C., 2004) relatou uma menor produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio, em conjunto com uma redução do DNA de linfócitos modificados por oxidação, após 8 semanas de suplementação de vitamina C por via intravenosa (300 mg, após cada sessão de diálise). Embora tenham sido relatados resultados semelhantes numa amostra de pacientes com insuficiência cardíaca crónica de longo prazo, após a terapia de vitamina C. Em ratos, a vitamina C melhorou a disfunção endotelial e reduziu as lesões ateroscleróticas (Deicher R., 2005). Um estudo recente com pacientes em pré-diálise e hemodiálise descobriu que a vitamina C parenteral aumenta a actividade antioxidante do soro e, simultaneamente, melhora a dilatação de endotélio dependente do óxido nítrico dos vasos de resistência do antebraço. Nenhum efeito da vitamina C foi observado em indivíduos saudáveis, sugerindo que a vitamina C pode melhorar a disfunção endotelial vascular apenas em pacientes com conhecidas deficiências em antioxidantes. É importante ressaltar que a melhoria da função endotelial relatada não foi associada a alterações uniformes das medidas bioquímicas de stress oxidativo: os níveis totais de sangue permaneceram não afectados pela vitamina C, mas os hidroperóxidos lipídicos aumentaram, de modo similar ao observado em pacientes com insuficiência cardíaca crónica (Deicher R., 2005).

Estudos futuros deverão avaliar os resultados cardiovasculares de pacientes com doença renal terminal em relação a um regime seguro de dosear a vitamina C. Embora tenha sido ajustado o modelo final de um determinado número de factores de risco estabelecidos para um desfecho cardiovascular pobre, o estudo realizado não prova que baixos níveis plasmáticos totais de

vitamina C estejam envolvidos na patogénese do dano cardiovascular. É concebível que variáveis temporais no status de vitamina C do indivíduo (nutrição, infecção, a não conformidade com a prescrição multi-vitamínica, ou outras) possam exercer uma constelação exposição-resultado significativamente diferente. Pode-se argumentar, no entanto, que os pacientes estavam num estado de equilíbrio no que diz respeito à vitamina C. O suplemento multivitamínico contendo 100 mg de vitamina C foi continuamente consumido por 85% dos pacientes. Este montante supera largamente a média semanal de perda estimada de cerca de 200 mg, pelo próprio procedimento de diálise (Deicher R., 2005).

É plausível que antioxidantes como o ascorbato sejam susceptíveis de atenuar os primeiros estágios da aterosclerose inflamatória, mas têm poucos efeitos sobre as lesões estabelecidas (Aguirre R., 2008).

O ascorbato é um antioxidante primário que neutraliza directamente espécies radicais. O ascorbato não é muito reactivo com oxidantes celulares prevalentes, tais como o peróxido de hidrogénio e, provavelmente, reage com produtos de desagregação do peróxido de hidrogénio (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Considerando que o ascorbato pode eliminar tais oxidantes, também pode doar electrões directamente para libertar iões ferro, o que vai realmente aumentar o seu efeito redox e a formação de espécies reactivas de oxigénio (Halliwell, 1999; Buettner & Jurkiewicz, 1996). Este poderia ser um problema significativo em áreas envolvidas na inflamação ou aterosclerose, onde os metais de transição livre podem estar disponíveis, devido ao rompimento do tecido (Stocker & Keaney, 2005).

O ascorbato também pode reciclar a vitamina E (alfa-tocoferol) da sua forma radical (Niki et al., 1995). A importância da reciclagem do ascorbato e alfa-tocoferol deriva das propriedades deste último como um antioxidante lipofílico, capazes de interferir com a modificação oxidativa aterogénica das lipoproteínas de baixa densidade (Thomas & Stocker, 2000).

Apesar dos resultados de ensaios clínicos *in vitro*, até recentemente não havia sido demonstrado que o ascorbato poupasse alfa-tocoferol em animais ou

seres humanos sob stress oxidativo. Esse problema foi dissipado com o estudo realizado pelo grupo de Traber (Bruno, 2006) e aplicado em fumadores saudáveis. Muitas pessoas que fumam têm baixos níveis de plasma e ascorbato celular (Lykkesfeldt, 2000), assim como altas taxas de desaparecimento da fracção alfa-tocoferol (Bruno, 2005). O estudo realizado por Bruno *et al.* (2006) foi um estudo cruzado, duplo-cego, controlado por placebo, em 11 fumadores e 10 não-fumadores. Suplementos de ácido ascórbico de 500 mg duas vezes por dia durante duas semanas foram suficientes para normalizar a taxa de desaparecimento da fracção de alfa-tocoferol nos fumadores. A capacidade do ascorbato para servir como um co-antioxidante ajuda a preservar alfa-tocoferol e deste modo oferece outro mecanismo pelo qual poderia diminuir o dano oxidativo associado com a aterosclerose precoce (Aguirre R., 2008).

A lesão do endotélio vascular representa um evento crítico para a iniciação da aterosclerose (Hansson G.K., 2005; Ross R., 1999), uma vez que a desnudação endotelial promove a activação das células musculares lisas vasculares (VSMCs), proliferação e migração para formar a neoíntima. (Saeed R.W., 2003). O ascorbato não só estimula a proliferação de células endoteliais (Saeed R.W., 2003) como impede sua apoptose (Saeed R.W., 2003; Recchioni R., 2002; Rossig L., 2001).

O ascorbato mostrou impedir a apoptose devido a citocinas inflamatórias de lipoproteínas de baixa densidade em culturas de células endoteliais (Saeed R.W., 2003; Recchioni R., 2002; Rossig L., 2001). Isto é também evidente *in vivo* assim como a diminuição da libertação de micropartículas derivadas de células endoteliais em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva tratados com vitamina C (Rossig L., 2001). O ascorbato também ajuda a proteger o endotélio vascular, aumentando a geração de óxido nítrico pela síntese de óxido nítrico endotelial. O óxido nítrico causa um relaxamento das células musculares lisas, vasodilatação a jusante, e inibe os efeitos de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão importantes na aterosclerose (Aguirre R., 2008).

O facto de o ascorbato ser benéfico para o endotélio *in vivo* é também apoiado por estudos clínicos de vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com disfunção endotelial devido a aterosclerose (Tousoulis D., 2005; Heitzer T., 2001) e condições relacionadas, incluindo a hipertensão (Duffy S.J., 2001), tabagismo (Kaufman et al. 2000) e diabetes (Tousoulis D., 2007).

Um dos papéis do ascorbato na prevenção da proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMCs) é sugerida pelos resultados de um ensaio clínico de estenose após angioplastia, na qual indivíduos recebendo suplementos orais de ácido ascórbico de 500 mg três vezes ao dia durante 4 meses tinham 25% maior diâmetro luminal, em comparação com indivíduos que não receberam o ácido ascórbico. O tratamento com ascorbato também resultou em 50% na diminuição da necessidade de intervenção em relação ao grupo de controlo (Tomoda et al., 1996). Resultados similares foram observados em estudos de estenose coronária em suínos utilizando combinações de ascorbato e alfa-tocoferol (Orbe, 2003; Nunes; 1995). O ascorbato tem várias funções nas células musculares lisas vasculares (VSMCs) activadas. Além de melhorar a modificação pós-translacional em células musculares lisas vasculares (VSMCs) do colagénio, o ácido ascórbico também aumenta a síntese de colagénio (Aguirre R., 2008).

Embora a síntese de colagénio seja necessária para a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares (Rocnik E.F., 1998; Ivanov V.O., 1997), o efeito global do ascorbato sobre esses processos parece ser o oposto. Por exemplo, as concentrações fisiológicas de ascorbato favorecem a diferenciação de células musculares lisas vasculares e aquisição de marcadores de músculo liso (Ulrich-Merzenich G., 2002; Siow R.C., 1998; Ivanov V.O., 1997). O ascorbato também evita a diferenciação de células musculares lisas vasculares (VSMCs) e (Arakawa E., 2003; 2000) há indícios de que o ácido ascórbico protege as células musculares lisas vasculares (VSMCs) de apoptose/necrose, devido a lesão por lipoproteínas de baixa densidade oxidada. Oxidada, mas não nativa, as lipoproteínas de baixa densidade e seus hidroperóxidos lipídicos reactivos aumentam a proliferação das células musculares lisas vasculares (VSMCs) (Ulrich-Merzenich G., 2002; Watanabe T., 2001), um efeito que foi

mais uma vez, paradoxalmente, associado com o aumento da síntese de colagénio. Por outro lado, as concentrações fisiológicas de ascorbato bloquearam ambos os efeitos das lipoproteínas de baixa densidade oxidada (Aguirre R., 2008).

Os macrófagos têm um duplo papel na aterosclerose, especialmente na sua fase inicial (Hasty A.H., 1999). Pegam em lipoproteínas de baixa densidade modificado para se tornarem em células de espuma de tal forma que os seus números são significativamente aumentados nas lesões iniciais de estrias gordurosas de humanos adultos, apesar da falta de desnudação endotelial (Babaev V.R., 1993). Os macrófagos também intervêm na resposta inflamatória que acompanha a aterosclerose (Aguirre R., 2008; Kanters et al., 2004).

Além de reduzir o stress oxidativo, o ácido ascórbico mostrou estimular várias funções dos macrófagos peritoneais, incluindo a adesão, quimiotaxia, fagocitose e produção de superóxido (Aguirre R., 2008). Estudos mostram que, o ascorbato inibiu a função dos macrófagos, diminuindo o consumo e degradação de lipoproteínas de baixa densidade oxidativa (Aguirre R., 2008; Kang Y.H., 2002). O ascorbato também mostrou aumentar a produção de óxido nítrico em macrófagos, aumentando a isoforma induzível da síntese óxido nítrico (Aguirre R., 2008).

Recentemente, os efeitos da vitamina C sobre a expressão genética têm sido estudados no âmbito da diferenciação celular. A vitamina C estimula a diferenciação *in vitro* de vários tipos de células mesenquimais, como os adipócitos, condrócitos, mioblastos, osteoblastos e odontoblastos. Além disso, a diferenciação de condrócitos, mioblastos e osteoblastos, exige vitamina C, presumivelmente devido à sua capacidade de induzir a síntese da matriz de colagénio e a sua deposição (Duarte T.L., 2005).

A diferenciação osteoblástica de células mesenquimais também pode ser alcançada quando se utiliza a estabilidade de derivados L-ácido ascórbico 2 - fosfato (AA2P) da vitamina C, o que sugere que é um processo dependente do ácido ascórbico, ao invés de um possível efeito não-específico resultante da autoxidação de vitamina C, *in vitro*. O ácido ascórbico e L-ácido ascórbico 2-

fosfato também podem estimular a diferenciação das células musculares lisas vasculares (VSMCs) pelo aumento da expressão de dois marcadores de músculo liso específicos, a cadeia de miosina específica do músculo liso tanto *in vitro* como *in vivo* (Arakawa E., 2003). A diferenciação de células musculares lisas vasculares (VSMCs) está fortemente implicada nos processos de aterosclerose e estenose após angioplastia, por isso os autores propuseram que a vitamina C pode ter uma acção cardioprotectora importante *in vivo*, devido à sua capacidade de manter as células musculares lisas vasculares (VSMCs) no seu estado diferenciado na parede vascular (Duarte T.L., 2005).

A vitamina C induz a diferenciação de células embrionárias em miócitos cardíacos e aumenta a expressão de um certo número de marcadores genéticos cardíacos (Takahashi T., 2003). Como observado pelos autores, este efeito é, aparentemente, independente das suas propriedades antioxidantes. Assim, sabe-se que são outros antioxidantes que inibem a diferenciação de cardiomiócitos, enquanto peróxido de hidrogénio aumenta (H_2O_2) (Duarte T.L., 2005).

A diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento da glicemia e de anormalidades no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lípidos (Conget I., 2002). É uma das doenças mais comuns no mundo (Wild S., 2004), podendo causar morbidade e mortalidade. A diabetes mellitus é não só um sério problema de saúde que afecta negativamente a vida quotidiana das pessoas diabéticas, mas também tem custos económicos muito elevados para ambos: o governo e os pacientes afectados (Eiselein L., 2004). Esta afecta diversos órgãos e sistemas do corpo humano. As complicações são particularmente comuns nos capilares, na pele, nos olhos, nos rins e no sistema nervoso (Mahajan S., 2003). A diabetes mellitus leva a duas complicações: as complicações macrovasculares que incluem doenças coronárias e doenças vasculares periféricas e as complicações microvasculares, por outro lado, causam retinopatia, neuropatia e nefropatia, (Mahajan S., 2003) dermatopatia, pé diabético, pigmentação púrpura, e reduzido fluxo capilar estão entre os sinais cutâneos de microangiopatia (Sari Kılıçaslan S.M., 2009; Sreedevi C., 2002).

A microangiopatia e a macroangiopatia são manifestações cutâneas de complicações diabéticas que podem causar lesões cutâneas diversas (Chishiki M., 1998). O dano oxidativo aumenta na diabetes mellitus, devido à escassez de enzimas antioxidantes e vitaminas como a vitamina C. As espécies reactivas de oxigénio produzidas pelo impacto da hiperglicémia desempenham um papel importante no aparecimento da maioria das complicações da diabetes. Uma maneira de diminuir o possível dano oxidativo é aumentar a capacidade antioxidante do corpo humano. Estudos mostram que a vitamina C dietética aumenta a capacidade antioxidante global do organismo. Por isso, uma dieta suplementar de vitamina C pode impedir o desenvolvimento de complicações em pacientes diabéticos (Blüher M., 2010; Sari Kılıçaslan S.M., 2009).

Têm sido investigadas as alterações ultraestruturais nos capilares da derme em ratos albinos Wistar sujeitos a tratamento com vitamina C. Foram utilizados na análise três grupos de 21 ratos: de controlo, de diabetes e de ratos diabéticos tratados com vitamina C. A diabetes foi induzida por injeção de estreptozotocina. O grupo que foi induzido com estreptozotocina foi tratado durante 21 dias, com vitamina C, nos quais foram experimentalmente demonstrados os efeitos anti-diabéticos e anti-hiperlipidémicos. As amostras recolhidas a partir da pele das pernas dos ratos foram examinadas sob microscópio electrónico de transmissão (Sari Kılıçaslan S.M., 2009). Os resultados para cada um dos grupos são os seguintes: Grupos de controlo – os capilares foram localizados entre fibras de colagénio na derme; os lúmens capilares eram claros e rodeados por células endoteliais; a estrutura das células endoteliais, neste grupo foi normal, com núcleos planos e poucos organelos; os pericitos foram localizados pelas células endoteliais; não foram observadas anomalias nas células musculares lisas ou na fina membrana basal. Grupo diabético - Foram detectadas várias mudanças nos capilares do grupo de diabéticos, em comparação com o grupo de controlo. Os exames microscópicos revelaram lúmens capilares diminuídos devido ao inchaço das células endoteliais e uma membrana basal espessada resultante de depósitos de material amorfo; foi observada uma redução na densidade do material de cromatina do núcleo e hialinização do citoplasma nas células musculares lisas;

além disso, o material de cromatina foi agregado na periferia da membrana nuclear interna; foi também observada a fusão das cristas mitocondriais no pericito. Grupo diabético tratado com vitamina C - Contrariamente ao grupo diabético, não foi observado nenhum sinal de degeneração nas células endoteliais; as células endoteliais e os pericitos eram normais e semelhantes aos do grupo de controlo; não foram observados nem células endoteliais inchadas nem fusão mitocondrial nos pericitos; o lúmen capilar era claro e a membrana basal manteve a sua fina estrutura semelhante ao grupo de controlo (Sari Kılıçaslan S.M., 2009). Embora tenha sido demonstrado que a diabetes mellitus conduz a degenerações na estrutura capilar da derme, a vitamina C pode ajudar a manter a estrutura celular normal da mesma e desempenha um papel significativo na melhoria tanto da estrutura como do funcionamento dos capilares no grupo tratado. Khaksari et al. (2005) demonstraram que a vitamina C pode melhorar disfunções em ratos diabéticos experimentais. Do mesmo modo, foi constatado que a vitamina C ajuda a manter a função endotelial na hiperglicémia (Price K.D., 2001) e pode diminuir a agregação anormal de açúcar (glicolização) das proteínas e a acumulação de sorbitol (Iqbal K., 2004). Se a descoberta de células endoteliais edemaciadas no grupo diabético foi correlacionada com a acumulação de sorbitol, a melhoria das células endoteliais capilares pode ter sido afectada pela administração de vitamina C (Sari Kılıçaslan S.M., 2009). Vários trabalhos têm descrito que concentrações milimolares de ácido ascórbico têm um profundo efeito inibidor sobre o crescimento de várias linhas de células cancerígenas *in vitro* (Chen Q., 2005; Casciari J., 2001). Na verdade, parece que tal actividade citotóxica da vitamina C depende mais da sua capacidade de gerar espécies reactivas de oxigénio do que da sua popular acção antioxidante. Isto é paradoxal, mas, como descrito anteriormente, o ácido ascórbico pode ter efeitos pró-oxidantes e mesmo mutagénicos na presença de metais de transição. *In vitro*, a citotoxicidade do ascorbato está intimamente ligada à formação de peróxido de hidrogénio. Contudo, o mecanismo subjacente à produção destas últimas espécies não é claro e ainda não sabemos se são necessários, para a toxicidade do ascorbato, metais de transição específicos (ferro e cobre, principalmente) ou proteínas

(Chen Q., 2005). Refira-se que os dados *in vitro* sobre a produção, pelo ascorbato, de peróxido de hidrogénio são por vezes difíceis de interpretar uma vez que podem ser influenciados pelas condições de cultura celular (isto é, componentes do soro e do meio) (Verrax J., 2008; Duarte T., 2007). Curiosamente, o stress oxidativo promovido pelo ascorbato parece atingir preferencialmente células cancerosas (ou cancerígenas) que apresentam uma maior sensibilidade ao ascorbato comparando com as suas homólogas normais (Verrax J., 2008; Chen Q., 2005; Zhang W., 2001). A origem desta diferença de sensibilidade entre células normais e cancerosas é desconhecida, mas podem ser formuladas diferentes hipóteses. Assim, foi demonstrado que as células cancerosas facilmente absorvem o ácido ascórbico. Na verdade, a maioria dos tumores exprimem transportadores facilitadores de glicose em excesso devido ao seu alto metabolismo glicolítico que requer alto fornecimento de glicose (Gatenby R., 2004). Como consequência, o ácido ascórbico pode ser conduzido por transportadores de glicose (GLUTs), levando à acumulação de vitamina C nos tumores. Este mecanismo tem sido observado em vários modelos (Verrax J., 2008) e pode parcialmente explicar a maior sensibilidade das células cancerosas em relação ao ácido ascórbico. Para além da maior absorção de vitamina C pelas células cancerosas, estas últimas têm sido descritas como sendo mais sensíveis ao stress oxidativo. Na realidade, tem sido relatado que a transformação oncogénica induz um elevado estado basal de espécies reactivas de oxigénio (ROS) intracelulares (Raffaghello L., 2008) associada a uma maior sensibilidade em relação ao stress oxidativo (Trachootham D., 2008; Trachootham D., 2006). A lógica é que as células cancerosas, que apresentam altos níveis endógenos de espécies reactivas de oxigénio (ROS), seriam preferencialmente mortas por qualquer agente de promoção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Laurent A., 2005). Além disso, um baixo estado antioxidante devido a um desequilíbrio nos níveis de enzimas antioxidantes tem sido descrito em várias linhagens de células de cancro que também poderiam participar na sua sensibilidade às espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Verrax J., 2008, 2004). Embora estes dados apoiem uma alteração na expressão de enzimas antioxidantes, continua a ser

perigoso produzir uma conclusão global sobre o estatuto antioxidante apresentado por células cancerosas, e isto por uma variedade de razões: poucos estudos estão disponíveis, a ausência de comparação com tecidos saudáveis, devido às condições de cultura celular (Kinnula V., 2004). No entanto, não foi relatada uma resposta anti-cancerígena objectiva neste ensaio, muito provavelmente porque os pacientes sofriam de cancro avançado (Verrax J., 2008).

1.3.3 Cicatrização e Regeneração

A pele é não só o maior órgão humano, mas também o único constantemente exposto ao meio ambiente. A aparência da pele de cada um reflecte a saúde geral e comunica a etnia, o estilo de vida e a idade. Estas características são em grande parte determinadas pela cor da pele, textura, firmeza e suavidade. À medida que se envelhece, a pele tende a tornar-se desigual na cor, áspera, relaxada, e enrugada. A derme, que fornece suporte estrutural para a vascularização da pele, dos anexos, e da epiderme, é composta principalmente por matriz extracelular. Esta matriz extracelular é composta por vários tipos de proteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que são largamente produzidas e secretados por fibroblastos (Fisher G.J., 2008). A pele é a parte do corpo mais frequentemente lesada; (Lima C.C., 2009) é uma barreira protectora contra agressões externas e qualquer tipo de lesão deve ser rápida e eficientemente reparada (Duarte T., 2008).

Após a lesão da pele, o tecido conjuntivo é exposto e são accionados uma série de eventos celulares e bioquímicos locais para restabelecer a integridade do tecido. A vasoconstrição reduz a hemorragia e favorece a agregação plaquetária. Quase simultaneamente, a vasodilatação permite que as células inflamatórias entrem no local da lesão (Van Beurden H.E., 2005). Esta sequência de eventos é chamada de cicatrização e envolve três fases dinâmicas, subsequentes, interligadas e parcialmente sobrepostas, tais como: inflamação, proliferação e maturação do tecido (Lima C.C., 2009). Após a

lesão, a deposição de um coágulo de fibrina e o início de uma inflamação 2 caracterizam a fase inicial (Van Beurden H.E., 2003). A inflamação, que constitui uma parte da resposta aguda, resulta num fluxo coordenado de neutrófilos que migram para o local da ferida para evitar a deposição e proliferação de microorganismos. Estas células, através da sua actividade característica de “explosão respiratória”, produzem radicais livres (Gopinath D., 2004; Van Beurden H.E., 2003). O exame histológico revela uma alta migração de células inflamatórias em direcção ao ambiente da ferida.

Durante uma migração elevada de células inflamatórias, uma grande variedade de citocinas são expressas para auxiliar na reparação dos tecidos. A expressão aumentada de citocinas activa os fibroblastos em direcção ao ambiente da ferida, o que leva a um aumento na proliferação de fibroblastos e de colagénio (Gopinath D., 2004). A transição para a fase de proliferação começa com a migração de fibroblastos para a área da ferida e sua propagação. Os fibroblastos anexam-se à matriz provisória e começam a produzir componentes do tecido de granulação. A matriz deste tecido relativamente flexível é constituída principalmente por fibronectina, colagénio e ácido hialurónico (Van Beurden H.E., 2003). Simultaneamente, a re-epitelização ocorre pela proliferação e migração das células epiteliais das bordas da ferida. Uma população especializada de fibroblastos diferenciados, os miofibroblastos, aparece durante esta segunda fase. Estas células expressam proteínas do citoesqueleto de músculo liso (alfa-actina de músculo liso [alfa-SMA], em particular) e estão envolvidas na produção da matriz extracelular (MEC) e na contracção do tecido; Na terceira fase da reparação da ferida, os fibroblastos remodelam a matriz extracelular (MEC), levando a uma melhor cicatrização celular. Os fibroblastos desempenham, obviamente, um papel crucial durante as várias fases do processo de cicatrização de feridas (Van Beurden H.E., 2003).

Durante a cicatrização de feridas há uma rápida síntese e degradação de proteínas do tecido conjuntivo, um processo muitas vezes referido como remodelação. A estimulação da síntese de colagénio excede a degradação do

colagénio extracelular de tal modo que a quantidade total de colagénio continua a aumentar durante esta fase de formação da cicatriz (Mutsaers S.E., 1997).

A cicatrização é uma propriedade dos organismos vivos que resiste a um estado de entropia para retomar a função e manter a vida. A cicatrização de feridas é uma cadeia de processos necessários para a remoção de invasores patogénicos dos tecidos danificados do corpo, e para a remodelação total ou parcial de tecidos lesionados (Sumitra M., 2009).

A cicatrização de feridas cutâneas é uma sequência ordenada altamente complexa de eventos interactivos que inclui vários tipos de células (por exemplo, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos), levando ao eventual encerramento da ferida. Este processo normalmente começa como uma resposta inflamatória mediada principalmente por macrófagos, culminando na reparação da lesão cutânea através da deposição da matriz extracelular (MEC) pelos fibroblastos com a concomitante regeneração de uma nova camada epidermal pelos queratinócitos, o que significa, deste modo, o encerramento da ferida. Em particular, a oportuna e ordenada infiltração de macrófagos, a migração/proliferação de fibroblastos dérmicos e, de igual modo, os queratinócitos são consideradas algumas das principais características da cicatrização de sucesso (Liao H., 2009).

As feridas abertas cirurgicamente curam principalmente por dois mecanismos básicos: a contracção das bordas da ferida e a migração das células epiteliais. A contracção reduz o tamanho da espessura total da ferida operatória através de movimentos centrípetos da pele ao redor dos tecidos. Depois, os capilares das margens da ferida formam de novo vasos, a migração de fibroblastos acontece e a ferida será preenchida. A contracção das feridas abertas depende da capacidade que os fibroblastos têm de se contrair e de se mover através da matriz extracelular (Filho A.M.D., 2007).

Os fibroblastos dérmicos são a principal fonte da matriz extracelular do tecido conjuntivo e desempenham um papel importante na cicatrização de feridas. Eles são recrutados para a área da ferida por células inflamatórias, invadem as lesões, e desempenham um papel importante na promoção da reepitelização e

no restabelecimento da sua integridade, em locais de lesões (Duarte T.L., 2008). Durante a formação do tecido de granulação, enquanto se dá a contracção e o aumento da resistência, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos. A presença de miofibroblastos é considerada característica dos tecidos submetidos a contracção (Sumitra M., 2009).

Os miofibroblastos contêm estruturas contrácteis como a alfa-actina de músculo liso (SMA) e, portanto, geram forças mecânicas da matriz extra-celular levando à contracção do tecido. Forças mecânicas mostraram estimular a transformação de fibroblastos dérmicos em miofibroblastos. No entanto, não se sabe qual a magnitude ou duração das forças necessárias para induzir este tipo de transdiferenciação (Junker J.P.E., 2008). No final da cicatrização de uma ferida normal a actividade contráctil e de síntese dos miofibroblastos geralmente termina e o número de células é drasticamente reduzido por apoptose (Hinz B., 2006).

O aumento de colagénio tipo III deve-se aos fibroblastos locais, que são activados pelo processo de cicatrização da ferida. O colagénio tipo III tem uma maior actividade de agregação plaquetária do que o colagénio tipo I e desempenha um papel importante na formação de um tampão homeostático (Sumitra M., 2009).

Verificou-se que as feridas na mucosa oral cicatrizam mais rapidamente e com menos cicatrizes do que as feridas dérmicas, embora o contrário também seja reivindicado. A causa desta diferença não está totalmente entendida, mas parecem estar envolvidos a saliva, leucócitos, factores de crescimento e subpopulações de fibroblastos específicos. A saliva oferece um ambiente único, favorecendo a cicatrização de feridas. Feridas cutâneas tratadas com saliva têm uma menor reacção inflamatória, mais rápida cobertura epitelial, e uma rápida regeneração do tecido conjuntivo. Feridas orais na ausência de saliva contêm menos miofibroblastos do que feridas tratadas com saliva (Van Beurden H.E., 2005).

A reparação de feridas cutâneas é um processo complexo que requer eventos celulares e bioquímicos locais que são activados por uma série de mediadores,

tais como os factores de crescimento (Lima C.C., 2009). O processo de reparação é iniciado imediatamente após a lesão através da libertação de vários factores de crescimento, citocinas e compostos de baixo peso molecular a partir do soro dos vasos sanguíneos lesionados e de plaquetas (Filho A.M.D., 2007).

Tem sido demonstrado que o factor de crescimento básico dos fibroblastos (FGF β) é capaz de reverter os efeitos da infecção sobre a contracção em feridas abertas em todas as fases da cicatrização, através da formação e da migração de fibroblastos. Apesar de reduzir o tempo de cicatrização, alguns estudos demonstraram uma redução na força das feridas. O factor de crescimento básico dos fibroblastos (FGF β) tem sido capaz de melhorar a cicatrização de feridas de incisão e de feridas abertas infectadas, reduzindo o seu tempo de cicatrização e aumentando a síntese de DNA na matriz extracelular, sem aumentar a força de tensão (Filho A.M.D., 2007).

Vários estudos têm demonstrado um efeito benéfico de muitos factores de crescimento, por exemplo, dos factores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs), dos factores de crescimento dos fibroblastos (FGFs), e dos factores estimulantes da colónia de granulócitos e macrófagos (GMCSF) sobre o processo de cicatrização, tanto em modelos animais como também em pacientes que sofrem de diferentes tipos de distúrbios de cicatrização e de infecção (Filho A.M.D., 2007).

Há já anos que a importância do ácido ascórbico no processo de cicatrização tem sido reconhecido. O ascorbato concentrado em tecidos feridos é rapidamente utilizado durante a cicatrização. A resistência à tracção de feridas e a incidência da deiscência da lesão estão relacionadas com os níveis de ácido ascórbico (Murad S., 1981).

A vitamina C pode ter um leque mais vasto de acções que são relevantes para o processo de cicatrização de feridas. *In vivo*, os fibroblastos dérmicos estão expostos a soro durante a recolonização de uma ferida; em resposta, os fibroblastos começam a proliferar e, eventualmente a migrar para o coágulo da ferida. Porém, esta resposta não é imediata, sendo o passo limitador o tempo

necessário para os fibroblastos emergirem da quiescência nesta fase de contracção da ferida. Exames clínicos sugerem que a vitamina C pode favorecer a cicatrização da ferida, estimulando a reentrada de fibroblastos quiescentes no ciclo celular e promovendo a migração celular. Observou-se que a vitamina C pode activar cascatas de sinalização intracelulares que regulam a proliferação e a motilidade dos fibroblastos (Duarte T.L., 2008). É possível que os efeitos aqui relatados estejam relacionados com a sua capacidade de estimular a síntese de colagénio. Os fibroblastos dérmicos expressam dois receptores transmembranares independentes, que podem converter sinais em resposta ao colagénio. Assim, ambos os receptores respondem à ligação do colagénio, iniciando sinais intracelulares que criam sinergia com os factores de crescimento, resultando na modulação da tensão do citoesqueleto, na migração celular e na proliferação celular. A vitamina C é necessária para a hidroxilação intracelular dos resíduos proil e lisil durante a biossíntese de colagénio e, portanto, L-ácido ascórbico 2-fosfato (AA2P), aumenta a deposição de colagénio nos fibroblastos da pele. É improvável, no entanto, que essas vias de sinalização possam explicar todos os efeitos da expressão do gene, alguns dos quais podem incidir sobre as funções fisiológicas de base da vitamina C nas células, em vez do seu envolvimento na cicatrização de feridas (Duarte T.L., 2008).

A hemorragia difusa em pacientes cirúrgicos com parâmetros de coagulação normal pode ser causada por deficiência de vitamina C e é rapidamente revertida pela reposição desta (Blee T. H., 2002).

A deficiência de vitamina C deve ser incluída no diagnóstico diferencial de sangramento não específico em pacientes cirúrgicos. Uma hospitalização prolongada, doença grave e dieta pobre, originam deficiência de vitamina C com consequências clínicas significativas. A reposição oral de vitamina C reverte rapidamente os efeitos desta enfermidade (Blee T.H., 2002).

A hemorragia em pacientes com deficiência de vitamina C é causada por um defeito na integridade vascular relacionado com a formação inadequada de colagénio. Tem sido descrita uma fragilidade capilar dentro e em torno dos

vasos sanguíneos proveniente de tecidos conjuntivos mal formados ou facilmente degradados (Blee T.H., 2002).

A fragilidade capilar, juntamente com a deficiência de vitamina C, podem causar hemorragia oculta crônica e anemia, hemorragia espontânea descontrolada, ou sangramento cirúrgico substancial. O sangramento típico descrito em pacientes com avançada depleção de vitamina C envolve hemorragia maciça e espontânea na pele, músculos e articulações, e pode ser fatal se conduzir à hipovolemia, isquemia coronária e enfarte (Blee T.H., 2002). Manifestações adicionais da depleção de vitamina C, incluindo as alterações da pele, podem ser completamente revertidas com duas a três semanas de terapia de reposição adequada. A deficiência de vitamina C pode também ser um marcador para outras falhas nutricionais, que devem ser investigados e corrigidos (Blee T.H., 2002).

Num estudo recente foram identificados doze pacientes com hemorragia difusa, perfis de coagulação normais, e baixos níveis plasmáticos de ácido ascórbico. Em cada um dos pacientes, as evidências clínicas de sangramento cessaram após a administração de vitamina C. Estudos com vista a relacionar a deficiência de vitamina C e o sangramento "não cirúrgico" devem incluir testes de ácido ascórbico em grupos maiores de pacientes cirúrgicos e estudos caso-controlo que entendam melhor o papel da vitamina C no metabolismo do colagénio. Embora a depleção de vitamina C com um quadro clínico de escorbuto seja rara, a deficiência de vitamina C é uma entidade clínica desvalorizada. Um número significativo de pessoas possui factores dietéticos ou médicos que as coloca em risco no que concerne à deficiência da vitamina C. Outros podem viver com normais baixas reservas de vitamina C e a hospitalização ou doença grave pode rapidamente torná-los deficientes em vitamina C (Blee T.H., 2002).

Nos doze pacientes identificados e anteriormente referidos, nos quais a deficiência de vitamina C contribuiu para eventos hemorrágicos que foram rapidamente revertidos com a reposição da vitamina C, a maioria desses pacientes com hemorragia pós-operatória têm sangramento cirúrgico ou

coagulopatia de causas corrigíveis, tais como hipotermia, acidose metabólica, disfunção plaquetária, trombocitopenia, ou o esgotamento do factor de coagulação (Blee T.H., 2002).

No entanto, quando a hemorragia difusa continua sem causa identificável e os perfis de coagulação são normais, a deficiência de vitamina C deve ser considerada como uma possível origem (Blee T.H., 2002).