

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO CITO-GENÔMICO DO PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) EM  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Alencar Kolinski Machado**

Santa Maria, RS, Brasil  
2014

**EFEITO CITO-GENÔMICO DO PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) EM  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

**Alencar Kolinski Machado**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia dos Processos Oxidativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KOLINSKI MACHADO, ALENCAR  
EFEITO CITO-GENÔMICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO  
GUARANÃ (Paullinia cupana) EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
/ ALENCAR KOLINSKI MACHADO.-2014.  
96 p.; 30cm

Orientadora: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO 2.  
METABOLISMO OXIDATIVO 3. DANOS CELULARES I. BEATRICE  
MÂNICA DA CRUZ, IVANA II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, Aprova a Dissertação de  
Mestrado**

**EFEITO CITO-GENÔMICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO  
GUARANÁ (*Paullinia cupana*) EM CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS**

elaborada por

**Alencar Kolinski Machado**

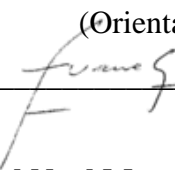
como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**


**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

(Orientadora)



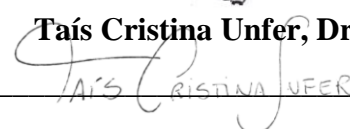
---

**Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)**



---

**Táís Cristina Unfer, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**



---

Santa Maria, 22 de janeiro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por estar sempre me guiando pelo melhor caminho, pelas oportunidades, conquistas e aprendizados e por me dar o privilégio de possuir pessoas tão especiais em minha vida.

A professora orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ivana pela oportunidade e confiança. Tudo começou com uma banca durante a graduação. Agradeço pelos ensinamentos, tanto profissionais como pessoais, pelo empenho e trabalho, que nem mesmo em situações não tão boas deixaram de acontecer. Terás sempre minha admiração, amizade e respeito.

Aos meus queridos pais João Claudio e Ana Lúcia, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e aconselhando e sem medir esforços para que eu realizasse meus sonhos. Falo e repito, meus pais são sinônimo de amor! Obrigado pela amizade e carinho de todas as horas, me sinto privilegiado por ter pessoas como vocês em minha vida.

A minha querida irmã Amanda que ilumina nossas vidas todos os dias. Obrigado pelo amor e carinho e por sempre torcer por mim. Mana serei eternamente grato por sempre estar a minha espera nos finais de semana e por ser essa pessoa tão especial e amável que és.

Agradeço *in memoriam*, aos meus avós Alivino e Jacyra, pois devo também a eles os meus estudos. Dignos de admiração para sempre, exemplos de dedicação, compaixão e amor. Pessoas especiais que sempre nos ensinaram o que realmente possui valor na vida, sem vocês eu não seria o que sou hoje.

Aos meus avós João e Eloisa pelo carinho e por sempre torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional. Aos tios (as), primos (as), padrinhos e madrinhas que sempre estiveram ao meu lado.

A minha amiga de todas as horas Vanessa, que apesar de algumas vezes não nos vemos, sei que está sempre presente em pensamentos positivos. Torço muito por ti e sei que irás muito longe, pois tens muito potencial.

A minha colega e amiga Francine por ter sempre me ajudado nos experimentos, estudos, estatísticas e pela amizade de todos os dias que renderam muitas risadas e momentos bons. Pode contar sempre comigo.

As colegas e amigas Verônica e Fernanda pelas ajudas e pela estimada amizade. Esses anos de convívio nos deixaram muitas histórias a contar. Vocês são pessoas muito queridas e estarei sempre pronto a ajudá-las quando preciso.

Aos professores e colegas Olmiro e Michele e ao amigo Luiz Filipe que desde a minha chegada ao laboratório me premiaram com a oportunidade de trabalhar junto a eles e que me ensinaram o trabalho com cultura de células.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica que são exemplos de coleguismo. Desde que entrei no laboratório me senti em casa, admiro cada um pelas suas características e qualidades. O meu muito obrigado de coração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelos recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

***“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”***

*(Eleanor Roosevelt)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO CITO-GENÔMICO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO GUARANÁ (*Paullinia cupana*) EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

AUTOR: Alencar Kolinski Machado

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 22 de janeiro de 2014

Com os avanços das técnicas de cultivo celular, as células tronco (CTs) passaram a ser utilizadas como forma de terapia alternativa, firmando a chamada medicina regenerativa. Um tipo de CT que vem sendo estudada são as Células Tronco derivada do tecido adiposo (ASCs) que possuem características idênticas as Células Tronco Mesenquimais (CTMs). Para realizar um transplante de CTs, se faz necessária uma grande quantidade de células, o que faz com que tais cultivos sejam mantidos *in vitro* por longos períodos de tempo, consequentemente tais células, com as repetidas passagens, entram em senescência celular, o que inviabiliza a sua utilização. Sendo assim, algumas pesquisas demonstraram que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pode atuar potencializando a proliferação destas células. Contudo, sabe-se que o metabolismo oxidativo está intimamente associado ao processo de senescência celular. A partir disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito cito-genômico da exposição de ASCs ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao extrato de guaraná. Foi realizado isolamento e cultivo de ASCs, as quais em quarta passagem foram expostas as concentrações de 1-1000 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e realizados ensaios para a avaliação da viabilidade celular, parâmetros de estresse oxidativo, danos ao DNA e rota apoptótica das caspases. Além disso, ASCs senescentes foram tratadas com concentrações de 1-20mg/mL de extrato de guaraná, sendo testadas para a reversão da senescência, viabilidade celular, parâmetros oxidativos, de danos ao DNA e atividade e expressão de enzimas antioxidantes. Os resultados mostraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa danos cito-genômicos as ASCs, havendo redução da viabilidade celular principalmente a partir da concentração de 200 µM, assim como aumento da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também diminuiu a atividade da catalase de forma dose-dependente e atuou sobre a atividade da SOD. Os tratamentos também conduziram a um aumento progressivo dos danos ao DNA. Além disso, na oitava passagem foi observada a senescência das ASCs e o tratamento com guaraná mostrou capacidade de reversão deste fenótipo na concentração de 5 mg/mL, de forma a reduzir a taxa total de EROS, a lipoperoxidação, a carbonilação de proteínas e os danos ao DNA, quando comparado às ASCs não tratadas. O guaraná também foi capaz de modular a atividade e expressão de enzimas antioxidantes, aumentando a catalase, reduzindo a SOD total e uma leve redução na expressão da glutathione peroxidase. Logo, pode-se dizer que a exposição aguda de ASCs não senescentes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi altamente citotóxica, demonstrando a alta sensibilidade destas células a este agente estressor. Todavia, ASCs senescentes tratadas com guaraná demonstraram o potencial efeito deste extrato na reversão da senescência celular.

**Palavras-chave:** Células Tronco derivadas do tecido adiposo. Metabolismo Oxidativo. Danos Celulares.



## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Post-Graduate Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **CITO-GENOMIC EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE AND GUARANÁ (*Paullinia cupana*) IN MESENCHYMAL STEM CELLS**

Author: Alencar Kolinski Machado

Advisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, January 22, 2014.

With advances in techniques of cell culture, stem cells (SCs) have to be used as an alternative therapy, firming the called regenerative medicine. An type of SC that has been studied is the Adipose-derived stem cell (ASCs) having identical characteristics of Mesenchymal Stem Cells (MSCs). To realize a transplanting of SCs, is necessary a large amount of cells, which makes such cultures are maintained *in vitro* for long periods of time, consequently these cells, with the repeated passages, enter cellular senescence, which prevents their use. Thus, some studies showed that the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) can act to potentiate the proliferation of these cells. However, it is know that the oxidative metabolism can be associated with the senescence process. From this, the aim of this study was available the cito-genomic effect of the exposition of ASCs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to guaraná extract. Was realized isolation and cultivation of ASCs, that were, in forth passage, exposed to concentrations of 1-1000 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and realized assays to available the cell viability, oxidative stress parameters, DNA damage and the apoptotic way of caspases. Moreover, senescents ASCs were treated with concentrations of 1-20 mg/mL of guaraná extract, being tested to the senescence reversion, cell viability, oxidative parameters, DNA damage and activity and expression of antioxidants enzymes. The results showed that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cause cito-genomic damages to ASCs, with decrease in the cell viability mainly at the concentration of 200 µM, as well as increase the total reactive oxygen species (ROS) rate and lipidic peroxidation effect. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> also decreased the catalase activity in dose-dependent form e acted in the SOD activity. The treatments also conducted to a progressive increase of DNA damage. Moreover, in the eighth passage was observed the senescence of ASCs and the treatment with guaraná showed capacity to revert this phenotype in the concentration of 5 mg/mL, with reduction in the total ROS rate, lipoperoxidation, protein carbonyl and DNA damage, when compared with senescent ASCs untreated. The guaraná also was able to modulate the activity and expression of antioxidants enzymes, increasing the catalase, decreasing the total SOD and a light decrease in the glutathione peroxidase was observed. Therefore, it can be said that the acute exposition of no senescent ASCs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was highly cytotoxic, demonstrating the high sensibility of these cells to this stressor agent. However, senescent ASCs treated with guaraná showed the potential effect of this extract in the reversion of the cellular senescence.

**Key-words:** Adipose-derived stem cells. Oxidative metabolism. Cellular damages.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Cultura de Células .....	12
1.2 Células Tronco (CTs) e a emergência do uso nas terapias regenerativas .....	13
1.3 Células Tronco Mesenquimais (CTMs) .....	14
1.4 Células Tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs) e senescência .....	17
1.5 Metabolismo Oxidativo: papel na proliferação, diferenciação e senescência das CTs	19
1.6 O guaraná como potencial modulador da senescência celular .....	22
1.7 Justificativa .....	24
1.8 Objetivos .....	26
1.8.1 Objetivo Geral .....	26
1.8.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>2 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
Manuscrito 1 – Human adipose-derived stem cells obtained from lipoaspirates are highly cytogenotoxic susceptible to hydrogen peroxide .....	29
Abstract .....	30
Introduction .....	31
Material and Methods .....	32
Results .....	36
Discussion .....	37
Conclusions .....	39
References .....	40
Manuscrito 2 – Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) effects on senescent adipose-derived stem cells obtained from human lipoaspirates .....	50
Abstract .....	51
Introduction .....	52
Material and Methods .....	54

Results .....	60
Discussion .....	62
References .....	70
<b>3 DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Células Tronco (CTs) são células indiferenciadas que estão envolvidas nos processos de renovação e proliferação celular de tecidos de forma fisiológica, bem como na regeneração de tecidos lesionados (PERES e CURI, 2005). Além das CTs de origem embrionária, existem também CTs de origem adulta (ARANDA et al., 2009).

Um grande interesse científico e clínico tem sido atribuído as CTs adultas, já que são mais facilmente obtidas. Estas células também têm apresentado uma resposta terapêutica positiva em estudos voltados ao desenvolvimento de tratamentos para algumas doenças, como diabetes e cardiopatias, caracterizando a chamada terapia celular e firmando a aplicação da medicina regenerativa (DAI e KLONER, 2007; LEE et al., 2006; McNIECE, 2007; NOGUCHI, 2007).

Células tronco mesenquimais (CTMs) são um tipo de CT que no organismo possuem a capacidade de se diferenciar em células de tecidos de origem mesodérmica, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, também estando associadas a funções imunomodulatórias (AMADO et al., 2005; KULTERER et al., 2007; PITTENGER et al., 1999). Devido a tais características, estas células são foco de investigações voltadas ao desenvolvimento de terapia celular regenerativa com várias indicações de uso no tratamento de doenças degenerativas e auto-imunes (ANKRUM e KARP, 2010). Dessa forma, algumas pesquisas também estão sendo desenvolvidas utilizando a engenharia genética no intuito de aumentar a capacidade terapêutica das CTs, no qual tal prática baseia-se na inserção de genes exógenos. Todavia, estes procedimentos podem consequentemente aumentar as chances de desenvolvimento tumoral (FAZEL et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Ao longo do envelhecimento biológico e também em grande parte de doenças ou injúrias corporais há o aumento do estresse oxidativo e resposta inflamatória no local. Este fenômeno parece atrair as CTs para o local lesado a fim de auxiliar na regeneração tecidual. Sendo assim, alguns estudos foram desenvolvidos de forma a avaliar a modulação destas células quando expostas a um ambiente estressor (ADAMS e SCADDEN, 2008; LAU et al., 2008). Kaburagi e colaboradores (1993), por exemplo, demonstraram que a exposição de CTs ao Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) conduz a um aumento do crescimento celular. Já Zhang e colaboradores (2012), evidenciaram que além do crescimento celular, a exposição a  $H_2O_2$  por um curto período de tempo pode aumentar a capacidade de diferenciação de tais células,

podendo assim ser uma forma de pré-condicionamento celular antes do transplante, porém os estudos na área de avaliação dos padrões de segurança desta aplicabilidade ainda são escassos.

Outra questão importante relacionada ao uso das CTs em terapias regenerativas é o quanto a manipulação destas células pode alterar o metabolismo oxidativo e gerar danos que tornam a mesma menos eficientes em termos de regeneração e mais propensas ao desenvolvimento tumoral. Por este motivo, investigações relacionadas à exposição de CTs a moléculas ou compostos pró-oxidantes e antioxidantes são de grande interesse. Entretanto, estudar o efeito destes compostos não é tarefa fácil dada a complexidade das interações bioquímicas que ocorrem no ser vivo. Portanto, uma estratégia para avaliar o efeito de agentes pró e antioxidantes é o uso de modelos experimentais *in vitro* utilizando cultura celular (KUILMAN et al., 2010).

## 1.1 Cultura de Células

Antes mesmo dos protocolos de cultura de células começarem a surgir, o desenvolvimento de soluções salinas com a capacidade de manter as necessidades vitais de órgãos isolados foi estabelecido por Sydney Ringer no século XIX. Alguns anos após, Wilhelm Roux conseguiu manter células embrionárias vivas em condições *in vitro* pela primeira vez (CRUZ et al., 2009).

Entretanto, os primeiros experimentos que realmente aplicaram a cultura de células foram efetuados por Ross Granviele Harrison, há mais de 100 anos. O estudo deste pesquisador tinha por objetivo avaliar como as células animais se comportavam em um ambiente homeostático e em situações de estresse. Para tanto, Harrison desenvolveu uma técnica baseada na desagregação de fragmentos de tecidos de anfíbios que migravam para o meio (CRUZ et al., 2009; PERES E CURI, 2005).

Após as pesquisas de Harrison, outros pesquisadores manifestaram interesse pelo cultivo de tecidos. Alexis Carrel, por exemplo, foi um dos cientistas que continuaram a pesquisar a cultura de células, comprovando a necessidade do controle da temperatura e das trocas periódicas do meio de cultivo celular, pois desta forma, um melhor crescimento celular era observado (PERES e CURI, 2005).

A aplicabilidade do cultivo celular foi aumentando, incluindo o início de pesquisas envolvendo cultivo de células tumorais. Assim, na década de 50 foi estabelecida a primeira linhagem tumoral comercial a partir de um adenocarcinoma de cervix denominada células HeLa em homenagem a doadora, Henrietta Lacks. A partir daí foi estabelecida uma grande quantidade de linhagens celulares que são comercializadas e podem ser assim utilizadas por diversos laboratórios do mundo, dada a necessidade do aumento de conhecimentos relacionados à oncologia e também pesquisas direcionadas a produção de vacinas antivirais (CRUZ et al., 2009; PERES e CURI, 2005).

Atualmente a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*, seu uso se estende a investigações voltadas a aplicação na medicina regenerativa, pois possuem importante papel no tratamento de doenças degenerativas principalmente considerando as CTs adultas (MOLINARO et al., 2010).

## **1.2 Células tronco (CTs) e a emergência do uso nas terapias regenerativas**

Os tecidos de organismos multicelulares realizam fisiologicamente processos de renovação celular, a fim de manter as suas funções e padrões estruturais. Para tanto, o organismo desencadeia ações como a proliferação e diferenciação celular ao longo da embriogênese. Tais processos também ocorrem em situações patológicas, a fim de reparar o local lesionado. As células que são indiferenciadas, mas que possuem esta capacidade de proliferação e diferenciação, são as CTs (PERES e CURI, 2005).

Com o envelhecimento populacional cresceu a prevalência de doenças crônico-degenerativas que se originam de disfunções celulares. Uma vez estabelecidas estas doenças passam a ser sistêmicas. Assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que auxiliem ao retorno funcional do metabolismo ou de estruturas corporais é de grande interesse mundial. Este interesse foi fortalecido pelo potencial uso de CTs na medicina e saúde (MARTIN, 2011).

Com o desenvolvimento das técnicas de cultura celular e de biologia molecular a ideia de utilizar CTs em processos regenerativos de tecidos corporais que apresentam disfunções por doenças ou lesões impulsionou as pesquisas. Inicialmente, os estudos se voltaram para as CTs embrionárias. Entretanto, por questões éticas e de complexidade de procedimentos para tornar as mesmas potencialmente transplantáveis para organismos geneticamente diferentes, o

uso das CTs embrionárias nas pesquisas científicas ficou mais restrito. Por outro lado, o desenvolvimento de marcadores de identificação de CTs no corpo adulto possibilitou não só o reconhecimento destas células, mas também o seu acesso voltado a estudos clínicos que possibilitem o seu uso de forma terapêutica (LEE et al., 2006; MARTIN, 2011).

Assim, um grande interesse científico e clínico tem sido atribuído as CTs adultas, já que são facilmente obtidas e também porque os estudos em modelos experimentais mostraram que as CTs adultas têm uma resposta terapêutica positiva no tratamento de algumas doenças, como diabetes e problemas cardíacos. Entre as CTs adultas que apresentam maior chance de uso terapêutico na regeneração tecidual se destacam as CTMs (DAI e KLONER, 2007; LEE et al., 2006; McNIECE, 2007; NOGUCHI, 2007).

### **1.3 Células tronco mesenquimais (CTMs)**

As CTMs possuem morfologia fibroblastoide e formato fusiforme, e vêm sendo descritas como componentes de diversos tipos teciduais, possuindo diferentes sítios de obtenção (KORBLING e ESTROV, 2003; WAGERS e WEISSMAN, 2004). Estas células são multipotentes e apesar de possuir menor capacidade de diferenciação comparada às CTs embrionárias, quando estimuladas, podem se diferenciar em diferentes tipos celulares, como células osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, neurogênicas e cardiogênicas (AMADO et al., 2005; ANISIMOY et al., 2007; DE GEMMIS et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2006; KULTERER et al., 2007; PARK et al., 2006). Além disso, torna-se mais viável a utilização de tais células devido a maior facilidade de obtenção e pelas questões de manutenção em cultura celular (BOBIS et al., 2006).

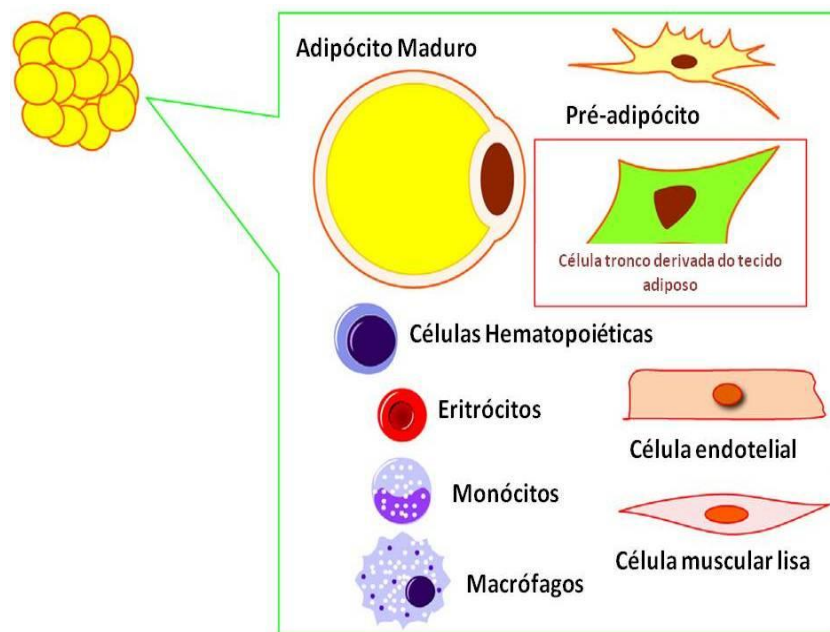
Embora as CTMs não sejam imortais, estas possuem uma considerável capacidade de expansão em condições *in vitro*, sustentando seu potencial de crescimento e multipotencialidade, favorecendo a aplicabilidade da cultura celular (BYDLOWSKI et al., 2009).

Tais células podem ser adquiridas através da medula óssea, líquido amniótico, tecido adiposo, tecido de polpa dentária, dentre outros, fornecendo suporte estrutural e regulando a passagem de células. Os avanços nos estudos e pesquisas deste tipo de célula têm conduzido a novas formas de tratamento para diversas doenças, visando à regeneração de tecidos lesionados, caracterizando a chamada medicina regenerativa (BAKSH et al., 2004; BIANCO

et al., 2008; CABRAL et al., 2008; CHOI et al., 2012; ESTRELA et al., 2011 VALLONE et al., 2013).

Além disso, Helmy e colaboradores (2010) relataram o uso de CTMs para a terapia de outras doenças como, desordens da musculatura esquelética, doenças inflamatórias, problemas hepáticos e outras doenças, demonstrando a aplicabilidade deste tipo de célula na prática clínica e a necessidade de maiores estudos científicos neste ramo.

Um tipo de CTM são as CTs derivadas do tecido adiposo (ASCs, do inglês adipose-derived stem cells), as quais são isoladas do tecido via processos de digestão enzimática e centrifugações (figura 1) e possuem as mesmas características de CTMs oriundas da medula óssea (HALVORSEN et al., 2000; ZUH et al., 2001), considerando as propriedades definidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, que incluem: a) capacidade de aderência nos frascos próprios de cultivo de células; b) característica de multipotencialidade de diferenciação; c) positividade para os receptores de membrana CD73, CD90 e CD105 d) negatividade para os receptores de membrana CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

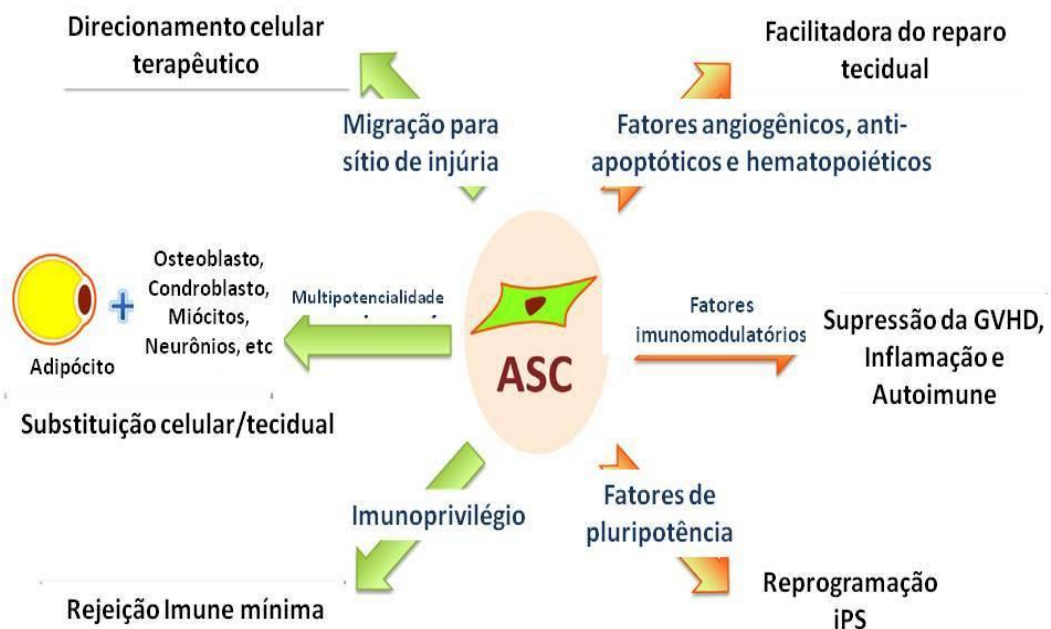


**Figura 1:** Heterogeneidade do tecido adiposo humano que apresenta na sua composição adipócitos maduros, pré-adipócitos, células do sistema imunológico, eritrócitos, células endoteliais e musculares e ASCs.

Fonte: adaptado de Ong e Sugi (2013).



As ASCs são células parecidas com as CTMs, que além de possuírem a capacidade de se diferenciar nas mesmas linhagens em que as CTMs são capazes, também podem ser tornar, quanto estimuladas *in vitro*, em cardiomiócitos, células musculares lisas e esqueléticas, neurônios, células epiteliais e endoteliais. Além disso, tais células são ditas imunoprivilegiadas, já que expressam o complexo MHC-II e são imunomodulatórias diminuindo a resposta imunológica inflamatória. Essas células também são capazes de secretar fatores que promovem a reparação de tecidos lesionados e de autorrenovação, como ilustrado na figura 2 (BAER e GEIGER, 2012; LINDROOS et al., 2011).



**Figura 2:** propriedades biológicas e terapêuticas das ASCs. Fonte: adaptado de Ong e Sugi (2013).

Entretanto, apesar de serem de fácil cultivo e indução de diferenciação, existem muitas questões em aberto a serem respondidas antes que as CTMs, assim como ASCs, possam ser efetivamente utilizadas na clínica médica. Isto porque, além da eficácia, um dado procedimento terapêutico também necessita ser seguro. Deste modo, é importante avaliar o comportamento destas células em situação de estresse, como é o caso do estresse oxidativo.

#### 1.4 Células tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs) e senescência

Até o início da década de 60 não se sabia se as células corporais poderiam viver indefinidamente. Os estudos com fibroblastos de frango realizados em cultura celular mostraram que as células envelheciam na medida em que perdiam a sua capacidade proliferativa. Este fenômeno ficou conhecido como senescência celular (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961). No organismo, as células quando envelhecem e perdem a sua capacidade proliferativa diminuem o seu metabolismo e função e podem se manter neste estado por um tempo relativamente longo, conforme o tipo celular. Na fase final, as células podem então ser eliminadas do corpo através de duas maneiras: ou a própria célula induz sua morte de modo controlado, fenômeno este conhecido como “apoptose”, ou elas são fagocitadas pelos macrófagos (KUILMAN et al., 2010).

Como o próprio nome faz referência, proveniente do latim *senex*, a senescência celular está vinculada ao envelhecimento celular e pode ser classificada em três fases, as quais: I) fase de pouca proliferação que antecede a primeira passagem; II) rápida proliferação celular; III) fase em que a proliferação passa a diminuir até uma parada completa (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961; HAYFLICK, 1965). Ao contrário das células saudáveis, as células de câncer não apresentam senescência bem como as CTs embrionárias. Entretanto, as CTs adultas, obtidas de órgãos humanos, não são imortais. Ou seja, existe uma limitação quanto a sua capacidade proliferativa (KUILMAN et al., 2010).

Uma vez que a senescência celular é um processo fisiológico que ocorre de forma a controlar a replicação celular, tal processo envolve o desenvolvimento de diversas mudanças citomorfológicas e também no material genético. Os telômeros são as porções finais da molécula de DNA que compõe cada cromossomo, e tem como função proteger o DNA codificador dos genes de agressões ou mesmo da incorporação de DNA estranho proveniente de outros organismos (KUILMAN et al., 2010).

A principal diferença do DNA telomérico para o restante da molécula de DNA, que contem os genes, é ser constituído por um DNA simples fita. Esta molécula de DNA telomérica é composta por 100 a 1000 repetições da sequência específica TTAGGG. Como a enzima DNA polimerase, só é capaz de fazer a replicação do DNA eucariótico dupla-fita, a molécula responsável pelo alongamento e a manutenção do telômero nas células embrionárias é a enzima telomerase. Entretanto, esta enzima é inibida na maior parte das células adultas

diferenciadas do organismo. Portanto, como a DNA polimerase não é capaz de copiar o trecho final do DNA linear telomérico, em cada divisão celular são perdidos aproximadamente 100 pares de base (pb) da região telomérica. Deste modo, o telômero vai sendo encurtado até chegar a um tamanho muito pequeno que serve como um sinalizador de inibição da divisão celular. Por este motivo, o encurtamento telomérico é considerado o “relógio mitótico” das células que desencadeia a sua senescência (HARLEY et al., 1990; BEN-PORATH e WEINBERG, 2005).

Diferente das células diferenciadas, as CTs que são encontradas no organismo adulto conseguem se autorreplicar e se manter indiferenciadas e não-senescentes ao longo da vida. Entretanto, este processo faz com que o número destas células seja bastante reduzido nos tecidos e órgãos. Quando existe a necessidade de reposição celular, ou mesmo regeneração em decorrência de alguma lesão ou doença, estas células são estimuladas a aumentar rapidamente a sua proliferação e a se diferenciarem na linhagem celular necessária. Uma vez diferenciadas, o relógio mitótico passa a contar e estas novas células começam a envelhecer como as demais já diferenciadas (KANYON e GERSON, 2007).

O conhecimento do modo fisiológico em que as CTs adultas regulam a sua manutenção ou a sua diferenciação passou a ser uma questão de grande relevância na ciência moderna. Isto porque a quantidade de CTs obtidas de um tecido doador geralmente é bastante reduzida. Deste modo, existe a necessidade de expansão destas células em condições laboratoriais, e da análise de indicadores da qualidade funcional das mesmas antes da ocorrência da sua transferência para o paciente (WAGNER et al., 2010).

Assim, apesar dos avanços relacionados à indução das CTs adultas a se diferenciarem, se for considerado, por exemplo, o uso de CTs nas cardiopatias, o sucesso na regeneração tecidual ainda é muito variável de paciente para paciente (DOPPLER et al., 2013). Um dos desafios a ser ultrapassado se relaciona ao fato de que, em condições *in vitro* as CTs indiferenciadas passam a apresentar uma senescência prematura que não é observada *in vivo*. Esta condição ocorre mesmo que as CTs não sejam estimuladas a se diferenciarem. Portanto, a senescência de CTMs, incluindo as ASCs, é um dos principais fatores que inviabiliza a utilização destas células como forma terapêutica na medicina regenerativa, pois para tal finalidade é necessária uma grande quantidade de células, o que obrigatoriamente faz com que o cultivo celular seja mantido por longos períodos de tempo, para a aquisição da confluência e do número de células ideal ao tratamento (WAGNER et al., 2010).

O envelhecimento das ASCs, assim como das demais CTs, caracteriza-se pela diminuição da capacidade de proliferação e diferenciação de tais células (PITTINGER et al.,

1999). Este problema é bastante complexo e de difícil resolução. Para tanto, os pesquisadores precisam entender que estímulos estão vinculados à modulação *in vitro* da proliferação, diferenciação e senescência das CTs. Neste sentido, o grande desafio contemporâneo é descobrir que fatores causais aceleram a senescência e como estes fatores podem ser modulados a fim de se obter células com alto poder regenerativo (WAGNER et al., 2010; KUILMAN et al., 2013).

Evidências apontam que, o metabolismo oxidativo possui um papel fundamental na regulação celular. Investigações sobre o tema sugerem que procedimentos inadequados de cultivo celular podem causar estresse celular, pois as células extraídas de um determinado organismo e passadas para o cultivo necessitam de adaptação ao ambiente artificial, bem como as condições nutritivas e de oxigenação. Este estresse no qual as células são submetidas pode induzir senescência prematura, inviabilizando os cultivos (SHERR e DEPINHO, 2000).

### **1.5 Metabolismo Oxidativo: papel na proliferação, diferenciação e senescência das CTs**

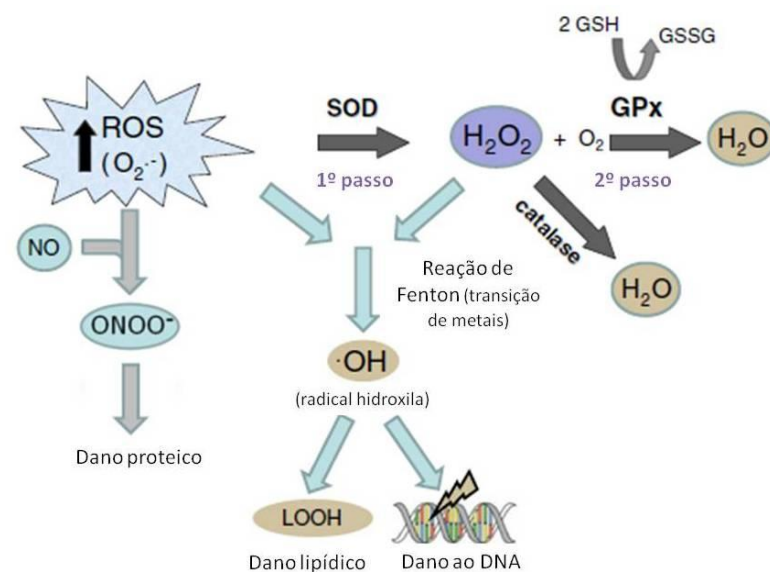
Por muito tempo se acreditou que processos oxidativos nas células eram negativos e deviam ser evitados através dos sistemas antioxidantes endógeno e exógeno. Entretanto, ao longo dos últimos anos esta concepção foi modificada, sendo observado os papéis do metabolismo oxidativo em processos naturais do organismo (CHIU e DAWES, 2012). Muitos dos processos que envolvem biomoléculas no organismo são dependentes de oxigênio, fazendo com que o estado de oxidação seja fundamental para a manutenção da homeostase, o que conduz a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (WALLACE, 1999). Dentre estes, podem ser citados o anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), entre outros (HAN et al., 2001; PIERRE et al., 2002).

A produção destas moléculas ocorre, porque em termos bioquímicos, o metabolismo oxidativo é um processo contínuo no organismo aeróbio principalmente em nível mitocondrial, mais especificamente na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), relacionada a produção energética, através da geração de adenosina-trifosfato (ATP), via fosforilação oxidativa (KOURY et al., 2003). Entretanto, esta produção ocorre em uma situação fisiológica, que é regulada por um sistema antioxidante. Assim, o sistema antioxidante possui por função inibir a produção em excesso de EROS e, por conseguinte os

danos oxidativos. Estes são divididos em antioxidantes endógenos e antioxidantes exógenos, sendo estes últimos adquiridos principalmente pela dieta (KOURY et al., 2003).

Dentre os antioxidantes não-enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C), o qual inibe a ação dos LDL oxidado e protege contra a ação dos EROs, ácidos fenólicos, resveratrol, catequinas,  $\beta$ -caroteno (vitamina A), que protegem contra a lipoperoxidação e danos ao DNA,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), cobre (Cu), zinco (Zn), dentre outros (FITO et al., 2007; RODRIGO et al., 2007). Já quanto aos antioxidantes enzimáticos tem-se a superóxido dismutase (SOD) que faz a conversão do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , a catalase (CAT) que converte o  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ , e a glutatona peroxidase (GPx) a qual possui capacidade de reduzir o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (VICENT et al., 2007), como demonstrado na Figura 3.

Esta regulação do estado oxidativo da célula é muito importante uma vez que níveis baixos de EROs, como a  $H_2O_2$  e o óxido nítrico (NO) possuem um papel importante atuando como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação através da modulação de diversos tipos de genes (MORENO-SANCHEZ et al., 2007; SHAMI e MOREIRA, 2004; CHIU e DAWES, 2012). Entretanto, quando as EROs encontram-se em excesso e o sistema antioxidante enzimático e não enzimático não conseguem manter tal equilíbrio, se estabelece um fenômeno conhecido como estresse oxidativo que pode levar a danos as células e tecidos corporais (MAK e NEWTON, 2001; OBAYAN, 2004; SHAMI e MOREIRA, 2004).



**Figura 3:** Ação de enzimas antioxidantes e efeitos dos radicais livres.  
Fonte: adaptado de Rosenfeldt e colaboradores (2013).

O estresse oxidativo está envolvido em várias doenças crônicas não-transmissíveis, como por exemplo, a aterosclerose, a hipertensão, as doenças neurodegenerativas, o câncer e o diabetes *mellitus* tipo 2. Nesta última, por exemplo, os radicais livres em excesso influenciam de forma prejudicial na captação da glicose pelos tecidos musculares e adiposo, além de diminuir a secreção de insulina (BROWNLEE, 2001; GREEN et al., 2004; MADDUX et al., 2001; RUDICH et al., 1998).

Apesar das rotas metabólicas de controle do metabolismo oxidativo serem similares entre as células, a regulação deste metabolismo parece ser bastante diferenciada. Isto ocorre porque existem diferentes condições microambientais, incluindo componentes celulares e não celulares que modulam as células (ADAMS e SCADDEN, 2008; LAU et al., 2008; TROSKO e KANG, 2010). A indução da produção de EROS nas CTs é modulada por fatores de crescimento, estimulação de citocinas, mudanças no metabolismo do oxigênio ou produção energética, estado da célula e diferenciação. Na recente revisão feita por Urao e Ushio-Fukai (2013) sobre a regulação redox das CTs e células progenitoras da medula óssea vermelha, os autores enfatizam que a capacidade de diferenciação das CTs está intimamente associada aos níveis de  $H_2O_2$  das células. Na presença de altos níveis de EROs estas células apresentam grande capacidade de diferenciação, enquanto que em baixos níveis permanecem indiferenciadas e assim, mantem a sua capacidade de autorrenovação. Entretanto, se os níveis de EROs se elevam muito, como ocorre em algumas doenças e disfunções, ou mesmo ao longo do envelhecimento, esta condição pode criar um microambiente oxidativo-inflamatório persistente, que induz as CTs ao dano celular e a apoptose.

Com base nestes conhecimentos, a exposição controlada de EROs nas CTs está sendo utilizado como um potencial indutor da proliferação *in vitro* com finalidade terapêutica. Por exemplo, um estudo utilizando uma dosagem subletal de  $H_2O_2$  (200 $\mu$ M) observou um grande aumento na capacidade proliferativa destas células sugerindo que a exposição de CTs a um estado de estresse oxidativo agudo poderia ser uma ferramenta para expandir estas células na terapia regenerativa (ZHANG et al., 2012).

Teoricamente a adição de EROs para a expansão *in vitro* das CTs poderia reduzir os custos e aumentar a capacidade regenerativa das CTs. Entretanto, é preciso considerar que, esta indução não-fisiológica pode acarretar danos genômicos que potencialmente poderiam comprometer a qualidade das células produzidas. Além do mais, não se sabe se todas as CTs adultas possuem a mesma suscetibilidade e/ou resistência ao aumento abrupto dos níveis de EROs. Considerando este contexto se faz necessário determinar se o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  não poderiam causar senescência e genotoxicidade nas ASCs.

Outra questão em aberto é se a exposição aguda de ASCs senescentes a moléculas antioxidantes poderia reverter este fenótipo. Este é um aspecto que ainda foi muito pouco estudado, principalmente considerando o efeito de moléculas antioxidantes presentes em frutos e vegetais.

### 1.6 O guaraná como potencial modulador da senescência celular

A *Paullinia Cupana* (figura 4A), conhecido popularmente como guaraná. O fruto cresce no chamado guaranazeiro (figura 4B), que é uma espécie nativa da Amazônia brasileira, pertencente à família *Sapindaceae*. Popularmente lhe são atribuídas propriedades medicinais, estimulantes, energéticas e afrodisíacas. O Brasil é o único país que produz o fruto em escala comercial, com cerca de 4300 toneladas por ano (SEBRAE, 2012), o que tem garantido o consumo do fruto, sob a forma da semente em pó, no Brasil e em outros países como Estados Unidos, Itália, Espanha, Inglaterra, entre outros. Assim, o guaraná possui importância econômica para o país. Atualmente o guaraná é comercializado em várias formas, como em cápsulas gelatinosas, xaropes, bebidas energéticas, refrigerantes, entre outros (KUSKOSKI et al., 2005; SCHIMPL et al., 2013).



A



B

**Figura 4:** Imagens da *Paullinia cupana* (guaraná). (A) Frutos de guaraná. (B) Guaranazeiro com frutos de guaraná. Fonte: EMBRAPA (2013); AGROEVENTO (2013).

Referente à constituição química da *Paullinia cupana* pode-se citar a presença de alcaloides, como teofilina, cafeína, teobromina, bem como terpenos, flavonoides e amidas,

além de saponinas, gorduras, amido, colina e pigmentos. O guaraná é considerado o fruto mais rico em cafeína do mundo. Esta molécula bioativa apresenta-se em concentrações superiores cinco vezes maiores que o café e 30 vezes maior do que o cacau (ALBUQUERQUE, 1991; BYDLOWSKI et al., 1991; EDWARDS et al., 2005; ESPINOLA et al., 1997; HOWELL et al., 2005).

Evidências científicas descreveram diversas propriedades biológicas do guaraná, a partir de estudos *in vitro*, em modelos experimentais e em seres humanos incluindo atividade antioxidante, antiplaquetária, anti-inflamatória, energética, antitumoral, termogênica, antiobesogênica, hipolipídica e na modulação neuro-cognitiva, antibacteriana e antifúngica (SMITH e ATROCH, 2010 e SCHIMPL et al., 2013).

A ação antioxidante do guaraná está bastante relacionada à presença de compostos fenólicos que possuem o potencial de capturar EROs e outros radicais livres, assim prevenindo doenças degenerativas, coronarianas e até mesmo o câncer (RICHELLE et al., 2001; WATANABE et al., 2002). Além disso, foi evidenciado efeito protetor contra a peroxidação lipídica de células adiposas (BASILE et al., 2005). Segundo estudo de Majhenic e colaboradores (2007) como o guaraná também possui concentrações significativas de catequina, epigallocatequina e epigallocatequina galato, dosados em extratos dos frutos, estas moléculas podem estar contribuindo na ação antioxidante e antitumoral deste fruto, o que o torna de interesse farmacológico. Outros constituintes da composição química da *Paullinia cupana*, como teofilinas e teobrominas possuem ação imunomodulatória, efeito broncoprotetor e atividade anti-inflamatória (KUSKOSKI et al., 2005).

Um estudo epidemiológico realizado por Costa Krewer e colaboradores (2011) em idosos ribeirinhos do Amazonas descreveu que idosos que habitualmente consumiam guaraná apresentavam menor prevalência de algumas doenças crônicas associadas ao envelhecimento como hipertensão, diabetes, obesidade, dislipidemia e doenças cardiovasculares.

Com base nestas investigações, Bittencourt e colaboradores (2013) realizaram um estudo *in vitro* utilizando uma linhagem comercial de CTs obtidas a partir de fibroblastos (NIH-3T3). Neste estudo os autores realizaram uma exposição aguda das células ao nitroprussiato sódico, que produz uma grande concentração de óxido nítrico, e a diferentes concentrações de guaraná. O guaraná mostrou efeito protetor importante incluindo modulação diferencial das enzimas antioxidantes. Estes resultados subsidiam a hipótese que o guaraná poderia modular o metabolismo oxidativo das ASCs senescentes diminuindo ou até mesmo revertendo a senescência destas células quando cultivadas *in vitro*.



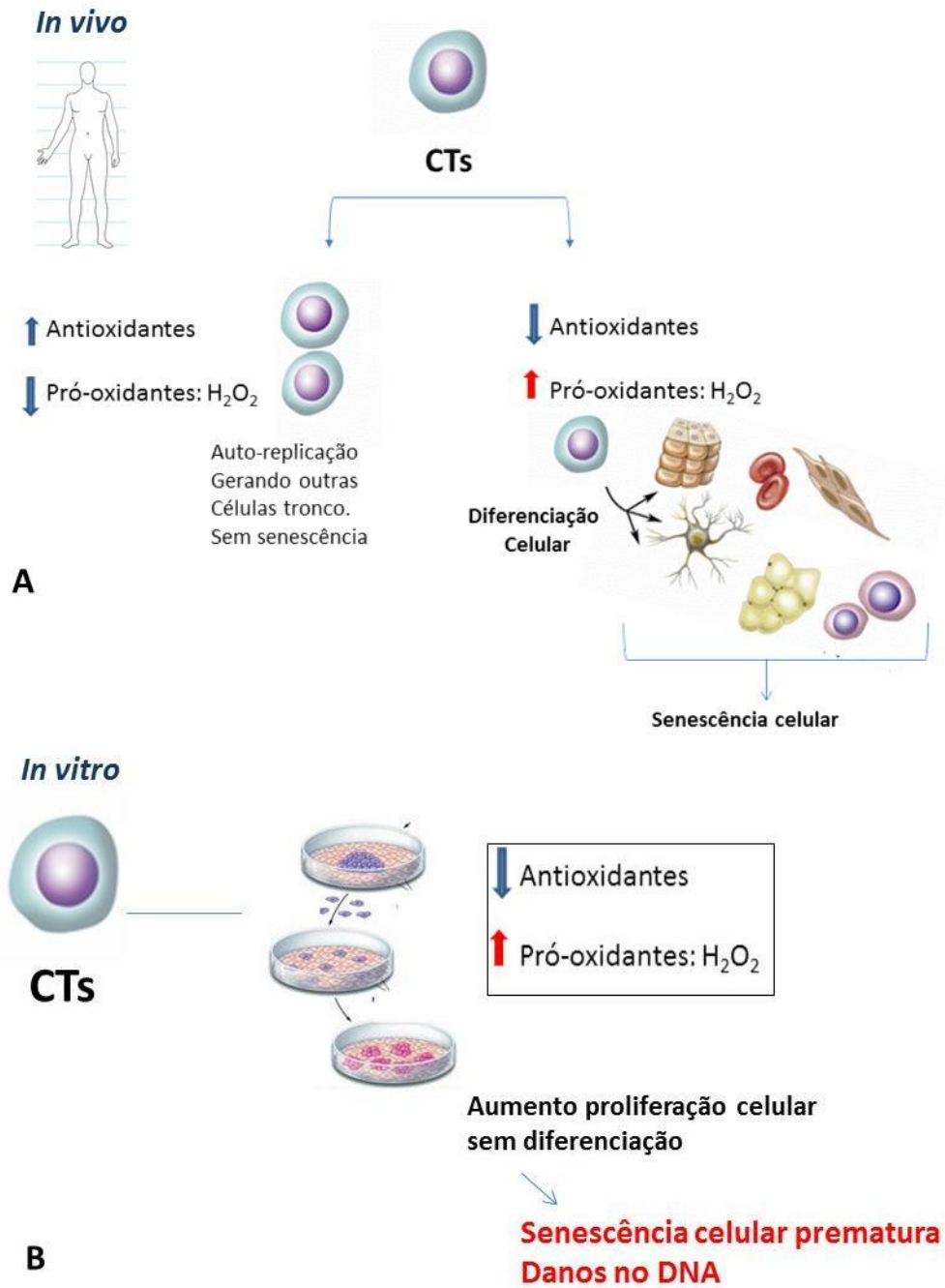
## 1.7 Justificativa

Diversas doenças crônicas e degenerativas vêm sendo alvo de pesquisas para aplicações clínicas com CTs a fim de para regenerar tecidos e órgãos, como uma forma de obtenção de benefícios mais eficazes. Tais patologias incluem a hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças neurodegenerativas e o câncer.

Como sintetizado na Figura 4, estudos sobre a biologia das CTs demonstraram que em condições *in vivo* estas células possuem capacidade de permanecer indiferenciadas e se renovar até serem estimuladas a diferenciação. Uma vez que ocorra este processo de diferenciação, a senescência celular também é estabelecida. As investigações sugerem que, o metabolismo oxidativo tem um papel fundamental neste processo. CTs indiferenciadas possuem baixos níveis de EROs e outros radicais livres enquanto que as CTs induzidas a diferenciação inicialmente proliferam via aumento dos níveis de EROs, em especial da  $H_2O_2$ . Entretanto, esta condição geral não é mantida quando as CTs são cultivadas *in vitro*. Em cultivo, estas células, ainda que não diferenciadas, entram em senescência replicativa o que é indesejável.

Com base no conhecimento de que na terapia regenerativa existe a necessidade do transplante de um grande número de CTs, alguns autores sugerem que a exposição aguda a  $H_2O_2$  pode ser um método de rápida expansão das células. Porém, é possível que tal exposição acelere a senescência celular e também cause efeitos de genotoxicidade. Estas duas situações contribuem muito para a diminuição da qualidade das células obtidas quanto ao seu potencial regenerativo também aumentando o risco de desenvolvimento de células tumorais.

Uma vez que ASCs obtidas de lipoaspirados humanos são células com grande potencial de uso clínico nas terapias regenerativas, o presente estudo buscou investigar a sensibilidade destas células a exposição aguda ao  $H_2O_2$  através da análise da viabilidade, de parâmetros do estresse oxidativo e da genotoxicidade. Além disso, considerando o estudo prévio de Bittencourt e colaboradores (2013) que sugeriram ser o guaraná um modulador do estresse oxidativo de CTs fibroblásticas, este estudo também avaliou se o guaraná poderia agir benéficamente em ASCs senescentes estimulando a sua proliferação e melhora no metabolismo oxidativo.



**Figura 4:** Esquema geral da biologia das células-tronco (CTs) adultas. (A) Em condições *in vivo* as células se autoduplicam e se mantêm em estado indiferenciado. A concentração destas células nos tecidos é bastante baixa. Quando estimuladas, principalmente em situações que ocorrem injúrias que aumentam o metabolismo oxidativo-inflamatório estas células proliferam rapidamente e se diferenciam. Uma vez diferenciadas o processo de senescência celular é estabelecido. (B) Em condições *in vitro* as células se proliferam mesmo estando indiferenciadas. Entretanto, elas passam a envelhecer. Na presença de níveis elevados de EROs como a  $H_2O_2$  pode ocorrer senescência celular prematura e danos no DNA.

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo Geral

Em células tronco mesenquimais adiposas (ASCs), obtidas a partir de lipoaspirados humanos, avaliar o efeito cito-genotóxico da exposição aguda ao peróxido de hidrogênio em células não senescentes e da exposição ao extrato hidroalcoólico de guaraná em células senescentes.

### 1.8.2 Objetivos Específicos

A partir de ASCs não senescentes isoladas de lipoaspirados humanos avaliar os efeitos da exposição aguda a diferentes concentração de  $H_2O_2$  na:

- Citotoxicidade;
- Ativação da via das caspases;
- Metabolismo oxidativo, incluindo balanço oxidativo geral e danos de lipoperoxidação;
- Genotoxicidade.

Determinar o padrão de senescência das ASCs em condições de cultivo *in vitro* através da análise da taxa de proliferação celular;

Determinar o efeito do extrato hidroalcoólico do guaraná em ASCs senescentes através da análise da:

- Modificação da proliferação celular;
- Modulação de indicadores de estresse oxidativo (lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e genotoxicidade);
- Modulação da atividade e da expressão gênica das enzimas antioxidantes.

## 2 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão organizados sob a forma de dois manuscritos científicos. O primeiro contempla a análise do efeito agudo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas ASCs não senescentes e o segundo contempla a determinação do padrão de senescência das ASCs e o efeito do guaraná sobre este fenômeno.

### **Manuscrito 1**

**Título:** Human adipose-derived stem cells obtained from lipoaspirates are highly cytogenotoxic susceptible to hydrogen peroxide.

**Autores:** Alencar Kolinski Machado, Francine Carla Cadoná, Sabrina Guastavino Homrich, Cíntia Corte Real Rodrigues, Verônica Farina Azzolin, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, José Raul Pinto Saldanha, Luana Lenz, Thais Doeler Algarve, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.

Elsevier Editorial System(tm) for Mutation Research/Fundamental and Molecular  
Mechanisms of Mutagenesis  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Human adipose-derived stem cells obtained from lipoaspirates are highly cytogenotoxic  
susceptible to hydrogen peroxide

Article Type: Research Paper

Keywords: adults stem cells; genotoxicity; oxidative stress; lipoaspirates; cytotoxicity

Corresponding Author: Prof. Ivana Beatrice mânica da Cruz, MSc, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: ALENCAR K MACHADO, DR

Order of Authors: ALENCAR K MACHADO, DR; FRANCINE C CADONÁ, DR; SABRINA G HOMRICH,  
MRS; CÍNTIA R RODRIGUES, MSC; VERONICA F AZZOLIN, MSC; MARTA M DUARTE, PhD; JOSÉ R  
SALDANHA, MD; LUANA LENZ, MRS; THAIS D ALGARVE, DR; Ivana Beatrice mânica da Cruz, MSc,  
PhD

Abstract: Some evidences suggested that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can induce the proliferation, migration, and regenerative potential on adult mesenchymal stem cells, as well as on adipose-derived stem cells (ASCs). That could be useful to ASCs expansion in the therapeutic applications. However, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could cause premature senescence, in addition to DNA damage predisposing the cells to malignant transformation. Therefore, the present study evaluated the acute cytotoxic, oxidative and genotoxic effects of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on ASCs obtained from human lipoaspirates. After the lipoaspirate ASCs were obtained, isolated and cultured, these cells were treated with concentration by 1-1000 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during two hours. The cell viability was evaluated by cell culture-free doublestrand (ds) DNA determination using DNA@picogreen dye; apoptosis induction was analyzed from immunoassay measure of caspases 1, 3 and 8 levels; the analysis of oxidative stress in biochemical markers as well as the genotoxic effect by DNA Comet assay were also performed. All concentrations increased the cell mortality occurring 100% of mortality at > 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The levels of 1, 3 8 caspases, ROS, lipoperoxidation increased in a dose-dependent way in cells treated with < 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The catalase levels also increased approximately 50% in cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared to the control group. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations > 10 µM were genotoxic when compared to control group. The results suggest that ASCs obtained from processed human lipoaspirates are highly sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition and the survived cells might present important DNA damage that could affect its proliferative and differentiation capacity.

Suggested Reviewers: ELENA BUROVA

lenbur87@mail.ru

Expertise in stem cells

N TAVERNARAKIS

tavernarakis@imbb.forth.gr

Expertise in stem cells

K FROELICH

froelich\_k@klinik.uni-wuerzburg.de

Expertise in DNA mutation

BM MOONEY

bm0675@albany.edu

# Human adipose-derived stem cells obtained from lipoaspirates are highly cytogenotoxic susceptible to hydrogen peroxide

Alencar Kolinski Machado<sup>a,c</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>b,c</sup>, Sabrina Guastavino Homrich<sup>c</sup>, Cíntia Corte Real Rodrigues<sup>c</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>c</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>c</sup>, José Raul Pinto Saldanha<sup>c</sup>, Luana Lenz<sup>c</sup>, Thais Doeler Algarve,<sup>c</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Post-graduation program of Pharmacology, Center of Health Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>b</sup> Post-graduation program of Biological Science: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>c</sup> Biogenomic Laboratory, Morphology Department, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil, Zip Code: 97105900. Phone: 55-55-32208163, E-mail: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

## Abstract

Some evidences suggested that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can induce the proliferation, migration, and regenerative potential on adult mesenchymal stem cells, as well as on adipose-derived stem cells (ASCs). That could be useful to ASCs expansion in the therapeutic applications. However, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could cause premature senescence, in addition to DNA damage predisposing the cells to malignant transformation. Therefore, the present study evaluated the acute cytotoxic, oxidative and genotoxic effects of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on ASCs obtained from human lipoaspirates. After the lipoaspirate ASCs were obtained, isolated and cultured, these cells were treated with concentration by 1-1000 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during two hours. The cell viability was evaluated by cell culture-free double-strand (ds) DNA determination using DNA@picogreen dye; apoptosis induction was analyzed from immunoassay measure of caspases 1, 3 and 8 levels; the analysis of oxidative stress in biochemical markers as well as the genotoxic effect by DNA Comet assay were also performed. All concentrations increased the cell mortality occurring 100% of mortality at  $\geq 200$  µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The levels of 1, 3 and 8 caspases, ROS, lipoperoxidation increased in a dose-dependent way in cells treated with  $\leq 200$  µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The catalase levels also increased approximately 50% in cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared to the control group. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations  $\geq 10$  µM were genotoxic when compared to control group. The results suggest that ASCs obtained from processed human lipoaspirates are highly sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition and the survived cells might present important DNA damage that could affect its proliferative and differentiation capacity.

**Key-word:** adults stem cells; genotoxicity; oxidative stress; lipoaspirates; cytotoxicity.

## 1 Introduction

The embryogenesis is triggered by the differentiation of stem cells into several body tissues. However, during all life, the body also maintains, special cells that have self-renew capacity as well as potential to proliferate and differentiate in specialized cells to replace tissues with a high rate of replacement or to regenerate damaged areas. Most cells are originated of mesenchymal strome named adult mesenchymal stem cells (MSCs) [1].

Some tissues, as processed lipoaspirates, present cells with great similarity to MSCs including the capacity to differentiate into bone, fat, muscle, cartilage cells, cardiomyocytes, periodontal tissue, neurogenic, endothelial, and other lineage pathways. These cells are identified as a type of adipose-derived stem cells or ASCs [2]. So, the potential ASCs differentiation to multi-lineage becomes these cells potentially useful for tissue and cell replacement therapy [3].

However, despite the large quantity of lipoaspirates ASCs, the achievement of adequate cell concentration is necessary, using *in vitro* expansion of these cells. Previous evidences have suggested that reactive oxygen species (ROS) at low levels may play a pivotal role as second messengers and they can also induce the proliferation, migration, and regenerative potential of ASCs [4,5].

Theoretically, the addition of a ROS donor may reduce the costs for the expansion of ASCs in culture, while ROS preconditioning may potentially enhance the regenerative capacity of ASCs in clinical application. Then, if ROS is harmful or beneficial to ASCs is primarily an issue of dosage.

Additional studies also showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preconditioning treatment is able to enhance the therapeutic efficacy of some stem cells in regenerative processes as described in Zhang et al [6] in a study that used the Wharton's Jelly mesenchymal cells in the neovascularization of mice with an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> myocardial infarction at 200 µM concentration [6]. Robaszkiewicz et al [7] described the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the induction of MSCs osteogenic programs. The exposition presented procalcifying effect and inhibitory regulation of the general antioxidant enzymes, catalase and GPX. In this process, it increased the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caused by upregulation of NADPH oxidases enzymes.



However, differently from embryonic cells, adult MSCs exhibit limited proliferative potential *in vitro*, the so-called Hayflick limit, and studies described that those high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can induce this senescence process. This is the case of the investigation performed by Burova et al [8] that exposed endometrium-derived mesenchymal stem cells (hMESC) to 200 and 900 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As a consequence, the survived cells lost irreversibly their proliferative capacity.

Other limiting factor in the use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to MSCs induction is related to potential genotoxic effect of high levels of ROS in these cells. This fact can be considered as a potential contraindication for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> therapeutic applications in human procedures. Even though there are no studies about the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in genotoxic response of MSCs, this type of study is relevant because it is necessary to consider not only the efficacy of a treatment, but also its security especially when dealing with the use of ROS. Therefore, the present study developed *in vitro* protocol in order to test the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentrations on acute cito-genotoxicity and oxidative stress using ASCs obtained from human lipoaspirates.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Isolation and stem cells culture**

Human adipose tissue was collected from patients who were undergoing elective liposuction surgery at the Unimed Hospital (Santa Maria, RS, Brazil). The protocol were reviewed and approved by the Federal University of Santa Maria Ethics Committee Board (23081.015838/2011-10). The tissue was collected from three female patients aged from 30 to 55, with an average age of 45±7. ASCs were isolated following the protocol described by Buehrer and Cheatham [9]. Briefly, the lipoaspirate was initially washed three times with PBS buffer (pH 7.4) to eliminate blood cells and, after that, it was digested for 20 min in 0.075% collagenase I at 37 °C. The resulting suspension was centrifuged at 2000 rpm to obtain an ASC-rich pellet. The new cell pellet was resuspended in growth media (DMEM/F12 plus 10%

Fetal Bovine Serum, 100 I.U. penicillin, and 100µg/mL streptomycin) and it was passed through a 40µm cell strainer. The remaining cells were plated on standard tissue made of culture plastic and they stayed overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, the non-adherent cells were removed with two rinses with 1× PBS, and then serially passaged at 70% confluence. Growth media was changed every 3–4 days. At the fourth passage cell, waste of blood and fat were no longer present, and present only ASCs, which remained adhered to the bottle (Figure 1).

Figure 1 here

## 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition

The ASCs were treated similar to what described in Zhang et al [6], however using eight H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (1-1000 µM). The samples were treated in 96-well plates (2.5X10<sup>5</sup> cells/mL in each well). After incubation, the samples were centrifuged for 10 min at 2000 rpm, the supernatant were isolated and the cells were suspended in DMEM culture medium to procedure all analysis.

Since the ASCs were exposed to high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations that cause acute toxicity, the cell viability were evaluated by cell culture-free double-strand (ds) DNA determination. In addition, it was analyzed apoptosis induction from measure of caspases 1, 3 and 8 levels, biochemical markers of oxidative stress as well as the genotoxic effect using DNA Comet assay. All biochemistry assays were measured using SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader; Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA, USA) equipment. All results obtained from these analyses were expressed as percentage of dsDNA in relation to untreated control samples.

## 2.3 Cell culture-free dsDNA assay

To evaluate the acute H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxic effect on ASCs, the presence of dsDNA in supernatant was determined, using Quant-IT™ PicoGreen® ds DNA kit (Invitrogen

- Life Technologies) as manufactures instructions. When the cell dies, the membrane is disrupted and dsDNA fractions are released into the extracellular medium. The DNA PicoGreen® dye presents high affinity with the dsDNA and is able to quantify the dsDNA released. In relation to the dsDNA, it was measured by using 50µL of the sample and 50µL of the DNA Picogreen® dissolved in TE buffer, 1X (1:1; v.v), following the incubation by 5 minutes in dark room. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm recorded at room temperature.

## **2.4 Caspases Determination**

The levels of caspases 1, 3 and 8 of ASCs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were determined by ELISA immunoassay and using Quantikine Human Caspase Immunoassay® kit and following the manufactures instructions.

## **2.5 ROS quantification Dichlorofluorescein diacetate assay**

The reactive species oxygen (ROS) into the cells was determined by using dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA) as described in Ahn et al [10]. In this assay, DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent DFF by cellular oxidants. To perform the measure, the sample cells were treated with DCFDA (10µM) for 60 min at 37°C and the fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm.

## **2.6 Biochemical oxidative markers assays**

The lipid peroxidation was performed by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described in Ohkawa et al [11].

Total blood SOD (E.C.1.14.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to Boveris and Cadenas [12]. One unity of activity is defined according to the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50%. Catalase activity (EC 1.11.1.6) was determined according to Aebi [13]. One unit of catalase activity was defined as the activity required degrading 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 60s.

## **2.7 The alkaline single cell gel electrophoresis assay**

To detect the DNA damage, we performed the well-known comet assay, first conducted as Singh et al [14] with modifications from Nadin et al [15]. Such samples were placed on slides containing low melting agarose and, after that, they were submitted to cellular lysis, for each sample two slides were prepared. Then, electrophoresis was performed, as well as the staining with silver nitrate. After all the process, 50 cells were read by two analysts considering that the larger the size of the DNA drag is, the larger the increase cell damage gets. Thus, the damage index was calculated from the equation:  $x.(n^0)+x.(n^1)+x.(n^2)+x.(n^3)+x.(n^4)$ .

## **2.8 Cell morphology evaluation**

The analysis of ASCs morphology after  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposition was evaluated by optical microscopic visualization. The sample were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes and the cell pellet were suspended in fixative solution (ethanol: methanol, 1:1, v:v). Then, the material was transferred to microscope slides and after drying, using Giemsa dye, the cells of each treatment were microscopically analyzed at 40X magnification.

## **2.9 Statistical Analysis**

The results among treatments were compared by one way, ANOVA analysis of variance, followed by *post hoc* Tukey test using Graphpad Prism 5 software. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The  $p \leq 0.05$  were considered significant.

### 3 Results

The acute effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition on ASCs viability was investigated and the results are presented in Figure 2. After two hours of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition, all concentrations increased the cell mortality when compared to the untreated control group. At 1-10  $\mu$ M 29.7 $\pm$  9.3% of cells died, whereas cells exposed at 30-100  $\mu$ M the mortality increased to 52.9  $\pm$  8.4%. In the present study, 91.1 $\pm$  13.3% ASCs cells exposed to 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> died when compared to control group, occurring 100% of mortality in concentrations > 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Figure 2 here

The 1, 3 and 8 caspase levels were quantified as an indication of triggering of cellular apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A significant increase in these proteins was observed in the cells which were exposed to all H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations when compared to the untreated control group. The increase in caspases levels tended to be concentration-dependent (Figure 3).

Figure 3 here

As expected the ROS and TBARS levels increased in a dose-dependent way when the cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 1). The catalase levels also increased approximately 50% in the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared to the control group. However, this effect was not dose-dependent. The cells exposed to 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

presented an intense SOD total activity. Nevertheless, this activity decreased from  $\geq 3 \mu\text{M}$  concentrations, mainly in 10, 30 and 100  $\mu\text{M}$ .

Table 1 here

Cells exposed to  $\geq 200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations presented high level of membrane disruption and loss of cytoplasmic prolongations that are characteristic of mesenchymal like-cells as ASCs. Many cells wilted indicating loss of water into the extracellular medium (Figures 3 A, B).

In lower  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations ( $< 3 \mu\text{M}$ ) was not detected genotoxic effect when compared to the untreated control group. However, this result was completely altered in concentrations  $\geq 10 \mu\text{M}$  (Figure 4). In the higher concentrations the damage index increased about 30% when compared to the control group. The frequency of nucleus cell without damage in untreated group was estimated to be 55.76%. This value decreased to 36.5% at 1  $\mu\text{M}$  and 24.8% at 3  $\mu\text{M}$ . From 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration the frequency of cells with no DNA (damage 0) was 19.5% of analyzed sample.

Figure 4 here

## 4 Discussion

The present study evaluated the effect of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations on cito- and genotoxicity of ASCs obtained from human processed lipoaspirates. Cells exposed to  $\geq 200 \mu\text{M}$  concentration showed higher mortality, whereas cells exposed to  $\geq 10 \mu\text{M}$  concentrations showed increase mortality as well as DNA damage indicating genotoxicity. Extensive occurrence of DNA damage was observed in approximately 80% of cells exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  doses which were tested in this study. The oxidative stress caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposition in the concentrations here analyzed was also confirmed from analysis of biochemical markers (Table 1). In addition, the acute cytotoxic effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , survived cells also presented increase in caspases 1, 3 and 8 that indicate the future occurrence of apoptosis.

When occurred genotoxic effects leading to DNA double-strand breaks, differentiate cells activate, at least, three DNA damage response programs in order to preserve the genome integrity and prevent malignant transformation: DNA repair, apoptosis or senescence. On the other hand, recent studies in normal and cancer precursor, or stem cells, have suggested that cell stress with genotoxic effect are able to induce differentiation processes [16].

The evidence of the ROS as  $H_2O_2$  are able to induce MSCs differentiation opened the possibility to use these molecules in protocols applied to clinical therapies. However, the ROS dosage used to induce cellular differentiation programs is a central issue that needs to be determined by each SC type [4]. Until recent years,  $H_2O_2$  was considered a destructive ROS molecule. This view changed when several studies observed  $H_2O_2$  capacity to act as cell signaling, mainly through oxidation of specific target molecules [17-19][5].

Therefore, the increase in the ROS levels has being described as a key inducer of MSCs proliferation and differentiation, which are important steps to regeneration of tissues and organs [1]. Previous studies demonstrated that in low level of endogenous  $H_2O_2$ , the MSCs remain in a quiescent state, while exposed to a higher level of  $H_2O_2$  occur induction of cell growing and the differentiation state that includes senescence processes, leading to a premature exhaustion of self-renewal in these cells [20, 5]. Furthermore, in high concentrations these oxidation processes may lead to irreversible damage, followed by cell death [21], as well as to cellular senescence [8].

However, citotoxicity and DNA damage produced by  $H_2O_2$  exposition are more or less intense according to type of cell line [22]. It seems like that ASCs from human processed lipoaspirates are very sensitive to  $H_2O_2$ . The present study showed that  $H_2O_2$  exposition causes acute cito- and genotoxicity in ASCs occurred from 10  $\mu M$  concentration. This minimal  $H_2O_2$  dose is 20 times less concentrated than the one used by Zhang et al [6] to stimulate the SCs proliferation and differentiation of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells. Unfortunately, comparative studies to evaluate the effect of  $H_2O_2$  in different MSCs and ASCs in similar experimental conditions were not performed, yet. That is probably explained by the difficulty to obtain these cells at the same time and at the same sample of subjects.

All the results published in the literature, as described in the present investigation, suggest which survival cells obtained from high  $H_2O_2$  exposition can

present an oxidative stress resistance and can have a poor genome quality. This condition is similar to observed in cancer cells and it can be related to some situations which SCs can be involved in tumors development and not differentiate tissues as expected [23]. In general, cancer cells exhibit an accelerated metabolism, demanding high ROS concentrations to maintain their high proliferation rate [24].

In this regard, and considering the results already described, the genotoxic stress-induced by  $H_2O_2$ , even though it is a potential co-activator of cellular differentiation programs, it can also produce differentiated cells with deleterious or impairment genetic alterations. Consequently, these genetic alterations may compromise the expected regenerative results of cells oxidative stress-induced. Unfortunately, the number of studies involving analysis of  $H_2O_2$  genotoxic effect on MSCs is still low. Therefore, we suggest that studies involving use of  $H_2O_2$ , as potential differentiation inducer, also include concomitant protocols to evaluate the DNA damage effect on survived cells, mainly considering ASCs obtained from processed human lipoaspirates.

## **5 Conclusions**

The results obtained here suggest that ASCs obtained from processed human lipoaspirates are highly sensitive to  $H_2O_2$  exposition and the number of healthy ASCs  $H_2O_2$ -induced, which could be potentially used in the regenerative processes, is very low. In addition, the survived cells may present important DNA damage that could affect its proliferative and differentiation capacity.

## **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that there were no conflicts of interest.



## Acknowledgements

The authors thank Taís Cristina Unfer, Tiago Luis Eilers Treichel and Jaime Sarda Aramburú Jr for technical support in biochemical analysis and ASC cell isolation. This research was supported by grants and fellowships from Brazilian governmental funds: CNPq, FAPERGS and CAPES.

## References

- [1] V.B. Fernández Vallone, M.A. Romaniuk, H. Choi, V. Labovsky, J. Otaegui, N.A. Chasseing. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? *Differentiation* 85 (2013) 1-2.
- [2] W.K. Ong, S. Sugii. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45 (2013) 1083-1086.
- [3] B. Lindroos, R. Suuronen, S. Miettinen. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews* 7 (2011) 269–291.
- [4] S.G. Park, J. Kim, Y. Xia, J. Sung. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: Friend or Foe? *NHI Public Access* 15 (2011) 1297-1306.
- [5] N. Urao, M. Ushio-Fukai. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med* 54 (2013) 26-39.
- [6] J. Zhang, G. Chen, Y. Wang, J. Zhao, H. Duan, L. Liao, X. Zhang, Y. Chen, H. Chen. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton’s Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin. Med. J* 125 (2012) 3472-3478.
- [7] A. Robaszkiewicz, K. Erdélyi, K. Kovács, I. Kovács, P. Bai, É. Rajnavolgyi, L. Virág. Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free Radical Biology and Medicine*. 53 (2012) 1552-1564.
- [8] E. Burova, A. Borodkina, A. Shatrova, N. Nikolsky. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 1-12.

- [9] B.M. Buehrer, B. Cheatham. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cells for use in tissue engineering. *Methods Mol Biol* 1001 (2013) 1-11.
- [10] S.J. Ahn, J. Costa, J.R Emanuel. PicoGreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post-PCR. *Nucleic Acids Research* 24 (1996) 2623-2625.
- [11] H. Ohkawa, H. Ohishi, K. Yagi. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 95 (1979) 351–358.
- [12] A. Boveris, E. Cadenas. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch, L., Massaro, d. (Eds.), *Oxygen, Gene Expression and Cellular Function* 105 (1997) 1-25.
- [13] H. Aebi. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105 (1984) 121-127.
- [14] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 175 (1988) 184-191.
- [15] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, D.R.A. Ciocca. Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49 (2001) 1183-1186.
- [16] M.H. Sherman, C.H. Bassing, M.A. Teitell, Regulation of cell differentiation by the DNA damage responde. *Trends Cel Biol* 21 (2011) 312-319.
- [17] C.N. Weiss, K. Ito. DNA damage response, redox status and hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 52 (2014) 12-18.
- [18] K. Naka, T. Muraguchi, T. Hoshii, A. Hirao. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 10 (2008) 1883-1894.
- [19] J.L. Sardina, G. Lopez-Ruano, B. Sanchez-Sanchez, M. Llanillo, A. Hernández-Hernández. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 81 (2012) 257–274.

- [20] Y.Y. Jang, S.J. Sharkis. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 110 (2007) 3056-3063.
- [21] G. Groeger, C. Quiney, T.G. Cotter. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 2655-2671.
- [22] P. Chaudhari, Z. Ye, Y.Y. Jang. Roles of Reactive Oxygen Species in the Fate of Stem Cells. *Antioxid Redox Signal* 19 (2012).
- [23] B.M. Mooney, N.A. Raof, Y. Li, Y. Xie, Convergent mechanisms in pluripotent stem cells and cancer: implications for stem cell engineering. *Biotechnol J* 8 (2013) 408-419.
- [24] V. Sosa, T. Moliné, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh, M.E. Lleonart. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12 (2013) 376-390.

## Figure Legends

**Figure 1** Adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates at 400X of magnification. (A) ASCs and waste drop fat (dp) are observed in the processed lipoaspirates samples; (B) ASCs monolayer adherent cells with morphology similar to fibroblasts.

**Figure 2** Citotoxicity of Adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates treated to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition concentrations. (A) Living cell morphology modification analyzed by optic microscopy (x 400 magnification); (B) Cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showing nucleus fragmented and membrane blebbing; (C) Cell mortality estimated from culture cell-free dsDNA assay by fluorimetric analysis with DNA®Picogreen dye. Data are presented as % of untreated control group. Different letters indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

**Figure 3** Caspases levels of adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates treated to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition concentrations. (A) Caspase 1; (B) Caspase 3, (C) Caspase 8. Different letters indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

**Figure 4** DNA damage index of adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from human lipoaspirates treated to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition concentrations determined by DNA Comet Assay (from 0 when all cells with no migration to 400 cells with maximal migration). Different letters indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

**Table 1** Oxidative metabolism parameters of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) obtained from human lipoaspirates exposed to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Concentration ( $\mu$ M)						
	0	1	3	10	30	100	200
ROS	100.3 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	106.0 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	108.8 $\pm$ 11.9 <sup>b</sup>	166.8 $\pm$ 23.5 <sup>c</sup>	165.1 $\pm$ 22.0 <sup>c</sup>	185.8 $\pm$ 31.3 <sup>d</sup>	368.3 $\pm$ 11.1 <sup>e</sup>
TBARS	100.4 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	305.4 $\pm$ 18.0 <sup>b</sup>	656.3 $\pm$ 40.7 <sup>c</sup>	776.3 $\pm$ 40.7 <sup>d</sup>	838.2 $\pm$ 28.6 <sup>e</sup>	915.0 $\pm$ 90.6 <sup>f</sup>	1823.0 $\pm$ 35.2 <sup>g</sup>
CAT	100.1 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	152.3 $\pm$ 11.5 <sup>b</sup>	151.5 $\pm$ 10.5 <sup>b</sup>	154.1 $\pm$ 8.8 <sup>b</sup>	159.3 $\pm$ 10.8 <sup>b</sup>	156.3 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>	156.3 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
SOD	100.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	211.7 $\pm$ 25.8 <sup>b</sup>	89.9 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	22.1 $\pm$ 3.5 <sup>d</sup>	24.9 $\pm$ 2.8 <sup>d</sup>	30.5 $\pm$ 6.3 <sup>d</sup>	34.12 $\pm$ 4.6 <sup>d</sup>

Data are presented as percent of control group; ROS= reactive oxygen species determined by DCFH-DA assay; CAT = catalase; SOD= superoxide dismutase. Different letters indicate statistics significant differences using oneway analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test at  $p \leq 0.05$ .

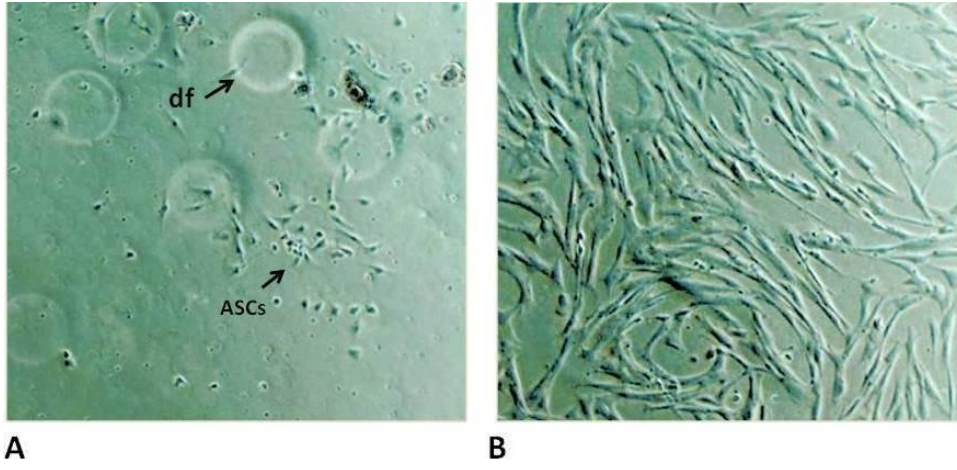


Fig 1

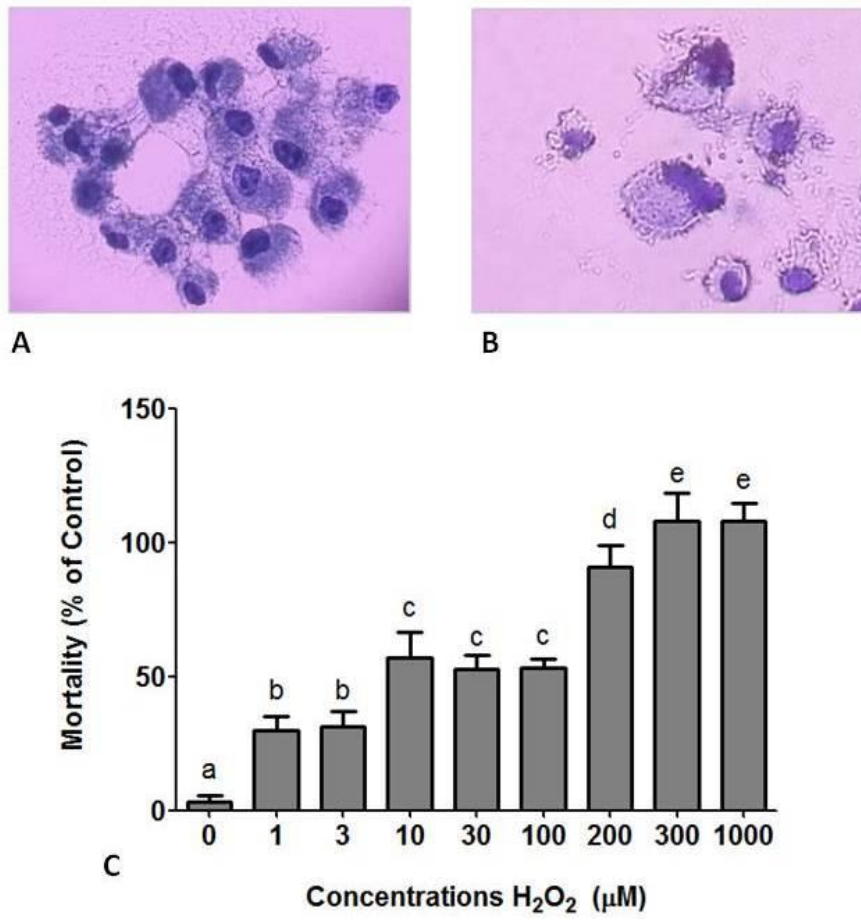


Fig 2

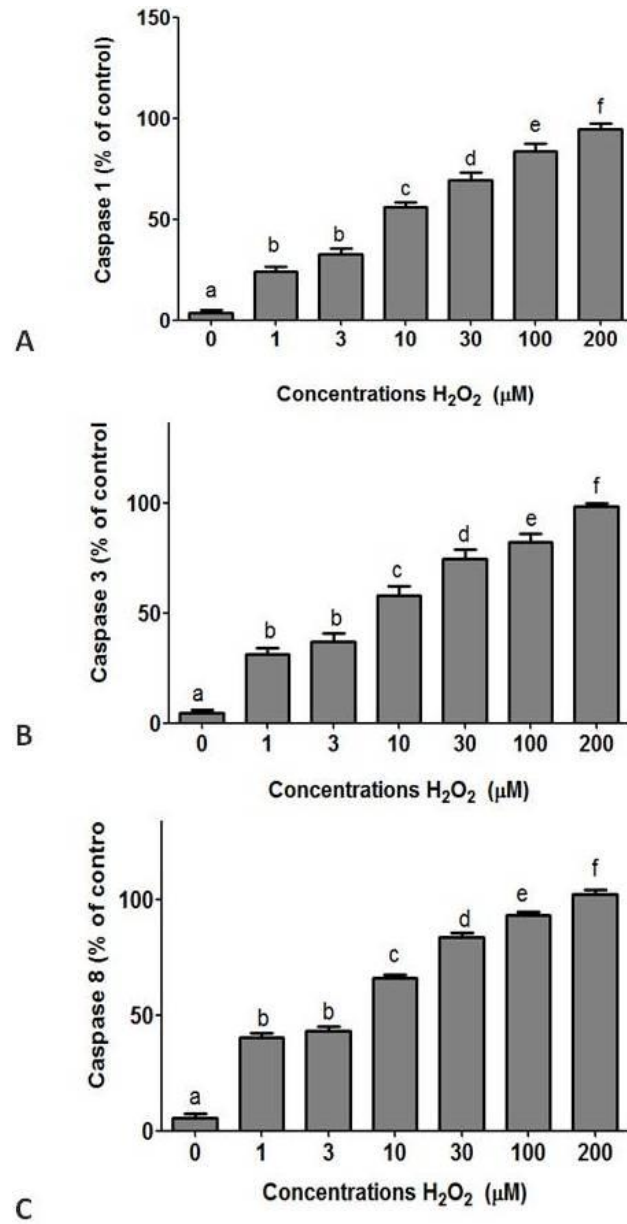


Fig 3



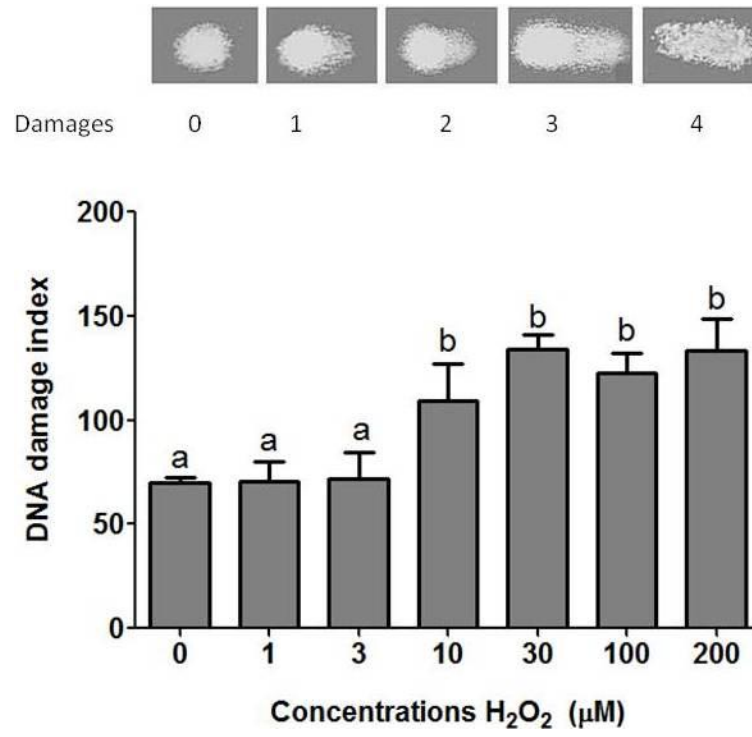


Fig 4

**Manuscrito 2**

**Título:** Guaraná (*Paullinia cupana*) effects on senescent adipose-derived stem cells obtained from human lipoaspirates.

**Autores:** Alencar Kolinski Machado, Francine Carla Cadoná, Verônica Farina Azzolin, Eduardo Dornelles, Fernanda Barbisan, Euler Esteves Ribeiro, Maria Fernanda Mânica-Cattani, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** Rejuvenation Research.

# Guaraná (*Paullinia cupana*) effects on senescent adipose-derived stem cells obtained from human lipoaspirates

Alencar Kolinski Machado<sup>a</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>b</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>a</sup>, Eduardo Dornelles<sup>b</sup>, Fernanda Barbisan<sup>a</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>c</sup>, Maria Fernanda Mânica-Cattani<sup>c</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Post-graduation program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria

<sup>b</sup> Post-graduation program of Biological Science: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria

<sup>c</sup> Biogenomic Laboratory, Morphology Department, Health Science Center, Federal University of Santa Maria

Word Count: 4000 words.

\*Address for correspondence and reprints: Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil, Zip Code: 97105900. Phone: 55-55-32208163, Email: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

Keywords: Cellular senescence; mesenchymal stem cell; Amazon fruit.

Abbreviated title: Guaraná effects on senescent stem cells

## Abstract

The process of cellular senescence is a limiting factor for the cell expansion of mesenchymal stem cells, as adipose-derived stem cells (ASCs) often making unviable for use in clinical practice. Natural products supplementation could to delay the ASCs senescence. Therefore, the present study evaluated the effects of guaraná (*Paullinia cupana*) supplementation in senescent ASCs obtained from human lipoaspirates. ASCs cells were isolated and cultured with peal every 3-4 days and the cell proliferation was accompanied in all passage by MTT assay until occur significant decrease in growing when compared to 1<sup>st</sup> passage ( $\geq 20\%$ ). The ASCs senescent cells were treated with 1, 5, 10 and 20 mg/mL of hydro alcoholic guaraná extract and the proliferative state was measured after 72 h of exposition by cell culture-free double-strand (ds) DNA determination using DNA <sup>®</sup> Picogreen dye. The guaraná concentration with better proliferative effect was used to available the general oxidative state, the genotoxic effects by comet assay, and also was available the modulation of the treatment in the activity and expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-peroxidase (GPx). The results showed that at 8<sup>th</sup> passage occurrence of a significant decrease in the cells growing, and these cells exposed to guaraná at 5mg/mL concentration improved the cellular proliferation with increase of  $79.1 \pm 15.7\%$  when compared to untreated cells. This concentration decrease general oxidative stress and DNA damage when compared with untreated ASCs. The total SOD activity was decreased as well as occurred down regulation of SOD1 gene expression. On the other hand, the guaraná extract up regulated the CAT gene increasing the activity of this enzyme. The results suggest that the guaraná exposition can reverse the senescence in the ASCs modulating the activity and expression of antioxidant enzymes that catalyze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without cause additional oxidative stress or DNA damage.

## 1 Introduction

In general, human cells present replicative senescence, also named cellular aging that is characterized by several biological changes leading to state of permanent growth arrest [1,2]. Adult mesenchymal stem cells (MSCs) that are multilineage somatic of stem cells capable of trilineage mesodermal differentiation into osteoblasts or adipocytes or chondrocytes and immunomodulatory properties. They also present senescence after *in vitro* expansion, characterized by declines of proliferative and differentiation capacities [3].

The MSCs senescence is a limiting factor in the use of these cells in regenerative therapies since there is necessity to increase the MSCs number to get a successful clinical use [4]. This phenomenon appears to be universal independent of MSCs to be obtained from embryonic or adult tissues.

The *in vitro* protocols identified two types of cellular senescence: one is telomere-dependent and the second is stress-induced premature senescence (SIPS). Therefore, the modulation of cellular senescence is considered as a potential pro-longevity strategy [5]. Many reports have suggested that cellular oxidative imbalance that leads to accumulation in intracellular ROS is related to senescence MSCs [6]. Whereas low levels of ROS, mainly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce proliferation and differentiation of MSCs. On the other hand survived cells exposed to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> present irreversible loss in their proliferative capacity [7].

Many nutritional compounds present in functional foods have important properties that could act positively in MSCs. However, there are few studies investigating the effect of foods and some bioactive molecules on MSCs. Bickford et al [8] investigated the effect of some foods as green tea that is rich in catechins and

caffeine on human bone marrow cells. The authors showed that combinations of nutrients and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) promote cellular proliferation. Other investigation showed that adipose-derived stem cells (ASCs) treated with caffeine < 0.3 mM enhancing differentiation to osteoblasts whereas higher doses present inhibitory effect on osteoblasts differentiation [9].

Therefore, is relevant to determine the potential effect of food extracts on MSCs biology and senescence. Guaraná (*Paullinia cupana*), a Brazilian Amazonian fruit commonly used in energy drinks, since is very good source of caffeine [10] and several studies suggest its functional properties in multiple biological functions.

Investigations performed by independent research groups have suggested that guaraná present a broadly and diverse properties including antioxidant [11,12], antimicrobial [12], antiplatelet aggregation [13], anti-obesogenic [14], modulation of lipid metabolism [15,16]; antimutagenic and anticarcinogenic [17] effects as well as *in vitro* and *in vivo* immunomodulation effects on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) decreasing proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and Ig- $\gamma$  and increasing IL-10 levels [18].

Guaraná also presents anti fatigue effect in breast cancer patients and patients with solid tumors undergoing to systemic chemotherapy [19,20]. Multivitamin supplements formulated with guaraná also seem to act on neurofunctions as cognitive performance improvement and mental fatigue [21], increasing brain activation areas associated with working memory and attentional processing [22].

Despite the apparent low toxicity of guaraná and its beneficial action, a recent investigation performed by Zeidán-Chuliá et al [23] that evaluated the morphological and biochemical *in vitro* effects of main compounds used in energetic drinks on human neuronal SH-SY5Y cells showed that high guaraná exposition determined

signs of neuritis degeneration and apoptosis suggesting that, in healthy cells the excessive removal of intracellular reactive oxygen species could generate an “antioxidant stress state” causing cytotoxicity.

At contrary, embryonic fibroblast NIH-3T3 cells concomitantly exposed to high oxide nitric (ON) levels caused by degradation of sodium nitroprusside (SNP) showed important protective guaraná effect involving differential modulation of antioxidant enzymes, mainly increase of superoxide dismutase (SOD) enzyme activity [24].

In this context, a question that needs to be answered is if guaraná has some effect on biology and senescence MSCs markers. Therefore, the present study analyzed the effect of hydro-alcoholic extract guaraná on senescent adipose-derived stem cells (ASCs) obtained from human lipoaspirated adipose tissues.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Isolation and ASCs culture and cell passages**

Human adipose tissue was collected from patients undergoing to elective liposuction surgery at the Unimed Hospital (Santa Maria, RS, Brazil). The protocol was approved by the Federal University of Santa Maria Ethics Committee Board (23081.015838/2011-10) and donators signed consent term. Tissue was collected from three female patients ranging in age from 30 to 55, with an average age of  $45 \pm 7$ . ASCs were isolated following a protocol described by Buehrer and Cheatham [25]. Briefly, the lipoaspirate was initially washed three times with PBS buffer (pH 7.4) to eliminate blood cells and digested for 20 min in 0.075% collagenase I at 37 °C. The resulting suspension was centrifuged at 2000 rpm during 10 minutes to

obtain an ASC-rich pellet. The new cell pellet was resuspended in growth media (DMEM/F12 plus 10% Fetal Bovine Serum, 100 I.U. penicillin, and 100µg/mL streptomycin) and passed through a 40µm cell strainer. The remaining cells were plated on standard tissue culture plastic overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, the non-adherent cells were removed with two rinses with 1× PBS, and then serially passaged at 70% confluence. Growth media was changed every 3–4 days. The cell proliferation was determined in each cellular passage until occur significant decrease in growing when compared to 1<sup>st</sup> passage. The senescent stage was determined when the ASCs proliferation decreased  $\geq 20\%$  when compared to 1<sup>st</sup> cellular passage. In this moment, was performed the experiment to observe the potential guaraná effect on ASCs proliferative state.

## **2.2 Guaraná hydro-ethanolic extract and treatments**

The hydro-ethanolic guaraná extract used in the present study was the same prepared and described in Bittencourt et al [24], which was lyophilized and stored at – 20° C until to be used in the experiments described here. The authors obtained the extract using 70:30 alcohol and water to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 21 days, with weekly filtering, the preparation was centrifuged at 3000 RPM to 10 minutes, and the supernatant was isolated. The resulting solution was filtered, the ethanol removed using a rotary evaporator at reduced pressure, 25°C at 115 rpm. Further, the extract was lyophilized and the caffeine, theobromine and catechin were determined by chromatographic analysis with detection by UV absorbance at 272 nm on an HPLC system. The caffeine



content was estimated to be 12.240 mg/g, theobromine = 6.733 mg/g and total catechins = 4.336 mg/g.

The senescent cells were treated with guaraná extract at same concentrations of 1, 5, 10 and 20 mg/mL used by Bittencourt et al [24] which evaluated the guaraná effect on embryonic fibroblasts (NHI-T3T) exposed to higher nitric oxide. After 72 hours the cell proliferation was determined as well as the viability since guaraná could present some cytotoxic effect due antioxidant stress as described by Zeidán-Chuliá et al [23]. The guaraná concentration with better effect on ASCs proliferative state was used to determine the effect on cell oxidative metabolism compared to cells in the same passage without guaraná supplementation.

### **2.3 Senescence analysis by cell proliferation assay and ASCs morphological evaluation**

The *in vitro* proliferative capacity displays three phases: phase I, corresponding to a period of little proliferation before the first passage, during which the culture establishes; phase II, characterized by rapid cell proliferation; and phase III, during which the proliferation gradually grinds to a complete halt [26]. Therefore, the cell proliferation in each passage was determined using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, as described by Mosmann [27], briefly cells/well treated were incubated for 4 h with MTT reagent. After formazan salt was dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO), absorbance was measured at 570 nm. To confirm the reaction, before DMSO addition the cells were photographed to observe visually the formazan crystals. The absorbance was measured in micro plate reader. The cell viability observed in each treatment was

expressed as a percentage of the control absorbance value. Since the MTT assay presents some limitations that can overestimated the proliferative effects of extracts rich in polyphenols before the analysis the cells were centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes, the supernatant discarded and the cells were resuspended in PBS buffer.

ASCs present morphology with similar fibroblast pattern. Therefore, the senescent cells present loss their original fibroblastic shape acquiring a flattened morphology, characterized by larger cells, occurrence of many vacuoles in cytoplasm and bigger nucleus [28].

#### **2.4 Cell viability assay**

To determine if guaraná cause some cytotoxic effect on ASCs, the dead cells were quantified to presence of dsDNA in supernatant. When a cell dies, the membrane is disrupted and dsDNA fractions are released into the extracellular medium. As DNA PicoGreen® dye presents high affinity with the dsDNA and is able to quantify the dsDNA released, the Quant-IT™ PicoGreen® ds DNA kit (Invitrogen - Life Technologies) was used to perform the dsDNA determination following manufacture instructions. To dsDNA was measured using 50µL of the sample and 50µL of the DNA Picogreen® dissolved in TE buffer, 1X (1:1; v.v), following the incubation by 5 minutes in dark room. The fluorescence was measured at an excitation of 480 nm and an emission of 520 nm recorded at room temperature.

#### **2.5 Oxidative stress biomarkers assay**

Three assays were performed to determine the oxidative stress in senescent ASCs cells with and without guaraná supplementation: intracellular ROS, lipoperoxidation and protein carbonylation.

The quantification of ASCs intracellular ROS was determined using dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA) as described by Ahn et al [29]. In this assay, DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent DFF by cellular oxidants. To perform the measure the sample cells were treated with DCFH-DA (10 $\mu$ M) for 60 min at 37°C and the fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm.

To evaluate the oxidative state of senescent ASCs the lipoperoxidation as well as protein carbonylation were spectrophotometrically determined. Lipoperoxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described in Ohkawa et al [30] and protein carbonyls were measured according the method described by Morabito et al [31].

## **2.6 The alkaline single cell gel electrophoresis assay**

To detect the possible DNA damage in the samples, we performed the, also as know, comet assay as described by Singh et al [32] with modification in the coloration process conducted as Nadin et al [33]. In this methodology is placed two slides to sample and these blades pass through processes of cellular lyses, electrophoresis and staining with silver nitrate. After 50 cells are read by two analysts evaluating the size of the DNA drag, considering that the higher the drag, the greater

the damage index. The DNA damage index is determined by the equation:  
 $x.(n^0)+x.(n^1)+x.(n^2)+x.(n^3)+x.(n^4)$ .

## 2.7 Antioxidant enzymes analysis

The activity and gene expression of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-peroxidase (GPx) was evaluated in the senescent ASCs samples with and without guaraná supplementation.

The total SOD activity was determined in the samples treated with guaraná using the methodology described by Spitz & Oberley [34]. This assay is based in the ability of the SOD to reduce the nitroblue tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich®, USA) to formazan. Therefore, greater is the activity of the SOD, higher is the absorbance of the sample. The absorbance was determined at 560nm.

The CAT activity was determined using the methodology described by Aebi [35]. This assay use the hydrogen peroxide as substrate and a kinetic reading is performed in three points in 15 to 15 seconds. The results obtained were expressed like k/g of protein present in each sample.

The GPX was indirectly determined from thiol groups analysis of each sample treated with the different guaraná concentrations were determined as described by Ellman [36]. The absorbances were determined at 412nm.

The gene expression of SOD1, SOD2, CAT and GPx were quantitatively determined by real time PCR (q-PCR). The determination was performed using the total RNA obtained of each sample in test. The cells were washed at room temperature with PBS (pH 7,4), cell lysis was performed using 2,5 mL of Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). After the total RNA obtained was solubilized in 20  $\mu$ L of

water. Using the RNA, we amplified the cDNA using Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) with an initial step of 95°C for 5 minutes and 40 cycles of alternating temperatures: 95°C for 1 minutes; 60°C for 30 seconds; 72°C for 1 minute; 72°C for 4 minutes to final extension. So, the amplification reaction was performed using REDEExtract-N-Amp PCR Reaction Mix Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in an Eppendorf Mastercycler gradient thermocycler (Maxygene II, Axygen, Foster City, CA, USA). Then, the electrophoresis was conducted in 10% acrylamide gel in 1x TBE buffer, at 220V for 30 minutes. Using the 0,2% ethidium bromide the bands were reveled in a transluminator equipment. The primers used to this technique are listed in Table 1.

Table 1 here

## 2.8 Statistical Analysis

The data were presented as percentage of the control group and statistically analyzed using Graphpad prism software. All experiments were performed in triplicates. The results were compared by Oneway analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test or Student t test. Data with  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## 3 Results

The proliferative capacity of ASCs obtained from human lipoaspirates was analyzed. As showed in Figure 1, a rapid cell growing from 3 to 5<sup>th</sup> passages was observed where the cells presented young morphological pattern (Figure 1A). During 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> cell passage occurred decrease in cell proliferation that return to similar

levels observed in the first passage. The cell culture also started to change from young to senescent morphological pattern (Figure 1B). The 8<sup>th</sup> passage presented significant decrease in cell proliferation when compared to first passage, and well characterized senescent pattern (Figures 1C, 1D). Therefore, in the 8<sup>th</sup> passage, ASCs received guaraná supplementation at different concentrations.

The guaraná supplementation at 5 and 10 mg/mL stimulated the ASCs proliferation when compared to senescent ASCs in the same cell passage (8<sup>th</sup>) whereas lower concentration (1 mg/mL) and higher concentration (10 mg/mL) did not change the cell proliferation pattern when compared to untreated cells. Specifically, at 5 mg/ml concentration was observed  $79.1 \pm 15.7\%$  of increase in cell proliferation when compared to untreated control cells (Figure 1E).

Figure 1 here

The ASCs viability was also evaluated since the results could to be related to rate of cell mortality and not for increase in cell proliferation. The results showed a slight and no significant decrease in mortality of cells supplemented with guaraná at 5 and 10 mg/mL ( $84.34 \pm 8.06\%$ ) determined by free-culture medium dsDNA. Considering these results, and due the limitation in sample cells at same passage to perform the assays, all further experiments were performed using the lower guaraná concentration that presented positive effect on ASCs cell proliferative capacity (5 mg/mL).

The senescent ASCs supplemented with guaraná 5 mg/mL showed significant decrease in oxidative stress variables analyzed here: intracellular ROS, lipoperoxidation and protein carbonylation levels (Figures 2A, B, C). The DNA index

damage in cells that receive guaraná supplementation was also lower than untreated cells (Figure 2D).

Figure 2 here

The guaraná modulate differentially the ASCs antioxidant enzymes activity and their gene expression (Figures 3 and 4). The SOD activity was lower in senescent ASCs cells supplemented with guaraná. However, the gene expression analysis showed just SOD1 decreasing whereas SOD2 expression was similar to untreated cells. On the other hand significant increase in CAT activity and gene expression was observed in cells treated with guaraná when compared to control group. The thiols levels were similar between two ASCs cells groups, however a slight significant decrease in GPx gene expression was also detected in cells supplemented with guaraná.

Figure 3 here

Figure 4 here

## **4 Discussion**

The present study analyzed if guaraná supplementation could act on ASCs senescence obtained from human lipoaspirates and if its action involves differential regulation of cell oxidative metabolism. When senescent ASCs cells at 8<sup>th</sup> passage lost approximately 25% of proliferative capacity, they received a guaraná 5 mg/mL supplement. These cells showed an improvement in their proliferation as well as a

decrease of oxidative stress markers, ROS levels, lipoperoxidation, protein carbonylation and DNA damage. On the other hand, the guaraná supplementation increased significantly the CAT activity and gene expression. Although lowering in SOD total activity and SOD1 gene expression has being detected in the cells guaraná exposed.

The results described here suggesting that guaraná is able to revert the senescent ASCs phenotype is relevant considering that stem cells present in adult tissues are important mediators of tissue maintenance and wound repair [37]. However, similar to differentiate cells, adult stem cells as ASCs are not immortal and present proliferative senescence when *in vitro* cultured [26]. Their longevity is dependent on careful control of gene expression, proliferation and cell cycle, and differentiation signals [37]. The *in vitro* finite lifetime of diploid cell strains may be an expression of aging that denotes long-term loss of proliferative capacity, despite continued viability and metabolic activity [28].

Previous investigations described that, among the changes related to *in vitro* cell aging are an accumulation of oxidative damage [38]. Nowadays, oxygen is considered one of the major determinants of stress induced premature senescence. In fact, the oxygen singlet ( $O_2$ ) did not present cellular toxicity. However, the ROS produced from this molecule affect the cell aging biology. In chemical terms, ROS can be classified in two groups: the first one includes ROS as superoxide and hydroxyl radicals that contain one or more unpaired electrons in their outer molecular orbitals. In the second group, are the molecules as  $H_2O_2$ , ozone, peroxinitrate and hydroxide that is composed of non-radical ROS that remain chemically reactive and can be converted to radical ROS [39].



Among these molecules,  $H_2O_2$  appears to present an important effect on cellular senescence [40-42]. Therefore, the regulation of  $H_2O_2$  levels can be a mechanism that could delay the cellular senescence observed in differentiated and adult stem cells as ASCs from human lipoaspirates that were studied here. However, the fine  $H_2O_2$  cell regulation is difficult to do, since in low physiological levels this molecule is an important cell signaling in several biological pathways.

In these terms, functional foods that present a complex nutritional matrix with several bioactive molecules can present an important role in the ROS modulation of senescent cells, since the concentration of these molecules, is in general lower than purified substances as well as they create a synergism that produces a differential property than observed in the isolate molecules. Probably, guaraná effect on senescent ASCs cells is related to whole of its main chemical molecules that are able to regulate the oxidative metabolism in a harmonic way.

This affirmative is based in the results described here that showed decrease in ROS levels at 8<sup>th</sup> passage ASCs cells supplemented with guaraná in comparison with untreated cells. Previous study performed by Bittencourt et al [24] also showed increase in the viability and differential oxidative stress modulation in the embryonic NH3-T3 fibroblast cells exposed to high NO levels.

The ASC senescent characteristics reversion by guaraná supplementation, considering the proliferative state probably involves the modulation of oxidative metabolism. A possible model of guaraná action on ASC cells is showed in Figure 5. In the expected situation, ASCs present senescent phenotype from 7 to 8<sup>th</sup> passage, mainly detected by decrease in cell rate proliferation (Figure 5A).

However, the guaraná supplementation induced change in this phenotype by decreasing in ROS levels, mainly  $H_2O_2$  and, in consequence decreasing in cell

oxidative state determined by lipoperoxidation, protein carbonylation and DNA damage. Probably this effect was obtained for two concomitant pathways: first, by non-genomic action of antioxidant scavenger molecules present in guaraná composition and second, by genomic action involving increase in CAT activity, because the  $H_2O_2$  acts as a cell proliferation signaling of SCs and the function of catalase is exactly metabolize this molecule, with up-regulation of this gene and decrease of SOD activity with down-regulation of SOD1 gene. The lowering effect on SOD enzyme has a consequence decrease in dismutation rate of superoxide ion in  $H_2O_2$ . However, this genomic effect seems to occur just in cytoplasm since was not detected influence of guaraná on SOD2 gene expression that act only in mitochondrial level. This hypothesis is also corroborated by the fact that GPX activity and gene expression is slight influenced by guaraná supplementation.

An speculation related to relevance in maintaining cellular  $H_2O_2$  in low levels could to be related to chemical interactions, as Fenton reaction that occur in cytoplasmic levels involving  $H_2O_2$  and Zn/Cu transitions metals that originate hydroxyls ( $OH^\cdot$ ) molecules. The  $OH^\cdot$  is high DNA affinity ROS molecule that causes genotoxic effects leading to DNA double-strand breaks and mutation accumulation [37]. Three possible programs were activated to preserve the genome integrity and prevent malignant transformation: DNA repair, apoptosis or senescence. Then, is realistic to postulate that control of  $H_2O_2$  level within the cytoplasm can prevent or controlled the  $OH^\cdot$  production avoiding the harmful consequences, including senescence induction. Both guaraná antioxidant non-genomic and genomic action contribute to decrease the ASCs oxidative state, including lowering effect on DNA damage, with final consequence the increase in cell proliferation (Figure 5B). However, whether guaraná supplementation could extend the period of ASCs

proliferative state (cell longevity?) delaying the senescence period is an open question, which unfortunately the present study did not clarify (Figure 5C).

Figure 5 here

The modulatory effect of guaraná on ASCs cell proliferation obtained from human lipoaspirates is a new information, despite the present protocol to present many methodological constraints as: (1) the guaraná effect on elongation of proliferative state from supplementation since the first ASCs passage was not determined; (2) the analysis of other senescent characteristics as telomeric-shortening, and some gene modulations aging-related were not performed; (3) the analysis of guaraná regulation on antioxidant metabolism was limited to some biomarkers as SOD total; (4) this is an *in vitro* study, therefore the results obtained here cannot be extrapolated to *in vivo* situations; (5) this *in vitro* protocol did not use commercial ASCs lines or obtained from animal experimental model as rodents. Therefore, there are large difficulties to obtain the human lipoaspirates sample and to perform a prospective analysis involving the analysis of functional food effects on stem cell senescence. However, considering the potential use of adult stem cells in the regenerative clinical therapies investigations using human MSCs from tissues as lipoaspirates are relevant.

Unfortunately, the most methodological constraints presented in this study cannot be avoided due to limitations to obtain large ASCs cell concentrations in each passage to permit additional biochemical and molecular analysis. In these terms, if the guaraná in higher concentrations than 5 mg/mL could present harmful effects on ASCs is not known.

A previous study performed by Zeidan-Chuliá et al [23] described a negative effect of main compounds present in energy drinks, including guaraná on human neuronal SH-SY5Y cell line due “antioxidant stress”. However, the guaraná, taurine and ginseng exposition was performed in cells with homeostasis integrity, which these compounds disrupted. Therefore, we cannot discard that in higher concentrations guaraná presents contrary effect on ASCs. Bittencourt et al [24] found that guaraná effect on cell oxidative stress caused by high NO exposition was not reverted at 20 mg/mL concentration, such as observed here. These results suggest a hormetic effect of guaraná on cells and need to be considered in the future studies involving this functional food.

For the same reason involving limited cell number to perform the experiments was not possible to evaluate the isolate effect of main chemical molecules present in guaraná extract (caffeine, theobromine and total catechins) on senescent ASCs. For this reason, the present study can be considered an exploratory investigation where additional future investigations need to be performed.

The complementary investigations need to evaluate if the ASC senescent reversion is maintained during future cellular passages. The guaraná interference in the other important ASCs properties as potential differentiation in osteoblasts, adipocytes and chondrocytes are also need to be determined. Both are important issues since previous investigations considering that increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels appear to be good inductor of differentiation of some MSCs cells [43,44] whereas other investigations showed that increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels triggered premature MSCs exhaustion of self-renewal [45,46].

Finally, is important to comment that epidemiological studies suggest that high consumption of fruit is beneficial for prevention of chronic diseases as cardiovascular

morbidities [47], cancer [48] and neurodegenerative disorders [49]. There are a large number of studies describing anti-tumoral properties of several fruits and plant extracts indicating positive effect of fruit and other functional foods consumption and human health [50]. However, at present moment, the effect of functional foods on adult stem cells, mainly in senescence development is less studied. The effect of functional food on adult stem cells are relevant, at least for two reasons: first, to evaluate the potential causal mechanism involved in the preventive effects related to these dietary foods and second, to determine if dietetic supplementation could become more successful the regenerative therapies using MSCs, as ASCs from human lipoaspirates.

**Acknowledgements**

We thank the José Raul Pinto Saldanha for his help in the obtaining samples of human adipose tissue, Taís Cristina Unfer for her help in the SOD assay, Tiago Luis Eilers Treichel and Jaime Sarda Aramburú Jr. for their help in the methodology of ASCs isolation. This work was supported by grants and fellowships from Brazilian governmental funds: CNPq, FAPERGS and CAPES.

**Author Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

## References

[1] Hayflick L. The limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-636.

[2] Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:961-976.

[3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.

[4] Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16:445-453.

[5] Sykora P, Yang JL, Ferrarelli LK, Tian J, Tadokoro T, Kulkarni A, Weissman L, Keijzers G, Wilson DM 3rd, Mattson MP, Bohr VA. Modulation of DNA base excision repair during neuronal differentiation. *Neurobiol Aging* 2013; 34:1717-1727.

[6] Ho PJ, Yen ML, Tang BC, Chen CT, Yen BL. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation mediates differentiation capacity alteration, but not proliferative decline, in senescent human fetal mesenchymal stem cells. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18:1895-1905.

[7] Burova E, Borodkina A, Shatrova A, Nikolsky N. Sublethal Oxidative Stress Induces the Premature Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Endometrium. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 2013:1-12.

[8] Bickford PC, Tan J, Shytle RD, Sanberg CD, El-Badri N, Sanberg PR. Nutraceuticals synergistically promote proliferation of human stem cells. *Stem Cells Dev.* 2006; 15:118-123.

[9] Su SJ, Chang KL, Su SH, Yeh YT, Shyu HW, Chen KM. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int J Food Sci Nutr* 2013; 64:429-436.

[10] Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JF, Mazzafera P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol* 2013; 150:14-31.

- [11] Mattei R, Dias RF, Espínola EB, Carlini EA, Barros SB. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *Journal Ethnopharmacology* 1998; 60:111-116.
- [12] Basile A, Ferrara L, Pezzo MD, Mele G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 102:32-36.
- [13] Ravi Subbiah MT, Yunker R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guaraná (*Paullinia cupana* ). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 2008; 78:96-101.
- [14] Opala T, Rzymiski, P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J. (2006) Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects-a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur J Med Res* 2006; 11:343-50.
- [15] Costa Krewer C, Ribeiro EE, Ribeiro EA, Moresco RN, da Rocha MIUM, Santos Montagner GF, Machado MM, Viegas K, Brito E, Cruz IB. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytother Res.* 2011; 25: 1367-1374.
- [16] Portella RL, Barcelos RP, da Rosa EJ, Ribeiro EE, da Cruz IB, Suleiman L, Soares FA. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. *Lipids Health Dis* 2013; 12:1-12.
- [17] Fukumasu H, Latorre AO, Zaidan-Dagli ML. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. *Phytother Res* 2011; 25:11-16.
- [18] Costa Krewer C, Suleiman L, Duarte MMMF, Ribeiro EE, Mostardeiro CP, Montano, MAE, da Rocha MIUM, Algarve TD, Bresciani G, da Cruz IBM. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin modulates cytokines: evidence from human *in vitro* and *in vivo* protocols. *Eur Food Res Techn* 2013; (in press).
- [19] de Oliveira BF, Costa DC, Nogueira-Machado JA, Chaves MM.  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid: differential profile of antioxidant, inflammatory status and regulation of gene expression in human mononuclear cells of diabetic donors. *Diabetes Metab Res Rev* 2013; 29:636-645.



[20] Del Giglio AB, Cubero DI, Lerner TG, Guariento RT, de Azevedo RG, Paiva H, Goldman C, Carelli B, Cruz FM, Schindler F, Pianowski L, Matos LL, Giglio AD. Purified Dry Extract of Paullinia cupana (Guaraná) (PC-18) for Chemotherapy-Related Fatigue in Patients with Solid Tumors: An Early Discontinuation Study. *J Diet Suppl* 2013; 10:325-334.

[21] Kennedy DO, Haskell CF, Robertson B, Reay J, Brewster-Maund C, Luedemann J, Maggini S, Ruf M, Zangara A, Scholey AB. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (Paullinia cupana). *Appetite* 2008; 50:506-513.

[22] Scholey AB, Camfield DA, Hughes ME, Woods W, Stough CK, White DJ, Gondalia SV, Frederiksen PD. A randomized controlled trial investigating the neurocognitive effects of Lacprodan® PL-20, a phospholipid-rich milk protein concentrate, in elderly participants with age-associated memory impairment: the Phospholipid Intervention for Cognitive Ageing Reversal (PLICAR): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013; 14:404.

[23] Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Kolling EA, Rybarczyk-Filho JL, Ambrosi P, Terra SR, Pires AS, da Rocha JB, Behr GA, Moreira JC. Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid Med Cel Long* 2013; 2013:1-22.

[24] Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, Dos Santos GF, Algarve TD, Marinowic DR, Ribeiro EE, Soares FA, Barbisan F, Athayde ML, Cruz IB. The protective effects of guaraná extract (Paullinia cupana) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:119-125.

[25] Buehrer BM, Cheatham B. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cells for use in tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2013; 1001:1-11.

[26] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585-621.

[27] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met* 1983; 65:55-63.

[28] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24:2463-2479.

[29] Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post-PCR. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:2623-2625.

[30] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.

[31] Morabito F, Cristani M, Saija A, Stelitano C, Callea V, Tomaino A, Minciullo P, Gangemi S. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators Inflamm* 2004; 13:381-383.

[32] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 1988; 175:184-191.

[33] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DRA. Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2001; 49:1183-1186.

[34] Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179:8-18.

[35] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-127.

[36] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Bioph* 1959; 82:70-77.

[37] Kenyon J, Gerson S. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Research* 2007; 35:7557-7565.

[38] Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 1998; 63:935-48.

[39] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Discov* 2009; 8:579-591.

[40] Chen XL, Li DH, Yang HH, Zhu QZ, Zheng H, Xu JG. A new red-region substrate, tetra-substituted amino aluminium phthalocyanine, for the fluorimetric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by mimetic peroxidases. *Analyst* 2001; 126:523-527.

- [41] Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2011; 317:1541-1547.
- [42] Harbo M, Koelvraa S, Serakinci N, Bendix L. Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2012; 11:774-779.
- [43] Zhang J, Chen G, Wang Y, Zhao J, Duan H, Liao L, Zhang X, Chen Y, Chen H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J* 2012; 125:3472-3478.
- [44] Robaszekiewicz A, Erdélyi K, Kovács K, Kovács I, Bai P, Rajnavölgyi E, Virág L. Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free Radic Biol Med* 2012; 53:1552-1564.
- [45] Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 2007; 110:3056-3063.
- [46] Urao N, Ushio-Fukai M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 54:26-39.
- [47] Hartley L, Flowers N, Holmes J, Clarke A, Stranges S, Hooper L, Rees K. Green and black tea for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 6: Art. No.: CD009934. DOI: 10.1002/14651858.CD009934.pub2.
- [48] Kontou N, Psaltopoulou T, Panagiotakos D, Dimopoulos MA, Linos A. The mediterranean diet in cancer prevention: a review. *J Med Food* 2011; 14:1065-1078.
- [49] Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci* 2009; 29:12795-12801.
- [50] Martin C, Zhang Y, Tonelli C, Petroni K. Plants, diet, and health. *Annu Rev Plant Biol* 2013; 64:19-46.

## Figures Legends

**Figure 1:** The process of senescence in adipose-derived stem cells (ASCs) and their proliferative response to guaraná treatments. (A) ASCs between 3-5<sup>th</sup> passage with intense cell growth and young morphological pattern; (B) ASCs between 6 and 7<sup>th</sup> passage with decrease in cell proliferation; (C;D) ASCs at 8<sup>th</sup> passage with significant decrease in cell proliferation, characterizing the senescence process; 400X of magnification; (E) Guaraná treatments showing a significant increase in proliferation of senescent ASCs mainly at concentration of 5 mg/mL. Data of treatments are presented as % of untreated control group. Different letters indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test.

**Figure 2:** Senescent ASCs supplemented with guaraná 5 mg/mL. (A, B, C) The treatment decrease the total rate of ROS, the lipoperoxidation and the protein carbonylation levels, respectively; (D) The treatment showed lower DNA damage index. Data of treatments are presented as % of untreated control group. The asterisk indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by Student t test.

**Figure 3:** Guaraná modulate differentially the senescent ASCs antioxidant enzymes activity. (A) The senescent ASCs treated with guaraná 5 mg/mL presented a lower SOD activity; (B) The senescent ASCs treated with guaraná 5 mg/mL presented a increase in CAT activity; (C) The senescent ASCs treated with guaraná 5 mg/mL showed a similar response between the groups. Data of treatments are presented as % of untreated control group. The asterisk indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by Student t test.

**Figure 4:** Guaraná modulate differentially the senescent ASCs antioxidant enzymes gene expression. The senescent ASCs treated with guaraná 5 mg/mL showed a significant decrease in SOD1 expression and a similar expression of SOD2. The treatment also induces increase in CAT expression and a slight significant decrease in GPx gene expression. Data were normalized by beta-actin expression. The asterisk indicated significant differences ( $p \leq 0.05$ ) by Student t test.

**Figure 5:** Schematic illustration of how supplementation with guaraná acts on senescent ASCs. (A) ASCs 7-8<sup>th</sup> passage pass to present decrease in cell proliferation characterizing the senescence process; (B) Supplementation with

guaraná present positive effects on senescent ASCs contributing to decrease the ASCs oxidative states; (C) Despite the data obtained, whether the guaraná is able to extend the period of ASCs proliferation is a open question.

**Table 1** Primers list of genes investigated in ASCs treated with 5mg/mL of *Paullinia cupana* extract.

Genes	Primers	
	Foward	Reverse
$\beta$ - actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
SOD1	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCACAAGCCAAACGACTT
SOD2	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
CAT	GATAGCCTTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT
GPX1	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT

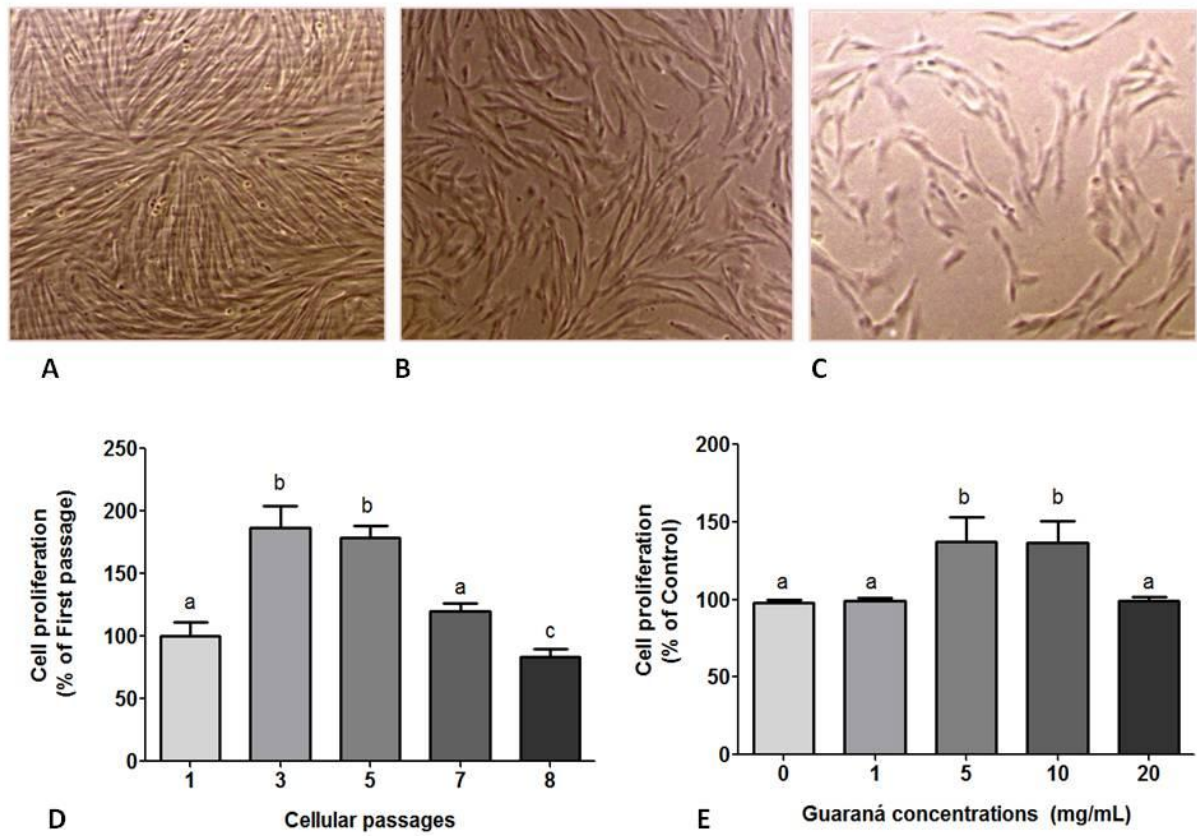


Fig 1

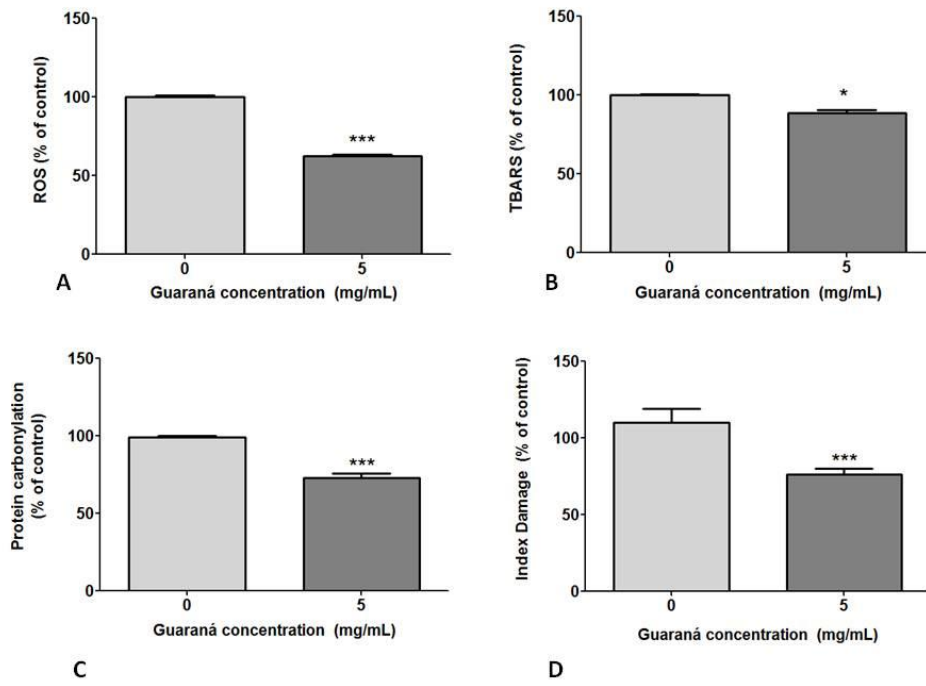


Fig 2



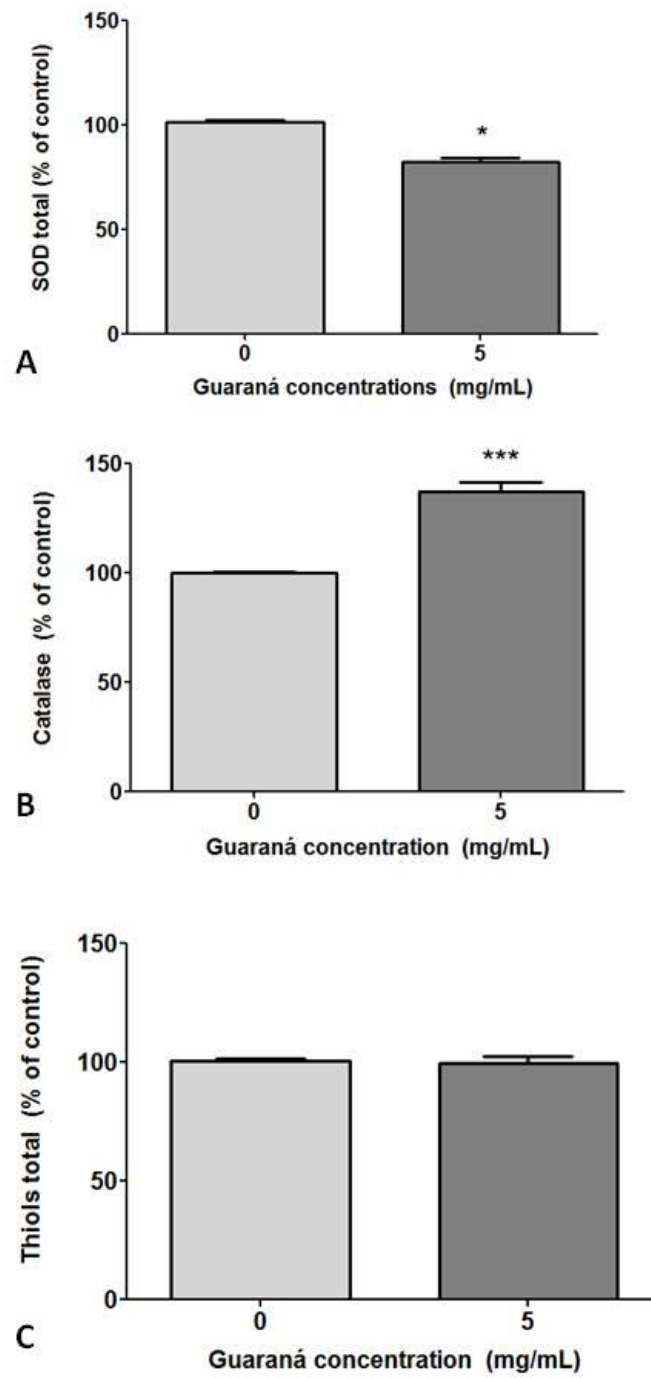


Fig 3

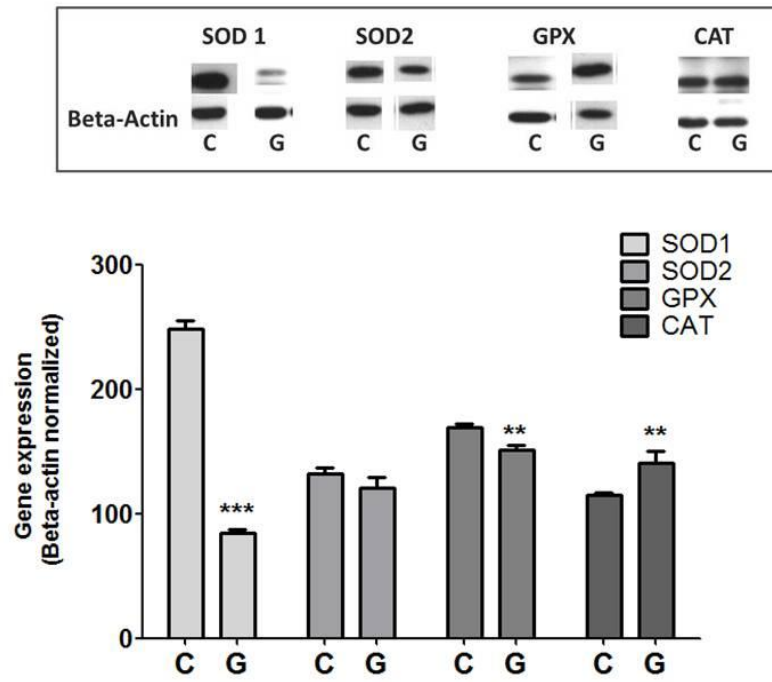


Fig 4

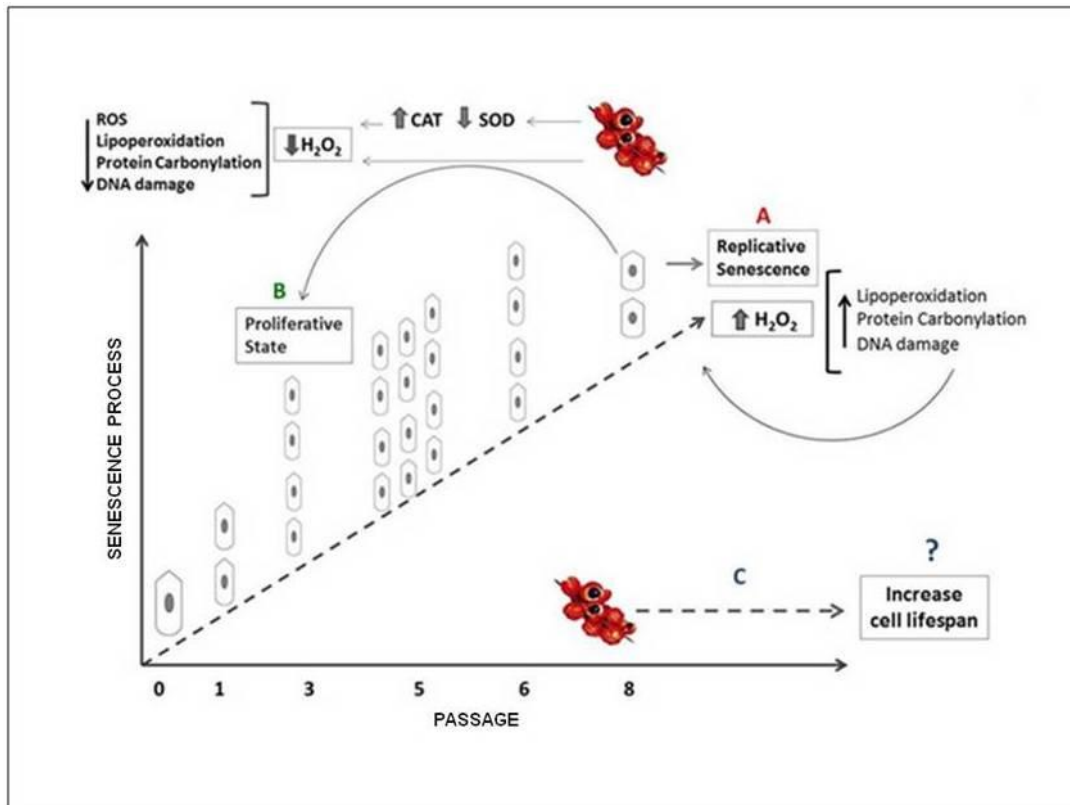


Fig 5

### 3 DISCUSSÃO

Investigações sugerem que a modulação do metabolismo oxidativo regula padrões de proliferação, diferenciação e senescência das CTs adultas. Por este motivo, este estudo buscou investigar o efeito da exposição aguda ao estresse oxidativo em ASCs não senescentes, bem como o efeito da exposição ao guaraná de ASCs em processo de senescência celular, que é principalmente identificado pela diminuição na taxa proliferativa. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

No primeiro estudo, foi observado que o tratamento agudo de ASCs com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  pode conduzir a efeitos cito e genotóxicos. Tais resultados sugerem que a exposição aguda ao  $H_2O_2$  em concentrações subletais pode atuar de forma a alterar o metabolismo oxidativo celular, modulando a atividade de enzimas antioxidantes e conduzindo a danos em nível de DNA. Deste modo, nas células sobreviventes pode ocorrer um comprometimento da homeostase celular.

Estudos sobre o efeito da exposição ao  $H_2O_2$  têm sido conduzidos em outros tipos de CTs adultas. Um dos objetivos destes estudos foi o de averiguar se, uma exposição aguda a EROs, em condições *in vitro* não poderia ser benéfico no sentido de aumentar a resistência destas células a este estresse, já que as mesmas geralmente são transplantadas em tecidos que estão com níveis oxidativo-inflamatórios muito elevados. Murry e colaboradores (1986) foram os primeiros a estudar e descrever a capacidade citoprotetora do pré-condicionamento de cultivos celulares como um mecanismo universal de proteção celular. Entretanto, tais autores não investigaram se este procedimento poderia levar a um aumento da genotoxicidade tornando as CTs predisponentes a transformação tumoral.

Outros estudos também começaram a ser realizados a fim de avaliar se a exposição ao  $H_2O_2$  auxiliaria na rápida expansão celular a fim de se obter um número elevado de células aptas a serem transplantadas. No estudo efetuado por Zhang e colaboradores (2012) os autores expuseram CTs obtidas de cordão umbilical a uma concentração subletal de  $H_2O_2$  (200  $\mu$ M). Este processo aumentou a capacidade de diferenciação dessas células, de forma a regenerar o tecido cardíaco de ratos com infarto agudo do miocárdio. Outro estudo conduzido por Choe e colaboradores (2012) relatou que a exposição contínua ao  $H_2O_2$  auxiliou na diferenciação de osteoblastos a partir de CTs obtidas do ligamento periodontal. Robaszkiewicz e colaboradores

(2012) também descreveram que o  $H_2O_2$  seria a principal EROs mediadora dos estágios finais da osteodiferenciação, com capacidade também de reduzir a apoptose celular.

Entretanto, os resultados aqui descritos sobre o efeito da exposição aguda ao  $H_2O_2$  em ASCs obtidas de lipoaspirados humanos mostraram que tais células possuem uma alta sensibilidade ao aumento nos níveis de EROs. Esta afirmativa é corroborada a partir da observação de uma significativa redução da viabilidade celular que ocorreu de forma dose-dependente. No caso, houve 100% de morte quando as células foram expostas a concentrações de 200  $\mu M$  ou mais de  $H_2O_2$ . Análise adicional mostrou que, a exposição aguda ao  $H_2O_2$  foi capaz de induzir a cascata apoptótica, já que foi observado aumento dos níveis das caspases iniciadora 8 e 1 e da caspase 3 executora.

Como esperado, a concentração de EROs dentro das células aumentou consideravelmente quando comparada ao controle negativo, também ocorrendo aumento no estresse oxidativo avaliado através da análise da lipoperoxidação. Estes resultados estão em conformidade com os experimentos de Tuteja e colaboradores (2009) que descreveram que o acúmulo de EROs conduz a danos celulares, sendo a peroxidação lipídica um dos danos mais expressivos, já que caracteriza a lesão de membrana celular.

Além disso, a enzima CAT apresentou aumento significativo conforme a progressão do tratamento o que está de acordo com a função desta enzima na metabolização da molécula de  $H_2O_2$  (GAETANI et al., 1996). Por outro lado, a atividade total da enzima SOD também apresentou modulação quanto ao tratamento, porém esta resposta não aconteceu de forma dose-dependente, já que as células tratadas com a concentração de 1  $\mu M$  apresentaram aumento significativo para a atividade enzimática, enquanto a partir da concentração de 3  $\mu M$  foi observada uma redução corroborando com o estudo de Gottfredsen e colaboradores (2013) que demonstrou que o tratamento de células embrionárias de rim (HKE293) com  $H_2O_2$  induziu uma diminuição da atividade da SOD por ação inibitória. Esta inibição pode ser explicada pelo fato de que a SOD quando dismuta o ânion superóxido produz  $H_2O_2$ . Deste modo, na presença de altos níveis desta EROs na célula, a inibição da SOD é um processo que ajuda a diminuir os níveis intracelulares de  $H_2O_2$ .

Chen e colaboradores (2001) demonstraram que a exposição de CTs adultas a agentes estressores, como o  $H_2O_2$ , conduz a senescência celular, via encurtamento dos telômeros. Deste modo, estudos complementares a fim de averiguar se a exposição ao  $H_2O_2$  modula a enzima telomerase são importantes de serem conduzidos. Estes autores também observaram efeito genotóxico associado à exposição. Os resultados aqui obtidos através do ensaio cometa mostraram que os tratamentos com  $H_2O_2$  também induziram danos significativos ao DNA das

ASCs, pois a frequência de dano 0 nas amostras decaiu expressivamente com as exposições em quantão. Adicionalmente, a visualização citomorfológica das células também sugeriu efeito pró-senescente do  $H_2O_2$  nas ASCs.

Sendo assim, apesar de algumas pesquisas demonstrarem a ação do  $H_2O_2$  na proliferação e diferenciação de CTs, ficou muito evidente que a exposição aguda de ASCs ao  $H_2O_2$ , principalmente a partir da concentração de 3  $\mu M$  leva ao aumento da taxa de citotoxicidade, do estresse oxidativo e principalmente do dano genômico em ASCs obtidas a partir de lipoaspirados humanos. Como estas alterações acabam por comprometer a homeostase celular, se torna questionável a utilização deste agente indutor de proliferação e diferenciação celular, pelo menos em se tratando de ASCs. Estudos adicionais precisam ser feitos para se entender melhor o porquê estas células são tão suscetíveis.

Por outro lado, se a exposição ao  $H_2O_2$  indicou cito-genotoxicidade e aumento no estresse oxidativo de ASCs não senescentes, por outro a exposição ao guaraná de ASCs senescentes levou a uma resposta oposta.

Como previamente comentado, o processo de senescência celular de CTs, como por exemplo, de ASCs é um fator limitante para o uso destas células de forma clínica como modo de terapia regenerativa ou até mesmo para fins de pesquisas experimentais (WAGNER et al., 2010). Os resultados obtidos através do ensaio MTT, realizado em todas as passagens celulares durante o processo de cultivo das ASCs, mostraram que na oitava passagem ocorreu uma diminuição significativa na proliferação destas células quando comparado à primeira passagem, caracterizando o processo de envelhecimento celular.

No caso, ASCs senescentes identificadas na oitava passagem de cultivo celular, quando expostas ao extrato hidroalcoólico de guaraná apresentaram aumento na proliferação celular, diminuição do estresse oxidativo e modulação positiva do sistema de enzimas antioxidantes. Infelizmente, por questão de quantidade amostral de células senescentes, não foi possível avaliar separadamente os níveis das enzimas SOD1 e SOD2. Entretanto, apesar desta limitação, os resultados puderam ser analisados sem prejuízo. No caso, a queda a atividade da SOD e o respectivo aumento na atividade catalase provavelmente são eventos relacionados com a diminuição na produção de  $H_2O_2$  em nível citoplasmático. É interessante notar que a queda nos níveis destas enzimas foi acompanhada pela diminuição nos níveis de expressão dos genes da SOD1 e catalase. Os resultados também mostraram que o tratamento com guaraná não causou genotoxicidade.

Com base nestes resultados parece que o guaraná, em ASCs de lipoaspirados humanos principalmente na concentração de 5 mg/mL leva a um aumento considerável na proliferação

das ASCs sem causar efeito citotóxico, indicando reversão do estado de senescência. Porém se tal reversão se mantém ou se traduz em melhor eficácia regenerativa das ASCs são questões que precisam ser respondidas a partir de estudos complementares.

Os resultados obtidos estão em consonância com estudos publicados na literatura envolvendo também alimentos ricos em cafeína e catequinas. Bickford e colaboradores (2006), por exemplo, investigaram a ação do chá verde, que é rico em cafeína e catequinas, em CTs da medula óssea. O chá verde mostrou ser capaz de aumentar a atividade proliferativa das células quando combinada ao fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos humanos. Já Su e colaboradores (2013) expuseram ASCs a diferentes concentrações de cafeína e na concentração de 0,3 mM também foi observado um aumento na capacidade de diferenciação destas células a osteoblastos, enquanto que altas concentrações de cafeína reduziram esta capacidade.

Esta pesquisa também apresentou algumas limitações metodológicas entre as quais se destacam as seguintes: (a) não foi determinada a ação do guaraná na proliferação e estado oxidativo desde a primeira passagem; (b) não foi realizada a análise de outros parâmetros vinculados a senescência celular, como encurtamento dos telômeros e genes relacionados ao envelhecimento celular; (c) a avaliação do efeito do guaraná no metabolismo antioxidante foi limitada a biomarcadores como a SOD total; (d) por se caracteriza como um estudo *in vitro*, os resultados aqui obtidos não podem ser extrapolados para situação *in vivo*; (e) as células utilizadas não pertencem a uma linhagem comercial ou obtidas de animais e a obtenção de amostras de lipoaspirado humano é bastante dificultosa para uma análise prospectiva.

De qualquer modo, acredita-se que as limitações supracitadas não diminuem a relevância dos resultados obtidos, mas sim indicam a necessidade de investigações adicionais. Nestes termos, o conjunto dos resultados corrobora a relevância da modulação do metabolismo oxidativo na proliferação e senescência das CTs, sugerindo, entretanto, que esta modulação é dependente do tipo de CTs, sendo as ASCs muito sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente o estudo indica que o uso de extratos de plantas, como o guaraná pode auxiliar na diminuição da senescência celular das ASCs.

## 4 CONCLUSÃO

A exposição aguda ao  $H_2O_2$  de ASCs não senescentes obtidas de lipoaspirado humano foi altamente citotóxica, envolvendo ativação da rota apoptótica, aumento nos níveis intracelulares de EROs, aumento no estresse oxidativo e da genotoxicidade. Considerando os trabalhos publicados na literatura este estudo parece ser o primeiro trabalho que descreve a alta suscetibilidade das ASCs a exposição aguda ao  $H_2O_2$  e do seu potencial genotóxico nas células sobreviventes;

As ASCs apresentaram um padrão de senescência bem definido na oitava passagem de cultivo celular em condições padronizadas e controladas;

A exposição de ASCs senescentes ao extrato hidroalcolico do guaraná aumentou a proliferação celular, assim como o estado antioxidante da célula via modulação de enzimas antioxidantes e seus respectivos genes, diminuindo também os níveis de genotoxicidade. Estes resultados sugerem que o guaraná possui potencial efeito na reversão da senescência celular de ASCs.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. B.; SCADDEN, D. T. A niche opportunity for stem cell therapeutics. **Gene Ther.** v. 15, p. 96–99, 2008.

AGROEVENTOS. Acessado em: 20 de dez 2013. Disponível em:  
<<http://agroevento.com/agenda/curso-manejo-cultura-guaranazeiro>>.

ALBUQUERQUE, L. Guaraná: A vitalidade em grãos. **Amazônia em Foco.** P. 9-14, jun. 1991.

AMADO, L. C.; SALIARIS, A. P.; SCHULERI KH, S. T.; JOHN, M.; XIE, J. S.; CATTANEO, S.; DURAND, D. J.; FITTON, T.; KUANG, J. Q.; STEWART, G.; LEKRKE, S.; BAUMGARTNER, W. W.; MARTIN, B. J.; HELDMAN, A. W.; HARE, J. M. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 102, p. 11474-11479, 2005.

ANISIMOV, S. V.; CHRISTOPHERSEN, N. S.; CORREIA, A. S.; LI, J. Y.; BRUNDIN, P. "NeuroStem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. **BMC Genomics.** v. 8, p. 1-15, 2007.

ANKRUM, J.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. **Trends Mol. Med.** v. 16, p. 203–209, 2010.

ARANDA, P.; AGIRRE, X.; BALLESTAR, E.; ANDREU, E. J.; ROMAN-GOMEZ, J.; PRIETO, I.; MARTIN-SUBERO, J. I.; CIGUDOSA, J. C.; SIEBERT, R.; ESTELLER, M.; PROSPER, F. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. **PLoS One.** v. 4, p. 1-14, 2009.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells International.** v. 2012, p. 1-11, 2012.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell Mol. Med.** v. 8, p. 301-316, 2004.

BASILE A, FERRERA L, DEL PEZZO M, MELED G, SORBO S, BASSI P, MONTESANO D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol.** v. 102, p. 32-36, 2005.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 37, p.961-976, 2005.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell.** v. 2, p. 313-319, 2008.

BICKFORD, P. C.; TAN, J.; SHYTLE, R. D.; SANBERG, C. D.; EL-BADRI, N.; SANBERG, P. R. Nutraceuticals synergistically promote proliferation of human stem cells. **Stem Cells Dev.** v. 15, p. 118-123, 2006.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; DOS SANTOS, G. F.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; SOARES, F. A.; BARBISAN, F.; ATHAYDE, M. L.; CRUZ, I. B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem Toxicol.** v.53, p. 119-125, 2013.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochem Cytobiol.** v. 44, p. 215-230, 2006.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.** v. 414, p. 813-820, 2001.

BYDLOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 24, p. 421-424, 1991.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 31, p. 25-35, 2009.

CABRAL, A. C. V.; ÂNGELO, C. P. C.; LEITE, H. V.; PEREIRA, A. K.; LOPES, A. P. B. M.; OLIVEIRA, M. B.; BORGES, K. B. G.; PARDINI, V. C.; FERREIRA, A. C. S. Isolamento, Diferenciação e Aspectos Bioquímicos de Células-tronco de Líquido Amniótico. **Revista da Associação de Medicina Brasileira.** v. 54, p. 489-493, 2008.

CHEN, X. L.; LI, D. H.; YANG, H. H.; ZHU, Q. Z.; ZHENG, H.; XU, J. G. A new red-region substrate, tetra-substituted amino aluminium phthalocyanine, for the fluorimetric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalyzed by mimetic peroxidases. **Analyst.** v. 126, p. 523-527, 2001.

CHIU, J.; DAWES, I. W. Redox control of cell proliferation. **Trends Cell Biol.** v. 22, p. 592-601, 2012.

CHOI, S. A.; LEE, J. Y.; WANG, K.; PHI, J. H.; SONG, S. H.; SONG, J.; KIM, S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas. **European Journal of Cancer.** v. 48, p. 129-137, 2012.

COSTA KREWER, C.; RIBEIRO, E. E.; RIBEIRO, E. A.; MORESCO, R. N.; DA ROCHA, M. I. U. M.; SANTOS MONTAGNER, G. F.; MACHADO, M. M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; CRUZ, I. B. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytother Res.** v. 25, p. 1367-1374, 2011.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Brasileira de Pneumologia.** v. 15, n. 4, p. 670-682, 2009.

DAI, W.; KLONER, R. A. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: challenges to be overcome. **J. Mol. Cell Cardiol.** v. 42, p. 730-732, 2007.

DE GEMMIS, P.; LAPUCCI, C.; BERTELLI, M.; TOGNETTO, A.; FANIN, E.; VETTOR, R.; PAGANO, C.; PANDOLFO, M.; FABBRI, A. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** v. 15, p. 719-728, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** v. 8, p. 315-317, 2006.

DOPPLER, S. A.; DEUTSCH, M. A.; LANGE, R.; KRANE, M. Cardiac regeneration: current therapies-future concepts. **J. Thorac. Dis.** v. 5, p. 683-697, 2013.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J.; HYARIC, M. L.; ALMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta.** v. 532, p. 177-186, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Acessado em: 20 dez 2013. Disponível em: <<http://www.cpaa.embrapa.br/agricultura-1/embrapa-lanca-cultivares-de-guaranazeiro-que-produzem-sete-vezes-mais>>.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** v. 55, p. 223-229, 1997.

ESTRELA, C.; ALENCAR, A. H. G.; KITTEN, G. T.; VENCIO, E. F.; GAVA, E. Mesenchymal Stem Cells in the dental tissue: perspectives for tissue regeneration. **Braz. Dent. J.** v. 22, p. 91-98, 2011.

FAZEL, S. S.; ANGOULVANT, D.; BUTANY, J.; WEISEL, R. D.; LI, R. K. Mesenchymal stem cells engineered to overexpress stem cell factor improve cardiac function but have malignant potential. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** v. 136, p. 1388-1389, 2008.

FITO, M. L. A.; TORRE, R.; FARRE-ALBALADEJO, M.; KHYMENETZ, O.; MARRUGAT, J.; COVAS, M. I. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Ann Inst Super Sanita.** v. 43, p. 375-381, 2007.

GAETANI, G. F.; ROLFO, M.; ARENA, S.; MANGERINI, R.; MELONI, G. F.; FERRARIS, A. M. Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. **Blood.** v. 88, p. 1084-1088, 1996.

GOTTFREDSSEN, R. H.; LARSEN, U. G.; ENGLILD, J. J.; PETERSEN, S. V. Hydrogen Peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. **Redox Biol.** v. 1, p. 24-31, 2013.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes.** v. 53, p. 110-118, 2004.

HALVORSEN, Y. C.; WILKISON, W. O.; GIMBLE, J. M. Adipose-derivate stem cells – their utility and potential in bone formation. **Int J Obes Rel Met Des.** v. 24, p. 41-44, 2000.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Biochem. J.** v. 353, p. 411-416, 2001.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature.** v. 345, p. 458-460, 1990.

HASHIMOTO J.; KARIYA, Y.; MIYAZAKI, K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). **Stem Cells**. v. 24, p. 2346-2354, 2006.

HAYFLICK, L. The limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. **Exp Cell Res**. v. 37, p. 614-636, 1965.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**. v. 25, p. 585-621, 1961.

HELMY, K. Y., PATEL, S. A., SILVERIO, K., PLINER, L., RAMESHWAR, P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. **Therapeutic Delivery**. v. 1, p. 693–705, 2010.

HOWELL, E. G. M.; FARWELL, D.W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J. M.; HYARIC, M. L.; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Anal. Chim. Acta**. v. 532, p. 177-186, 2005.

KABURAGI, Y.; MOMOMURA, K.; YAMAMOTO-HONDA, R.; TOBE, K.; TAMORI, Y.; SAKURA, H.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. Site-directed mutagenesis of the juxtamembrane domain of the human insulin receptor. **J. Biol. Chem**. v. 268, p. 16610-16622, 1993.

KANYON, J.; GERSON, S. L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. **Nucleic Acids Res**. v. 35, p. 7557-7565, 2007.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? **The New England Journal of Medicine**. v. 349, p. 570–582, 2003.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**. v. 16, p. 433-441, 2003.

KUILMAN, T.; MICHALOGLU, C.; MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. The essence of senescence. **Genes Dev**. v. 24, p. 2463-2479, 2010.

KULTERER B, FRIEDL G, JANDROSITZ A, SANCHEZ-CABO F, PROKESCH A, PAAR C, SCHEIDELER, M.; WINDHAGER, R.; PREISEGGER, K. H.; TRAJANOSKI, Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC Genomics**. v. 8, p. 1-15, 2007.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M.; Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de La facultad de Química Farmacéutica**. v. 12, p. 45-52, 2005.

LAU, D.; OGBOGU, U.; TAYLOR, B.; STAFINSKI, T.; MENON, D.; CAULFIELD, T. Stem cell clinics online: the direct-to-consumer portrayal of stem cell medicine. **Cell Stem Cell**. v. 3, p. 591–594, 2008.

LEE, R. H.; SEO, M. J.; REGER, R. L.; SPEES, J. L.; PULIN, A. A.; OLSON, S. D.; PROCKOP, D. J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 103, p. 17438-17443, 2006.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews**. v. 7, p. 269–291, 2011.

MADDUX, B.A.; SEE, W.; LAWRENCE, J. C. Jr.; GOLDFINE, A. L.; GOLDFINE, I. D.; EVANS, J. L. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. **Diabetes**. v. 50, p. 404–410, 2001.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**. v. 104, p. 1258-1268, 2007.

MAK, S.; NEWTON, G. E. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure: radical thoughts. **Chest**. v. 120, p. 2035–2046, 2001.

MARTIN, G. M. The biology of aging. **FASEB J**. v. 25, p. 3756-3762, 2011.

McNIECE, I. Delivering cellular therapies: Lessons learned from ex vivo culture and clinical applications of hematopoietic cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 18, p. 839-845, 2007.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. Instituto Oswaldo Cruz. v. 2, p. 217-218, 2010.

MORENO-SANCHEZ, R.; RODRIGUES-ENRIQUEZ, S.; MARIN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, E. Energy Metabolism in tumor cells. **FEBS J**. v. 274, p. 1393-1418, 2007.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**. v. 74, p. 1124–1136, 1986.

NOGUCHI, H. Stem cells for the treatment of diabetes. **Endocr. J.** v. 54, p. 7-16. 2007.

OBAYAN, A. **Oxidative stress: Natural history and modulation in surgery and trauma patients**. 2004. 195 f. Thesis (Doctorate in Philosophy) - Department of Surgery, University of Saskatchewan, Saskatoon, 2004.

ONG, W. K.; SUGII, S. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. **The Int J Biochem Cell Biol**. v. 45, p. 1083-1086, 2013.

PARK, K. S.; LEE, Y. S.; KANG, K. S. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. **J. Vet. Sci.** v. 7, p. 343-348, 2006.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Ed. Guanabara Koogan. v. 1, p. 3-4, 2005.

PIERRE, J. St.; BUCKINGHAM, J. A.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 44784-44790, 2002.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v. 284, p. 143-147, 1999.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. **J Agric Food Chem**. v. 49, p. 3438-3442, 2001.

ROBASZKIEWICZ, A.; ERDÉLYI, K.; KOVÁCS, K.; KOVÁCS, I.; BAI, P.; RAJNAVÖLGYI, E.; VIRÁG, L. Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. **Free Radic Biol Med**. v. 53, p.1552-1564, 2012.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundam Clin Pharmacol**. v. 21, p. 111-127, 2007.

ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE, G.; KURE, C.; OU, R.; BRUAN, L.; HAAN, J. Oxidative Stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**. v. 48, p. 45-54, 2013.

RUDICH, A.; TIROSH, A.; POTASHNIK, R.; HEMI, R.; KANETY, H.; BASHAN, N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**. v. 47, p. 1562–1569, 1998.

SCHIMPL, F. C.; da SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J. Ethnopharmacol.** v. 150, p. 14-31, 2013.

SEBRAE. Informações de Mercado sobre o Guaraná. Acessado em 27 de abril de 2012. Disponível em: [http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/EA4413F15EF0A2938325754C0063C9C8/\\$File/NT0003DC32.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/EA4413F15EF0A2938325754C0063C9C8/$File/NT0003DC32.pdf).

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** v. 17, p. 227-236, 2004.

SHERR, C. J.; DEPINHO, R. A. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? **Cell**. v. 102, p. 407–410, 2000.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Region Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 7, p. 279-282, 2010.

SU, S. J.; CHANG, K. L.; SU, S. H.; YEH, Y. T.; SHYU, H. W.; CHEN, K. M. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. **Int J Food Sci Nutr.** v. 64, p. 429-436, 2013.

TROSKO, J. E.; KANG, K. S. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. **Toxicol. Sci.** v. 120, p. 5269–5289, 2010.

TUTEJA, N.; AHMAD, P.; PANDA, B. B.; TUTEJA, R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage repair and DNA repair helicases. **Mutat Res.** v. 68, p. 134-149, 2009.

URAO, N.; USHIO-FUKAI, M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 54, p. 26-39, 2013.



VALLONE, V. B. F.; ROMANIUK, M. A.; CHOI, H.; LABOVSKY, V.; OTAEQUI, J.; CHASSEING, N. A. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? **Differentiation**. v. 85, p. 1-10, 2013.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obes. Metab.** v. 9, p. 813-839, 2007.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**. v. 116, p. 639-648, 2004.

WAGNER, W.; HO, A. D.; ZENKE, M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng Part B Rev.** v. 16, p. 445-453, 2010.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**. v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WATANABE, T.; WATANABE, W.; KAWAHARA, S. Manufacture of guarana extracts and their use for improvement of liver functions, stimulation of tumor immunity, and for functional foods. **Tokyo: Jpn. Kokai.** p. 13, 2002.

ZHANG, J.; CHEN, G.; WANG, Y.; ZHAO, J.; DUAN, H.; LIAO, L.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; CHEN, H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Chin. Med. J.** v. 125, p. 3472-3478, 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.** v. 7, p. 211-228, 2001.