



Efeitos do extrato botânico LGM3 em células do endotélio vascular humano (EA.hy926) sob modelo hiperglicêmico

PROBIC-FAPERGS

Autores: Gabrielle Slomp Mattiello¹, Luana Minello¹, Luciana Bavaresco Andrade Touguinha¹, Cátia dos Santos Branco¹, Mirian Salvador¹

¹Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Universidade de Caxias do Sul - Campus-Sede, 95070-560, Caxias do Sul - RS, Brasil.



INTRODUÇÃO/OBJETIVO

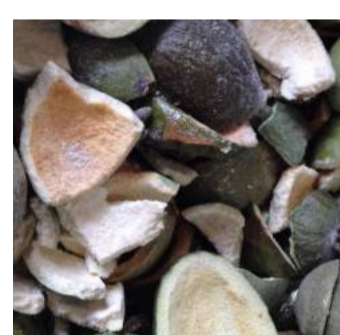
O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio fisiopatológico caracterizado pela presença de grandes quantidades de glicose na corrente sanguínea. A hiperglicemia crônica causada pelo DM2 leva ao estresse oxidativo e nitrosativo, que se mantém mesmo após medicação e está associado às co-morbidades do DM. LGM3 é um extrato feito a partir das cascas dos frutos de uma árvore pequena da família Myrtaceae (NODARI et al., 2008). O fruto de LGM3 possui alto potencial medicinal e nutricional podendo ser uma boa fonte alternativa para uso e aplicação em produtos nutracêuticos e farmacêuticos (CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011). Seus compostos bioativos mais conhecidos são do grupo dos flavonoides, caracterizados por serem metabólitos secundários das plantas e possuírem capacidade antioxidante (WAR et al., 2012). Os compostos fenólicos possuem a capacidade de proteger dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio ao doar elétrons para estabilizar as espécies reativas (RICE-EVANS et al., 1997). O objetivo deste desenho experimental foi verificar o efeito do extrato da casca do fruto de LGM3 sobre o estresse oxidativo e nitrosativo induzido por alta concentração de glicose em células endoteliais (EA.hy926). A atividade antioxidante do extrato e seu conteúdo fenólico total também foram avaliados.

METODOLOGIA

Preparação do extrato LGM3

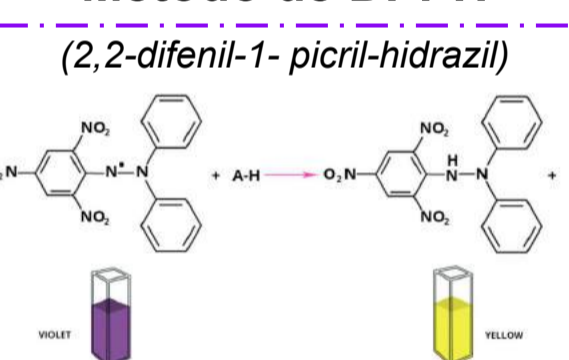
Casca de frutos LGM3:

- Higienizadas com NaClO 1%;
- Liofilizadas e trituradas;
- Extração aquosa 2% sob 80°C (infusão).



Filtrado e liofilizado novamente
Acondicionado a -20°C

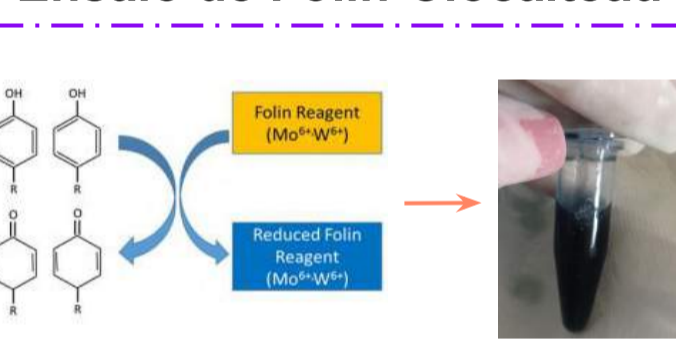
Potencial Antioxidante do Extrato Método de DPPH°



A redução foi medida por espectrofotômetro a 517 nm

YAMAGUCHI et al., 1998.

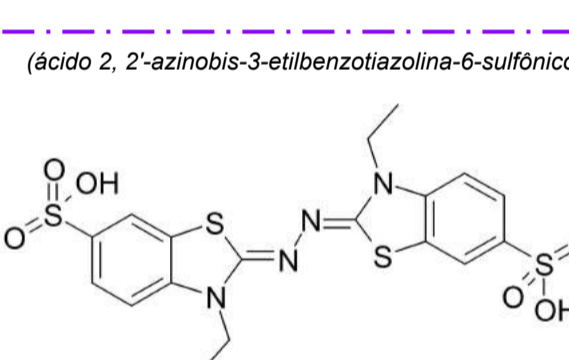
Quantificação dos Polifenóis Totais do Extrato Ensaio de Folin-Ciocalteu



A absorbância foi medida por espectrofotômetro a 765 nm

SINGLETON et al., 1965.

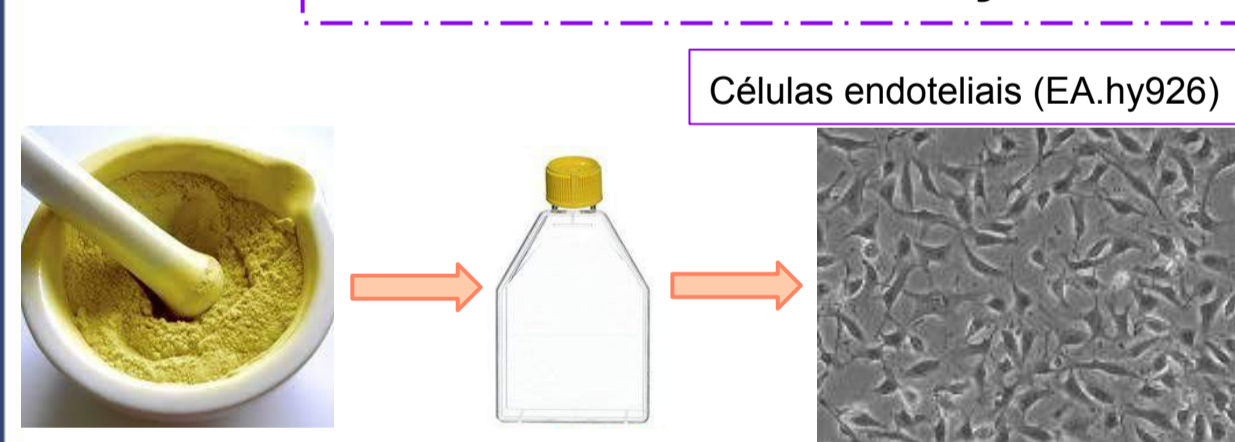
Potencial Antioxidante do Extrato Método de ABTS•+



A redução foi medida por espectrofotômetro a 734 nm

RE et al., 1999.

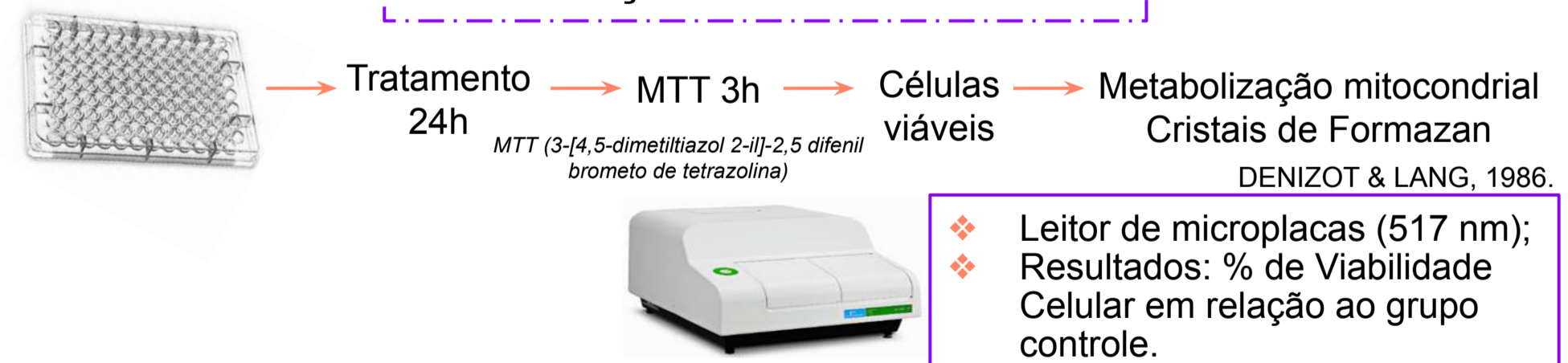
Cultura de células e avaliação da citotoxicidade do extrato



Células endoteliais (EA.hy926)

- Controles:** normoglicêmico (NG-25mM de glicose) e hiperglicêmico (HG-35mM de glicose), antibiótico 1%, sob privação sérica;
- Amostras:** NG + extrato (10, 25, 50 µg/mL); HG (35mM) + extrato LGM3 (10, 25, 50 µg/mL) + extrato privação sérica.

Determinação da viabilidade celular



Tratamento 24h

MTT 3h

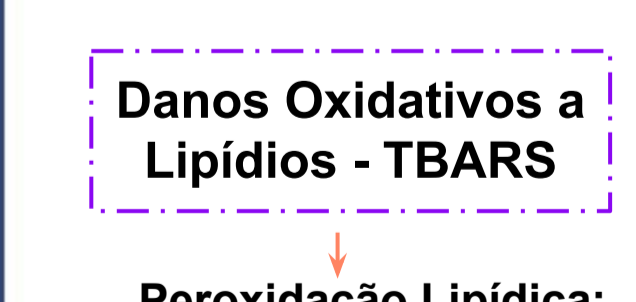
Células viáveis

Metabolização mitocondrial Cristais de Formazan

DENIZOT & LANG, 1986.

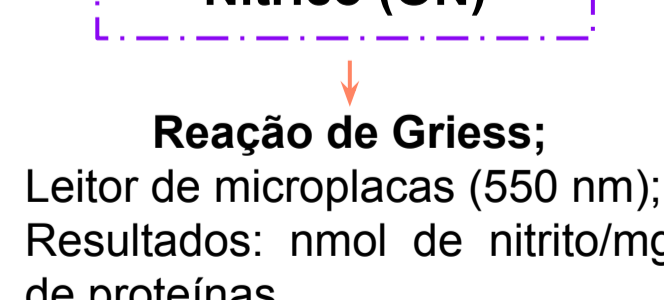
- Leitor de microplacas (517 nm); Resultados: % de Viabilidade Celular em relação ao grupo controle.

Danos Oxidativos a Lipídios - TBARS



WILLS et al., 1966.

Níveis de Óxido Nítrico (ON)



GREEN et al., 1982.

Proteínas Totais Método de Lowry

- Albumina como padrão;
- Leitor de microplacas (620 nm);
- Resultados expressos em mg/mL.

LOWRY et al., 1951.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que extrato LGM3 possui **281,5mg de EAG/g** e significativa capacidade de varredura dos radicais **ABTS•+** e **DPPH•**, com **95% e 82%**, respectivamente. Frente a esses resultados, as concentrações de 10, 25, 50µg/mL de LGM3 foram testadas em cultura celular EA.hy926.

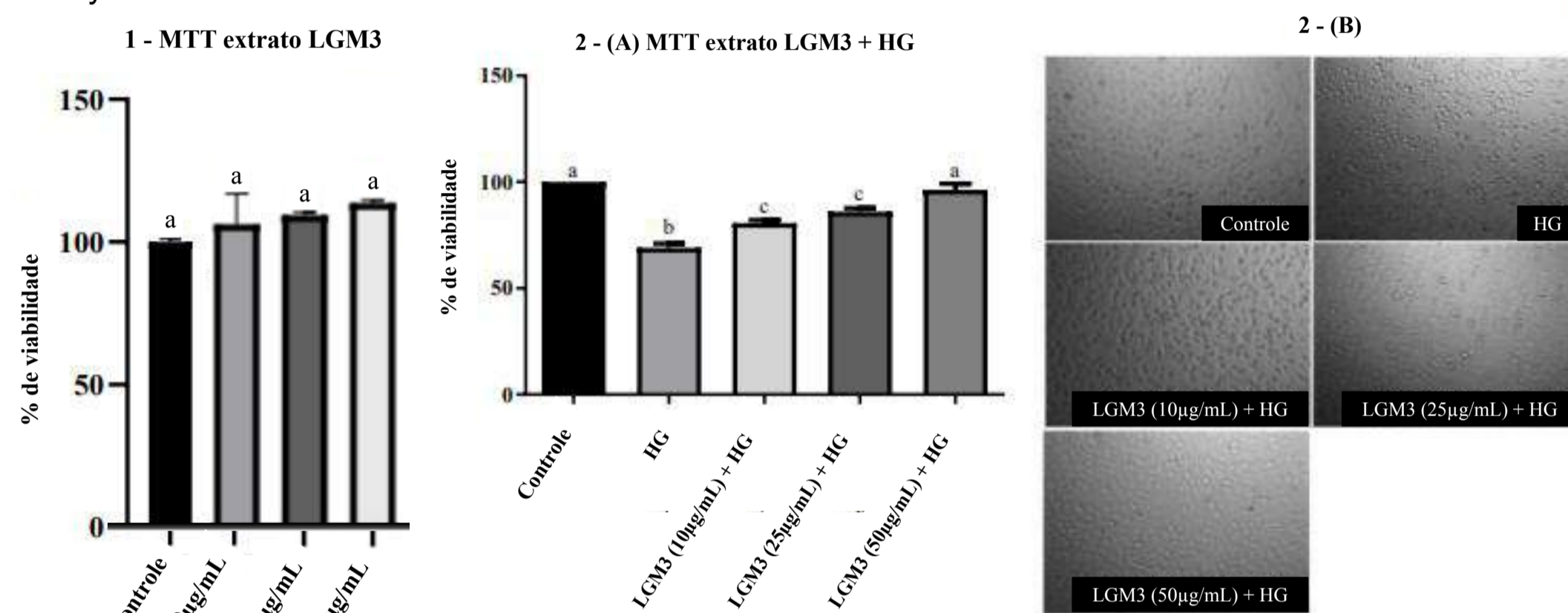
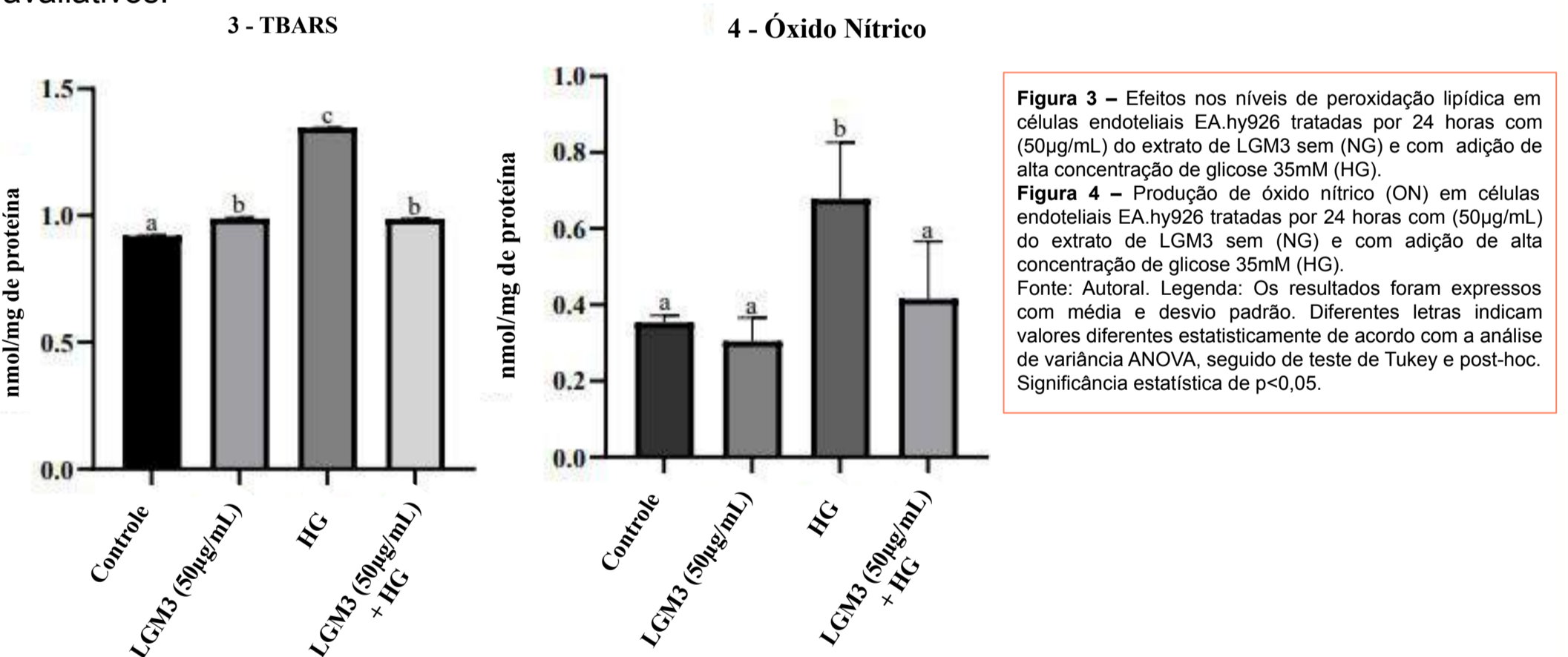


Figura 1 – Efeitos na viabilidade celular em três concentrações (as concentrações de 10, 25, 50µg/mL) do extrato de LGM3 em células endoteliais EA.hy926 por 24 horas. Figura 2 – Efeito na viabilidade (A) e morfologia celular (B) de diferentes concentrações do extrato de LGM3 com adição de glicose (HG = 35mM) em células endoteliais EA.hy926 por 24 horas. Fonte: Autoral. Legenda: Os resultados foram expressos com média e desvio padrão. Diferentes letras indicam valores diferentes estatisticamente de acordo com a análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey e post-hoc. Significância estatística de p<0,05.

Os extratos de LGM3 não apresentaram citotoxicidade em nenhuma doses testadas (10, 25, 50µg/mL) (Figura 1). Para verificar o possível efeito protetor do LGM3, as células foram expostas à HG (35mM) durante 24 horas. Verificou-se, na Figura 2 (A), que a viabilidade das células na presença da alta concentração de glicose (HG) levou a uma diminuição de viabilidade de 31% em relação ao controle, além de alterações na morfologia das células, conforme Figura 2 (B). A concentração de HG + LGM3 50µg/mL apresentou um aumento na porcentagem da viabilidade celular de 39,6%, em relação ao HG, se aproximando estatisticamente do controle. Portanto, o co-tratamento com o extrato LGM3 na concentração de 50µg/mL evitou a redução de viabilidade e o dano à morfologia celular, mesmo com a presença de HG. Diante desse resultado, essa concentração foi elencada para os demais parâmetros avaliativos.



O tratamento HG apresentou um aumento de quase 50% nos níveis de peroxidação lipídica (Figura 3) e 91,52% na concentração de ON (Figura 4). No entanto, o extrato de LGM3 50µg/mL + HG foi capaz de reduzir estatisticamente estes níveis, em cerca de 39% para o ON e 30% para peroxidação lipídica. Logo, pode-se inferir que o extrato na concentração de 50µg/mL foi capaz de reverter o dano oxidativo aos lipídios e preservar os níveis de ON endotelial causados pelo excesso de glicose intracelular.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo contribuirão para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas coadjuvantes ao tratamento das disfunções celulares causadas pelo Diabetes Mellitus. É importante ressaltar, que estão sendo realizados maiores avaliações acerca desse extrato frente a hiperglicemia para esclarecer melhor os mecanismos de ação celular envolvidos.

REFERÊNCIAS

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, [s.l.], v. 44, n. 7, p. 1658-1670, ago. 2011.
DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal Of Immunological Methods*, [s.l.], v. 89, n. 2, p. 271-277, maio 1986.
GREEN, L.; TANNENBAUM S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germline and conventional rat. *Science*, [s.l.], v. 212, n. 4490, p. 56-58, 3 abr. 1981.
LOWRY, D.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the form phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, [S. L.], v. 193, n. 1, p. 265-275, nov. 1951.
NODARI, R. O.; SANTOS, K. L.; DOS DUROUQUET, J. P.; QUERRA, M. P. (2008). Coabitação serrana: domesticação, in: Barberi, R. *Stump EST (est) Origem e evolução de plantas cultivadas*, p. 418.
RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALÀ, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1999), pp. 1231-1237.
RICE-EVANS, C.; HILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, [S. L.], v. 2, n. 4, p. 152-159, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-9701\(97\)01018-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-9701(97)01018-2).
SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 1965; 16: 144-58.
WAR, A. R.; PALKUJAI, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGANACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 7, n. 10, p. 1306-1320, out. 2012.
WILLS, E. D. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 1968; 106(3):667-76.
YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, M.; MATOBA, T.C.; TERAO, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical - scavenging of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 62(6), 1201-1204.

