

Introdução

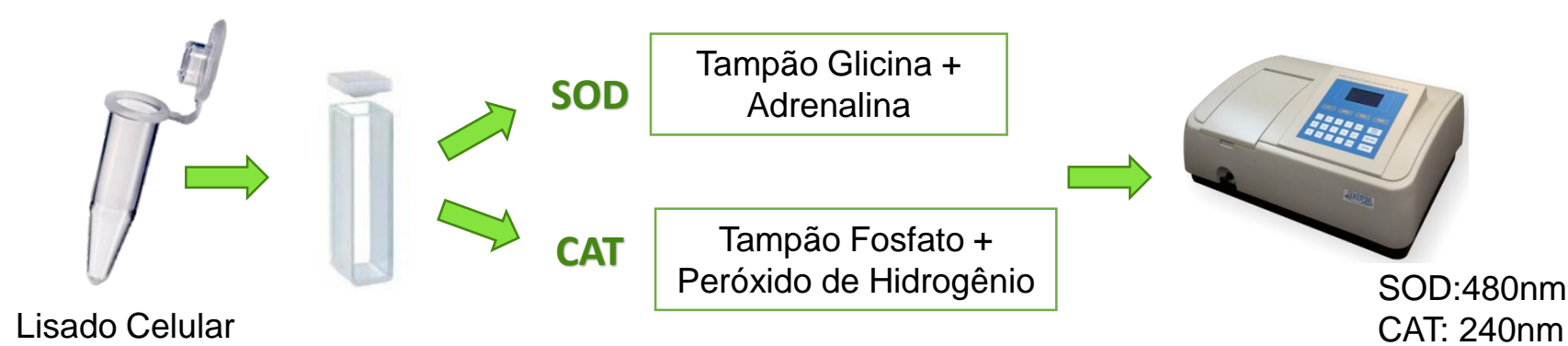
O Diabetes Mellitus (DM) é uma das doenças cujo a incidência mais cresce no Brasil, sendo caracterizada pelo estado de hiperglicemia (HG) crônica. Essa condição é responsável por induzir o estresse oxidativo através da produção excessiva de espécies reativas (ER) na mitocôndria, gerando consequentemente, dano celular (Kozziel *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que proantocianidinas (PACs), compostos antioxidantes presentes na semente da uva, podem auxiliar na eliminação dessas ER e na regulação de vias metabólicas. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar o metabolismo redox e a expressão de sirtuínas 1 e 3 (SIRT1 e SIRT3) em células endoteliais tratadas com PAC em modelo de hiperglicemia.

Metodologia

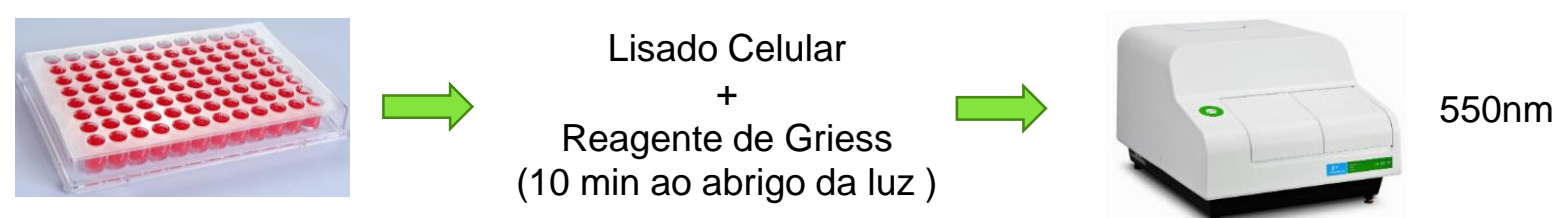
Cultivo Celular e Tratamento com PACs



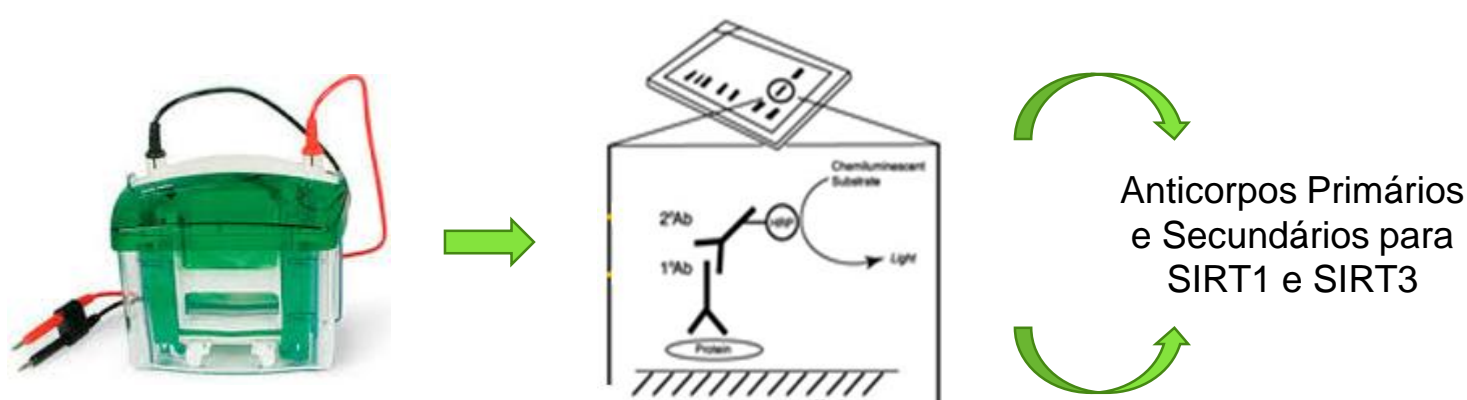
Atividade das Enzimas Antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) (Bannister & Calabrese, 1987; Aebi, 1984)



Quantificação de Óxido Nítrico (ON) (Green *et al.*, 1981)



Expressão das Proteínas SIRT1 e SIRT3



Resultados e Discussão

Conforme demonstrado nas Figuras 1A e 1B observou-se, respectivamente, uma diminuição na atividade de SOD e CAT no grupo HG em relação ao controle. Tanto SOD quanto CAT são enzimas antioxidantes que fazem parte da defesa endógena das células, detoxificando ER e reduzindo o estresse oxidativo. Quando diminuídas, demonstram fragilidade do sistema de defesa e maior susceptibilidade aos danos oxidativos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

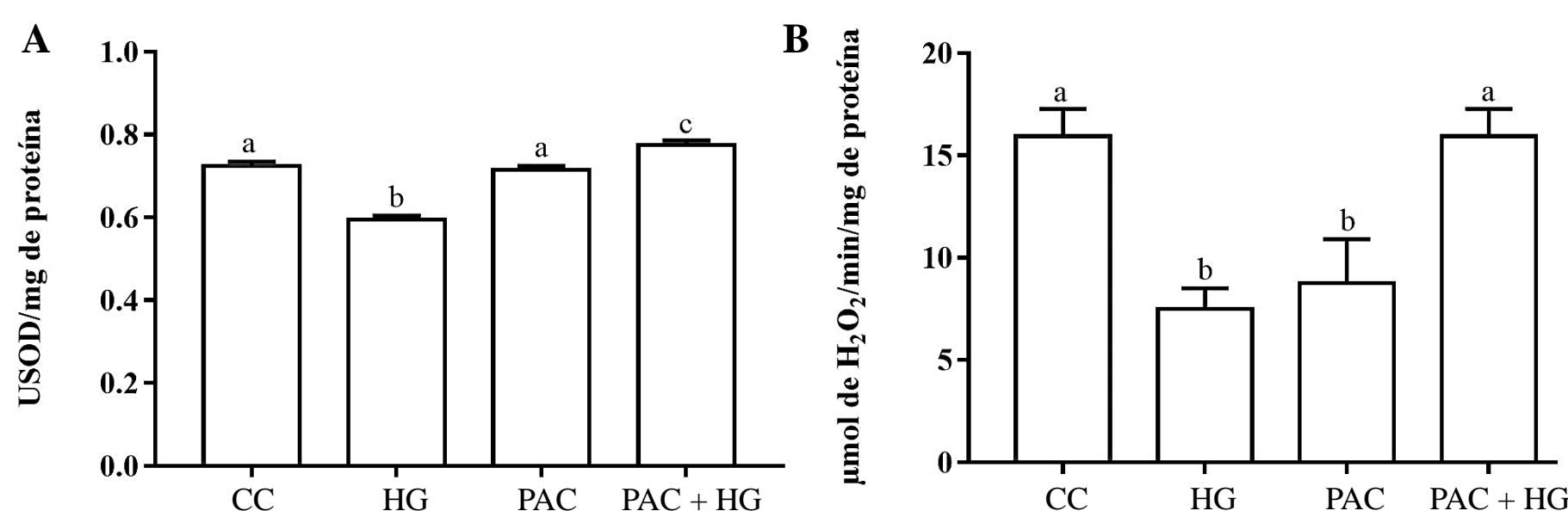


Figura 1. Atividade das enzimas SOD (A) e CAT (B) em células endoteliais tratadas com proantocianidina (PAC) e/ou hiperglicemia (HG) por 24 horas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). CC: controle celular.

Ademais, verificou-se que mesmo em presença de HG, as PACs puderam aumentar a atividade dessas enzimas, igualando-se ao controle celular (Figuras 1A e 1B). Por sua vez, PACs administradas de forma isolada não modularam SOD e CAT. Em relação aos níveis quantificados de ON (Figura 2), identificou-se uma redução no grupo HG. Outro estudo em 2017 já demonstrou redução na produção de ON na HG crônica em ratos diabéticos (Li *et al.*, 2016). Esse efeito está possivelmente relacionado com a disfunção do endotélio vascular, uma das principais complicações do DM (Apostolova & Victor, 2015). Quando as células foram tratadas com PACs, ainda em meio hiperglicêmico, observou-se valor significativamente igual ao controle, demonstrando que as PACs são efetivas na proteção das células endoteliais.

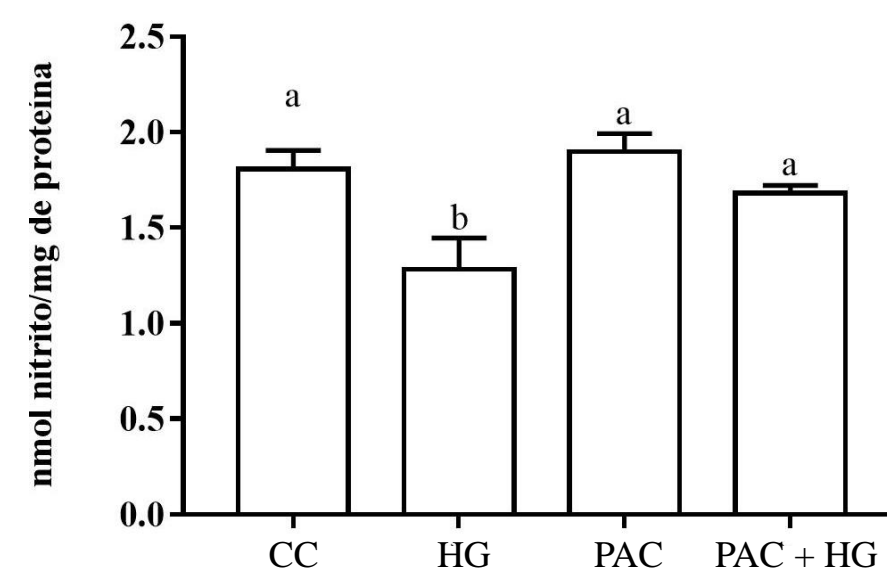


Figura 2. Quantificação de óxido nítrico (ON) em células endoteliais tratadas com proantocianidina (PAC) e/ou hiperglicemia (HG) por 24 horas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). CC: controle celular.

Após a avaliação da expressão das sirtuínas 1 e 3 (Figuras 3 e 4), verificou-se para SIRT1 um aumento em condição hiperglicêmica. De modo contrário, para SIRT3 foi observado redução na sua expressão no grupo HG. Outros estudos já encontraram redução de SIRT3 em células renais após 48 h expostas a HG (Cai *et al.*, 2015). O extrato de PACs foi capaz de restabelecer a expressão de ambas as proteínas mesmo na presença de HG. Tanto a SIRT1 quanto a SIRT3 são proteínas com papel importante na regulação do metabolismo celular em geral, especialmente na função mitocondrial. A proteína SIRT1 é mais presente no citoplasma e núcleo celular e a SIRT3 na mitocôndria (Cai *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016).

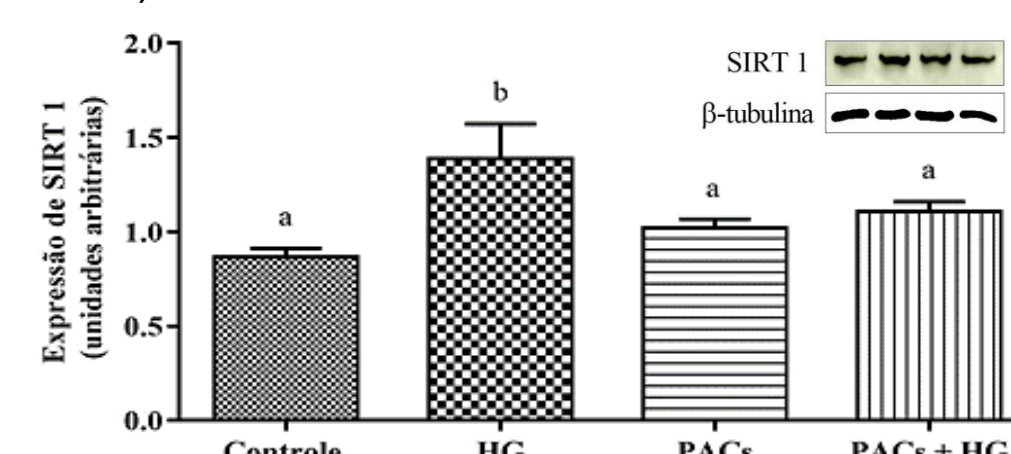


Figura 3. Expressão da proteína sirtuína 1 (SIRT1) em células endoteliais tratadas com proantocianidina (PAC) e/ou hiperglicemia (HG) por 24 horas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$).

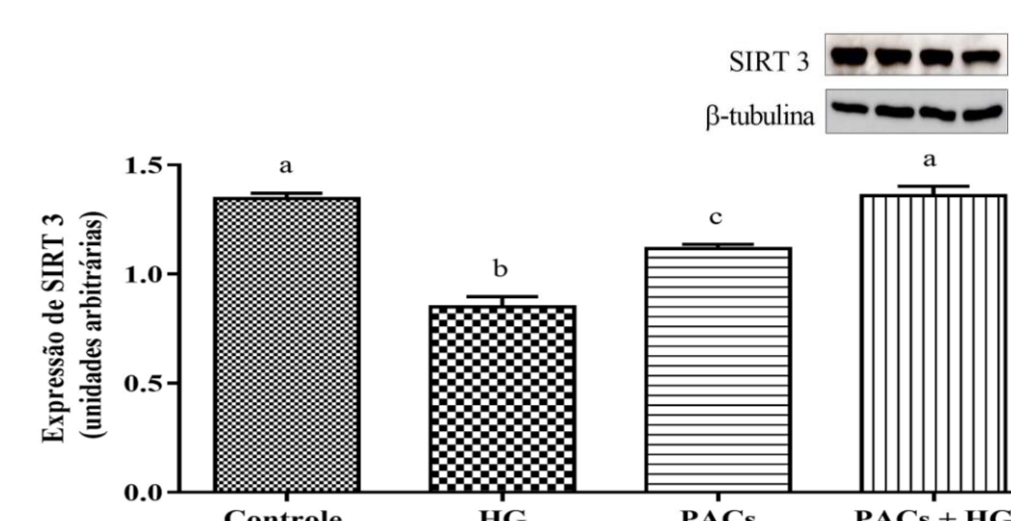


Figura 4. Expressão da proteína sirtuína 3 (SIRT3) em células endoteliais tratadas com proantocianidina (PAC) e/ou hiperglicemia (HG) por 24 horas. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$).

Considerações Finais

Os resultados até então obtidos indicam que PACs podem atuar na regulação das enzimas antioxidantes SOD e CAT e, consequentemente, reduzir o estresse oxidativo através da diminuição na geração de ER. Ademais, o extrato mostrou-se eficiente na modulação da expressão de SIRT1 e SIRT3, proteínas essenciais ao metabolismo redox das células. Por fim, a continuidade dos estudos nessa área são de extrema importância para o melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos.

Referências

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105:121-126.
 APOSTOLOVA, Nadezda; VICTOR, Victor M.. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, [s.l.], v. 22, n. 8, p.686-729, 10 mar. 2015. Mary Ann Liebert Inc.
 Bannister, J.V. & Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. *Methods of Biochemical Analysis*, 32: 279-312.
 CAI, Xiaxia et al. Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1α axis *in vitro*. *Food & Function*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.805-815, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).
 GAO, Jian et al. Deacetylation of MnSOD by PARP-regulated SIRT3 protects retinal capillary endothelial cells from hyperglycemia-induced damage. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [s.l.], v. 472, n. 3, p.425-431, abr. 2016. Elsevier BV.
 Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P. (1981). Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212: 56-58.
 Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4 ed. New York: Oxford Univ. Press. 851p.
 Kozziel, A., Woyda-Ploszczyca, A., Kicinska, A., Jarmuszkiwicz, W. (2012) The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells. *European Journal of Physiology*, 464(6): 657-69.
 LI, Jin-yi et al. Resveratrol rescues hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of Akt. *Acta Pharmacologica Sinica*, [s.l.], v. 38, n. 2, p.182-191, 12 dez. 2016. Springer Nature.