



EXTRATOS AQUOSOS DE PITAYA NORMALIZAM O ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO INDUZIDOS POR SOBRECARGA DE GLICOSE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS

KARINA ZANELLA LODI; ALENCAR KOLINSKI MACHADO; LUCIANA ANDRADE TOUGUINHA; CATIA SANTOS BRANCO

RESUMO

O Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é uma doença crônica e multifatorial associada com estresse oxidativo e inflamação. Apesar dos diversos medicamentos utilizados para o seu manejo, novas estratégias de tratamento devem ser pensadas. A pitaya da polpa vermelha (*Hylocereus lemairei*) exibe efeitos antidiabéticos *in vitro* e *in vivo*, no entanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse efeito ainda não estão totalmente esclarecidos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de extratos aquosos de casca ou polpa de pitaya vermelha em modelo tipo diabético *in vitro* induzido por sobrecarga de glicose utilizando células endoteliais EA.hy926. As células foram tratadas com glicose (35 mM) e/ou extratos (1 µg/mL) durante 24 horas. Parâmetros de estresse oxidativo e defesas antioxidantes foram avaliados (TBARS, conteúdo de proteína sulfidril (-SH) e atividades enzimáticas de superóxido dismutase – SOD e catalase – CAT) através de espectrofotometria. Níveis de expressão gênica de interleucina-6 (IL-6) e expressão protéica de ciclooxigenase-2 (COX-2) foram quantificados através de PCR e *Western blot*, respectivamente. Os resultados mostraram que as células, quando tratadas com sobrecarga de glicose, apresentaram redução na atividade enzimática de SOD e CAT e no teor de proteínas sulfidril. Simultaneamente, níveis de TBARS, indicativo de dano oxidativo à lipídeos, aumentaram. Ambos os extratos normalizaram esses marcadores, em alguns casos retornando a níveis basais. Com relação aos marcadores inflamatórios, houve aumento da expressão de COX-2 e IL-6 induzido por alta glicose. Os extratos foram capazes de normalizar os níveis de COX-2, no entanto, não modularam os níveis de expressão gênica de IL-6, indicando um possível efeito pós transcricional. Esses achados contribuem para aumentar o conhecimento acerca dos mecanismos bioquímicos e moleculares da hiperglicemia e suas complicações, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas coadjuvantes para o tratamento do DM2.

Palavras chave: inflamação; estresse oxidativo; produtos naturais; hiperglicemia; antioxidantes

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado pela incapacidade de direcionar a glicose para os tecidos, por conta da insuficiente produção de insulina. O número de pessoas afetadas pelo DM é maior nos países em desenvolvimento, afetando indivíduos de todas as faixas etárias (NAM HAN CHO, 2017). Os fatores de risco para a doença são diversos e incluem uma alimentação inadequada. Consequentemente, observa-se desregulação no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, especialmente ao nível do endotélio vascular (INCALZA et al., 2018).

No DM elevadas quantidades de glicose contribuem para aumentar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) levando ao estresse oxidativo e consequente danos aos tecidos (SZENDROEDI; PHIELIX; RODEN, 2011). A disfunção mitocondrial pode levar a uma produção descontrolada de ERO pela Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) e desregulação do balanço energético, acarretando em complicações microvasculares e macrovasculares (BROWNLEE, 2001), além de inflamação crônica (DO PRADO *et al.*, 2009). Todos esses desfechos são observados em pacientes diabéticos, os quais, mesmo medicados, continuam a apresentar tais complicações (“memória metabólica”) (TESTA *et al.*, 2017). A identificação de potenciais alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento para essa condição são necessários. Nesse cenário, os produtos naturais vem se destacando.

A Pitaya, *Hylocereus spp.*, é uma cactácea frutífera originária das Américas, popularmente conhecida como “Fruta-Dragão”(APARECIDA RIBEIRO NEPOMOCENO *et al.*, 2019). Possui flores brancas, hermafroditas, as quais dão origem aos frutos. Os frutos apresentam diferentes colorações de polpa dependendo da espécie, podendo ser branca, amarela ou rosa/vermelha, possuindo características químicas e nutricionais distintas (CRISTIANE ANDRÉA DE *et al.*, 2013).

A pitaya da polpa vermelha (*Hylocereus lemairei* sin. *polyrhizus* (Hook.) Britton & Rose) vêm gerando interesse da indústria nutracêutica e farmacêutica, principalmente pela presença de compostos fenólicos em sua composição, especialmente antocianinas (ESQUIVEL; ARAYA QUESADA, 2012). As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonoides e possuem diversos efeitos na saúde humana, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006) e antidiabética (HADI *et al.*, 2012; JOSHI; PRABHAKAR, 2020).

Especialmente em relação à sua atividade antidiabética, uma revisão sistemática e meta-análise resumiram dados de ensaios clínicos randomizados que demonstraram efeitos benéficos da pitaya na prevenção do diabetes (POOLSUP; SUKSOMBOON; PAW, 2017). Fadlilah e Sucipto (FADLILAH *et al.*, 2020) investigaram os efeitos da ingestão de pitaya vermelha na glicemia de estudantes após o consumo excessivo de alimentos, tendo encontrado uma redução significativa nos níveis de açúcar no sangue em jejum. Apesar destas evidências, os mecanismos bioquímico-moleculares envolvidos no seu efeito terapêutico são, até ao momento, desconhecidos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de extratos de casca ou polpa de pitaya vermelha em células endoteliais EA.hy926 submetidas a uma sobrecarga de glicose, mimetizando um microambiente “tipo-diabético”.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular e tratamentos

Células endoteliais (EA.hy926; BCRJ®, código 0345) foram cultivadas utilizando meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina-estreptomicina em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram cultivadas em frascos de 75cm², expostas a uma alta concentração de glicose (35mM) e tratadas com extrato de casca ou polpa de pitaya por 24 horas.

A concentração de glicose (35mM) foi validada em nosso estudo anterior (CERBARO *et al.*, 2020). As concentrações seguras dos extratos utilizados frente a glicose foram definidas a partir de testes prévios, sendo utilizada a concentração efetiva de 1 µg/mL. Para controle tipo-normoglicêmico foi utilizado meio DMEM contendo 25mM de glicose, condição na qual as células estão aclimatadas. O tempo de exposição aos extratos e/ou glicose foi de 24 horas.

Avaliação de marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

A peroxidação lipídica foi avaliada pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (WILLS, 1966). O reagente 1,1,3,3-tetra metoxipropano foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em nmol TMP/mg de proteína. A atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi medida com base na taxa de decomposição de H₂O₂ a 30 °C por 1 min a 240 nm (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos como UCAT/mg de proteína. A enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com a oxidação da adrenalina pelo radical superóxido (O₂^{•-}) (BANNISTER; CALABRESE, 1987). Os resultados foram expressos em USOD/mg de proteína. O teor de proteína sulfidrila (-SH) foi determinado por uma reação com ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), e os resultados foram expressos em nmol DTNB/mg de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001). O conteúdo total de proteína foi determinado utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY et al., 1951). Todas as absorbâncias foram medidas num espectrofotômetro modelo UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Avaliação de marcadores inflamatórios Expressão da proteína COX-2

A análise foi realizada utilizando um anticorpo primário conjugado com peroxidase para a proteína COX-2 (sc-376861) adquirida da Santa Cruz Biotechnology. O lisado celular foi ressuspenso em tampão de amostra (2% SDS, 2-beta-mercaptoetanol 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e Tris-HCL 0,1M, pH 6,8), fervido a 100°C e depois resfriado. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) e depois transferidas para membranas ativadas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). O bloqueio da membrana foi realizado com leite desnatado a 5% por 60 min, seguido de incubação por 2h com o anticorpo primário (1:1000). As bandas foram capturadas utilizando o equipamento Molecular Imager ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences) e as comparações foram realizadas utilizando o software Image-J 1.45. A expressão relativa da proteína foi comparada com GAPDH (4670T; Cell Signaling Technology) conjugada com peroxidase (1:2000; 1h) (BRANCO et al., 2015).

Expressão do gene IL-6

Após os tratamentos, o RNA total foi extraído utilizando o Reagente TRI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). O RNA foi quantificado usando um NanoDrop Lite® (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Então, a quantidade de RNA foi normalizada entre os grupos de tratamentos. DNA complementar (cDNA) foi produzido usando o kit de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação da expressão gênica para IL-6 foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qRT-PCR) e usando um kit GoTaq® qPCR Master (Promega, Madison, WI, EUA). Os iniciadores de IL-6 foram: Forward – 5'TACCCCCAGGAGAAGATTCCA3' – Reverse – 5' CCGTCGAGGATGTACCGAATT3'-. Os ciclos qRT-PCR foram: 1) 50 °C por 120 segundos; 2) 95°C durante 120 segundos; 3) 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos seguidos de 60 °C por 30 minutos. A beta-actina foi usada para normalização dos resultados. Os primers da beta-actina foram: forward - 5' CTGGCACCACACCTTCTAC 3'- ; reverse: 5'- GGGCACAGTGTGGGTGAC 3'-.

Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SPSS 22.0 para Windows (SPSS inc., Chicago, IL). As variáveis foram testadas quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram

calculadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a atividade de SOD e CAT, que desempenham papel importante na regulação dos níveis de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente, gerados, principalmente nas mitocôndrias. Ademais, foram avaliados os níveis de -SH e de TBARS (Tabela 1).

Observou-se que a glicose elevada esgotou a atividade enzimática tanto da SOD quanto da CAT, bem como o teor de SH (marcador de defesa antioxidante não enzimática). Todavia, as defesas foram normalizadas com o tratamento com os extratos, porém, não retornou aos níveis basais. Paralelamente, foi observado um aumento nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e os extratos foram capazes de remediar, retornando aos níveis observados no controle.

Tabela 1. Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células endoteliais humanas tratadas com extratos de pitaya na presença ou ausência de glicose.

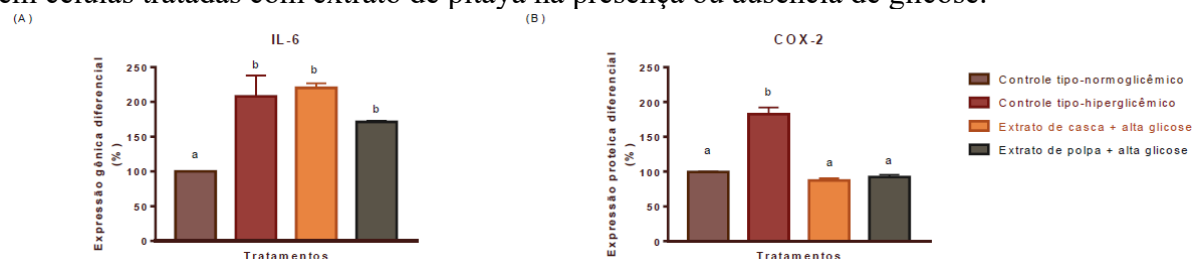
	TBARS (nmol TMP/mg proteína)	Proteína sulfidril (nmol DTNB/mg proteína)	Atividade de SOD (USOD/mg proteína)	Atividade de CAT (UCAT/mg proteína)
Controle tipo- normoglicêmico	0.99 ± 0.18 ^a	4.08 ± 0.04 ^a	16.23 ± 3.65 ^a	10.31 ± 0.94 ^a
Controle tipo- hiperglicêmico	1.31 ± 0.09 ^b	3.03 ± 0.04 ^b	8.30 ± 1.09 ^b	6.88 ± 0.57 ^b
Extrato de casca + alta glicose	0.88 ± 0.01 ^a	2.98 ± 0.20 ^b	9.07 ± 0.15 ^{bc}	12.75 ± 0.38 ^c
Extrato de polpa + alta glicose	0.81 ± 0.09 ^a	2.92 ± 0.66 ^b	10.13 ± 0.06 ^{bc}	14.50 ± 0.57 ^d

Legenda: TMP = 1,1,3,3-tetrametoxipropano hidrolisado; USOD = quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de oxidação da epinefrina em 50%; UCAT = quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H_2O_2 em 1 min. Os resultados são expressos como média ± DP. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os tratamentos conforme análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de Tukey. A significância estatística foi determinada em $p < 0,05$.

O estresse oxidativo está ligado a uma diminuição na ação da SOD e CAT e pode afetar a eliminação de ERO medida pela peroxidação lipídica. (JAMAL GILANI et al., 2021) relataram que ratos diabéticos apresentavam níveis mais elevados de TBARS, acompanhados de redução nas atividades de SOD e CAT quando comparados a ratos saudáveis. Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes diabéticos e por (BUDIN et al., 2009) e (JAISWAL et al., 2013) em ratos diabéticos.

A exposição à glicose elevada duplicou a expressão relativa de IL-6 em comparação ao controle tipo-normoglicêmico. Ambos os extratos não foram capazes de reverter essa alteração (Figura 1 A). Com relação a expressão proteica de COX-2, houve um aumento de cerca de 80% induzido pela sobrecarga de glicose (Figura 1 B) quando comparado ao controle tipo-normoglicêmico. O extrato de casca e polpa reduziram significativamente esse parâmetro, retornando aos níveis basais.

Figura 1. Expressão gênica e proteica relativa de interleucina-6 (A) e ciclooxigenase-2 (B) em células tratadas com extrato de pitaya na presença ou ausência de glicose.



A inflamação crônica descrita no DM está associada com níveis aumentados do fator de transcrição nuclear NF- κ B, da proteína inflamatória ciclooxigenase 2 (COX-2), da super produção de ON pela enzima óxido nítrico induzível (iNOS) (TARNOWSKI et al., 2017) e dos níveis de IL-6. De fato, foi relatado níveis aumentados de expressão da isoenzima COX-2 e subsequente produção de mensageiros inflamatórios em mulheres portadoras de DM gestacional (LIONG; LAPPAS, 2015). Achados de (LEE et al., 2019) relatam que o aumento de IL-6 afeta negativamente a cicatrização de feridas em camundongos expostos a alta glicose. Um estudo realizado por (ROBINSON et al., 2020) demonstrou que a inibição da IL-6 em ratos diabéticos contribuiu para diminuir os níveis de estresse oxidativo e inflamação em células endoteliais de retina.

4 CONCLUSÃO

Os extratos de casca e polpa de pitaya normalizaram os distúrbios oxidativo-inflamatórios em modelo tipo-diabético. Os resultados encontrados podem ser explicados, ao menos em parte, pela atividade antioxidante e anti-inflamatória exibida pelos compostos presentes na matriz química desse fruto. No entanto, são necessárias mais investigações para garantir que estes efeitos possam ser extrapolados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141–145, 2001.
- APARECIDA RIBEIRO NEPOMOCENO, T. et al. O Cultivo E a Comercialização De Pitaya (Hylocereus Sp.) No Brasil, Com Enfoque No Estado Do Paraná. p. 17–20, 2019.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BRANCO, C. D. S. et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEp-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.
- BROWNLEE, M. biology of diabetic complications. v. 414, n. December, p. 813–820, 2001.
- BUDIN, S. B. et al. The effects of palm oil tocotrienol-rich fraction supplementation on biochemical parameters, oxidative stress and the vascular wall of streptozotocin-induced

diabetic rats. **Clinics**, v. 64, n. 3, p. 235–244, 2009.

CERBARO, A. F. et al. Grape seed proanthocyanidins improves mitochondrial function and reduces oxidative stress through an increase in sirtuin 3 expression in EA. hy926 cells in high glucose condition. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 3319–3330, 2020.

CRISTIANE ANDRÉA DE, L. et al. Características físico-químicas, polifenóis e flavonoides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 565–570, 2013.

ESQUIVEL, P.; ARAYA QUESADA, Y. Características del fruto de la pitahaya (Hylocereus sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria Pitahaya (Hylocereus sp.): fruit characteristics and its potential use in the food industry. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 113–129, 2012.

FADLILAH, S. et al. Dragon Fruit (Hylocereuspolyrhizus) Effectively Reduces Fasting Blood Sugar Levels and Blood Pressure on Excessive Nutritional Status. **Pakistan Journal of Medical and Health Sciences**, v. 14, n. 2, p. 1405–1412, 2020.

HADI, N. A. et al. Effects of Red Pitaya Fruit (Hylocereus Polyrhizus) Consumption on Blood Glucose Level and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Subjects. **Borneo Science**, n. September, p. 127–142, 2012.

INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, n. April 2017, p. 1–19, 2018.

JAISWAL, D. et al. Role of Moringa oleifera in regulation of diabetes-induced oxidative stress. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 6, p. 426–432, 2013.

JAMAL GILANI, S. et al. Fustin ameliorates hyperglycemia in streptozotocin induced type-2 diabetes via modulating glutathione/Superoxide dismutase/Catalase expressions, suppress lipid peroxidation and regulates histopathological changes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 6963–6971, 2021.

JOSHI, M.; PRABHAKAR, B. Phytoconstituents and pharmaco-therapeutic benefits of pitaya: A wonder fruit. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 7, 2020.

LEE, E. G. et al. Interleukin 6 function in the skin and isolated keratinocytes is modulated by hyperglycemia. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

LIONG, S.; LAPPAS, M. Activation of AMPK improves inflammation and insulin resistance in adipose tissue and skeletal muscle from pregnant women. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 703–717, 2015.

LODI, K. Z. et al. Jo u rn a l P re-proof. **PharmaNutrition**, n. 2023, p. 100356, [s.d.].

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. Antocianinas Em Suco De Uva: Composição E Estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59–82, 2006.

NAM HAN CHO. **Eighth edition 2017**. [s.l: s.n.].

POOLSUP, N.; SUKSOMBOON, N.; PAW, N. J. Effect of dragon fruit on glycemic control in prediabetes and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–12, 2017.

ROBINSON, R. et al. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. **Redox Biology**, v. 34, n. March, p. 101574, 2020.

SZENDROEDI, J.; PHIELIX, E.; RODEN, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 2, p. 92– 103, 2011.

TARNOWSKI, M. et al. COX2 and NOS3 gene polymorphisms in women with gestational diabetes. **Journal of Gene Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1–7, 2017.

TESTA, R. et al. The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.

WILLS, E. D. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. **The Biochemical journal**, v. 99, n. 3, p. 667–676, 1966.