

EFEITO DO EXTRATO DE *CURCUMA LONGA* NA PROLIFERAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS INDUZIDAS A HIPÓXIA

Palavras-Chave: *CURCUMA LONGA*, CÉLULAS ENDOTELIAIS, ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Autores(as):

JULIA WANG JORGE, IB – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. CRISTINA PONTES VICENTE (orientadora), IB - UNICAMP

Prof Dr CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK(colaborador) IB, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As células endoteliais são as principais células vasculares responsáveis pela hemostasia e trombose. Doenças como a hipertensão, hipercolesterolemia e o diabetes iniciam um estado inflamatório nestas células que pode levar a lesão da parede arterial e a hipóxia tecidual. As lesões arteriais causadas pela aterosclerose e outras doenças ativam as células endoteliais e desencadeiam uma resposta inflamatória tornando o endotélio aderente, pró-inflamatório e pró-trombótico, induzindo a trombose, e levam a um estado em que a concentração de oxigênio disponível é insuficiente para a manutenção das funções ótimas do endotélio. O tratamento com drogas antioxidantes e antitrombóticas pode prevenir este estado inflamatório, levando a recuperação das células endoteliais, protegendo estas células contra as lesões e estimulando a regeneração vascular e a neovascularização.

A *Curcuma longa* (CL) é um composto fenólico obtido de plantas da família *Zingiberaceae* (gingibre), cujo componente principal é a curcumina. A curcumina possui atividade antioxidante e antitrombótica e tem sido utilizada na medicina asiática durante séculos. O tratamento com a curcumina ou seu extrato pode prevenir o estado inflamatório nas células e estimular a recuperação da parede vascular.

Este trabalho visa estudar o efeito da hipóxia, induzida pelo cloreto de cobalto (CoCl_2) (FELIZARDO, 2015), associado ou não ao tratamento com o extrato de *Curcuma longa*, curcuminoide com propriedades anti-oxidantes, anti-trombóticas e anti-inflamatórias (KOCADAM, et. al., 2017), na morfologia, proliferação e adesão celular, em sua ação na produção de espécies reativas de oxigênio, na presença da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) e na atividades destas células tratadas na coagulação sanguínea *in vitro*.

METODOLOGIA:

1. Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC)

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) são um modelo celular amplamente utilizados para estudo da função de células endoteliais adultas e são isoladas do cordão umbilical humano com alta taxa de sucesso (MEDINA-LEYTE, et. al., 2020).

2. Drogas a serem utilizadas

Cloreto de cobalto (Sigma-Aldrich), extrato de cúrcuma 95%, Purifarma (com 95% de curcuminóides). O extrato de cúrcuma foi dissolvido em DMSO, sendo utilizado em cultura 0,5% de DMSO em concentração final.

3. Grupos experimentais a serem testados

1) Proliferação e morfologia:

- a) Controle: células HUVEC cultivadas em Meio Dulbecco com 10% de soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina
- b) Células tratadas com CoCl_2 em diferentes concentrações (0, 75, 100, 125, 150, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$)
- c) Células tratadas com curcuma longa (CL) por 24h em diferentes concentrações (2,5; 5; 7,5; e 10 $\mu\text{g/mL}$)
- d) Células tratadas com 125 $\mu\text{g/mL}$ cloreto de cobalto (CoCl_2) por 24h e Curcuma longa (CL) por 24h em diferentes concentrações(2,5; 5; 7,5; e 10 $\mu\text{g/mL}$)

2) Demais experimentos:

- a) Controle: células HUVEC proliferadas com meio de cultura sem tratamento com cloreto de cobalto e curcuma longa (extrato e purificada), apenas 0,5% DMSO
- b) 125 $\mu\text{g/mL}$ de CoCl_2
- c) 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de curcuma longa (extrato e purificada)
- d) 125 $\mu\text{g/mL}$ de CoCl_2 com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de curcuma longa (concentrações a serem determinadas de acordo com proliferação e morfologia)

4. Proliferação e morfologia celular

Foram utilizadas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina. As culturas foram mantidas em incubadoras com 5% de CO_2 e temperatura 37°C. As células foram tratadas como descrito anteriormente e posteriormente incubadas 30 min com sulforodamina G, o excesso de corante foi lavado e o aderido a monocamada eluído com 10 μM de Trizma Base. A placa foi então lida a 595 nm em leitor de elisa. Para a morfologia, as células foram tratadas e depois fixadas com formalina 10 % por 20 min, coradas com hematoxilina e eosina e as imagens analisadas por microscopia de luz em aumento de 20X.

5. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), as células (1000 ou 5000 células) foram tratadas como descrito e incubadas com 50 μl de plasma humano a 37°C e incubado com cefalina por 2 min, foram adicionados 50 μl de cálcio e o tempo de coagulação analisado em coagulômetro Clot, utilizando-se o Kit TTPA Clot, de acordo com as instruções do fabricante.

6. Análise da atividade de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), um substrato fluorogênico indicativo da presença de EROs . As células tratadas com as diferentes drogas foram tratadas por 30 min com DCFDA, o excesso foi lavado e as células analisadas por microscopia de fluorescência a 488 nm.

7. Análise de expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) por imunohistoquímica. As células tratadas foram incubadas com anticorpo anti-eNOS e foi utilizado anticorpo secundário FITC e as células analisadas por por microscopia de fluorescência a 488 nm.

8. Análise estatística

Será utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's no caso de dados não paramétricos, e as análises serão realizadas por meio do programa PAST. Será considerado 5% de nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os grupos de tratamento com cloreto de cobalto mostram que a concentração utilizada nos demais experimentos, 125µg/mL, reduz a proliferação das células HUVEC em 20%, enquanto concentrações maiores levam à morte celular, como indicado na figura 1.

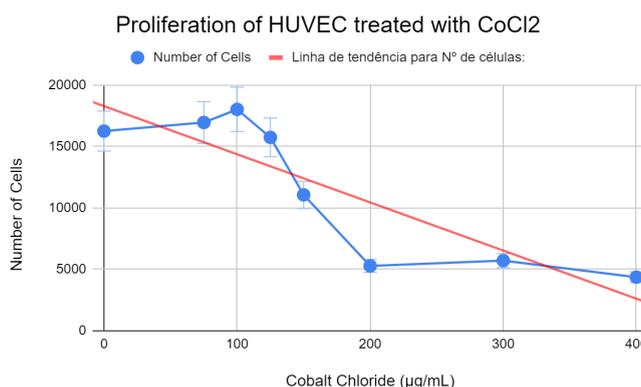


Figura 1: Proliferação de células HUVEC tratadas com diferentes concentrações de CoCl₂. Análise realizada utilizando sulforodamina B e a absorbância determinada por leitor de Elisa a 595nm.

Os experimentos de proliferação e morfologia indicam que o extrato de Curcuma longa contribui para a recuperação da morfologia similar ao controle e aumentando sua proliferação em 30% após tratamento com cloreto de cobalto e indução de hipóxia. Comparado ao grupo controle, o grupo tratado com 2,5µg/mL de Curcuma longa exibiu um aumento significativo de 11% ($p < 0,05$) na proliferação, enquanto os demais grupos, tratados com concentrações maiores da droga, tiveram uma redução significativa na proliferação. Em relação ao grupo tratado com cloreto de cobalto, células em hipóxia tratadas com 2,5µg/mL de Curcuma longa também demonstraram aumento significativo na proliferação, enquanto os demais grupos não tiveram mudanças significativas (Figura 2). A morfologia das células tratadas com Curcuma longa mantém-se semelhante ao controle, e sua proliferação é maior de 60% do que a dos grupos tratados apenas com cloreto de cobalto, indicando que sua ação antioxidante e anti-inflamatória contribui para a recuperação das células após indução da hipóxia

(Figura 3).

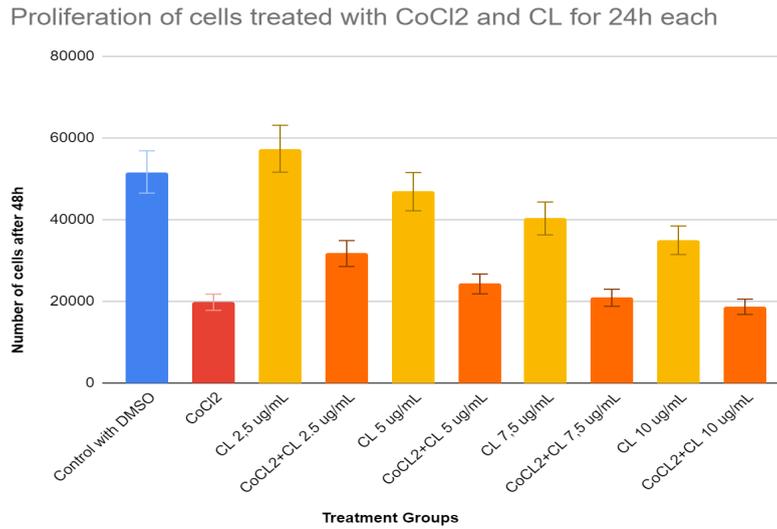


Figura 2: Proliferação de células tratadas 24h com 125µg/mL de CoCl₂ e 24 horas com as diferentes concentrações de Curcuma longa. Proliferação realizada utilizando sulforodamina B 0,4% a 495 nm.



Figura 3: Morfologia das células coradas com hematoxilina e eosina. (A) controle; (B) 125µg/mL de CoCl₂, (C) 125µg/mL de CoCl₂ + 2,5µg/mL de CL, aumento em 10x.

Em relação ao efeito das células sobre a coagulação sanguínea, os resultados indicam a ausência de alterações significativas ($p < 0,05$), a incubação com as células pré-tratadas com os diferentes tratamentos não afeta o tempo de coagulação com 1000 células (Figura 4). Com 5000 células ocorre uma diminuição significativa do tempo de coagulação, mas não existem diferenças entre os tratamentos. Indicando que o número de células, mas não os diferentes podem alterar a coagulação.

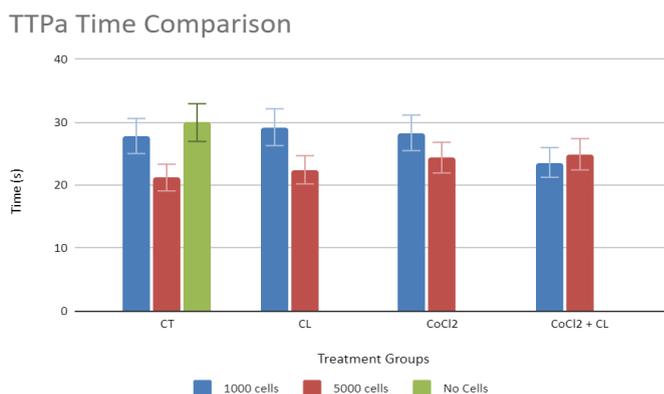


Figura 4: Tempos de coagulação de diferentes grupos de tratamento utilizando 1000 ou 5000 células.

A análise da presença de eNOs foi feita por imunofluorescência, as células foram marcadas por anticorpo anti eNOS e foi utilizado o anticorpo secundário anti-FITC e os núcleos marcados com DAPI. A partir das imagens, pudemos observar que tanto cloreto de cobalto quanto Curcuma longa aumentam a intensidade de fluorescência em comparação ao controle, mas tratamentos com Curcuma longa não apresentaram fluorescência tão intensa quanto o grupo tratado apenas com cloreto de cobalto

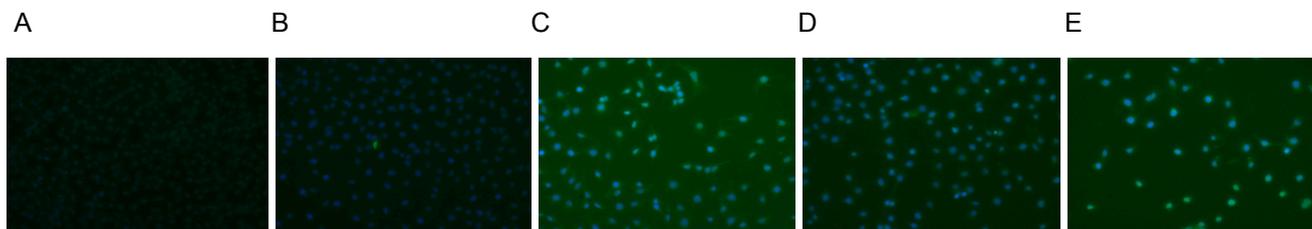


Figura 5: Determinação da presença da eNOS por imunofluorescência. (A) branco; (B) controle; (C) 125µg/mL de CoCl₂; (D) 2,5µg/mL de CL; (E) 125µg/mL de CoCl₂ + 2,5µg/mL de CL, aumento 20x.

Ainda está sendo realizada a análise dos dados obtidos a partir dos experimentos de imunofluorescência das células HUVEC em cloreto de cobalto e Curcuma longa, marcando eNOS,. Os programas utilizados são o ImageJ e Prisma.

CONCLUSÕES:

Os experimentos de proliferação e morfologia indicam que, segundo Akram, et. al. (2010), o extrato de Curcuma longa exerce um efeito positivo sobre as células, contribuindo para a recuperação da similar ao controle e aumentando sua proliferação após tratamento com cloreto de cobalto e indução de hipóxia. A morfologia das células tratadas com Curcuma longa mantém-se semelhante ao controle, e sua proliferação é maior do que a dos grupos tratados apenas com cloreto de cobalto, indicando que sua ação antioxidante e anti-inflamatória (KOCAADAM, et. al., 2017) contribui para a recuperação das células pós evento hipóxico. Além disso, os tratamentos realizados nas células HUVEC não afetam o tempo de coagulação do plasma sanguíneo.

BIBLIOGRAFIA

- AKRAM, Muhammad et al. Curcuma longa and curcumin: a review article. Rom J Biol Plant Biol, v. 55, n. 2, p. 65-70, 2010. https://www.researchgate.net/publication/284415430_Curcuma_longa_and_Curcumin_A_review_article
- AZEREDO, Patrícia dos Santos, Curcuma Longa e Ginkgo Biloba na ativação de células endoteliais mediada por TNF- α in vitro e agregação plaquetária, Tese (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 15 de julho, 2022
- FELIZARDO, Tatiana Raquel Lopes Esteves Rafael. Modelo in vitro para o estudo da isquemia e reperfusão cardíacas. 2015. Tese de Doutorado. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/35684>
- KOCAADAM, Betül; ŞANLIER, Nevin. Curcumin, an active component of turmeric (Curcuma longa), and its effects on health. Critical reviews in food science and nutrition, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>
- MEDINA-LEYTE, Diana J. et al. Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. Applied Sciences, v. 10, n. 3, p. 938, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10030938>