

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* na proliferação e na produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais humanas

Palavras-Chave: *Ginkgo biloba*, células endoteliais, espécies reativas de oxigênio

Autoras:

Thaís Fontes Milz Casal (autora) - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Cristina Pontes Vicente (orientadora) - UNICAMP

Julia Wang Jorge (co-autora) - UNICAMP

Mestranda Bianca Santiago Alves (co-autora) - UNICAMP

Doutoranda Patrícia dos Santos Azeredo (co-autora) - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Endotélio vascular

As células endoteliais, constituintes da camada mais interna do vaso sanguíneo, produzem moléculas com diferentes funções e expressam diversas moléculas de superfície, tanto de adesão quanto receptores, que se alteram em resposta a diferentes estímulos, tendo papel crucial na homeostasia vascular (1). O tecido endotelial tem participação importante na regulação da estrutura e do tônus vascular, e na manutenção da homeostasia vascular, tendo função, por exemplo, na supressão do desenvolvimento de trombose, da inflamação, da coagulação e da hipertrofia descontrolada (2). Esse tecido é responsável, ainda, pelo controle da contração e do relaxamento do vaso, através da ação de um gás endógeno de meia-vida curta, o óxido nítrico (NO; *nitric oxide*) (1). O NO, agente anti-inflamatório e anti-trombótico produzido continuamente pelas CE através da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS; *endothelial nitric oxide synthase*), pode promover a vasodilatação, além de inibir a adesão leucocitária, a formação de trombos, a expressão de proteínas pró-trombóticas, a proliferação inadequada de células musculares lisas e limitar a agregação plaquetária (3, 2, e 1).

Quando há lesão ou estimulação do tecido endotelial, as suas células sofrem ativação (ativação endotelial), exibindo novas moléculas de superfície e liberando agentes pró-trombogênicos (1), fatores de crescimento e o fator de ativação de plaquetas, que participa no processo de adesão destas células ao endotélio (4). Esse processo culmina na disfunção endotelial (3), além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e da inativação dos sistemas que as neutralizam (5), tornando

mais propenso o surgimento de doenças vasculares, como a aterosclerose (2). Muitos dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como a hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e a diabetes, são alguns dos responsáveis por essa disfunção que torna o endotélio um ambiente pró-trombótico e inflamatório, podendo levar à formação de trombos e à hipóxia.

As EROS, como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH°) são produzidas em muitos dos processos metabólicos dependentes de oxigênio, principalmente na mitocôndria (6). Em baixas concentrações, exercem papéis importantes para o funcionamento celular e, em altas, podem reagir com moléculas biológicas e promover danos celulares relacionados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças, e à morte celular (7). O aumento da concentração de EROS culmina na degradação exacerbada de NO e na redução da síntese desse gás pela eNOS, que é influenciada por diversos fatores, como a hipóxia, resultando na diminuição da biodisponibilidade de NO (8), e contribuindo para a disfunção endotelial.

A condição de hipóxia, por sua vez, ocorre quando há um desbalanço entre o consumo e a disponibilidade de oxigênio no meio, em que a concentração do oxigênio disponível cai a ponto de não ser suficiente para manter o funcionamento normal e a vida das células atingidas (9). Em doenças vasculares, a hipóxia ocorre devido a problemas na distribuição do fluxo sanguíneo, como em situações de formação de trombos após lesões no endotélio (10).

Ginkgo biloba

Ginkgo biloba (GB) é uma árvore nativa da China, Japão e Coreia, pertencente à família Ginkgoaceae. Os extratos de suas folhas fazem parte de produtos medicinais, além de alimentos e suplementos, devido à presença de compostos bioativos na planta, como flavonoides, terpenoides, biflavonoides e ácidos orgânicos. Dentro dessas classes de compostos bioativos, os que estão presentes em maior quantidade são os ginkgolídeos, o bilobalido, a quercetina e o canferol. O extrato padrão EGb 761, principal extrato comercializado como agente fitoterápico e vendido comercialmente com sua composição caracterizada quimicamente e aprovada pela ANVISA, contém 24% de flavonóides e 6% de terpenóides (ginkgolídeos A e B, e bilobalido), os quais se tornam biodisponíveis após ingestão do extrato. Este fitoterápico é muito utilizado, há centenas de anos, para o tratamento de disfunções cardiovasculares e neurológicas devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, neuro e cardioprotetoras, antitumorais e imunomodulatórias (11 e 12).

OBJETIVOS

Este projeto objetivou estudar, nas células endoteliais submetidas à hipóxia, os efeitos do extrato padrão EGb 761 de *Ginkgo biloba* (GB), um fitoterápico anti-inflamatório e antioxidante, na proliferação celular, na produção de EROS, na expressão da eNOS, na indução da apoptose celular, na produção de micronúcleos e na formação de trombos *in vitro*.

METODOLOGIA

Para os ensaios, utilizamos as células HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical humano), o cloreto de cobalto ($CoCl_2$) como agente indutor da hipóxia, e o GB. Foram verificadas a proliferação celular por análise por sulforodamina B e MTT, morfologia por coloração com hematoxilina e eosina e microscopia de contraste de fase a produção de EROS a partir de substrato cromogênicos e a determinação da expressão de eNOS por imunocitoquímica. Ademais, as células tratadas foram utilizadas para análises de indução de formação de trombo *in vitro* através de ensaios de Tempo de Tromboplastina ativada (TTPa). Por fim, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's para os dados não paramétricos. Os níveis de significância foram considerados de 5% e os resultados foram apresentados como média±desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa PAST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultados, até o momento, pudemos observar que o cloreto de cobalto reduz a proliferação celular, assim como é mostrado no estudo de Felizardo, 2015. A proliferação das HUVEC com 125 $\mu\text{g/ml}$ de $CoCl_2$ por 24 horas diminuiu em quase 10% em relação ao controle e, a partir desta concentração, o $CoCl_2$ começa a ser citotóxico para a cultura. Por outro lado, análises citoquímicas mostraram que, enquanto o $CoCl_2$ altera a morfologia celular, o tratamento com GB por 24 horas, 24 horas após $CoCl_2$, recuperou a morfologia celular de forma similar ao controle, revelando as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do GB, como apontam Kong et al., 2020, e Marcocci et al., 1994. Analisamos, ainda, o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), incluindo-se diferentes quantidades das células HUVEC (tratadas com $CoCl_2$ e com $CoCl_2$ e GB) ao plasma humano para se determinar a influência destas células na formação de trombo *in vitro*. Pudemos observar que 10^3 e 5×10^3 células dos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas no tempo de coagulação. Por fim, foram realizados ensaios de imunofluorescência e de DCFDA que poderão nos revelar informações adicionais acerca das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do GB.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento se mostram promissores, principalmente em relação à capacidade de recuperação das células endoteliais tratadas com GB após condição de hipóxia. A determinação dos efeitos do GB nas células endoteliais induzidas à hipóxia resultantes dos demais ensaios projetados para serem realizados neste trabalho, como a análise da produção de micronúcleos, poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de recuperação do endotélio ativado pelo processo inflamatório induzido pelos fatores de risco envolvidos nas doenças cardiovasculares, além de poder ajudar a esclarecer o papel do GB na recuperação da parede dos vasos sanguíneos

neste processo. Em suma, o Ginkgo biloba demonstra propriedades benéficas no combate à inflamação e aos danos do estresse oxidativo, posicionando-se como um candidato promissor para a criação de tratamentos e métodos preventivos para várias doenças.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ROSS, M. H., WOJCIECH, P. **Histologia: texto e atlas** – 7. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. ISBN 9788527729871
- (2) LANDMESSER, U., HORNIG, B., DREXLER, H. **Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?**. *Circulation*, v. 109, n. 21_suppl_1, p. II-27-II-33, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f>
- (3) FLAMMER, A. J. *et al.* (2012). **The Assessment of Endothelial Function: From Research Into Clinical Practice**. *Circulation*, 126(6), 753–767. doi:10.1161/circulationaha.112.09
- (4) MICHIELS, C., ARNOULD, T., REMACLE, J. **Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1497, n. 1, p. 1-10, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(00)00041-0)
- (5) LI, H., HORKE, S., FÖRSTERMANN, U. **Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis**. *Atherosclerosis*, 237(1), 208–219, 2014 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001
- (6) ANDRADE, E. R. *et al.* **Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun de 2010. Disponível em www.cbra.org.br
- (7) BERGAMINI, C. *et al.* **Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage**. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1611–1626, 2004. doi:10.2174/1381612043384664
- (8) YUGAR-TOLEDO, J. C. *et al.* **Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial**. *Rev Bras Hipertens* vol, v. 22, n. 3, p. 84-92, 2015. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/881232/rbh_v22n3_84-92.pdf
- (9) GILANI, K., VAFAKHAH. **Hypoxia: A Review**. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)* Spring 2010 Vol.1, No.2 ISSN 2008-496X
- (10) LEACH, R. M., TREACHER, D. F. **ABC of oxygen: Oxygen transport---2. Tissue hypoxia**. *BMJ*, 317(7169), 1370–1373, 1998. doi:10.1136/bmj.317.7169.1370
- (11) BEWAL, T. *et al.* **Ginkgo biloba**. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 241–250, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-812491-8.00035-7
- (12) MUÑOS-SÁNCHEZ, J., CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E. **The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model**. *Journal of Applied Toxicology*, 2018. doi:10.1002/jat.3749

- (13) AZEREDO, P. S. **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 de 2022.
- (14) FELIZARDO, T. R. L. E. R. Modelo in vitro para o estudo da isquemia e reperfusão cardíacas. Tese de Doutorado, 2015. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/35684>
- (15) KONG, X. et al. (2020). Structural characterization of Ginkgo biloba L. leaves cyclopeptides and anti-inflammatory potency evaluation in human umbilical vein endothelial cells. *Phytochemistry Letters*, 39, 12–18. doi:10.1016/j.phytol.2020.06.012
- (16) MARCOCCI, L. et al. (1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods in Enzymology*. Vol. 234, 462-475. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34117-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34117-6)