

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS TRONCO PULPARES TRATADAS COM A FRAÇÃO LIPÍDICA DA ALGA *Gigartina skottsbergii*

LAÍS ANDRADE FERREIRA<sup>1</sup>; CAMILA PERELLÓ FERRÚA<sup>2</sup>; LAÍSA CAMERINI DA ROSA<sup>3</sup>; BRUNA SILVEIRA PACHECO<sup>4</sup>; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA<sup>5</sup>; FERNANDA NEDEL<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [laisandradeferreira@hotmail.com](mailto:laisandradeferreira@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Católica de Pelotas – [camila\\_perello@hotmail.com](mailto:camila_perello@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Católica de Pelotas – [lcamerinidarosa@gmail.com](mailto:lcamerinidarosa@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [pacheco.sbruna@gmail.com](mailto:pacheco.sbruna@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [claudiochemistry@gmail.com](mailto:claudiochemistry@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Católica de Pelotas – [fernanda.nedel@gmail.com](mailto:fernanda.nedel@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, células-tronco mesenquimais (CTM) consistem na principal ferramenta de estudos relacionados à engenharia tecidual e terapia celular (LIU *et al.*, 2016), podendo ser obtidas a partir de uma ampla gama de tecidos adultos, como a polpa dental. As primeiras células-tronco pulpares (CTP) a serem isoladas foram as de dentes permanentes (DPSCs). Essas células apresentam alta frequência de formação de colônias e alta taxa de proliferação *in vitro*, sendo segundo os resultados obtidos por Gronthos e colaboradores (2000), maiores do que as taxas identificadas em células tronco (CT) de outras origens, na época mais consolidadas (GRONTOSHOS *et al.*, 2000).

Pouco tempo após o isolamento das DPSCs, Miura e colaboradores (2003) identificaram e isolaram as células-tronco de polpa de dentes decíduos exfoliados (SHEDs). Esta descoberta mostrou-se extremamente relevante ao desenvolvimento de terapias baseadas em CT, já que sua obtenção acontece através de dentes naturalmente perdidos, consistindo em uma abordagem minimamente invasiva (MIURA *et al.*, 2003).

No que compete aos potenciais tratamentos baseados no uso de CT, demonstra-se válido investir em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (EO). Este fenômeno ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas em relação à capacidade de remoção dessas por parte do sistema antioxidante (MONAGHAN *et al.*, 2009), o que pode afetar a estrutura e o funcionamento de moléculas biológicas essenciais como o DNA, proteínas e lipídios, inibindo sua função normal, tornando-se necessário, então, reestabelecer esse equilíbrio, propiciando uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO *et al.*, 2007).

Dessa forma, visando contornar este problema, alguns estudos vêm investigando o uso de extratos naturais como potenciais antioxidantes (LI *et al.*, 2014). Neste aspecto as algas marinhas têm despertado interesse no meio científico, já que apresentam amplas propriedades relevantes a aplicações clínicas, como antivirais, antialérgicas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antioxidantes (TSAL & SUN, 2012). Além disso, as algas marinhas são constantemente expostas a elevadas concentrações de luz e oxigênio, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (ROCHA *et al.*, 2007), no entanto elas não parecem sofrer com EO, sugerindo a presença de mecanismos antioxidantes eficientes (MATSUKAWA *et al.*, 1997).

A *Gigartina skottsbergii* é uma alga marinha rodofícea e sua principal região de produção de biomassa localiza-se em Magalhães, no Chile (MANSILLA

*et al.*, 2012). Avaliando as características de ácidos graxos específicos em algas da Antártida e da região Ártica, Graeve e colaboradores (2002), identificaram diferentes taxas de lipídios em diversas espécies para utilizações como potenciais agentes terapêuticos. A análise da ordem gigartinales representada pela *G. skottsbergii* mostrou uma quantidade de 28,4% de ácido palmítico, 22,2% de ácido araquidônico (AA) e 25,2% de ácido eicosapentaenoico (EPA) (GRAEVE *et al.*, 2002).

A propriedade antioxidante *in vivo* do EPA foi evidenciada através da análise de pessoas que ingeriram EPA e que apresentaram regulação positiva de enzimas antioxidantes (MAHMOUDABADI & RAHBAR, 2014). Além disso, ensaios *in vitro* (VAN DEN ELSEN *et al.*, 2013) e *in vivo* (PALANISWAMY *et al.*, 2014) demonstraram diminuição de espécies reativas de oxigênio relacionada à administração de EPA, sugerindo potencial capacidade antioxidante da *G. skottsbergii*.

Assim, dado o potencial antioxidante da *G. skottsbergii* e a busca por abordagens capazes de controlar e reverter eficientemente o EO, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade do extrato lipídico desta alga em promover a manutenção ou melhoria da viabilidade celular sobre SHEDs e DPSCs após a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 2. METODOLOGIA

O extrato lipídico da alga *G. skottsbergii*, cedida pela instituição chilena Universidad de Magallanes, foi obtido, purificado e caracterizado mediante cooperação dos Programas de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas e em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

As células utilizadas nos ensaios *in vitro* foram as SHEDs e DPSCs, cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco/Mistura Nutriente F12 (DMEM/F-12), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 1% de aminoácidos não essenciais, sob temperatura de 37°C em condição de atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

A análise da capacidade de resposta das SHEDs e DPSCs, estimuladas pelo eludato da alga *G. skottsbergii*, mediante um insulto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada através do ensaio colorimétrico de MTT. As células foram semeadas em placas de 96 poços, em densidade de 2x10<sup>4</sup> células/poço e volume de 100 µL/poço. Após 24 horas de incubação foram acrescentados 100 µL do eludato obtido a partir da porção lipídica da alga *G. skottsbergii*, nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µg/mL, por 2 e 6 horas. Após esses intervalos de tempo, a cada poço foram acrescentados 100 µL de uma solução composta de meio de cultivo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações de 250 e 500 uM. Após 12 horas de contato, foram adicionados ao meio de cultivo 20 µL de MTT (5 mg de MTT/mL de meio de cultivo) por poço e incubado por 4 horas. Desprezou-se o líquido contido nos poços, adicionou-se 200 µL de DMSO e colocou-se as placas em shaker por 5 minutos a 150 rpm. A leitura da absorbância foi realizada em espectofotômetro sob comprimento de onda de 450 nm. Cabe destacar que todos os grupos foram analisados em quadruplicatas, no entanto a repetição do teste fora realizada, até o presente momento, apenas com as SHEDs, sendo os resultados obtidos com as DPSCs ainda preliminares.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De forma geral o tratamento com a fração lipídica da alga *G. skottsbergii* na concentração de 100 µg/mL durante 6 horas apresentou efeito positivo sobre a viabilidade das SHEDs e DPSCs submetidas ao EO, sugerindo uma possível propriedade protetora.

Os resultados obtidos utilizando as SHEDs, representados na Figura 1A, evidenciam, primeiramente, o impacto do EO, induzido por uma solução 250 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sobre a viabilidade do controle, já que houve diferença estatística significativa entre o controle que não sofreu a indução de estresse e aquele não tratado e insultado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, pode-se inferir que na concentração de 100 µg/mL o tratamento proposto apresentou efeito positivo sobre a viabilidade celular, já que não houve diferença estatística entre este grupo e o controle exposto somente ao meio de cultivo.

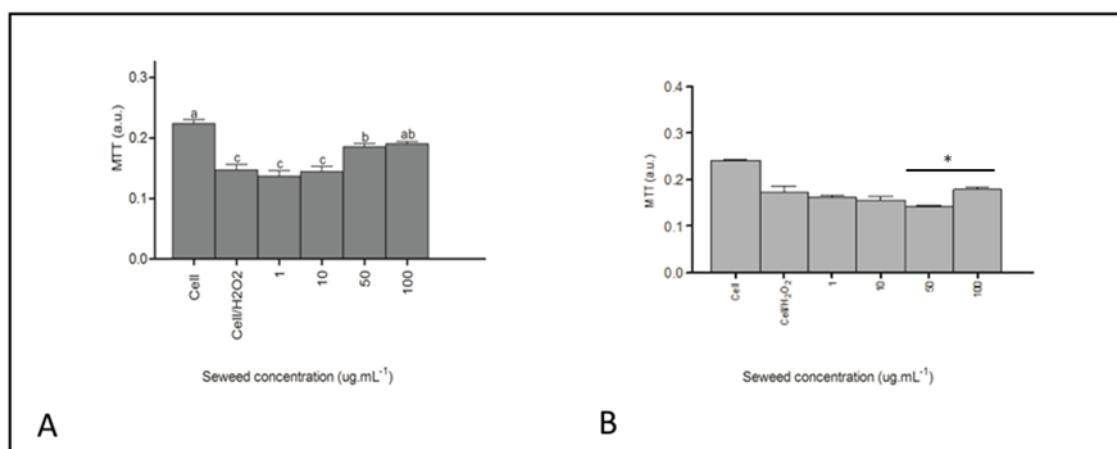


Figura 1. Gráfico de viabilidade celular – A) SHEDs ao serem submetidas a diferentes concentrações do extrato lipídico da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL) durante 6 horas, seguido de 12 horas de insulto com 250 uM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B) DPSCs ao serem submetidas a diferentes concentrações do extrato lipídico da alga *G. skottsbergii* (1, 10, 50, 100 ug/mL) durante 6 horas, seguido de 12 horas de insulto com 500 uM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*Diferença estatística determinada por valores de p<0.05 (one-way ANOVA e teste de Tukey).

Considerando os resultados positivos inicialmente obtidos com as SHEDs, o experimento foi repetido utilizando as DPSCs. Os resultados preliminares sugerem uma tendência de aumento da viabilidade das células quando tratadas com a maior concentração do extrato, conforme exposto na Figura 1B. No entanto, estes resultados ainda requerem confirmação através da repetição de testes. Além disso, uma diferença estatística significativa (p<0.05) entre os grupos tratados com as concentrações de 50 e 100 ug/mL pode ser indicativo de que maiores concentrações da fração lipídica de *G. skottsbergii* possa ter um efeito benéfico mais expressivo sobre as DPSCs quando submetidas ao EO.

A diferença entre as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas na indução de EO nos tipos celulares distintos justifica-se, principalmente, pelo fato de as DPSCs serem CTM em um estágio mais avançado de diferenciação quando comparadas com as SHEDs e, consequentemente, mais habituadas a alterações ambientais e mais resilientes no que se refere a condições hostis, enquanto que as SHEDs mostram-se mais sensíveis à exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta hipótese será avaliada em experimentos posteriores visando quantificar a expressão de enzimas antioxidantes nas CTP ao serem expostas a estas mesmas concentrações do agente estressor.

## 4. CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos, conclui-se que um tratamento das células com a fração lipídica da alga *G. skottsbergii* na concentração de 100 µg/mL durante 6 horas pode desempenhar um efeito protetor sobre as CTP em condições de EO.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRAEVE, M. et al. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae:indicators for phylogenetic and trophic relationships. **Marine ecology-progress series**, v. 231, p.67-74, 2002.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p.13625-136, 2000.
- LI, Y. et al. Lycopene protects bone marrow mesenchymal stem cells against ischemia-induced apoptosis *in vitro*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p.1625-1631, 2014.
- LIU, S. et al. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p.982-998, 2016.
- MAHMOUDABADI, M.M.S.; RAHBAR, A.R. Effect of EPA and vitamin C on superoxide dismutase, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity and malondialdehyde in type 2 diabetic patients. **Oman medical journal**, v. 29, n. 1, p.39-45, 2014.
- MANSILLA, A.; ÁVILA, M.; YOKOYA, N.S. Current knowledge on biotechnological interesting seaweeds from the Magellan Region Chile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p.760-767, 2012.
- MATSUKAWA, R. et al. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 1, p.29-35, 1997.
- MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p.5807-5812, 2003.
- MONAGHAN, P.; METCALFE, N.B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, v. 12, n. 1, p.75-92, 2009.
- PALANISWAMY, K.S.; VISHWANADHA, V.P.; SINGARAVELU, S.R. Fish oil rich in eicosapentaenoic acid protects against oxidative stress-related renal dysfunction induced by TCDD in Wistar rats. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 3, p.409-419, 2014.
- ROCHA, F.D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.631-639, 2007.
- TSAI, C.J.; SUN, P.B. Identification of sulfoglycolipid bioactivities and characteristic fatty acids of marine macroalgae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 34, p.8404-8410, 2012.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p.44-84, 2007.
- VAN DEN ELSEN, L.W. et al. Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells *in vitro* via inhibition of reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p.1821-1831, 2013.