TRABALHO COMPLETO
FULL PAPER
XXVIII SEPE
Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão
Teaching, Research and Extension Symposium
ISSN: 2316-9745
24 A 26 DE SETEMBRO DE 2024
SEPTEMBER 24th to 26th, 2024
UFN
https://doi.org/10.48195/sepe2024.28464

EFEITO DA (+)-CATEQUINA E CAFEÍNA EM CÉLULAS DA MICRÓGLIA EXPOSTAS A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

Thayline Correia da Silva[1]; Alice Kluge Borba[2]; Isadora Cassel Livinalli[3]; Ana Clara Zanini Bertoncelli[4]; Fernanda Krapf Saccol[5]; Tallys de Oliveira Mendes[6]; Camila Medianeira da Silva D'Ávila[7]; Francine Carla Cadoná[8]

RESUMO

A neuroinflamação, associada à geração de substâncias inflamatórias, desempenha um papel crucial na evolução de doenças neurodegenerativas. Da mesma forma, o diabetes mellitus está relacionado à neuroinflamação, neurodegeneração e comprometimento cognitivo. Pesquisas destacam a cafeína e (+)-catequina como potenciais agentes terapêuticos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi examinar o impacto da cafeína e (+)-catequina em células BV-2 expostas a altos níveis de glicose. Para isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações de glicose para determinar a IC50. Em seguida, a IC50 foi combinada com diversas concentrações dos compostos por 72 horas. Após a incubação, foram realizados testes para avaliar a proliferação celular e a produção de óxido nítrico (ON). Os resultados sugerem que os compostos reduziram os níveis de ON em todas as concentrações testadas. Além disso, promoveram um aumento significativo na proliferação celular. Os achados indicam que ambas podem atuar como agentes neuroprotetores em situações de altos níveis de glicose.

Palavras-chave: Estudo *in vitro*; Neuroinflamação; Produtos naturais.

ABSTRACT

Neuroinflammation, associated with the generation of inflammatory substances, plays a crucial role in the evolution of neurodegenerative diseases. Similarly, diabetes mellitus is linked to neuroinflammation, neurodegeneration and cognitive impairment. Research has highlighted caffeine and (+)-catechin as potential therapeutic agents. In this context, the aim of this study was to examine the impact of caffeine and (+)-catechin on BV-2 cells exposed to high levels of glucose. To do this, the cells were treated with different concentrations of glucose to determine the IC50. The IC50 was then combined with different concentrations of the compounds for 72 hours. After incubation, tests were carried out to assess cell proliferation and nitric oxide (NO) production. The results suggest that the compounds reduced NO levels at all the concentrations tested. In addition, they promoted a significant increase in cell proliferation. The findings indicate that both can act as neuroprotective agents in situations of high glucose levels.

Keywords: In vitro study; Neuroinflammation; Natural products.

[1] Autor/Apresentador - Instituição do(s) autor(es) e-mail(s).
[2] Demais Autores - Instituição do(s) autor(es) e-mail(s).

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS)

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é um dos principais fatores responsáveis pela neurodegeneração e está fortemente associada à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (EROs). A neuroinflamação ativa as células da micróglia, que desempenham um papel crucial na proteção neural ao eliminar células danificadas. Estas células identificam e respondem a agentes inflamatórios prejudiciais através de receptores na sua superfície. O processo ocorre por meio da apoptose ou ativação de receptores de quimiocinas e interferons (IFNs), que são componentes fundamentais do processo neuroinflamatório (TRAN *et al.,* 2022; SPENCER *et al.,* 2012).

Em contrapartida, o Diabetes Mellitus (DM) é uma enfermidade crônica causada pelo aumento de glicose no sangue, conhecido como hiperglicemia. Esta condição geralmente resulta da deficiência de insulina circulante ou da resistência à insulina em determinados tecidos. O DM tipo I está associado à falta de produção de insulina, enquanto o DM tipo II está relacionado com a resistência dos tecidos à ação da insulina. Observou-se que pacientes com Doença de Alzheimer (DA) apresentam disfunção da insulina similar à encontrada em pacientes com DM2. Suspeita-se que a redução do transporte de insulina para o cérebro e o mau funcionamento do receptor de insulina (RIs) estejam diretamente relacionados com essa patologia (DOBRICĂ *et al*., 2022; RAMTEKE *et al.*, 2019; TAKEISHI *et al.*, 2021).

O declínio cognitivo significativo ocorre ao longo de 12 anos, comparando indivíduos diabéticos e não diabéticos. Alguns fatores associados incluem a resistência dos tecidos à insulina. Esta resistência afeta a DA no metabolismo cerebral da glicose, diminuindo a Akt (proteína quinase B), que é importante para o metabolismo da glicose, e aumentando a ativação da GSK3β (glicogênio sintase quinase 3β). Esta última fosforila a proteína tau, abundante nos neurônios do SNC dos indivíduos com DA, levando à hiperfosforilação de tau e à neurodegeneração (CUKIERMAN-YAFFE *et al.,* 2009; PUGAZHENTHI *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas terapias que abordem a

interseção entre hiperglicemia e neuroinflamação é essencial. As plantas têm sido usadas como tratamentos alternativos para diversas doenças, o cacau por exemplo, é rico em moléculas bioativas como a (+)-catequina e cafeína. A (+)-catequina atua como um antioxidante e pode modificar a resposta imunológica de citocinas e da inflamação (BAHARUM *et al.*, 2016; MASKARINEC, 2009). Também age como relaxante muscular do sistema respiratório, vasodilatador e diurético, inibe a fosfodiesterase, estimula o SNC e bloqueia receptores de adenosina. Enquanto a cafeína aumenta a capacidade de captação de glicose pelo fígado (CADONÁ *et al*., 2022). A cafeína também possui efeito protetor contra a neuroinflamação e lesão neuronal (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011). Estudos *in vitro* são necessários para elucidar o papel da cafeína e da (+)-catequina na proteção contra o diabetes e a neuroinflamação. Portanto, esta pesquisa visa investigar o efeito desses compostos em células da micróglia expostas a altas concentrações de glicose.

2. METODOLOGIA

2.1 PREPARO DAS MOLÉCULAS

Um estudo anterior conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa determinou as concentrações das moléculas bioativas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). De acordo com Roggia *et al.* (2020), foi detectada uma presença significativa de cafeína e (+)-catequina na solução de cacau. As substâncias cafeína e (+)-catequina foram adquiridas da Merck (Sigma-Aldrich), garantindo a máxima qualidade. Foram pesadas 0,0001 g de cada uma e diluídas separadamente em 1 mL de PBS, assegurando a adequada homogeneidade das soluções. Em seguida, as diluições foram preparadas a partir das soluções estoque descritas previamente.

2.2 CULTURA CELULAR

As células da micróglia da linhagem BV-2 foram adquiridas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essas células foram cultivadas em meio de cultura apropriado, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, enriquecido com 1% de Hepes. As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de

CO2 e continuaram a ser cultivadas até atingirem a confluência desejada para a realização dos ensaios.

2.3 TRATAMENTO

As células BV-2, a uma densidade de 2x10^4 células/poço, foram expostas a diferentes concentrações de glicose (35, 60, 80, 100 e 200 mM) por um período de 72 horas, com o objetivo de determinar a IC50 (concentração inibitória média). A IC50 obtida foi então associada a diversas concentrações de (+)-catequina e cafeína (0,53; 1,58; 5,3; 15,8 e 53 µg/mL), também durante 72 horas. As concentrações das moléculas foram ajustadas proporcionalmente ao que foi encontrado na solução de cacau, conforme a análise por HPLC. As concentrações de glicose foram estabelecidas com base nos estudos de Machado (2019) e Lodi (2023).

2.4 ENSAIOS

2.4.1 Ensaio de proliferação e viabilidade celular – MTT

Para avaliar a viabilidade celular, utilizou-se o ensaio colorimétrico com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este sal tetrazólico, que tem uma coloração amarelada, é incorporado pelas células viáveis e reduzido nas mitocôndrias pela enzima desidrogenase (KANG *et al.,* 2010). Após a remoção do sobrenadante, a placa foi lavada duas vezes com tampão PBS para eliminar possíveis interferentes. Em seguida, PBS e MTT foram adicionados à placa para permitir a reação. A incubação ocorreu por 1 hora a 37 °C, e posteriormente, DMSO foi adicionado à placa. A leitura colorimétrica foi realizada a uma absorbância de 560 nm.

2.4.2 Determinação da produção de óxido nítrico

O ensaio de óxido nítrico (NO) baseia-se na detecção de nitrito orgânico na amostra analisada. Quando a amostra contém (NO^2), a adição do reagente de Griess resulta na formação de uma coloração rosada, indicando a presença de nitrito, que é então medida por meio de absorbância (NOH *et al.,* 2015). O sobrenadante da amostra foi adicionado, seguido do reagente de Griess. A incubação foi realizada por 15 minutos, e a leitura foi efetuada a uma absorbância de 540 nm.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida utilizando o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Dunnett, empregando o software GraphPad Prism 5.0 para a criação dos gráficos estatísticos. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 EFEITO CITOTÓXICO DA GLICOSE NAS BV-2 VIA AUMENTO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Após o tratamento com diferentes concentrações de glicose (35, 60, 80, 100 e 200 mM/mL) por 72 horas, foi possível determinar a IC50. As concentrações de glicose de 100 e 200 mM/mL mostraram uma redução na proliferação celular em comparação com o controle negativo (*** $p < 0,0001$) (Figura 1B). A confirmação desses resultados foi feita por meio de microscopia com objetiva de 10X (Figura 1A). A avaliação do metabolismo oxidativo foi realizada medindo o óxido nítrico (Figura 1C), que revelou taxas elevadas na produção de nitritos orgânicos a partir da concentração de 60 mM/mL (*** $p < 0,0001$). Assim, a IC50 foi determinada na concentração de 100 mM/mL.

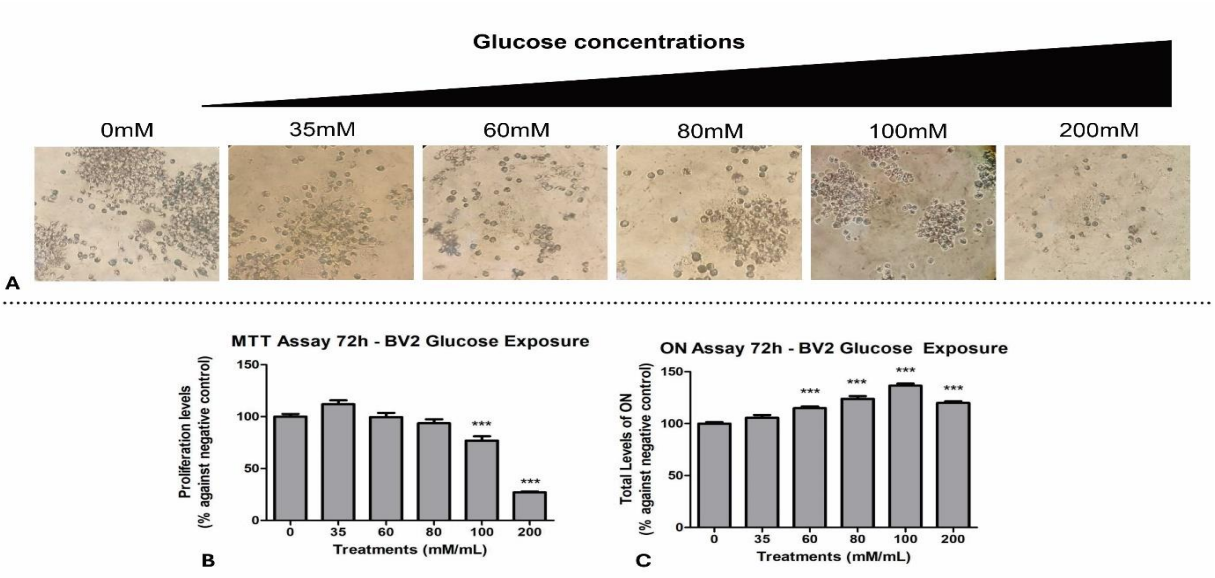


Figura 1. Células BV-2 expostas a diferentes concentrações de glicose (35, 60, 80, 100 e 200 mM/mL) durante 72h. Imagens obtidas por microscopia através do ensaio de MTT, com aumento de 10X (A). A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT (B). Os níveis de estresse oxidativo foram determinados pelo ON (C). As

*comparações foram feitas através do controle negativo (0), o qual só continha meio e células sem adição de glicose. N = 3, *** p < 0,0001.*

3.2 AÇÃO DA (+)-CATEQUINA E CAFEÍNA NAS BV-2 EXPOSTAS A GLICOSE VIA AUMENTO DOS NÍVEIS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A (+)-catequina (Figura 2B) e a cafeína (Figura 2C) foram testadas em concentrações de 0,53, 1,58, 5,3, 15,8 e 53 µg/mL em combinação com a IC50 da glicose. O efeito citotóxico da glicose a 100 mM/mL foi confirmado, com uma redução significativa na proliferação celular em comparação com o controle negativo (*** p < 0,0001) (Figura 2A). A (+)-catequina provocou um aumento na proliferação celular nas concentrações de 15,8 µg/mL (** p < 0,001) e 53 µg/mL (*** p < 0,0001). Por outro lado, a cafeína causou um aumento significativo na proliferação celular nas concentrações de 15,8 µg/mL e 53 µg/mL (* p < 0,005). As imagens obtidas por microscopia com objetiva de 40x corroboraram esses resultados (Figuras 2D - 2I).

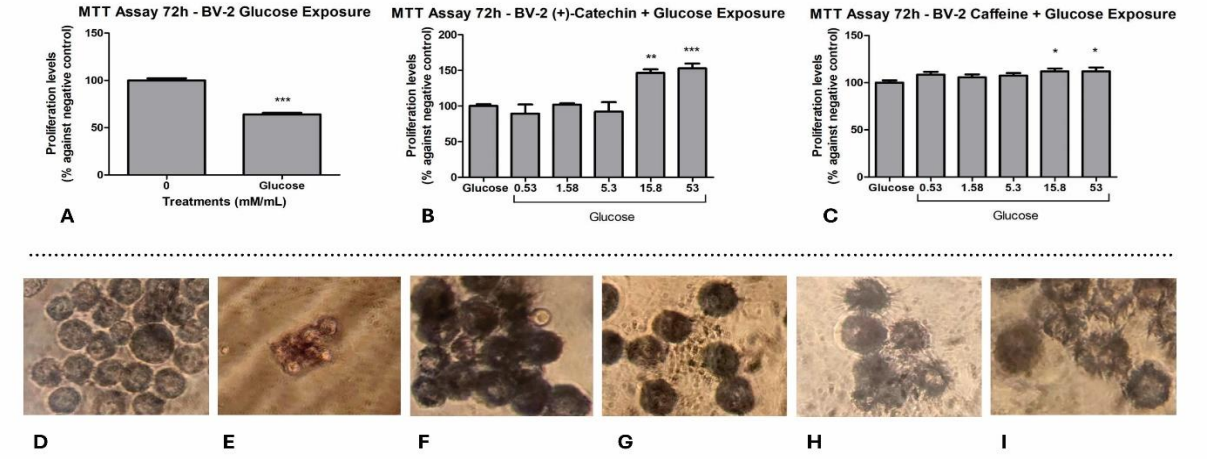


Figura 2. Células BV-2 expostas a diferentes concentrações de (+)-catequina e cafeína (0,53; 1,58; 5,3; 15.8 e 53 µg/mL), juntamente a IC50 da glicose (100 mM/mL), durante 72h. A proliferação celular foi determinada através do ensaio de MTT, para a (+)-catequina (B) e cafeína (C), e comparada ao controle contendo somente meio com glicose e células (controle positivo). Um controle com células expostas apenas a glicose foi conduzido (A). Imagens obtidas por microscopia através do ensaio de MTT, com aumento de 40X, controle negativo (D), controle positivo (E), (+)-catequina concentração de 15,8 µg/mL (F), (+)-catequina concentração de 53 µg/mL (G), cafeína concentração de 15,8 µg/mL (H) e cafeína na concentração de 53 µg/mL (I). N3 =, * p < 0,005, ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

3.3 EFEITO DA (+)-CATEQUINA E CAFEÍNA NAS BV-2 ASSOCIADA A ALTOS NÍVEIS DE GLICOSE EXTRACELULAR VIA REDUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

A cafeína (Figura 3C) e a (+)-catequina (Figura 3B) reduziram a produção de NO em todas as concentrações testadas (*** p < 0,0001). Além disso, a redução citotóxica causada pela glicose a 100 mM/mL foi confirmada, uma vez que houve um

aumento significativo na produção de NO em comparação com o controle negativo (*** p < 0,0001) (Figura 3A).

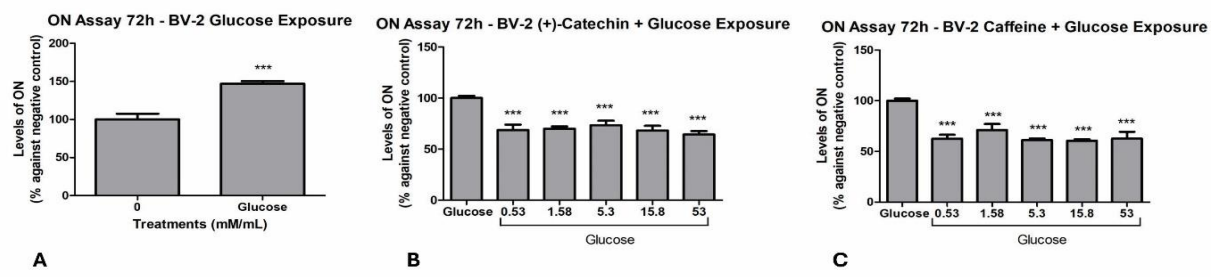


Figura 3. Células BV-2 expostas a diferentes concentrações de (+)-catequina e cafeína (0,53; 1,58; 5,3; 15,8 e 53 µg/mL), juntamente a IC50 da glicose (100 mM/mL), durante 72h. A proliferação celular foi determinada através da mensuração de ON, para (+)-catequina (B), cafeína (C) e comparada ao controle contendo somente meio com glicose (controle positivo). Um controle com células expostas apenas a glicose foi conduzido (A). N3 =, * p < 0,005, *** p < 0,0001.

4 DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo sugerem que altos níveis de glicose provocam danos celulares, resultando em redução da proliferação celular e aumento do estresse oxidativo por meio da produção de óxido nítrico (ON). A (+)-catequina e a cafeína demonstraram um efeito protetor em concentrações elevadas de 15,8 e 53 µg/mL, promovendo o aumento da proliferação celular. No que diz respeito ao metabolismo oxidativo, tanto a (+)-catequina quanto a cafeína mostraram uma redução significativa na produção de ON em todas as concentrações testadas.

De acordo com Ehtewish e colaboradores, a hiperglicemia e o estresse oxidativo estão relacionados com a apoptose neuronal, neurodegeneração e neuroinflamação. O estresse oxidativo e a hiperglicemia ativam o NF-κB (fator nuclear kappa B), que regula a apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de moduladores da cascata inflamatória. (EHTEWISH *et al.,* 2022; ZHOU *et al.,* 2024).

A cafeína, em altas doses, influencia mecanismos inflamatórios reduzindo biomarcadores associados à inibição da fosfodiesterase, conforme indicado por Barcelos *et al.* (2020). Outros estudos apontam que a cafeína pode diminuir a reatividade das células da micróglia ao favorecer mediadores pró-inflamatórios como TNF e ON, e seus genes reguladores estimulados por lipopolissacarídeos, além de

modular a ERK (proteína quinase) e ativar o receptor A2A (A2AR) (BARCELOS *et al.,* 2020; MADEIRA *et al.,* 2017).

A (+)-catequina sugere um efeito anti-inflamatório no sistema nervoso central (SNC), inibindo o NF-κB e o p53, além de ativar a ERK. Em baixas concentrações, a (+)-catequina atua como pró-apoptótica e pró-antioxidante, funcionando como um bom neuroprotetor. Estudos indicam que ela possui a capacidade de ativar seletivamente a PKC (proteína quinase C) nos neurônios, uma via considerada crucial para neuroproteção (IHM *et al*., 2009; SPENCER *et al*., 2012).

Portanto, devido ao potencial anti-inflamatório das moléculas presentes no cacau, cafeína e (+)-catequina, sugere-se que desempenhem um papel protetor e antioxidante significativo em células microgliais sob condições de alta concentração de glicose. Assim, esses compostos se destacam como promissores para o desenvolvimento de novas terapias alternativas para distúrbios neuroinflamatórios.

4. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que altos níveis de glicose causam danos celulares por meio do aumento do estresse oxidativo e da redução da viabilidade das células da micróglia. Por outro lado, as moléculas analisadas desempenham um papel neuroprotetor contra os efeitos adversos da hiperglicemia, pois promoveram o aumento da proliferação celular e reduziram o estresse oxidativo, diminuindo a produção de óxido nítrico (ON).

REFERÊNCIAS

BAHARUM, Zainal *et al*. Theobroma cacao: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. **Tropical Life Sciences Research**, v. 27, n. 1, p. 21–42, 2016.

BARCELOS, R. P*. et al.* Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. **Nutrition research** (New York, N.Y.), v. 80, p. 1–17, 2020.

CADONÁ, Francine C*. et al.* Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 26, p. 7222–7241, 2022

CUKIERMAN-YAFFE, T. *et al*. Relationship between baseline glycemic control and cognitive function in individuals with type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors. **Diabetes care**, v. 32, n. 2, p. 221–226, 2009.

DOBRICĂ, E. C. *et al*. Diabetes and skin cancers: Risk factors, molecular mechanisms and impact on prognosis. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 31, p. 11214–11225, 2022.

EHTEWISH, H.; ARREDOUANI, A.; EL-AGNAF, O. Diagnostic, prognostic, and mechanistic biomarkers of diabetes mellitus-associated cognitive decline. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 6144, 2022.

IHM, S.-H. *et al.* Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 1, p. 47–53, 2009.

KANG, Ki S., *et al.* Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells In Vitro and In Vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. 01-10, 2010.

KATZ, David L.; DOUGHTY, Kim; ALI, Ather. Cocoa and chocolate in human health and disease**. Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779–2811, 2011.

LODI, Karina Z. *et al*. Pre-clinical evidence for the therapeutic effect of Pitaya (Hylocereus lemairei) on diabetic intestinal microenvironment. **Natural Product Research,** v. 37, n. 10, p. 1735–1741, 2023.

MACHADO, Aline D. O. Efeito da hiperglicemia no desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2. **Plataforma Sucupira: UNIFESP**, 2019.

MADEIRA, M. H*. et al*. Having a coffee break: The impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

MASKARINEC, G. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 5, p. 573–579, 2009.

MELLO, Gabriela H. de *et al.* Cocoa presents cytotoxicity against melanoma cancer cell lines (A-375 e B16-F10) and improves chemotherapy activity by increasing oxidative stress. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. e14512, 2022.

NOH, Hyung J., *et al*. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, n. 2, p. 106–112, 2015.

PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. Biochimica et biophysica acta. **Molecular basis of disease**, v. 1863, n. 5, p. 1037–1045, 2017.

RAMTEKE, P. *et al*. Hyperglycemia associated metabolic and molecular alterations in cancer risk, progression, treatment, and mortality. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1402, 2019.

ROGGIA, I.; DALCIN, A.J.; DE SOUZA,D.; MACHADO, A.; DE SOUZA, D.; DA CRUZ, I., RIBEIRO, E.; OURIQUE, A.; GOMES, P. Guarana: Stability-Indicating RPHPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 94, p. 103629, 2020.

SPENCER, J. P. E. *et al*. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular aspects of medicine**, v. 33, n. 1, p. 83–97, 2012.

TAKEISHI, J. *et al*. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: The use of MCT oil and a ketogenic diet. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12310, 2021.

TRAN, V. T. A.; LEE, L. P.; CHO, H. Neuroinflammation in neurodegeneration via microbial infections. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

ZHOU, X. *et al*. Binding of RAGE and RIPK1 induces cognitive deficits in chronic hyperglycemia-derived neuroinflammation. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 30, n. 3, 2024.