



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**EFFECT OF OLIVE OIL PHENOLIC COMPOUNDS AGAINST OXIDATIVE  
STRESS-INDUCED INJURY IN RENAL PROXIMAL TUBULE CELLS AND  
KERATINOCYTES**

Efeito de compostos fenólicos do azeite contra a lesão induzida por stress  
oxidativo em células do túbulo proximal renal e queratinócitos

**Laura Correia Dias**

**Orientador: Dr. Pedro Gomes**

**Trabalho de Investigação**

**1º Ciclo em Ciências da Nutrição**



**Porto, 2012**





## Abbreviations

Calcein-AM – Calcein acetoxymethyl ester

CO<sub>2</sub> – Carbon dioxide

CT – Control

DAPI – 4',6-diamidino2-phenylindole

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM-F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

EGF – Epidermal growth factor

FBS – Fetal bovine serum

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Hydrogen peroxide

HEPES – *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid

HT – Hydroxytyrosol

ITS – Insulin-transferrin-selenium

LDL – Low density lipoproteins

PBS – Phosphate buffered saline

ROS – Reactive oxygen species

SHR – Spontaneously hypertensive rats

t-BOOH – Tertiary-butylhydroperoxide

TYR – Tyrosol

UV – Ultraviolet

WKY – Wistar Kyoto

Z-DEVD-R110 – rhodamine 110 bis-(*N*-CBZ-*L*-aspartyl-*L*-glutamyl-*L*-valyl-*L*-aspartic acid amide)

### Abstract

The Mediterranean Diet is an eating pattern well-known by its health-promoting benefits. There is a strong evidence of protection against pathologies like cardiovascular diseases and metabolic syndrome due to the consumption of certain foods typical of this diet such as fruits, vegetables and olive oil. Olive oil is important to health and nutrition because it contains monounsaturated fat and a great amount of antioxidants. Two antioxidants present in extra-virgin olive oil, hydroxytyrosol (HT) and tyrosol (TYR), have been reported to confer protection against oxidative stress. In this study, we aim to evaluate their putative protective role against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury in WKY, SHR and HaCaT cells. We evaluated cell viability and markers of apoptosis (chromatin condensation and caspase-3 activation). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicited cell death in a concentration- and time-dependent manner in all cell lines tested. The results on the capacity of the compounds in preventing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury were different among the 3 cell types used. In the viability and chromatin condensation assays the phenolic compounds only exerted protective effect on SHR cells. Also in these cells we observed a higher sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. In WKY and HaCaT cells, although without reaching statistical significance, the compounds exacerbated the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, on both viability and caspase-3 assay. The chromatin condensation assay for those cells revealed no effect for both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and phenolic compounds treatment. In conclusion, in spite of the strong evidence that TYR and HT have a protective effect against oxidative stress-induced injury, more studies are necessary so these compounds can be used as therapeutics.

**Keywords:** Oxidative stress, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, olive oil, tyrosol, hydroxytyrosol

## Resumo

A Alimentação Mediterrânica é um dos padrões alimentares reconhecido pelos seus efeitos benéficos a nível de saúde. Com evidência de protecção contra doenças cardiovasculares e síndrome metabólico, entre outras patologias, é característica desta dieta o abundante consumo de frutas, vegetais e azeite. O azeite é considerado um alimento importante para a saúde e nutrição, devido ao seu teor em gordura monoinsaturada e compostos antioxidantes. Dois compostos antioxidantes presentes no azeite virgem extra, tirosol (TYR) e hidroxitirosol (HT), têm efeito protector contra o stress oxidativo descrito na literatura. Neste estudo pretendeu-se avaliar este efeito protector na lesão induzida por  $H_2O_2$  em células WKY, SHR e HaCaT. Foram realizados ensaios de viabilidade e ensaios em marcadores de apoptose celular (condensação da cromatina e medição da actividade da caspase-3). O tratamento com  $H_2O_2$  induziu a morte celular, numa forma dependente da concentração e do tempo, nas 3 linhas celulares. Os resultados obtidos relativamente à capacidade dos fármacos em prevenir a lesão induzida por stress oxidativo foram diferentes para as 3 linhas celulares. No ensaio de viabilidade celular e condensação da cromatina, os compostos fenólicos mostraram efeito de prevenção apenas nas células SHR. Nestas células foi também observada uma maior sensibilidade às alterações induzidas pelo  $H_2O_2$ . Nas células WKY e HaCaT verificou-se, embora sem significado estatístico, que os fármacos acentuaram as alterações induzidas pelo  $H_2O_2$ , nos ensaios de viabilidade e caspase-3. Para estas células, no ensaio de condensação da cromatina o tratamento com  $H_2O_2$  e os compostos fenólicos não revelaram efeito. Em conclusão, apesar de existirem fortes evidências de que o TYR e HT são protetores contra a lesão por stress oxidativo, mais estudos são necessários para que estes compostos possam ser usados com fins terapêuticos.

**Palavras-Chave:** Stress oxidativo,  $H_2O_2$ , azeite, tirosol, hidroxitirosol

## Índice

Abreviaturas.....	ii
Abstract.....	iii
Resumo.....	iv
Introdução.....	1
Objetivo.....	3
Materiais e métodos.....	3
Resultados.....	7
Discussão.....	12
Conclusão.....	14
Bibliografia.....	15





## Introdução

A alimentação mediterrânica é definida como um padrão alimentar conhecido pelos seus efeitos benéficos a nível da saúde da população onde os níveis de adesão são maiores<sup>(1)</sup>. Numa descrição generalizada, esta dieta passa pelo consumo diário de cereais e derivados não refinados, hortícolas, fruta, azeite, queijos e vinho (tinto ou branco, em quantidades moderadas); consumo semanal de batatas, peixe, azeitonas, leguminosas, frutos secos e ovos; consumo mensal de carnes vermelhas e derivados<sup>(2)</sup>. São inúmeros os estudos já realizados sobre este padrão que confirmam o seu papel protetor em várias doenças, como é o caso das doenças cardiovasculares (DCV)<sup>(3, 4)</sup>, cancros diversos<sup>(4, 5)</sup>, síndrome metabólico<sup>(6)</sup>, doença de Alzheimer<sup>(1)</sup>, doença de Parkinson<sup>(1, 7)</sup>. Entre os vários mecanismos descritos para explicar estes benefícios, destaca-se o eficaz combate ao stress oxidativo<sup>(8)</sup>, muitas vezes responsável pelas alterações celulares que levam ao aparecimento das doenças referidas. O stress oxidativo resulta de um desequilíbrio, nas células, entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a capacidade das mesmas em remover ou prevenir os danos por elas provocados, levando à existência de um ambiente desfavorável ao funcionamento da célula que, em última instância, culmina na sua morte<sup>(9)</sup>. A existência já descrita, nos produtos que diariamente fazem parte da nossa alimentação, de compostos antioxidantes capazes de minimizar a ação dos ROS revela a importância que o padrão alimentar que adotamos pode ter na nossa saúde. Estes compostos presentes nos alimentos são de natureza não-enzimática<sup>(10)</sup> e encontram-se sobretudo em grupos de alimentos como as frutas e os vegetais. No caso da dieta mediterrânica, a já referida riqueza em termos de consumo destes grupos de alimentos é um dos fatores que contribui para o seu efeito benéfico na saúde. No entanto, não é apenas nestes alimentos que reside a capacidade antioxidante da dieta mediterrânica, pois esta contempla a ingestão diária do azeite

como principal fonte de gordura<sup>(5)</sup>, reconhecido pelo seu teor em ácidos gordos monoinsaturados e em compostos antioxidantes<sup>(5, 8)</sup>. Estes compostos dividem-se fundamentalmente em fenóis, secoiridoides, flavonoides e lignanas<sup>(8)</sup>, e a sua capacidade antioxidante está ligada a 3 mecanismos: captação de radicais livres, doação de átomos de hidrogénio, e quelação de metais. Dentro do grupo dos fenóis, os compostos com maior relevância biológica e presentes em maior quantidade no azeite extra virgem são o tirosol (TYR) e o hidroxitirosol (HT), que podem existir sob a forma livre ou conjugada<sup>(11)</sup>. A sua estrutura é semelhante, apenas divergindo no facto de o HT possuir um grupo catecol, ao contrário do TYR. Ambos os compostos têm sido alvos de vários estudos que descrevem os seus efeitos benéficos para a saúde. No caso do TYR, estão referidas capacidades de prevenir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL)<sup>(12, 13)</sup>, bem como de prevenir as lesões provocadas pelas LDL oxidadas<sup>(14)</sup>, de conferir protecção do miocárdio contra o stress isquémico<sup>(15)</sup> e de neuroprotecção contra a proteína  $\beta$ -amiloide (em conjunto com o HT)<sup>(16)</sup>. No caso do HT, a sua ação antioxidante está descrita como mais forte do que o TYR<sup>(17)</sup>, pelo que existem mais mecanismos protetores a ele associado. Estão referidas capacidades de protecção contra a lesão celular induzida por  $H_2O_2$  e raios UV em células renais e de melanoma<sup>(18-20)</sup>, melhoria da capacidade antioxidante de hepatócitos contra a citotoxicidade induzida pelo tert-butil hidroperóxido<sup>(21)</sup>, prevenção da peroxidação lipídica em células renais<sup>(13)</sup>, melhoria do perfil lipídico, perfil antioxidante e redução do desenvolvimento da aterosclerose<sup>(22)</sup> e possível prevenção da perda de massa óssea<sup>(23)</sup>.

Estando o stress oxidativo associado a alterações celulares que podem culminar com a morte da célula, neste estudo recorreu-se ao uso de  $H_2O_2$ , um ROS, como agente oxidante, para induzir um estado de stress oxidativo nas linhas celulares escolhidas, na tentativa de perceber se os compostos referidos, TYR e HT, são capazes de

reverter essas alterações. As linhas celulares escolhidas são de túbulo proximal de rim (WKY e SHR), órgão onde o HT se concentra preferencialmente<sup>(24)</sup>, e queratinócitos (HaCaT), e os ensaios realizados visaram avaliar o efeito dos compostos na prevenção da morte celular, no aumento da atividade da caspase-3 e na condensação da cromatina, induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Objetivo**

Com o presente estudo pretende-se avaliar a capacidade dos principais compostos fenólicos do azeite (tirosois e hidroxitirosois) em reverter as alterações celulares provocadas por stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio, em células de túbulo proximal de rim (WKY e SHR) e queratinócitos (HaCaT), através de ensaios de viabilidade celular e ensaios em marcadores da apoptose (técnica de coloração nuclear com DAPI e avaliação da atividade da caspase-3).

### **Materiais e métodos**

#### ***Reagentes:***

Os compostos fenólicos do azeite usados neste estudo (HT e TYR) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), bem como o peróxido de hidrogénio e os meios de cultura DMEM e DMEM-F12. O kit LIVE/DEAD cytotoxicity assay e o reagente DAPI foram obtidos a partir da Molecular Probes (Eugene, OR), e o kit da caspase-3 (EnzCheck Caspase-3 Assay Kit) foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA). O FBS e o antibiótico/antimicótico foram adquiridos na Gibco (SA).

#### ***Cultura de células:***

As células epiteliais do túbulo renal proximal imortalizadas a partir de ratos WKY e SHR foram mantidas em cultura em meio DMEM-F12 suplementado com 1% de solução antibiótico/antimicótico (100U/ml de penicilina G, 0,25 µg/ml anfotericina B e

100 µg/ml de estreptomicina), 4 µg/ml de dexametasona, 5 ml ITS (5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selênio), 10 ng/ml de EGF, 5% de FBS e 25 mM de HEPES. A atmosfera de cultura era humidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, e a temperatura mantida a 37°C. O meio de cultura era mudado de 2 em 2 dias, e a subcultura realizada 2 vezes por semana, antes de ser atingida a confluência, com recurso a tripsina-EDTA, com rácio de 1:8, em placas de 21 cm<sup>2</sup>. Os ensaios eram realizados geralmente 4 dias após a subcultura, com as células em DMEM-F12 a 1% de FBS nas 24 horas que antecediam os ensaios.

Os queratinócitos HaCaT foram mantidos em cultura em meio DMEM, suplementado com 10% de FBS, 1% de solução antibiótico/antimicótico (100U/ml de penicilina G, 0,25 µg/ml anfotericina B e 100 µg/ml de estreptomicina) e 25 mM de HEPES, na mesma atmosfera modificada descrita para as células WKY e SHR. O meio das células era mudado de 2 em 2 dias, e a subcultura realizada uma vez por semana, com recurso a PBS-EDTA e tripsina-EDTA, com rácio de 1:5, em placas de 21 cm<sup>2</sup>. Os ensaios eram realizados 4 dias após a subcultura das células em meio DMEM sem FBS, nas 24 horas que antecediam os ensaios.

#### ***Estudo da viabilidade celular:***

Para este ensaio, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, revestidas com colagénio (50 µg/ml) no caso das células WKY e SHR (20.000-30.000 células/poço). Após a subcultura, as células eram mantidas em meio com FBS, e, nas 24 horas anteriores ao ensaio, eram cultivadas com meio 1% FBS (DMEM-F12) e sem FBS (DMEM), contendo concentrações definidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100-1500 µM, WKY e SHR; 10-1000 µM, HaCaT). Com o objetivo de testar o efeito dos compostos fenólicos do azeite, HT e TYR, realizava-se um pré-tratamento das células com os mesmos, com duração de 2 horas, nas concentrações definidas (3-100 µM nas células WKY e HaCaT, 0,1-100 µM nas células SHR), sendo depois os meios trocados, adicionando

meio com os compostos nas mesmas concentrações e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações definidas (400 µM, SHR; 500 µM, HaCaT; 750 µM, WKY). Após as 24 horas de tratamento, o meio era retirado e adicionava-se a calceína-AM (2 µM), uma molécula que transmite fluorescência quando convertida pelas esterases intracelulares. A fluorescência era lida usando um leitor de placas (Spectramax Gemini, Molecular Devices), com comprimentos de onda de 490 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Os resultados, expressos em unidades de fluorescência, foram tratados e normalizados, para tentar perceber o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dos compostos testados.

### ***Ensaio da caspase-3:***

Para este ensaio, as células foram cultivadas em placas de 6 poços. Em primeiro lugar, foi realizado um ensaio dependente do tempo, onde as células, cultivadas em DMEM-F12 (1% FBS) ou DMEM (sem soro), eram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações definidas (400 µM, SHR; 500 µM, HaCaT; 750 µM, WKY) durante vários períodos de tempo (0, 6, 12 e 24 horas). No final do tratamento, as placas eram lavadas com PBS, as células eram retiradas e centrifugadas (1300 rpm, 5 minutos, 4°C), sendo o pellet resultante lisado em 50 µl de tampão de lise (componente do kit da caspase-3), com incubação no gelo durante 30 minutos. Após a lise das células, procedia-se a nova centrifugação (5000 rpm, 4°C, 5 minutos), para obter o sobrenadante (fração citosólica). Deste, retiravam-se 50 µl para cada poço de uma placa de 96 poços, ao qual se juntava 50 µl de solução contendo o substrato fluorogénico Z-DEVD-R110 (25 µM). A fluorescência emitida pela quebra deste substrato era lida no leitor de placas (Spectramax Gemini, Molecular Devices), com comprimentos de onda de 496 nm (excitação) e 520 nm (emissão). Os resultados, expressos em unidades de fluorescência, foram tratados e normalizados, com o objetivo de ver alterações na expressão da caspase-3 nas diferentes linhas celulares.

***Coloração nuclear com DAPI:***

Para visualizar as alterações na cromatina nuclear nas células em processo de apoptose, foi utilizado o corante nuclear fluorescente DAPI. As células eram cultivadas em placas de 24 poços com coverslips de vidro, revestidos com colagénio (50 µg/ml). Cada linha celular foi tratada, durante 24 horas, com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações definidas (400 µM, SHR; 500 µM, HaCaT; 750 µM, WKY) e com os compostos HT e TYR, neste caso também com pré-tratamento de 2 horas, na concentração definida (10 µM para todas as linhas celulares). Após tratamento, a placa era lavada com PBS, fixavam-se as células com formaldeído (4%) durante 30 minutos e procedia-se a nova lavagem (3 vezes, com 5 minutos de intervalo). Posteriormente era feita a permeabilização com Triton X-100 1%, durante 3 minutos, seguido de nova lavagem com PBS. De seguida era feita a coloração com DAPI (0,1 mg/ml), durante 20 minutos à temperatura ambiente, com posterior lavagem com PBS. Os coverslips de vidro eram retirados e colocados numa lâmina, e a montagem feita com o reagente ProLong Gold (Molecular Probes, Eugene, OR), e as lâminas eram visualizadas usando microscópio de fluorescência equipado com Zeiss ApoTome, na objetiva de 40x, retirando as imagens para posterior observação e comparação entre tratamentos.

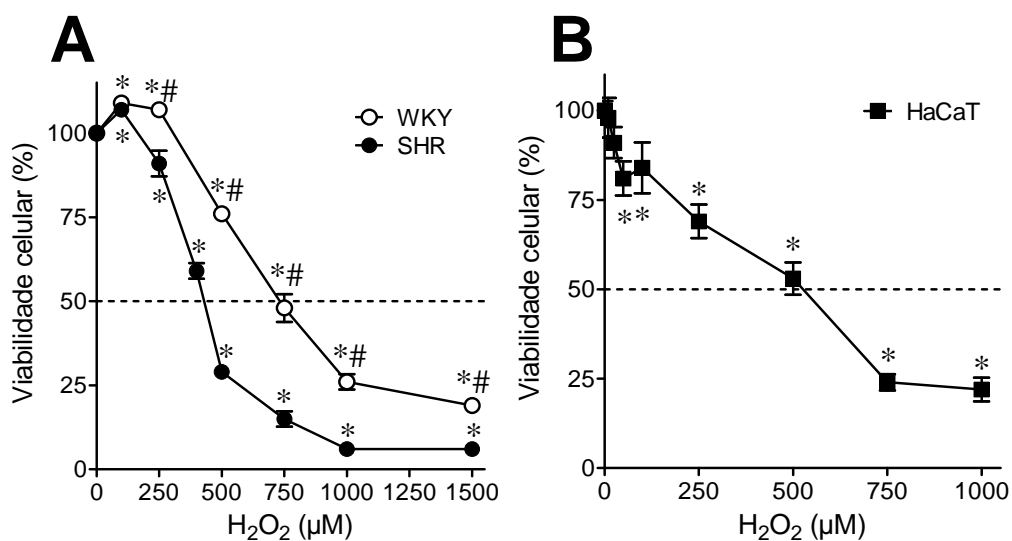
***Análise estatística:***

Os resultados dos ensaios são apresentados sob a forma de médias aritméticas ± desvio padrão da média (DPM). Para análise estatística recorreu-se ao uso do teste de análise da variância simples (One-way ANOVA) com posterior aplicação do teste de Newman-Keuls. As diferenças entre grupos são consideradas significativas quando o valor de p é inferior a 0,05.

## Resultados

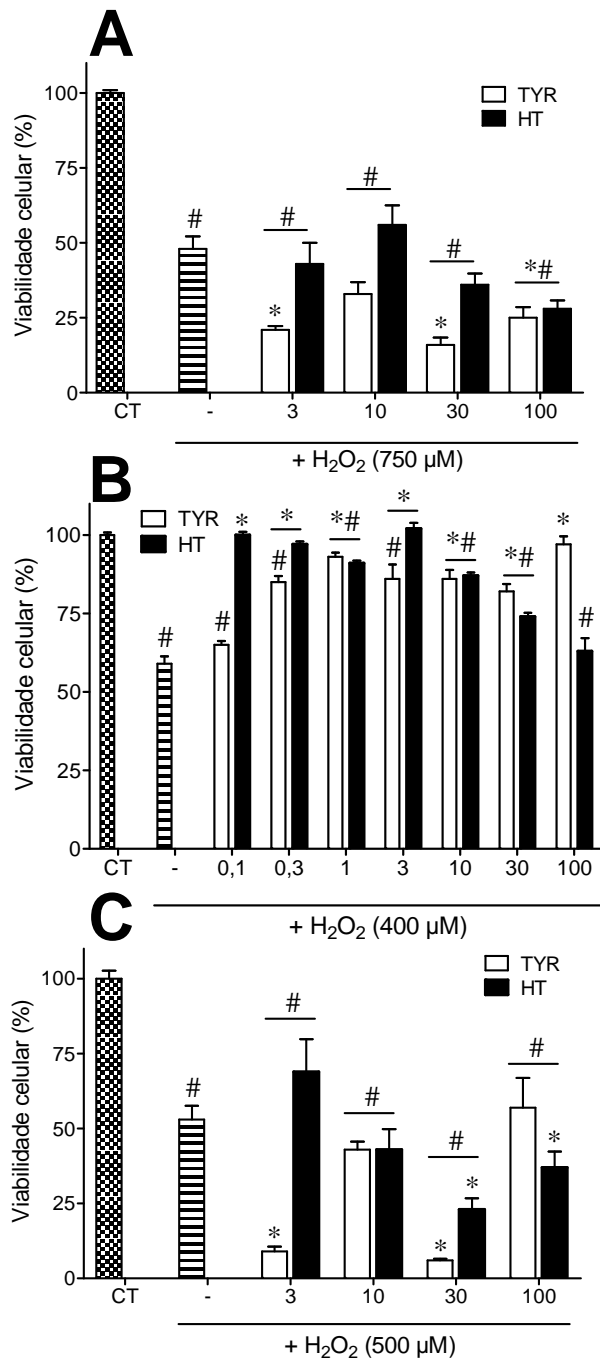
### **Estudo da viabilidade celular:**

O primeiro passo neste estudo foi caracterizar o comportamento das diferentes linhas celulares quando expostas a  $H_2O_2$ , para definir qual a concentração deste agente oxidante necessária para diminuir em cerca de 50% a viabilidade celular. A



**Figura 1 —Efeito do  $H_2O_2$  na viabilidade celular.** A viabilidade foi avaliada após 24h de exposição a concentrações crescentes de  $H_2O_2$ . Através da fluorescência da calceína eram quantificadas as células vivas, expressas em percentagem de viabilidade celular relativamente às células controlo. \* $P < 0,05$ , em comparação com as células controlo (sem tratamento); # $P < 0,05$  em comparação com iguais valores de  $H_2O_2$  na células SHR.

viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da calceína na forma esterificada (calceína-AM), uma molécula que na presença de esterases intracelulares se torna fluorescente. Na Fig.1, é possível verificar que o efeito do  $H_2O_2$  na viabilidade celular é dependente da concentração, à medida que esta aumenta, a percentagem de células viáveis diminui. Relativamente às células WKY e SHR, a Fig.1A revela que nas WKY o IC50 é aproximadamente 750  $\mu M$ , enquanto nas SHR o valor é mais baixo, cerca de 400  $\mu M$ . Para todas as concentrações de  $H_2O_2$  testadas, o efeito observado na viabilidade celular foi mais acentuado nas células de SHR, em comparação com as



**Figura 2 – Efeito do TYR e HT sobre a perda de viabilidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A-WKY; B-SHR; C-HaCaT** As células sofriam pré-tratamento de 2h com os fármacos (10μM), sendo depois expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h. Através da fluorescência da calceína eram quantificadas as células vivas, expressas em percentagem de viabilidade celular relativamente às células controlo. #P<0,05, em comparação com as células controlo (sem tratamento); \*P<0,05 em comparação com as células tratadas apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

células de WKY (Fig.1A). Quanto às células HaCaT (Fig.1B), o valor de IC<sub>50</sub> para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é cerca de 500 μM. As concentrações referidas como IC<sub>50</sub> foram as adotadas para realizar os ensaios subsequentes. Após definir a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a usar, foi de seguida testado o efeito dos compostos fenólicos TYR e HT sobre a perda de viabilidade celular induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se pode observar na Fig.2A, não houve prevenção da morte celular nas células WKY com o tratamento com ambos os compostos. De forma inesperada, verificou-se uma potenciação do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na viabilidade celular com o tratamento com TYR a 3, 30 e 100 μM e com HT a 100 μM. Ao contrário do observado nas

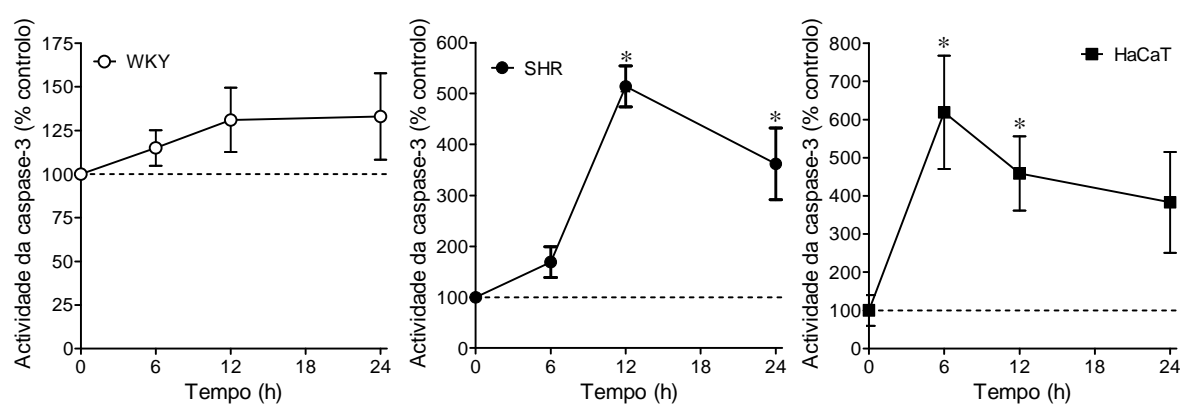
células WKY, nas células SHR os fármacos demonstraram, na maioria das concentrações usadas, um efeito protetor sobre a morte celular (Fig. 2B). À semelhança do que se



verificou nas células WKY, nas células HaCaT o pré-tratamento com os fármacos não se revelou eficaz na prevenção da morte celular induzida pelo  $H_2O_2$ , tendo até exacerbado o efeito induzido pelo mesmo. Na Fig.2C observa-se este efeito no tratamento com TYR a 3 e 30  $\mu M$  e no tratamento com HT a 30 e 100  $\mu M$ .

### **Ensaio da caspase-3:**

A morte celular pode ocorrer por 2 processos distintos: apoptose ou necrose. Para definir qual o processo que ocorre nas linhas celulares alvo do nosso estudo, procedemos à realização do ensaio da caspase-3, a enzima cuja activação leva à

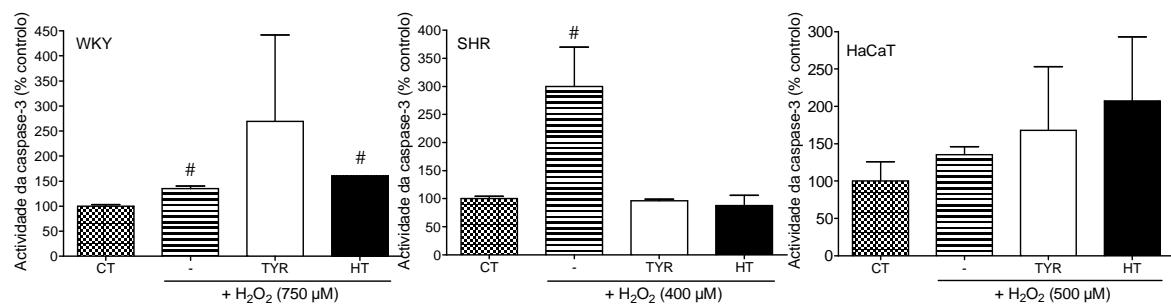


**Figura 3 – Aumento da atividade da caspase-3 após tratamento com  $H_2O_2$  nas células**

**SHR e HaCaT.** As células foram tratadas com  $H_2O_2$  (IC50) durante 6, 12 e 24h, sendo depois lisadas e quantificada a atividade da caspase-3 nos homogeneizados. Os valores estão corrigidos para a proteína total, expressos em percentagem relativamente às células sem tratamento. \* $P < 0,05$ , em comparação com as células controlo (sem tratamento)

execução do processo de apoptose. Numa primeira fase realizamos um ensaio dependente do tempo, em que as 3 linhas celulares foram expostas às concentrações de  $H_2O_2$  definidas inicialmente durante 6, 12 e 24h, sendo depois lisadas e medida a atividade da enzima caspase-3, por clivagem do substrato fluorescente Z-DEVD-R110 (Fig.3). Nas células WKY, apesar de se verificar um aumento de atividade da enzima dependente do tempo, este não se revelou estatisticamente significativo. Nas células SHR, o pico de atividade da caspase-3 deu-se às 12h, em cerca de 5 vezes maior que os valores do controlo, havendo uma ligeira diminuição para cerca de 3,5

vezes maior que os valores do controlo às 24h, sendo ambos valores estatisticamente significativos. Nas células HaCaT, a enzima tem o seu pico de atividade às 6h, atingido valores cerca de 6 vezes maiores que o controlo. Às 12h verifica-se um aumento da atividade para cerca de 4,5 vezes o valor do controlo, sendo estes 2 últimos valores referidos estatisticamente significativos. Às 24h verifica-se também um aumento em cerca de 4 vezes o valor do controlo, que não se revelou ser estatisticamente significativo.

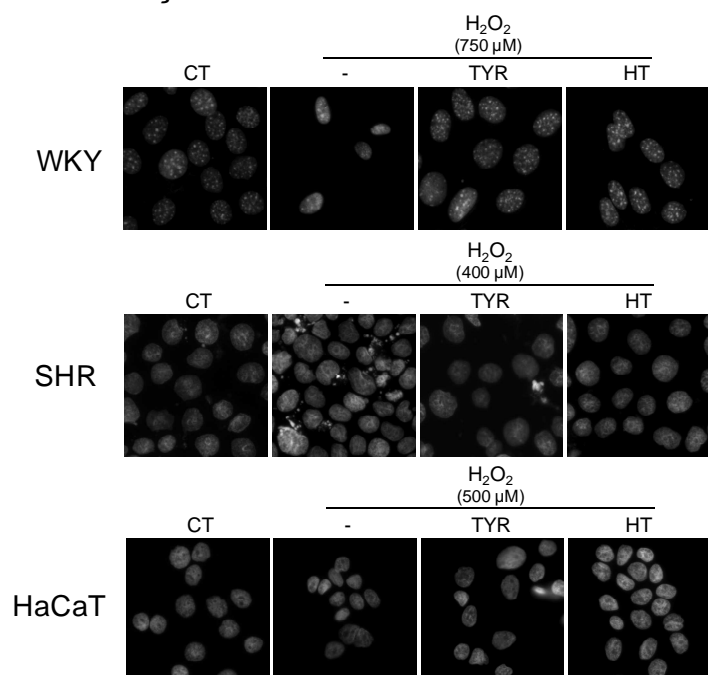


**Figura 4 – Efeito do TYR e HT sobre a estimulação da atividade da caspase-3 pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** As células foram pré-tratadas durante 2h com os fármacos (10 μM), com posterior exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 12h, sendo depois lisadas e quantificada a caspase-3 nos homogeneizados. Os valores estão corrigidos para a proteína total, expressos em percentagem relativamente às células sem tratamento. #P<0,05, em comparação com as células controlo (sem tratamento).

Numa segunda fase as 3 linhas celulares foram pré-tratadas com TYR e HT durante 2h, seguido de exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24h, e avaliada a atividade da caspase-3 (Fig.4). A única linha celular onde os fármacos preveniram a estimulação da atividade da caspase-3 induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi nas células SHR. Apesar de haver uma diminuição da atividade da enzima em ambos os fármacos quando comparado com o valor do tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta não se revelou estatisticamente significativa. Nas células WKY, além de não se observar nenhum efeito de prevenção, verifica-se, nas células tratadas com os fármacos, um aumento na atividade da caspase-3 relativamente às células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que no entanto não se revelou estatisticamente significativo. O mesmo foi observado nas células HaCaT. O

tratamento com  $H_2O_2$  não induziu um aumento significativo da atividade da enzima em nenhuma das 3 linhas celulares.

### **Coloração nuclear com DAPI:**



**Figura 5 – Ensaio de condensação da cromatina com DAPI.** As células eram tratadas, durante 24h, com  $H_2O_2$  e TYR e HT ( $10\mu M$ ) +  $H_2O_2$ , sendo depois fixas com DAPI para observar o núcleo em apoptose.

pré-tratadas com os fármacos e então sujeitas a uma concentração definida de  $H_2O_2$  por 24h, sendo depois observada no microscópio de fluorescência a condensação e fragmentação da cromatina. Nas células WKY não foram observadas alterações significativas no estado de condensação da cromatina após tratamento com  $H_2O_2$  e, da mesma forma, com o tratamento com os fármacos TYR e HT. O que se verificou nas células HaCaT foi semelhante, visto que não se detetam alterações na cromatina das células em nenhum dos tratamentos realizados. Pelo contrário, nas células SHR é possível visualizar a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos após tratamento com  $H_2O_2$ . Após tratamento com os compostos fenólicos tal já não é visível, sugerindo que os mesmos exerceram um efeito protetor nesta alteração específica do processo de morte celular.

A condensação e fragmentação da cromatina é uma das alterações características do processo de apoptose. Para complementar o ensaio da caspase-3, e tentar perceber o efeito dos fármacos TYR e HT sobre esta alteração, procedeu-se ao ensaio da condensação da cromatina com recurso ao corante fluorescente DAPI, específico para o núcleo celular. Como se observa na Fig.5, as 3 linhas celulares foram

## Discussão

Tendo em conta que o objetivo principal deste estudo consistiu na avaliação da capacidade dos compostos fenólicos do azeite (tirosol e hidroxitirosol) em reverter as alterações celulares provocadas por stress oxidativo induzido pelo  $H_2O_2$  nas linhas celulares já referidas, os resultados obtidos não nos permitem obter conclusões definitivas sobre o mesmo. Relativamente aos ensaios de viabilidade, apenas se observou um efeito de prevenção estatisticamente significativo por parte dos fármacos TYR e HT nas células SHR, enquanto nas células WKY e HaCaT, além de não se verificar esse efeito, observou-se que o tratamento com os fármacos aumentou a taxa de morte celular, quando comparado com o tratamento com  $H_2O_2$ . Este fenómeno era algo que, tendo em conta a literatura sobre o uso destes fármacos, não era esperado. O efeito protetor do HT foi demonstrado na perda de viabilidade celular induzida pelo t-BOOH nas células HepG2<sup>(21)</sup>, bem como a capacidade de prevenir a morte celular induzida pelo  $H_2O_2$  em células PC12<sup>(25)</sup> e em células epiteliais do túbulo renal<sup>(26)</sup>. Está também descrita para o HT a prevenção da morte celular induzida por  $H_2O_2$  em células Caco-2<sup>(27)</sup> e da hemólise em eritrócitos<sup>(28)</sup>. A aparente discrepância entre os nossos resultados e os descritos na literatura relativamente ao efeito protetor do HT contra o stress oxidativo poderá ser explicada pelas diferentes condições utilizadas (concentrações e tempos testados). Seria importante em estudos posteriores testar outras concentrações de agente oxidante utilizado, bem como de compostos fenólicos, e os tempos de tratamento escolhidos. Um outro aspeto importante revelado nos ensaios de viabilidade é a maior sensibilidade das células SHR ao tratamento com  $H_2O_2$  (Fig.1A), quando comparado com as células WKY. As células SHR têm origem em ratos que desenvolvem espontaneamente hipertensão arterial (HA). Um dos fatores que contribui para o patogénese desta doença é o stress oxidativo aumentado nas células renais, que

pode dever-se a um aumento na produção de ROS endógena ou na diminuição das defesas celulares contra os mesmos<sup>(29)</sup>. Estes mecanismos podem ajudar a explicar a maior sensibilidade das células SHR após exposição a agentes oxidativos como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A ação dos ROS provoca danos oxidativos nos constituintes celulares (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos), sendo que quando uma concentração crítica destes agentes é atingida, acaba por ocorrer morte celular. Numa tentativa de perceber se o efeito dos fármacos TYR e HT se faz notar nestas alterações celulares induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi realizado o ensaio da caspase-3. A caspase-3 é a enzima efetora do processo apoptótico, quando ativada, dá lugar a uma série de reações sequenciais que culminam na execução da morte celular por apoptose<sup>(30)</sup>. No primeiro ensaio realizado, para avaliar a dependência do tempo, verificou-se um ligeiro aumento da atividade da caspase-3 nas WKY, apesar de não ter atingido significado estatístico, o que não é concordante com o que foi observado no ensaio de viabilidade, em que a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminui a viabilidade celular em cerca de 50%. Esta ativação da caspase-3 nas células WKY pode estar relacionada com o facto de as células não responderem à agressão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a morte por apoptose mas sim por outro processo celular. As células SHR e HaCaT reagiram como seria esperado ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, registando o seu pico máximo de atividade da caspase-3 às 12 e 6h, respetivamente, com significado estatístico. Estes resultados são concordantes com o observado para estas linhas celulares no ensaio de viabilidade, onde as mesmas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaram numa diminuição da viabilidade celular em 50%. Quando as células foram tratadas com os fármacos, o observado para as WKY e HaCaT é concordante com os ensaios de viabilidade e de condensação da cromatina: o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não teve efeito significativo no aumento da actividade da enzima, ao contrário do que verificou com os fármacos. Nas células HaCaT, os resultados diferem da literatura revista, onde o HT exerce protecção

contra a lesão por stress oxidativo induzido, neste caso por UVB <sup>(31)</sup>. Quanto às células SHR os resultados obtidos demonstram a diminuição da ativação da caspase-3 induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após tratamento com os compostos fenólicos do azeite, embora esta não seja significativa. Estes resultados são concordantes com o descrito pela literatura sobre o tema. Estudos revelam que o HT tem a capacidade de reverter a peroxidação lipídica induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>(20, 32)</sup>, e em prevenir a lesão no DNA induzida também pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alterações celulares associadas ao stress oxidativo <sup>(33)</sup>. Para complementar o ensaio da caspase-3 recorreu-se ao ensaio da condensação da cromatina com o corante fluorescente DAPI. Foram detetadas alterações apenas nas células SHR, onde é possível observar a diminuição da condensação e fragmentação do DNA próprias de um processo de morte celular nas células tratadas com os fármacos e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. À semelhança do que se verificou no ensaio de viabilidade celular, nem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nem os fármacos demonstraram ter qualquer efeito no estado de condensação da cromatina das células WKY e HaCaT. Tendo em conta que as condições deste ensaio correspondem às do ensaio de viabilidade, seria pertinente rever as mesmas. Outra possibilidade é que o ensaio de condensação da cromatina não possui sensibilidade suficiente para avaliar as alterações provocadas por este agente oxidativo e fármacos nas condições utilizadas.

### **Conclusão**

A investigação sobre os fármacos TYR e HT usados neste ensaio é vasta, sendo forte a evidência do seu papel protetor relativamente ao stress oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários, de forma a poder, num futuro próximo, utilizar estes compostos com fim terapêutico para doenças cuja etiologia inclua o stress oxidativo.

## Bibliografia

1. Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 92(5):1189-96.
2. Dontas AS, Zerefos NS, Panagiotakos DB, Vlachou C, Valis DA. Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(1):109-15.
3. Bhupathiraju SN, Tucker KL. Coronary heart disease prevention: nutrients, foods, and dietary patterns. *Clin Chim Acta.* 412(17-18):1493-514.
4. Pauwels EK. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract.* 20(2):103-11.
5. Escrich E, Moral R, Solanas M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr.* 14(12A):2323-32.
6. Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 17(8):769-77.
7. Barichella M, Cereda E, Pezzoli G. Major nutritional issues in the management of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009; 24(13):1881-92.
8. Bullo M, Lamuela-Raventos R, Salas-Salvado J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Curr Top Med Chem.* 11(14):1797-810.
9. Ferreira I, Abreu R. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos [Review]. *Bioanálise.* 2007; IV(2)
10. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(9):567-79.
11. Miro-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57(1):186-90.
12. Vivancos M, Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr.* 2008; 99(6):1199-207.
13. Covas MI, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fito M, Lopez-Sabater C, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(4):608-16.
14. Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, et al. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr.* 1999; 129(7):1269-77.
15. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(20):9692-8.
16. St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpre F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling. *Curr Alzheimer Res.* 8(5):543-51.
17. Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, et al. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007; 17(7):535-45.

18. Incani A, Deiana M, Corona G, Vafeiadou K, Vauzour D, Dessi MA, et al. Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Mol Nutr Food Res.* 54(6):788-96.
19. D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, et al. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(7):908-19.
20. Deiana M, Incani A, Rosa A, Corona G, Atzeri A, Loru D, et al. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(9):2984-90.
21. Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr.* 2007; 46(2):70-8.
22. Gonzalez-Santiago M, Martin-Bautista E, Carrero JJ, Fonolla J, Baro L, Bartolome MV, et al. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 2006; 188(1):35-42.
23. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol.* 662(1-3):78-84.
24. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, et al. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(11):1492-8.
25. Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T, et al. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(5):555-64.
26. Deiana M, Incani A, Rosa A, Atzeri A, Loru D, Cabboi B, et al. Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage. *Chem Biol Interact.* 193(3):232-9.
27. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr.* 1997; 127(2):286-92.
28. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem.* 1999; 10(3):159-65.
29. Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13(1):93-9.
30. (NCBI) NCfBI. CASP3 caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase [Homo sapiens]. Bethesda MD, USA; 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/836>.
31. Guo W, An Y, Jiang L, Geng C, Zhong L. The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells. *Phytother Res.* 24(3):352-9.
32. Loru D, Incani A, Deiana M, Corona G, Atzeri A, Melis MP, et al. Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicol Ind Health.* 2009; 25(4-5):301-10.
33. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, et al. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and



other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. J Nutr. 2008; 138(8):1411-6.

*Texto escrito conforme o Acordo Ortográfico - convertido pelo Lince.*



