

Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## RESPOSTA DO EXTRATO DA ESPÉCIE SHINUS LENTISCIFOLIUS AO ESTRESSE OXIDATIVO <sup>1</sup> RESPONSE OF SHINUS LENTISCIFOLIUS SPECTRUM EXTRACT TO OXIDATIVE STRESS

Larissa Vilma Lohmann<sup>2</sup>, Bárbara Moreira<sup>3</sup>, Jéssica B.Corrêa<sup>4</sup>, Ilaine Teresinha Seibel Gehrke<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Greice Montagner<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa

<sup>2</sup> Aluna de Engenharia Química da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijuí), Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>3</sup> Aluna de Engenharia Química da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijuí).

<sup>4</sup> Mestranda Programa de Pós-Graduação em atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijuí).

<sup>5</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida/UNIJUI. Orientadora

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida - DCVida/UNIJUI

<sup>7</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida/UNIJUI

### 1-Introdução

A espécie *Schinus lentiscifolius*, é utilizada pela população para uma série de enfermidades, sendo necessário, validar o uso tradicional desta, com estudos científicos, para isso, faz-se necessário à identificação dos constituintes químicos e correlaciona-los com a atividade biológica, bem como, delinear sua precisão quanto aos mecanismos e possíveis valores terapêuticos, particularmente relacionados ao estresse oxidativo.

O organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante, como mecanismo de defesa contra os radicais livres, que são formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos e, quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2009). O peróxido de hidrogênio exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor facilmente as membranas celulares e gerar radical hidroxila. (BARREIROS et al., 2006)

Diante das informações apresentadas, este trabalho tem como objetivo analisar se o extrato da planta utilizada vem a inibir a atuação do peróxido de hidrogênio (reagente responsável pelo dano celular), para concluir como sendo, o extrato, bom para a saúde humana.

### 2- Metodologia

Os experimentos foram realizados de acordo com um protocolo já existente no laboratório de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijuí). (SINGH, 1988)

**Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA****2.1-Preparação da suspensão celular**

Os experimentos foram realizados com ratos *Wistar* fêmeos (*Rattus norvegicus*, Var. *albinus*). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sendo realizada incisão abdominal longitudinal mediana de aproximadamente 5 cm, a partir do *processus xiphoideus*. Os linfonodos mesentéricos foram retirados e tiveram sua gordura circundante removida sobre papel filtro. Os linfócitos foram separados do tecido linfóide por esmagamento, ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS). Essa suspensão foi filtrada em filtro Whatman (catálogo n° 2105 841, 100x150mm), e centrifugada a 1000g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 5 mL. Com auxílio de um microscópio, verificou-se a viabilidade celular para obter uma suspensão de aproximadamente  $1 \times 10^6$  Células/mL. Posteriormente, a suspensão foi separada em quatro grupos: controle DMSO1%, EXT32, EXT32+  $H_2O_2$  e  $H_2O_2$ . De acordo com esses grupos, foi adicionado  $10 \mu L$  da suspensão a  $90 \mu L$  de agarose de baixo ponto de fusão (LPM), espalhou-se sobre a lamina, adicionado a lamínula e levado à geladeira por 5 minutos. Depois da retirada das lamínulas, as lâminas foram encaminhadas para o processo de lise. A escolha do extrato na concentração  $32 \mu g/mL$  se deu devido a experimentos anteriores, realizados pela Mestranda Jéssica B. Corrêa, onde mostrou que foi capaz de diminuir a lipoperoxidação (LPO) induzida pelo  $H_2O_2$ . Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UNIJUI (n° 005/2016).

**2.2- Lise**

Foram removidas as lamínulas e as lâminas colocadas em cubetas de vidro apropriadas e protegidas da luz já com solução de lise gelada (preparado com uma hora de antecedência) (146,1g NaCl, 37,2g EDTA e 1,2g Tris base, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO e água miliQ), onde as lâminas ficaram por aproximadamente 29 horas.

**2.3- Eletroforese**

O procedimento se baseia em Posterior retirada das lâminas da Lise, elas são colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese (solução A 200g NaOH em 500ml de água e solução B 14,89g de EDTA em 200ml), solução de uso (36 mL da solução A e 6mL de B) onde ficaram em descanso por 20 minutos e protegidas da luz. Após, foi realizada eletroforese em condições alcalinas (pH >13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 20 minutos. A corrente foi controlada pelo volume do tampão. Esta etapa foi feita com a cuba de eletroforese no gelo para manter a temperatura a  $4^\circ C$  e ao abrigo de luz.

**2.4-Neutralização, fixação e coloração**

As amostras foram cobertas com o tampão TRIS (0,4 M Tris pH 7,5), para serem neutralizadas por cinco minutos. Esta etapa foi repetida três vezes, desprezando-se o tampão em cada troca. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e colocadas para secar "overnight", em temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram colocadas por 10 minutos em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco (heptahidratado) e 5% de glicerol), sendo lavadas três vezes em água destilada. Após foram

**Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

colocadas em estufa para secagem à 37°C por 2 horas. Ao retirar as lâminas da estufa, elas foram hidratadas por cinco minutos em água destilada.

Em seguida, as amostras foram coradas, por aproximadamente 30 minutos, em solução de coloração com prata com duas soluções, onde A = 5% de carbonato de sódio, e B = 0,1% de nitrato de amônia + 0,1% de nitrato de prata + 0,25% de ácido tungstosilícico + 0,15% de formaldeído, a 37°C até que a solução comece a escurecer. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada, sendo colocadas por cinco minutos em solução de parada (ácido acético 1% em água destilada) e, novamente lavadas três vezes em água destilada. Após este processo, as lâminas ficaram secando em temperatura ambiente e foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 40X para investigação da presença de alterações no DNA (cometas) e análise dos núcleos.

**2.5 - Análises das lâminas**

Cada célula contada foi analisada e classificado o tipo de dano conforme a dimensão e a extensão da “cauda do cometa”. A análise leva em referência a proporção do tamanho do núcleo em relação aos fragmentos de DNA, conforme as indicações na tabela abaixo (Tabela 1): (GREICE MONTAGNER,2017)

Tabela 1: Classificação de danos.

Tipo de dano	Ilustração	Visualização no microscópio	Descrição
0			O núcleo aparece intacto, sem nenhuma cauda.
1			O núcleo aparece com uma pequena cauda.
2			O núcleo apresenta uma cauda um pouco maior que no dano 1, aproximadamente do mesmo tamanho do núcleo.
3			A cauda apresenta-se maior que o núcleo, porém a extensão é maior apenas no comprimento.
4			A cauda apresenta migração maior que o núcleo em comprimento e também apresenta uma espécie de alargamento.
apoptose			O núcleo apresenta-se muito pequeno ou inexistente em relação à cauda e na maioria das vezes aparece separado da cauda.

Fonte: Protocolo de padrão de análise do teste cometa (Greice Montagner, 2017)

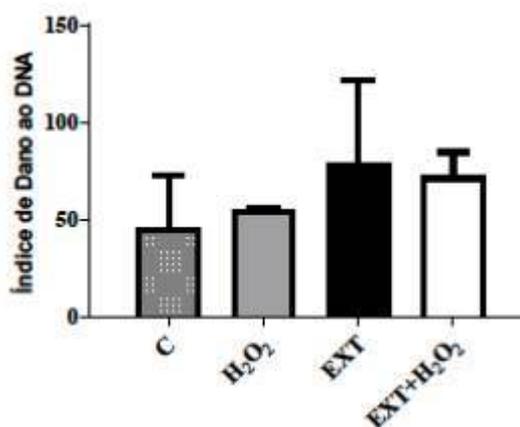
Após analisar cada célula e classificá-la, uma das formas de analisar é pelo cálculo do índice de danos, onde pega-se o número de células que apresentaram o dano e multiplica-se pelo tipo de

**Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

dano e soma-se obtendo-se um índice de danos. Ao analisar-se 50 células, o valor de índice pode variar de zero (nenhuma célula com dano) até 200 (onde temos todas as células apresentando dano 4). (GREICE MONTAGNER, 2017)

### 3-Resultados e discussões

Gráfico 1-Índice de Dano ao DNA comparado aos grupos



Através de dados preliminares, observa-se no gráfico que ao comparar os índices de Dano ao DNA o grupo peróxido de hidrogênio foi inferior ao grupo extrato e também ao grupo extrato acrescido de peróxido de hidrogênio.

### 4-Considerações finais

Através desse estudo, podemos observar que o extrato analisado da espécie *Schinus lentiscifolius* não somente causa danos ao DNA como também pode ser um agente tóxico para a célula. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão do perfil dos metabólitos associados ao estresse oxidativo.

**Palavras-chave: Peroxidação; Índice; Dano.**

**Keywords: Peroxidation; Index; Damage**

### 5-Referências

[1] MONTAGNER, G. F. F. **Análises das lâminas submetido ao teste Cometa.** Professora do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde, 2017.

[2] MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A.

**Evento: XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

[3] BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

[4] CORRÊA, J. B., Caracterização de compostos fenólicos do extrato da casca de *shinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) e seu efeito sobre a resposta celular ao estresse em linfócitos. 2017. 133 f. UNIJUI, Campus Ijuí, 2017.

[5] SINGH, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. e Schneider, E.L (1988). Uma simples técnica para quantificação de baixos níveis de dano do DNA em indivíduos Células. Exp. Cell Res. 175:184-191