

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE FISIOLOGIA**

**EFEITO INIBITÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DO
GUARANÁ, DO CHÁ VERDE E DA
EPIGALOCATECINA-3-GALATO SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA QUE DEGRADA A
INSULINA EM PRÓSTATA DE RATO**

JULIANY SILVEIRA BRAGLIA CÉSAR VIEIRA

**Recife, PE – Brasil
2006**

JULIANY SILVEIRA BRAGLIA CÉSAR VIEIRA

**EFEITO INIBITÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DO
GUARANÁ, DO CHÁ VERDE E DA
EPIGALOCATECINA-3-GALATO SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA QUE DEGRADA A
INSULINA EM PRÓSTATA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Biológicas – área
de concentração Fisiologia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos pré-requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas – área Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pedro Udrisar

Co-orientador: Profa. Maria Inês Wanderley

Recife, PE – Brasil
2006

Vieira, Juliany Silveira Braglia César

Efeito inibitório do extrato aquoso do guaraná, do chá verde e da epigallocatequina-3 galato sobre a atividade da enzima que degrada a insulina em próstata de rato / Juliany Silveira Braglia César Vieira. – Recife: A Autora, 2007.

58 folhas : il., gráficos, tabelas.

Dissertação (Mestrado) – Ciências Biológicas. UFPE. CCB.

1.Insulina 2.Chá Verde 3.Guaraná 4.Catequinas 5.Próstata I. Título.

573.4

CDD (22.ed.)

UFPE

612.43

CDU (2.ed.)

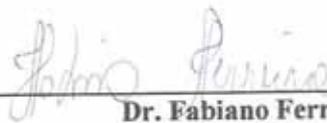
CCB - 2007 - 002

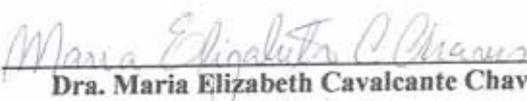
JULIANY SILVEIRA BRAGLIA CÉSAR VIEIRA

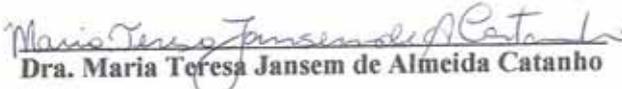
Efeito inibitório do extrato aquoso do guaraná, do chá verde e da epigalocatecina-3-galato sobre a atividade da enzima que degrada a insulina em próstata de rato

ORIENTADOR: 
Dr. Daniel Pedro Udrisar

BANCA EXAMINADORA:


Dr. Fabiano Ferreira


Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves


Dra. Maria Teresa Janssen de Almeida Catanho

Reife, 30 de Novembro de 2006.

Dedico este trabalho à memória de minha mãe Dóris, lembrança constante de momentos eternos... Pelo seu exemplo de vida e ensinamentos valiosos que norteiam o meu caminhar.

AGRADECIMENTOS

A elaboração de uma tese é um processo complexo, fruto de um trabalho coletivo. Várias pessoas contribuíram para que esse trabalho chegasse a esta etapa final, a todas elas registro meus sinceros agradecimentos.

A Deus, cuja presença permanente me manteve firme mesmo diante de situações adversas, pelo seu amparo e consolo.

Ao meu amado marido Lauro, pelo carinho, incentivo, paciência, por seu senso de humor incomparável, pela compaixão deliciosa, enfim por tornar cada momento do meu dia especial.

Aos queridos professores Daniel e Inês, exemplos de conduta profissional, ética e moral devo um parágrafo mais extenso. Foram 2 anos de aprendizado constante num ambiente harmonioso cuja experiência permanecerá nos meus registros de momentos sublimes. Senti-me não somente amparada “cientificamente” como também cercada de duas pessoas solidárias frente as minhas perdas e conquistas pessoais. Não tenho como descrever o quanto sou agradecida, vocês são pessoas muito especiais em minha vida!!!

Ao meu pai, por ser peça fundamental da construção do meu caráter, pelo incentivo dado, por sua dedicação à família, por nos transmitir o gosto pelo estudo e a necessidade do relacionamento profundo com Deus. Por ser meu amigo e conselheiro.

Aos amigos que fiz durante os 2 anos de mestrado Necíula, Érika, Léo, Érica, Fernandinha e Leila, porque nossa amizade foi além das disciplinas, dos estudos intermináveis para as provas, das traduções coletivas dos artigos. A amizade, apoio e cumplicidade nesses anos foram muito importantes para que este trabalho chegasse até aqui.

À minha sogra D. Neuma, pela disponibilidade irrestrita em me ajudar, pelo cuidado minucioso com nosso pequeno Matheus, por me acolher de forma tão maravilhosa, por tornar nossa convivência simples e harmoniosa.

Às minhas cunhadas Maria Gentila e Giselle que se tornaram verdadeiras irmãs, pelo apoio e amizade.

E também não poderia deixar de agradecer ao meu filho Matheus, que veio à somar nossa felicidade, um presente de Deus pra preencher ainda mais nossas vidas.

“Valeu a pena? Tudo vale a pena,
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”.

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Ações da Insulina.....	12
2.2 A IDE e a ação intracelular da insulina	13
2.3 Degradação celular da insulina e outras ações biológicas da IDE.....	14
2.4 Atividades biológicas do Guaraná	16
2.5 Efeitos Biológicos do Chá Verde.....	17
2.6 Classificação dos polifenóis.....	19
3.OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Reagentes	23
4.2 Animais e preparação dos extratos de tecido.....	23
4.3 Obtenção do extrato aquoso de guaraná e chá verde	24
4.4 Preparação da fração citosólica.....	24
4.5 Determinação da concentração total de proteínas-método de Bradford	25
4.6 Preparação da ¹²⁵ I-insulina monoiodada	25
4.7 Degradação da ¹²⁵ I-insulina	25
4.8 Adsorção da ¹²⁵ I-insulina ao carvão-dextrano	26
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
MANUSCRITO SUBMETIDO.....	37
CONCLUSÕES	58

RESUMO

A enzima que degrada (IDE) é uma proteína intracelular que degrada insulina e outros peptídeos e hormônios. A degradação da insulina é um processo importante tanto para o controle das respostas celulares ao hormônio como para a interação da insulina com seus tecidos-alvo. Muitas funções celulares estão relacionadas com a IDE em adição à degradação, incluindo funções regulatórias e de ligação. A IDE é regulada em situações de proliferação celular e apoptose, mostrando um aumento ou diminuição em sua quantidade e atividade respectivamente nessas condições. Foi demonstrado que a atividade do proteossoma é requerida para que as células cancerígenas sobrevivam e que o consumo de vegetais e frutas está associado à diminuição do risco de câncer. As catequinas (polifenóis solúveis em água) presentes em muitos alimentos, incluindo chá verde, guaraná, frutas e vegetais, apresentam efeitos inibitórios sobre a atividade do proteossoma e induzem apoptose em células tumorais. O presente trabalho avaliou o efeito do extrato aquoso do chá verde e do guaraná (GTE e GE) e das catequinas puras encontradas nesses extratos, a epigallocatecina-3-galato (EGCG), a (-) epicatecina e a (+) catecina, sobre a atividade da IDE "in vitro". Frações citosólicas de homogenizados de próstatas de rato foram incubadas com ^{125}I -insulina na presença de GTE: 87.5 a 70 $\mu\text{g}/\text{ML}$, GE: 175 a 1400 $\mu\text{g}/\text{ML}$ e EGCG: 50 a 300 $\mu\text{g}/\text{ML}$. Os resultados mostraram que o GTE e o GE são capazes de inibir a atividade da IDE e que esse efeito foi mimetizado somente pela EGCG. A presença de um grupo galato na epigallocatecina-3-galato parece ser importante para seu efeito inibitório na degradação da insulina, sugerindo uma relação estrutura-atividade nesse efeito inibitório. O efeito inibitório do extrato de guaraná pode ser devido à presença dos taninos.

Palavras chave: enzima que degrada a insulina – chá verde – guaraná – catequinas – próstata.

ABSTRACT

Insulin degrading enzyme (IDE) is an intracellular protein that degrades insulin and others peptides and hormones. Insulin degradation is important both in the control of cellular responses to the hormone and in the interaction of the hormone with their target tissues. Multiple cellular functions are related to the IDE in addition to degradation, including binding and regulatory functions. IDE is regulated in conditions of cellular proliferation and apoptosis, showing an increase or decrease in quantity and activity under these respective conditions. It has been demonstrated that the proteasome function is necessary for cancer cells to survive and that vegetable and fruit consumption are associated in the reduction of cancer risk. Catechins (water-soluble polyphenols) present in many diets including green tea, guarana, fruits and vegetables show inhibitory effects on the proteasome activity and induce tumor cell apoptosis. The present study evaluated the effect of aqueous green tea and guaraná extract (GTE and GE) and the pure catechins found in these extracts, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-) epicatechin (EC) and (+) catechin (C) on the activity of IDE *in vitro*. Cytosolic fractions of a rat prostate homogenate were incubated with ^{125}I -insulin in the presence of GTE: 87.5 to 70 $\mu\text{g}/\text{ML}$, GE: 175 to 1400 $\mu\text{g}/\text{ML}$ and EGCG: 50 to 300 $\mu\text{g}/\text{ML}$. The results showed that GTE and GE are capable of inhibiting the activity of IDE and that this effect was mimicked only by EGCG. The presence of a gallate group in the EGCG it seems to be important for its inhibitory effect on ^{125}I -insulin degradation, suggesting a structure-activity relationship in this inhibitory effect. The inhibitory effect of guaraná extract may be due to its tannins.

Key words: insulin-degrading enzyme – green tea – guarana – catechins – prostate

1. INTRODUÇÃO

A enzima que degrada a insulina (IDE) é uma proteína intracelular que inicia e controla a degradação da insulina (Burghen e col., 1972; Duckworth e col., 1998; Duckworth e col., 1997; Duckworth e col., 1988; Kuo e col., 1991; Camberos e col., 2001; Kaylar e col., 1989; Saltiel, 2000; Shii e col., 1986; Udrisar e col., 1992). A degradação da insulina é um processo regulado e é considerado parte integral da interação do hormônio com seus tecidos-alvo (Duckworth e col., 1998; Udrisar e col., 1992). Esse evento biológico apresenta correlação significativa com várias funções celulares como crescimento e diferenciação celular (Udrisar e col., 2005). Esta enzima degrada, além de insulina e glucagon, o fator de crescimento transformante α (TGF- α) “in vitro” (Garcia e col., 1989), o peptídeo β amilóide (Kurochkin, 1998), o peptídeo natriurético atrial (ANP) “in vivo” (Muller e col., 1991) e outros peptídeos (Duckworth e col., 1998). Essa protease capaz de remover insulina e fatores de crescimento pode desempenhar um papel importante nos processos de expressão gênica e crescimento celular. Recentemente evidenciou-se o proteossoma como um alvo particularmente importante da ação da insulina. Este se encontra envolvido no controle do ciclo celular e sofre o efeito inibitório da insulina através da interação desta com a IDE (Duckworth e col., 1994; Bennett e col., 2000). Células tumorígenas também parecem ser dependentes da função do proteossoma uma vez que a inibição deste leva a uma interrupção do crescimento na fase G1 e/ou a uma indução da apoptose (Chen e col., 2004). Estudos recentes demonstraram que a IDE encontra-se aumentada em quantidade e atividade sob condições de proliferação celular na fração citosólica de homogenizados de próstata de ratos, enquanto que sob condições de apoptose ocorre uma diminuição nesses dois parâmetros (Udrisar e col., 2005). Nas últimas décadas o uso de produtos naturais tornou-se crescente em todo o mundo (Santa Maria e col., 1998). O guaraná (*Paullinia cupana* Mart. *Var sorbilis* Mart Sapindaceae) é uma planta encontrada na Amazônia e muitas qualidades lhe são atribuídas: de estimulante a afrodisíaca. A semente do guaraná contém cafeína (2,5 – 5%), teofilina e teobromina e altas concentrações de tanino (16 %), além da presença dos polifenóis (catequinas ou flavonóides). O tanino tem efeitos antioxidante e antiproliferativo, o que permite inferir que o guaraná pode modificar o balanço apoptose/proliferação celular. O chá verde (*Camellia sinensis*) é uma bebida mundialmente popular e seu consumo tem feito parte da cultura chinesa nos

últimos 5.000 anos. Seu amplo consumo nos países asiáticos está associado à baixa incidência de determinados cânceres e doenças em humanos e a ele várias atividades biológicas tem sido relatadas incluindo efeitos antifúngicos, anticarcinogênico, antitumorígeno, antioxidante e redutor de colesterol (Kao e col., 2000; Wu e col., 2004). Os constituintes das folhas de chá verde incluem altos níveis de polifenóis (30 a 45 %) principalmente a epigalocatecina-3-galato (EGCG), a qual está ausente no guaraná, seguida em percentual pela (-) epigalocatecina, (-)-epicatecina, (-)-epicatecina-3-galato; também contém 3 a 4 % de cafeína e < 0,2% das outras metilxantinas teobromina e teofilina (proporção similar à do guaraná) (Graham, 1992). Recentemente foi descrito que a administração sistêmica de EGCG isolada do chá verde diminui o peso da próstata em ratos (Kao e col., 2000). Postula-se que a EGCG possui efeitos inibitórios sobre o crescimento de células cancerígenas em sistemas de cultura e em modelos in vivo (Gupta e col., 2003). Estudos epidemiológicos prévios sugerem que o consumo de chá tem um efeito protetor contra câncer em humanos e em animais. Os polifenóis presentes neste podem suprimir a formação e crescimento de câncer incluindo os de pele, pulmão, fígado, esôfago e estômago (Nam e col., 2001). Além disso, hipóteses sugerem os flavonóides como responsáveis por atividades inibitórias do proteossoma e indutoras da apoptose (Chen e col., 2005). Dessa forma, este trabalho objetivou determinar o efeito do extratos aquosos de guaraná e do chá verde, assim como também dos componentes puros mais importantes presentes nessas duas plantas (flavonóides) sobre a atividade da IDE em citosol de homogeneizado de próstata de ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ações da Insulina

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido, sendo essencial para o apropriado desenvolvimento e crescimento tecidual e para a manutenção da homeostase da glicose. É secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans principalmente em resposta a níveis circulantes aumentados de glicose e aminoácidos no período pós-prandial (Pessin & Saltiel, 2000). A extensão das ações da insulina é mais diversa do que a de qualquer outro hormônio. Os sistemas influenciados pela insulina incluem quase todo o tipo de função celular: metabolismo da glicose, metabolismo dos lipídios, metabolismo das proteínas, expressão gênica e controle da atividade enzimática (Duckworth e col., 1997). Os efeitos da insulina podem dividir-se em processos de curto, intermediário e longo prazo. Dentre os processos de curto prazo destacam-se transporte de glicose, síntese de glicogênio e glicólise, porém outros eventos como fluxo de íons, proliferação da membrana e antilipólise também se classificam dentro dessa divisão e assim como os anteriormente citados requerem segundos a minutos para ocorrer. A maioria dos eventos intermediários envolvem regulação de RNAm, eventos transcricionais e metabolismo de proteínas e lipídios, necessitando de minutos a horas para a sua realização. Os processos a longo prazo como crescimento e diferenciação celular requerem horas a dias (Duckworth e col., 1997).

As ações da insulina ao nível celular são iniciadas pela ligação da insulina ao seu receptor de membrana, uma glicoproteína heterotetramérica constituída de 2 subunidades α e 2 subunidades β ligadas por pontes dissulfídicas. A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação à insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela tradução do sinal. A insulina liga-se a subunidade α e estimula a autofosforilação das tirosinas da subunidades β s do receptor da insulina. A subunidade β é uma proteína quinase capaz de se autofosforilar (atividade tirosina quinase intrínseca) e de fosforilar outros substratos nos resíduos tirosina. A autofosforilação do receptor da insulina ocorre através de uma cascata de reações de fosforilação intramoleculares (Saad, 1994). Ao tornar-se ativado pela fosforilação, o receptor da insulina fosforila vários importantes substratos na tirosina, incluindo