

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica

EFEITO DA EPICATEQUINA GALATO SOBRE PARÂMETROS GLIAIS NA
LINHAGEM C6 DE GLIOMA DE RATO

RENATA TORRES ABIB

Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos L. Perry

Porto Alegre

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica

EFEITO DA EPICATEQUINA GALATO SOBRE PARÂMETROS GLIAIS NA
LINHAGEM C6 DE GLIOMA DE RATOS

RENATA TORRES ABIB

Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos L. Perry

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2008

Dedico aos meus pais, ao meu irmão
e a minha afilhada Stephanie

Agradeço:

A minha família, em especial aos meus pais: Elbio e Maria Elza por tudo que me proporcionaram até hoje e por todo incentivo e amor. Ao meu irmão e padrinho Elbio, a minha cunhada Vânia, e a minha querida afilhada Stephanie pelo apoio, alegrias e estímulo. E também ao meu namorado Marcelo que esteve sempre presente me motivando.

A minha orientadora Prof. Carmem, pela confiança no meu trabalho e por todo esforço, dedicação, disponibilidade, conhecimento e amizade ao longo deste período. Ao meu Co-orientador Prof. Perry. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof. CA por estes dois anos de convívio, pelo apoio, esclarecimento de dúvidas, harmonia e organização do laboratório.

À professora Ana Feoli que sempre me incentivou e me abriu caminhos.

Ao meu colega e grande amigo André, que dedicou muitas horas dos seus dias a me ensinar e me ajudar, sempre com bastante vontade, sabedoria e bom-humor. E a todos colegas e amigos do lab 33 que tornaram as rotinas menos pesadas, as técnicas menos difíceis e os problemas em soluções, pelo convívio e colaboração para o desenvolvimento e união do grupo. À Alessandra que possibilitou a segurança da minha pesquisa, com seu trabalho.

Às minhas colegas e amigas da faculdade (TDB), em especial à Juliana e à Gabriela, que acompanharam e incentivaram meu crescimento profissional, além de toda amizade e companheirismo. Às amigas Letícia, Alessandra, Janaina, Gabriela, Viviane e Karina pelas décadas de amizade e apoio.

Hoje, agradeço à equipe do Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital São Lucas da PUCRS que me deu a oportunidade de colocar em prática meus

conhecimentos e proporcionar uma experiência profissional muito rica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, assim como a todos funcionários do Departamento de Bioquímica que possibilitaram e asseguraram a execução do meu trabalho.

“O Homem “sujeito do conhecimento” aperceber-se-á enfim de que o Homem “objeto do conhecimento” é a chave de toda a Ciência da Natureza.”

Teilhard de Chardin

ÍNDICE	Pág
I. INTRODUÇÃO	01
1. <i>Camellia Sinensis</i>	01
2. Flavonóides	02
3. Astrócitos e Neuroproteção	05
3.1. <i>Linhagem C6</i>	06
3.2. <i>Proteína S100B</i>	06
3.3. <i>Glutamato</i>	08
4. Efeito de Polifenóis sobre Espécies Reativas de Oxigênio	10
5. Peróxido de Hidrogênio	10
6. Dano ao DNA	11
II. OBJETIVOS	13
III. CAPÍTULO I – Epicatechin Gallate Increases Glutamate Uptake and S100B secretion in C6 cells lineage	14
IV. CAPÍTULO II – Epicatechin Gallate Exerts Genoprotective and Genotoxic Effects <i>in vitro</i>	21
V. DISCUSSÃO	41
1. Concentrações de ECG em modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	42
2. Efeitos da ECG sobre morfologia e viabilidade celular em C6	43
3. Efeito da ECG sobre captação de glutamato	44
4. Efeito da ECG sobre secreção de S100B	46
05. ECG como composto redox ativo.....	46
6. Efeito da ECG sobre dano ao DNA em C6	48
7. Efeito da ECG contra a genotoxicidade induzida por H ₂ O ₂	49
8. Hipóteses e Mecanismos	50
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
VII. CONCLUSÕES	54
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
IX. ANEXO I – LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO.....	68

RESUMO

Hoje há um grande interesse em componentes da dieta, como os polifenóis do chá verde, os quais podem exercer efeitos de proteção contra várias doenças neurológicas, incluindo Alzheimer, isquemia e acidente vascular cerebral. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da (-) epicatequina 3-galato (ECG), um dos principais antioxidantes do chá verde, em células da linhagem C6. Avaliamos morfologia e integridade celular, captação de glutamato e secreção de S100B e o efeito sobre a genotoxicidade induzida por H_2O_2 , na presença de 0,1; 1 e 10 μM de ECG. Após 6 h de incubação, houve alteração morfológica somente com 10 μM de ECG. Entretanto, após 24 h, todas as concentrações de ECG induziram formação de processos ao redor do corpo celular. Houve perda da integridade celular (~ 6%) somente após 24 h, apenas na presença de 10 μM de ECG. Houve diminuição (~36%) na captação de glutamato após 1 h com 1 e 10 μM de ECG. Após 6 h, houve aumento na captação de glutamato (~70%) a partir de 0,1 μM . Também se observou aumento significativo na secreção de S100B com 1 μM de ECG (~ 36%) e com 10 μM (69%) após 1 h, enquanto após 6 h, todas as concentrações induziram um aumento na secreção de S100B (~60%). Curiosamente, na presença de 10 μM de ECG houve efeito genotóxico, dependente do tempo de exposição. Já com doses mais baixas (0,1 e 1 μM), a ECG foi capaz de prevenir completamente a genotoxicidade induzida pelo H_2O_2 . Em suma, demonstramos que a ECG pode modular captação de glutamato e secreção de S100B. Além disso, pode exercer efeitos genoprotetores ou genotóxicos em células C6, dependendo da concentração e do tempo de incubação. Estes resultados sugerem que a ECG pode contribuir para o papel neuroprotetor das células gliais e contrapor-se a patologias neurológicas associadas ao estresse oxidativo.

ABSTRACT

There is a current interest in dietary compounds, such as green tea polyphenols, that can favor protection against a variety of brain disorders, including Alzheimer's disease, ischemia and stroke. The objective of the present study was to investigate the effects of (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), one of three major green tea antioxidants, on C6 lineage cells. We evaluated cell morphology and integrity; specific astrocyte activities; glutamate uptake; S100B secretion and the effect on genotoxicity induced by H₂O₂ in the presence of 0.1, 1 and 10 μM ECG. During 6 h of incubation, cell morphology was altered only at 10 μM ECG; After 24 h, cells become stellate (process-bearing cells), in the presence of all concentrations of ECG. Loss of cell integrity (~ 6%) was observed after 24 h with 10 μM ECG. ECG (1–10 μM) induced a decrease (~ 36%) in glutamate uptake after 1 h, however, after 6 h, occurred a sustained increase in glutamate uptake (~ 70%) from 0.1 μM. A significant increase in S100B secretion was observed at 1 μM ECG (36%) and 10 μM ECG (69%) after 1 h, in contrast to 6 h, when all doses induced a significant increase (~ 60%). Interestingly, ECG 10 μM showed genotoxic effects depending on time of incubation. In contrast, smaller doses of ECG (0.1 and 1 μM) were able to almost completely prevent genotoxicity induced by H₂O₂. In summary, this study demonstrates that ECG can induce a significant improvement in glutamate uptake and S100B secretion. Also, ECG can exert genoprotective or genotoxic effects in C6 cells depending on concentration and time of incubation. These results suggest that ECG could contribute to the neuroprotective role of astroglial cells to counteract brain pathologies associated with oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

EAAC = Transportador de glutamato (do Inglês “excitatory aminoacid carrier”)

EAAT = Transportador de glutamato (do Inglês “excitatory aminoacid transporter”)

ECG = Epicatequina galato

EGC = Epigalocatequina

EGCG = Epigalocatequina galato

ERO = Espécies reativas de oxigênio

GFAP = Proteína ácida fibrilar glial (do Inglês “glial fibrillary acidic protein”)

GLAST = Transportador de glutamato astrocítico (do inglês “glutamate astrocyte transporter”)

GLT = Transportador de glutamato (do Inglês “glutamate transporter”)

RL = Radical livre

SOD= Superóxido dismutase

I. INTRODUÇÃO

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo todo (Yang et al,1998). O crescente interesse pela bebida deve-se grandemente a estudos que mostram uma relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças degenerativas como câncer e de doenças cardiovasculares (Ebling et al, 2005).

1. *Camellia Sinensis*

O chá, derivado da *Camellia sinensis* (Figura 1), apresenta muitos efeitos benéficos à saúde (Yang et al., 1998). Tais benefícios estão sendo atribuídos à propriedade antioxidante dos polifenóis que o constituem (Hakim et al, 2003).



Figure 1. Morphology of Green Tea, *Camellia sinensis*.

Esta espécie é extensivamente cultivada no mundo, particularmente: Sri Lanka, Índia, China, Japão, Taiwan, Quênia, Camarões, Tanzânia e Malawi. No Brasil, está associado a colônias japonesas, por exemplo, como ocorre no município de Registro, localizado na região sul-atlântica, no interior do estado de São Paulo.

Figura 1. Ilustração da planta *Camellia sinensis*. Retirado de Ravindranath et al (2006).

Os chás comerciais são usualmente classificados em quatro grandes categorias: **Chá Branco**, feito das mais tenras folhas, por desidratação solar, mais raro e de maior custo, com alta capacidade antioxidante; **Chá Verde**, produzido sob altas temperaturas, um processo que inativa a oxidação; **Chá Oolong**, conhecido como chá roxo, sofre um processo de semi-oxidação e o **Chá Preto**, intensamente oxidado (Friedman et al,2007).

O chá verde é rico em flavonóides, que são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas.

2. Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e podem ser subdivididos em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas. O que diferencia os flavonóis dos demais flavonóides é a presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C, (Mukhtar & Ahmad, 2000), conforme ilustrado na Figura 2.

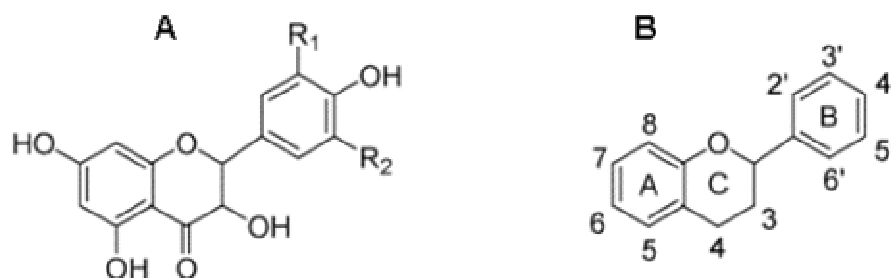


Figura 2. Estrutura básica de flavonóis (A) e de flavonóides (B). Retirado de Mukhtar & Ahmad (2000).

Os flavonóides começaram a ser estudados no início dos anos 80 quando Steinmentz e Potter (1991) demonstraram a relação existente entre uma dieta rica em frutas e vegetais e a redução do risco de doenças crônicas. Desde então, a atenção passou a ser direcionada para os compostos potencialmente bioativos, aos quais a família dos flavonóides pertence (Harnly et al, 2006).

Dos flavonóides do tipo flavanol (catequinas), encontrados no chá verde, em geral, somente 10% do peso seco do chá é composto por 3-flavanol, que é a catequina propriamente dita, ocorrendo um predomínio dos derivados deste flavonóide, dos quais podemos citar: (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) e a (-)-epicatequina (EC) conforme ilustrados na Figura 3.

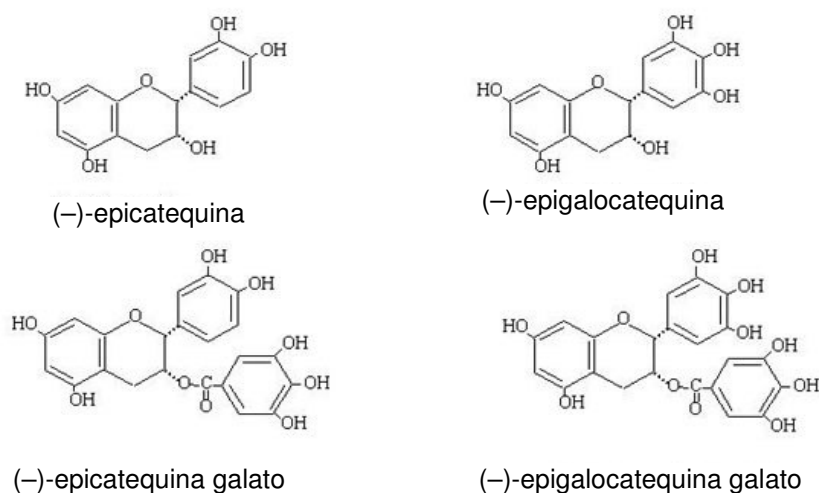


Figura 3. Estruturas características dos principais derivados de catequinas.

Retirado de Mukhtar & Ahmad, 2000).

Algumas das principais características dos flavonóides em sistemas biológicos incluem a sua habilidade de transferir elétrons para ERO, quelar metais, ativar enzimas antioxidantes e inibir oxidases (Doronicheva et al, 2007).

Durante o processo de oxidação, as catequinas vão sendo polimerizadas, formando derivados característicos de cada chá. A Figura 4 ilustra os polímeros de catequinas presentes no chá preto, as teaflavinas e as tearubiginas (Yang et al, 1998).

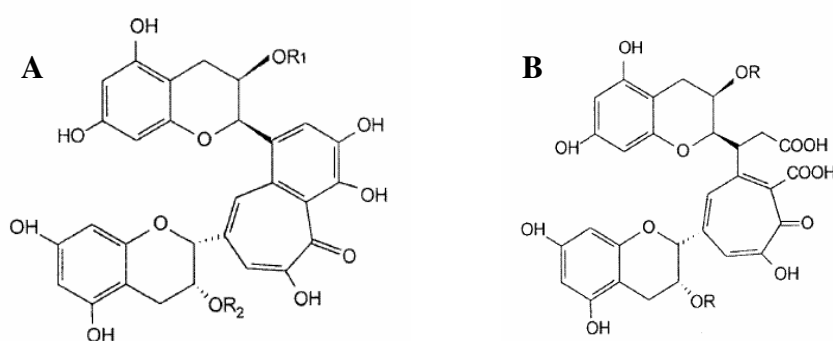


Figura 4. Estruturas características de dois polímeros de catequinas, a teaflavina (A) e a tearubigina (B). Retirado de Mukhtar & Ahmad (2000).

Das catequinas presentes no chá verde, a EGCG é a mais abundante (40–60%), seguido pela ECG (10–20%), EGC (10–20%), EC (4–6%). A ECG e a EGCG possuem algumas características químicas em comum, ambas demonstram uma grande capacidade seqüestradora (do inglês “scavenging”) de radicais. De todas as catequinas, tem se demonstrado que a ECG apresenta o melhor efeito antioxidante (Caturla et al,2003)

Estudos mostram que o pico de concentração plasmática atingidos pelos metabólicos das catequinas ocorre entre uma e duas horas após o consumo e corresponde a aproximadamente 3% da quantidade ingerida (Tsang et al., 2005). As catequinas podem atravessar a barreira hemato-encefálica e em função disso, se tem sugerido um importante papel neuroprotetor para estes compostos (Kakuda, 2002). Embora alguns estudos demonstrem que o efeito neuroprotetor das catequinas ocorra principalmente pela prevenção da peroxidação lipídica e pelo seu papel no seqüestro de radicais livres (Kakuda, 2002), ainda é pouco conhecido o efeito destes polifenóis sobre neuroproteção envolvendo função glial.

3. Astrócitos e Neuroproteção

Os astrócitos exercem um papel fundamental na manutenção da biologia celular durante o desenvolvimento. Além disto, em situações de injúria ou frente a uma patologia neural, podem tornar-se reativos. Esta reatividade ocorre, por exemplo, em resposta a agentes tóxicos, infecções virais, isquemia/hipóxia e doenças neurodegenerativas. Todas estas patologias estão acompanhadas por estresse oxidativo.

Estudos prévios demonstram que, em estágios iniciais de injúria cerebral, a reatividade dos astrócitos é benéfica para os neurônios por regular vários processos biológicos, tais como: concentração de íons e de neurotransmissores extracelulares (como glutamato), secreção de fatores tróficos (como a proteína S100B), controle da interface sangue-cérebro e defesa antioxidante (Takuma et al, 2004).

3.1 Linhagem C6

A linhagem C6 tem sua origem datada da década de 60 e constitui-se numa grande fonte de estudos bioquímicos. Ela foi obtido após injeções em ratos do agente alquilante N-nitrosometiluréia (Benda et al, 1968). Esta linhagem é morfológicamente similar a glioblastomas, quando injetada no cérebro de ratos neonatos (Auer et al, 1981).

A linhagem C6 constitui-se como uma linhagem neural, podendo apresentar características de oligodendrócitos, astrócitos e neurônios (Parker et al, 1980), dependendo do número de passagens. A expressão das proteínas gliais GFAP e S100B atesta o caráter astrocitário (Benda et al, 1971; Dos Santos et al, 2006). Por apresentar características de uma célula astrocitária, a linhagem C6 também é utilizada para investigações de características bioquímicas e metabólicas que envolvam funções astrocíticas (Mangoura et al, 1989; Feng & Zhang, 2004; Cechin et al, 2005; Funchal et al, 2005).

Estas células são também largamente utilizadas em pesquisas visando a regulação de fatores de crescimento e fatores tróficos (como a S100B), bem como inúmeras vias de transdução de sinal (Grobber et al, 2002; Kim et al, 2006).

3.2 Proteína S100B

A S100B é um membro da família de proteínas S100, encontrada principalmente na forma homodimérica (~21 kDa). É uma proteína ligante de cálcio do tipo EF-hand (hélice-alça-hélice), com dois sítios de ligação ao cálcio por monômero (Van Eldik & Wainwright, 2003). Foi isolada há mais de 40 anos (Moore, 1965), a partir de um extrato de cérebro bovino. Posteriormente, verificou-se que

este extrato continha duas proteínas muito similares, a S100A1 e a S100B, e a mesma foi identificada também em tecidos periféricos. Atualmente, são conhecidos 21 membros da família S100 presentes nos mais diversos tipos celulares de vertebrados (Donato, 2003), os quais possuem aproximadamente 50% de homologia na sua seqüência de aminoácidos (Zimmer & Van Eldik, 1988). As proteínas da família S100 receberam esta denominação por serem solúveis mesmo em 100% de sulfato de amônio.

No sistema nervoso central (SNC), a S100B é produzida e secretada principalmente por astrócitos e exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios apresentando funções intra e extracelulares como fosforilação de GFAP e manutenção da integridade do citoesqueleto (Donato, 2003; Frizzo et al, 2004). Culturas primárias de astrócitos e culturas de células da linhagem C6 são comumente utilizadas para estudar a expressão e a secreção de S100B (Van Eldik & Zimmer, 1987; Pinto et al, 2000; Davey et al, 2001).

A proteína S100B tem um efeito duplo dependente da concentração, ou seja, em concentrações na ordem de nanomolar exerce efeito neurotrófico, promovendo crescimento de neuritos, aumentando a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento e em situações de injúria ao SNC (Tramontina et al, 2002; Gottfried et al, 2003; Leite et al, 2006) e protegendo neurônios contra a excitotoxicidade do glutamato (Ahlemeyer et al, 2000; Tramontina et al, 2006). O efeito trófico também é exercido em astrócitos. Já em concentrações na ordem de micromolar, exerce efeito neurotóxico induzindo apoptose (Van Eldik & Wainwright, 2003).

3.3 Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e participa de vários processos fisiológicos, incluindo aprendizado e memória (Lee et al, 2004). Os neurônios contêm aproximadamente 1 a 10 mM de glutamato vesicular, que é liberado das células por impulso. O glutamato contribui para a transdução de sinal por estimular seus receptores e abrir canais iônicos. Depois, o glutamato é captado pelos neurônios ou principalmente pelas células astrogliais por transportadores, e assim, sua concentração no espaço extracelular é mantido entre 1 e 2 mM. O glutamato captado pelos astrócitos é convertido em glutamina e transferido para os neurônios, onde então é convertido novamente em glutamato (Kakuda, 2002), conforme ilustrado na Figura 5.

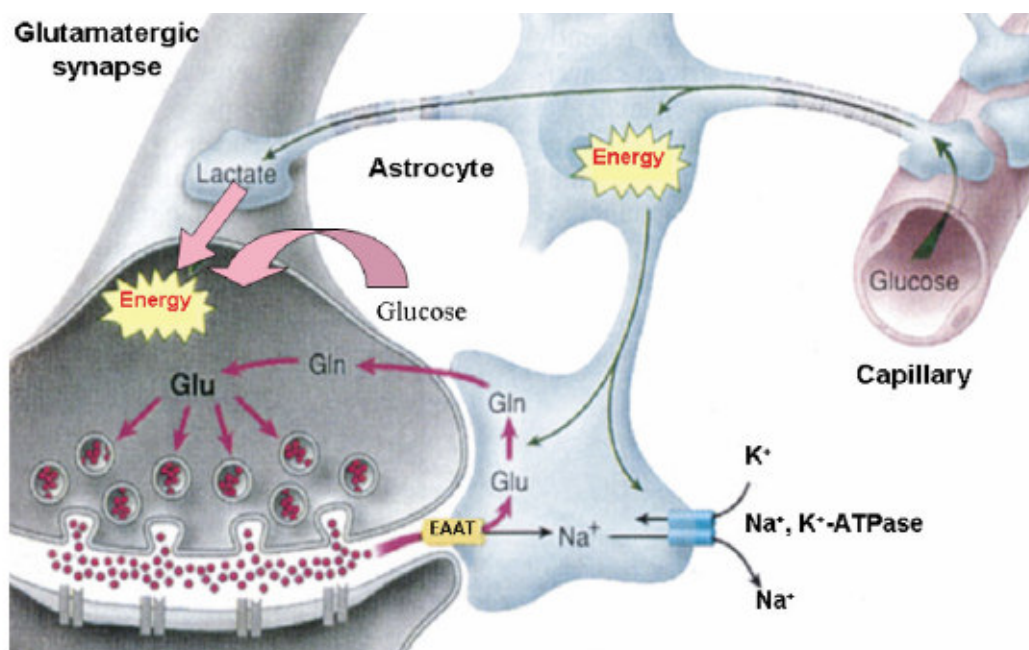


Figura 5. Modelo de acoplamento metabólico entre neurônios e astrócitos.

Retirado de Magistretti, 2006.

Atualmente, cinco tipos de transportadores de glutamato dependentes de sódio estão bem identificados e caracterizados: GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5 (Amara & Fontana, 2002). Os transportadores de glutamato localizados nas membranas das células gliais são de fato os responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de glutamato, garantindo dessa forma a homeostase celular (Anderson & Swanson, 2000; Tanaka 2000; Amara & Fontana, 2002; Emanuelli et al, 2003; Porciúncula et al, 2004).

Dos cinco subtipos de transportadores de glutamato identificados até hoje, GLT-1, localizado exclusivamente nos processos astrocíticos, representa a rota predominante de remoção do glutamato extracelular no encéfalo de ratos adultos, e sua inativação funcional aumenta a concentração de glutamato extracelular a níveis tóxicos (Zhou & Sutherland, 2004).

A linhagem celular C6 pode apresentar os seguintes transportadores de glutamato dependentes de sódio, EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1) e EAAT3 (EAAC1) (Takano et al, 2001; Beart & O'Shea, 2007). Também é expresso em C6 o trocador cistina-glutamato independente de sódio (sistema XC) (Ye & Sontheimer, 1999; Takano et al, 2001). A principal função do sistema XC é a captação de cistina e manutenção dos níveis de glutathione intracelulares (Takano et al, 2001).

4. Efeito de Polifenóis sobre Espécies Reativas de Oxigênio

Os polifenóis do Chá Verde são potentes antioxidantes, e a habilidade destes componentes sobre a remoção de ERO, como peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, dependem da sua estrutura química (Yamamoto et al,2004).

Inúmeros estudos caracterizaram os flavanols como potentes antioxidantes, capazes de atuar eficientemente na remoção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O mecanismo de sua ação envolve a doação de um átomo de hidrogênio e/ou elétron para estabilização do radical (Spencer, 2003).

As propriedades antioxidantes das catequinas ocorrem principalmente por impedir a formação e também atuar na remoção de radicais livres e por quelar metais, principalmente íons ferro e cobre, os quais catalisam reações que envolvem radicais livres (Sugisawa & Umegaki, 2002).

O cérebro é um dos mais importantes alvos de ERO, pois apresenta altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, alto consumo de oxigênio e grande conteúdo de metais de transição (por exemplo: o ferro) (Duarte et al, 2004).

5. Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Embora o H₂O₂ não seja estritamente um radical livre (RL), por definição ele é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) importante, por sua capacidade de gerar radical hidroxila (OH[•]) na presença de metais como ferro (Figura 6). Ele é formado principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido, por meio da enzima superóxido dismutase (Fridovich, 1998).

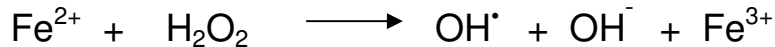


Figura 6. Reação de Fenton

6. Dano ao DNA

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Estima-se que aproximadamente 2×10^4 lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (Ames & Shigenaga, 1992). Acredita-se que, desta maneira, o reparo destas lesões possua um papel central na prevenção do aumento de mutações nos organismos vivos (Maluf, 2004).

O excesso de ERO (por ex: H_2O_2) pode levar a oxidação de lipídios, proteínas e DNA, causando dano às membranas celular e nuclear. O dano irreparável ao DNA está envolvido na carcinogênese, envelhecimento e outras doenças degenerativas (Cozzi et al, 1997). Porém, devemos levar em consideração que o dano ao DNA pode ser induzido por hábitos alimentares e estilo de vida (McCord & Edeas, 2005).

Dependendo da concentração, as catequinas podem induzir apoptose celular e algumas vezes causar dano ao DNA (Noel et al, 2006), fenômeno associado ao estresse oxidativo. Isto pode ser provocado pela ligação direta das catequinas ao DNA (Kuzuhara et al, 2007).

Desta forma, com base nas propriedades benéficas demonstradas para as catequinas do chá verde e nos importantes aspectos estruturais dos seus

derivados, o estudo da resposta de ECG sobre parâmetros envolvendo função glial e neuroproteção irá contribuir para a melhor compreensão do efeito deste polifenol sobre a homeostase do sistema neural.

II. OBJETIVOS

Esta dissertação será apresentada na forma de capítulos, constituídos de artigos científicos, visando atingir os seguintes objetivos gerais:

Capítulo I:

Avaliar a ação de ECG na linhagem celular C6, sobre os seguintes parâmetros:

1. Análise da morfologia e da integridade celular
2. Captação de glutamato
3. Conteúdo intracelular e secreção de S100B

Capítulo II:

Avaliar o efeito da ECG sobre dano ao DNA na linhagem celular C6, abordando os seguintes aspectos:

1. Curva de concentração e de tempo de incubação da ECG
2. Efeito genoprotetor da ECG sobre dano oxidativo ao DNA induzido por peróxido de hidrogênio.

III. CAPÍTULO I

Artigo 1

STATUS: publicado

Periódico: **Molecular and Cellular Biochemistry**

Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage

Renata T. Abib · André Quincozes-Santos · Patricia Nardin · Susana T. Wofchuk · Marcos L. Perry · Carlos-Alberto Gonçalves · Carmem Gottfried

Received: 31 August 2007 / Accepted: 22 November 2007 / Published online: 6 December 2007
© Springer Science+Business Media, LLC. 2007

Abstract There is a current interest in dietary compounds, such as green tea polyphenols, that can favor protection against a variety of brain disorders, including Alzheimer's disease, ischemia, and stroke. The objective of the present study was to investigate the effects of (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), one of three major green tea antioxidants, on C6 lineage cells. Here, we evaluated cell morphology and integrity and specific astrocyte activities; glutamate uptake and secretion of S100B in the presence of 0.1, 1 and 10 μM ECG. During 6 h of incubation, cell morphology was altered only at 10 μM ECG; however, after 24 h of treatment, cells become stellate in the presence of all concentrations of ECG. Loss of cell integrity was observed after 24 h with 10 μM ECG and represented only 6% of cells, in contrast with 2% observed at basal conditions. ECG (1–10 μM) induced a decrease (about 36%) in glutamate uptake after 1 h of incubation. After 6 h, an opposite effect occurred and ECG induced a sustained increase in glutamate uptake of about 70% from 0.1 μM . In addition, a significant increase in S100B was observed at 1 μM ECG (36%) and 10 μM ECG (69%) after 1 h, in contrast to 6 h of treatment, where all doses of ECG induced a significant increase (about 60%) in S100B secretion. These data demonstrate that ECG induces a significant improvement in glutamate uptake and S100B secretion in C6 cells, indicating that ECG could contribute to the neuroprotective role of astroglial cells.

Keywords ECG · Catechin · Astrocyte · C6 · Glutamate uptake · S100B

Introduction

Green tea is manufactured from the fresh leaves of the *Camellia sinensis* plant and is a popular beverage worldwide; its possible health benefits have received a great deal of attention. Documented beneficial effects of green tea and its active components include cancer chemoprevention, inhibition of the growth, invasion and metastasis of tumor cells, as well as antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities [1–3].

The green tea polyphenols are natural plant flavonoids and this group contains four major types of catechins: (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG); (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC) and (-)-epigallocatechin (EGC) [4]. These polyphenolic compounds, specifically EGCG, EGC and ECG, which account for 30–40% of the extractable solids of green tea leaves, has been thought to possess significant health-promoting effects. In vivo, green tea catechins lower the incidence of cancers and collagen-induced arthritis; oxidative stress-induced neurodegenerative diseases, and streptozotocin-induced diabetes (See [5] for a review). Also, EGCG can reduce body weight and body fat [6], contributing to nutritional strategies for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. In addition, it has been shown that ECG has the greatest antioxidant effects of all of the catechins [7]. More recently, it was demonstrated that ECG significantly improve the quality of wound healing and scar formation, a full thickness incisional model of wound healing in rats [8].

Various epidemiological studies have suggested that the consumption of polyphenols derived from fruits, vegetables,

R. T. Abib · A. Quincozes-Santos · P. Nardin · S. T. Wofchuk · M. L. Perry · C.-A. Gonçalves · C. Gottfried (✉)

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035 -003 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: cgottfried@ufrgs.br

and beverages may reduce the risk of age-related neurological disorders such as dementia of the Alzheimer's type (AD), stroke, and Parkinson's disease [9]. The catechins consumed in tea are absorbed into the blood vessels from the intestinal tract. Trace amounts of tea catechins pass through the blood-brain barrier. While tea catechins are very effective in preventing atherosclerosis through their antioxidant effect and scavenging of active oxygen species, their actions in the brain remain unclear [10].

Glutamate is a principal excitatory amino acid in the central nervous system and is known to play key roles in various physiological processes, including learning and memory [4]. Glutamate excitotoxicity has been suggested to be an underlying cause in the pathogenesis of ischemia and neurodegenerative diseases. Therefore, attenuation of the glutamate excitotoxicity, particularly by stimulating glial glutamate uptake, may be a promising therapeutic target [11]. In this context, dysfunction of astrocytes, the major CNS cell type, has been implicated as the main cause of neurotoxicity in several experimental models [12, 13]. Astrocytes participate in neuronal excitability by controlling the extracellular levels of glutamate and release glutamine back to the neurons [14].

S100B is a calcium-binding protein that is primarily expressed in the central nervous system by astroglia. This protein belongs to the S100 family involved in the regulation of cell proliferation and morphology. Besides its intracellular role, S100B is secreted by an unknown mechanism and exerts regulatory effects on neighboring cells (astrocytes, neurons, and microglia), depending on its concentration, being neurotrophic at nanomolar levels and apoptotic at micromolar levels [15, 16].

The C6 glioma cell line was originally derived from rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea [17]; these cells have oligodendrocytic, astrocytic, and neuronal properties [18] and are widely used as an astrocyte-like cell line [19, 20–24]. In our preparations, more than 95% of the C6 cells were identified as astrocytes by their immunoreactivity for GFAP, as previously demonstrated by immunocytochemistry [24]. Here, we investigated the *in vitro* effect of ECG on various parameters of astrocyte activity, namely glutamate uptake, S100B secretion, cell morphology and death, in C6 glioma cell lineage, in order to better understand the mechanisms by which ECG exerts the beneficial biological activities.

Material and methods

Materials

L-[³H]Glutamate was purchased from Amersham International (UK). (–)-epicatechin-3-gallate (ECG), monoclonal

anti-S100B (SH-B1, S100B protein, phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF), ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), carbonate-bicarbonate buffer, bovine serum albumine (BSA), tween-20, triton X-100, Sigma fast O-phenylenediamine dihydrochloride tablets sets (OPD), sodium dodecyl sulfate (SDS), propidium iodide (PI), trypsin/ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), and other materials for cell culture were purchased from Sigma (St. Louis MO, USA). Dulbeccos modified Eagle's medium (DMEM) was purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum (FBS) from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). Peroxidase-conjugated polyclonal anti-S100B antibody from DAKO. High-binding flat-bottom plates from Greiner Bio-One were used in ELISA. All other chemicals were purchased from common commercial suppliers. For cell analysis, it was used as an inverted microscope from Nikon containing digital camera (Sound Vision Inc. Wayland, MA) and TE-FM Epi-Fluorescence accessory.

Cell culture

C6 glioma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were seeded in flasks and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 2.5 mg/ml Fungizone® and 100 U/l gentamicin as previously described [24]. Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. Exponentially growing cells were detached from the culture flasks using 0.25% trypsin/EDTA and seeded in 24 well plates (5 × 10³ cells/well). After cells reached confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the absence (controls) or presence of ECG at time and concentrations indicated in each assay.

Cell morphology and integrity analysis

Cells were incubated for 1, 6, and 24 h in the absence (controls) or presence of 0.1, 1 or 10 μM ECG. Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake. Cells were incubated with 7.5 μM PI concomitantly with treatments and photographed after 1, 6, and 24 h of incubations. Optical density was determined with the Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values obtained were expressed as density light units (DLU). All images are representative fields from two experiments carried out in triplicate.

Glutamate uptake assay

C6 cells were pre-incubated in the absence (controls) or in the presence of 0.1, 1.0 or 10.0 μM of ECG for 1 and 6 h. Glutamate uptake was performed as previously described [25] with some modifications. Briefly, C6 glioma cells were incubated at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl, 1.26 CaCl_2 , 0.41 MgSO_4 , 0.49 MgCl_2 , 0.63 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.44 KH_2PO_4 , 4.17 NaHCO_3 , and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ L-[2,3- ^3H] glutamate. Incubation was stopped after 10 min by removal of the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a solution containing 0.1 M NaOH and 0.01% SDS. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Final glutamate uptake was obtained by discounting nonspecific uptake in assays carried out in sodium-free medium, prepared by replacing NaCl with choline chloride in the HBSS.

S100B measurement

S100B was measured in the culture medium at 1 and 6 h in the absence (controls) or in the presence of ECG (0.1, 1.0, and 10.0 μM). S100B measurement was carried out by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described [26]. Cells were harvested in PBS containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF. Briefly, 50 μl of sample plus 50 μl of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was then added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al [27], using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data from the experiments are presented as means \pm S.E.M. and were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant. All analyses were carried out in a PC-compatible computer using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

Results

Morphology and integrity in C6 cells exposed to ECG

To assess whether ECG could modulate cell morphology, C6 cells were incubated in the presence or absence of 0.1, 1 or 10 μM of ECG for 1, 6 and 24 h and phase contrast images were obtained at the end of the treatment. Figures 1a–c,e-g show that no alterations were observed in C6 cell morphology when cultures were exposed to 1 μM ECG during 1 and 6 h expositions. However, with 10 μM ECG (Fig. 1d,h) cells become stellate, with process-bearing cells. In contrast, after 24 h of treatment, cells become stellate at all ECG used concentrations (Fig. 1j–l). To investigate whether ECG interferes in cell integrity, a PI uptake assay was performed. There was a small increase in PI incorporation after 24 h of incubation (up to 4%, $P < 0.05$), only between basal (0.19 ± 0.034) and 10 μM ECG exposure (0.59 ± 0.042), data not shown.

Effect of ECG on glutamate uptake in C6 cells

To test whether ECG affects glutamate uptake, C6 cells were incubated in the presence or absence of 0.1, 1 or 10 μM of ECG for 1 and 6 h. Basal glutamate uptake under these conditions after 1 and 6 h of treatment was 0.28 ± 0.03 ($P < 0.05$) and 0.39 ± 0.04 ($P < 0.05$) respectively (Fig. 2)

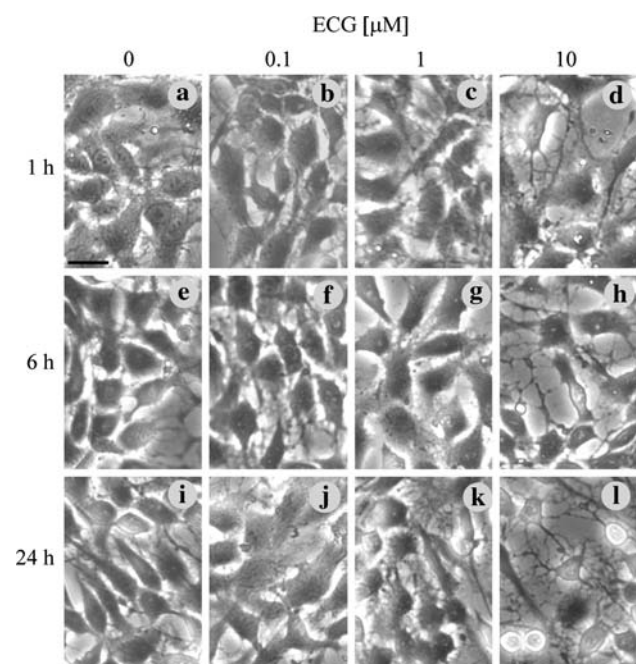


Fig. 1 Effect of ECG on C6 cell morphology. Cells were incubated in the presence or absence of 0.1, 1 or 10 μM ECG for 1, 6 and 24 h and phase contrast images were obtained at the end of treatment. Scale bar = 100 μm

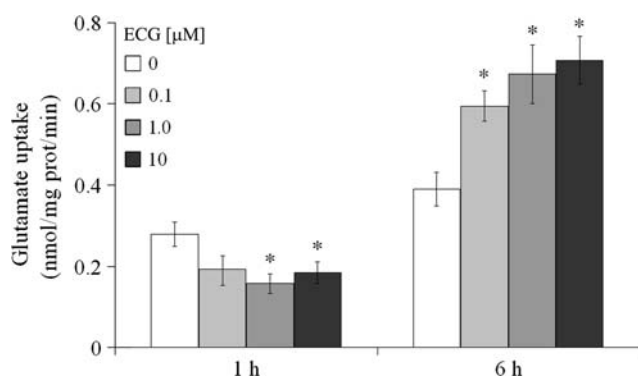


Fig. 2 Influence of ECG exposure on the glutamate uptake in C6 cells. Cells were treated with increasing concentrations (0.1, 1 and 10 μM) of ECG for 1 and 6 h, in DMEM without serum. After incubation, the medium was removed and glutamate uptake performed during 10 min, as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.E.M. values of four independent experiments performed in quadruplicate. Significant difference from control (0.1% DMSO) value is indicated by $*P < 0.05$

and was not affected by vehicle (0.1% DMSO). ECG (1–10 μM) induced a decrease of 36% in glutamate uptake after 1 h of incubation. Interestingly, after 6 h, an opposing effect was observed and ECG induced a sustained increase in glutamate uptake of approximately 70% (0.1–10 μM).

Effect of ECG on S100B secretion in C6 cells

In order to determine whether ECG could modulate S100B secretion by C6 cells, extracellular S100B content was measured after 1 and 6 h of ECG exposure (Fig. 3). Basal S100B secretion under our conditions was not affected by vehicle (0.1% DMSO). After 1 h of incubation a significant increase in S100B was observed with 1 μM ECG (36%, $P < 0.05$), and 10 μM ECG (69%, $P < 0.05$). Although there was an apparent dose-dependent increase in S100B secretion after 1 h of incubation, these values were not significantly different from each other. After 6 h of treatment, there was an increase (of about 60%) in S100B secretion from 0.1 to 10 μM ECG.

Discussion

Since ECG is a component of green tea and possesses several beneficial biological activities, many previous studies have been performed to elucidate its mechanisms of action. There is a growing recognition that polyphenolic catechins exert a protective role in neurodegenerative diseases [28, 29, 30]. With regard to this, astrocytes, the most abundant cells in the nervous system are intimately involved in many aspects of neuronal function, such as

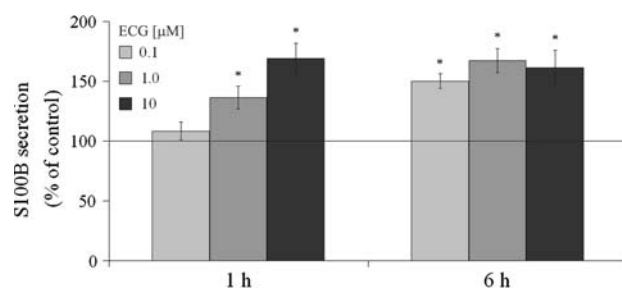


Fig. 3 Effects of ECG exposure on the S100B secretion in C6 cells. Cells were treated with increasing concentrations (0.1, 1, and 10 μM) of ECG for 1 and 6 h, in DMEM without serum. Data represent the mean \pm S.E.M. values from four independent experiments performed in quadruplicate. Significant difference from control (0.1% DMSO) value is indicated by $*P < 0.05$

glutamatergic transmission and, thus, with synaptic plasticity and neuroprotection [31–34]. Primary astrocytes and C6 glioma cell preparations have been used commonly and indistinctly to study astroglial functions [35, 36, 24, 37]. Data from the present study, using C6 lineage cells, delineate that ECG exhibits differential effects on glial morphology and activity related to glutamate uptake and S100B secretion.

Our observations demonstrate that typical morphology of C6 cells was maintained with almost all times and doses of ECG. However, with 10 μM ECG cells became stellate after 6 h of incubation, in contrast with 24 h where ECG induced stellation at all concentrations tested. This effect needs more investigations to clarify the influence of high doses of ECG on cell cytoskeleton, especially actin microfilaments modulation. In addition, there was a small increase in PI incorporation after 24 h of incubation, but only at 10 μM ECG. Based on cell morphology alteration and death observed after 24 h of treatment, we decided to investigate glutamate uptake and S100B secretion only at 1 and 6 h of ECG exposure.

Unexpectedly, ECG (from 1–10 μM) induced a decrease of about 36% in glutamate uptake after 1 h of incubation. However, after 6 h, ECG (from 0.1–10 μM) induced a sustained increase in glutamate uptake of about 70%. Previous *in vitro* studies indicate that glutamate uptake by glial cells is regulated by the surrounding redox environment and that this uptake activity decreases under oxidizing conditions (see [38] for a review). We have previously demonstrated, in primary astrocyte cultures, that H_2O_2 exposure induces a decrease in glutamate uptake [39]. On the basis of these results, it may be suggested that ECG induces an initial oxidative burst by generation of ROS, including H_2O_2 , as previously demonstrated with the other green tea catechin EGCG, in human oral tumor cell lines [40] and in human astrogloma cell line [41]. Considering this possibility, we assume that astroglial cells, in the presence of ECG, become more prepared to improve

glutamate uptake with time, as observed after 6 h of incubation, probably followed by H₂O₂ consumption. Therefore, ECG could affect the redox environment of glutamate transporters modulating their activities. It is possible that during an initial oxidative burst the decrease in glutamate uptake observed at 1 h can be mediated by oxidation of protein sulfhydryl (SH) groups [42]. More investigation, however, is necessary to demonstrate this hypothesis and to characterize which signaling is mediating this effect. In spite of the initial effect observed with ECG on glutamate uptake, results suggest that after 6 h there was a beneficial cell response induced by this polyphenol, indicating that ECG should be able to protect the brain against excitotoxicity induced by glutamate. In fact, a number of *in vivo* and *in vitro* studies have shown that polyphenol catechins from green tea extract possess a protective role in neurodegeneration [43]. Indeed, reports show increased extracellular levels of glutamate in certain neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, and stroke [44]. It is also very well-known that, in these brain disorders, increases in ROS levels occur, which have been associated with increased release and decreased uptake of glutamate [45]. Furthermore, the regulation of the glutamate levels in the synaptic cleft by glutamate transporters, located mainly in astroglia, is critical to avoid excitotoxic injury.

In addition, we found that ECG can induce a significant increase in S100B secretion. It has been proposed that extracellular S100B, at sub-nanomolar levels, can protect hippocampal neurons against glutamate-induced damage [46]. More recently, it was shown that addition of S100B protected hippocampal neurons against NMDA-mediated glutamate toxicity [47]. It may be postulated that S100B secretion, induced by ECG, may be associated with the cell improvement of glutamate uptake [48].

Promising future treatments of neurodegenerative diseases and aging depend on the availability of effective brain-permeable, neuroprotective drugs that could prevent the progression of neurodegeneration. Long-term consumption of tea can result in the absorption and retention of sufficient levels of flavonoids to exert beneficial effects directly in tissues or, indirectly, by modulating cell signaling pathways [49]. It is important to mention that we investigated ECG at a concentration range of 0.1–10 μ M based on other *in vitro* assays; however plasmatic levels of this polyphenol are lower (of about 20 nM) [1, 50]. Therefore, although we found a promising benefit of ECG in C6 cells, these results cannot be automatically extended to other neural cells, such as neurons; additional investigation into the neuroprotective activity of ECG, as well other catechins in other experimental models and cell types is required.

In summary, in agreement with the protective roles previously demonstrated for green tea polyphenols, we have demonstrated here, for the first time to our knowledge, that treatments with ECG result in a significant improvement in glutamate uptake and S100B secretion in C6 glioma cells, indicating that ECG could contribute to the neuroprotective role of astroglial cells.

Acknowledgments This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FINEP/Rede IBN 01.06.0842–00. We would like to thank Ms. Alessandra Heizelmann for technical support with cell culture.

References

- Zaveri NT (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci* 78:2073–2080
- Raza H, John A (2007) *In vitro* protection of reactive oxygen species-induced degradation of lipids, proteins and 2-deoxyribose by tea catechins. *Food Chem Toxicol* 45:1814–1820
- Tipoe GL, Leung TM, Hung MW et al (2007) Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7:135–144
- Lee JH, Song DK, Jung CH et al (2004) (-)-Epigallocatechin gallate attenuates glutamate-induced cytotoxicity via intracellular Ca modulation in PC12 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:530–536
- Moon HS, Lee HG, Choi YJ et al (2007) Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chem Biol Interact* 167:85–98
- Song EK, Hur H, Han MK (2003) Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Arch Pharm Res* 26:559–563
- Caturla N, Vera-Samper E, Villalain J et al (2003) The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic Biol Med* 34:648–662
- Kapoor M, Howard R, Hall I et al (2004) Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am J Pathol* 165:299–307
- Bastianetto S, Quirion R (2002) Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 23:891–897
- Kakuda T (2002) Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol Pharm Bull* 25:1513–1518
- Yazawa K, Kihara T, Shen H et al (2006) Distinct mechanisms underlie distinct polyphenol-induced neuroprotection. *FEBS Lett* 580:6623–6628
- Schousboe A, Waagepetersen HS (2005) Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res* 8:221–225
- Aschner M, Syversen T, Souza DO et al (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 40:285–291
- Matyja E, Taraszewska A, Naganska E et al (2006) Astroglial alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model of slow glutamate excitotoxicity *in vitro*. *Folia Neuropathol* 44:183–190
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637–668

16. Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97–108
17. Benda P, Lightbody J, Sato G et al (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370–371
18. Parker KK, Norenberg MD, Vernadakis A (1980) “Transdifferentiation” of C6 glial cells in culture. *Science* 208:179–181
19. Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J et al (1989). Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* 14:941–947
20. Feng Z, Zhang JT (2004) Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 37:1790–1801
21. Cechin SR, Dunkley PR, Rodnight R (2005) Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. *Neurochem Res* 30:603–611
22. Funchal C, Dos Santos AQ, Jacques-Silva MC et al (2005) Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis* 20:205–217
23. Chen TJ, Jeng JY, Lin CW et al (2006) Quercetin inhibition of ROS dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 223:113–126
24. Dos Santos AQ, Nardin P, Funchal et al (2006) Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 453:161–167
25. Gottfried C, Tramontina F, Gonçalves D et al (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induce by H(2)O(2). *Mech Ageing Dev* 123:1333–1340
26. Tramontina F, Karl J, Gottfried C et al (2000) Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Protoc* 6:86–90
27. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275
28. Komatsu M, Hiramatsu M (2000) The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicology* 148:143–148
29. Levites Y, Weinreb O, Maor G et al (2001) Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem* 78:1073–1082
30. Mandel S, Amit T, Reznichenko L et al (2006) Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res* 50:229–34
31. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
32. Chen Y, Swanson RA (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 84:1332–1339
33. Araque A (2006) Astrocyte-neuron signaling in the brain-implications for disease. *Curr Opin Investig Drugs* 7:619–624
34. Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009–1031
35. Pinto S, Gottfried C, Mendez A et al (2000) Immunoccontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett* 486:203–207
36. Davey GE, Murmann P, Heizmann CW (2001) Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 276:30819–30826
37. Quincozes-Santos A, Andrezza AC, Nardin P et al (2007) Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* 28:886–891
38. Trotti D, Danbolt NC, Volterra A (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19:328–334
39. De Almeida LMV, Piñeiro CC, Leite MC et al (2007) Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res*. doi:10.1007/s11064-007-9399-5
40. Sakagami H, Arakawa H, Maeda M et al (2001) Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxidants. *Anticancer Res* 21:2633–2641
41. Kim SY, Ahn BH, Kim J et al (2004) Phospholipase C, protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, and redox state are involved in epigallocatechin gallate-induced phospholipase D activation in human astrogloma cells. *Eur J Biochem* 271:3470–3480
42. Volterra A, Trotti D, Floridi S et al (1994) Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci* 738:153–162
43. Mandel S, Youdim MB (2004) Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37:304–317
44. Campiani G, Fattorusso C, De Angelis M et al (2003) Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* 9:599–625
45. Bowling AC, Beal MF (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56:1151–1171
46. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I et al (2000) S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858:121–128
47. Kögel D, Peters M, König HG et al (2004) S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience* 127:913–920
48. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF et al (2006) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 26:81–86
49. Friedman M (2007) Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 51:116–134
50. Tsang C, Auger C, Mullen W et al (2005) The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 94:170–181
51. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193–205

IV. CAPÍTULO II

Artigo 2

STATUS: submetido

Periódico: **Toxicology *in vitro***

**EPICATECHIN GALLATE EXERTS GENOPROTECTIVE AND GENOTOXIC
EFFECTS *IN VITRO***

Renata T. Abib, André Quincozes-Santos, Ana Cristina Andreazza, Caroline Zanotto,
Victorio Bambini-Junior, Marcos L. Perry, Carlos-Alberto Gonçalves, Carmem Gottfried

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-003 Porto Alegre,
RS, BRAZIL.

Running Title: Genoprotective and genotoxic effects of ECG

CORRESPONDENCE ADDRESS:

Dr. Carmem Gottfried

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo

90035 –003 Porto Alegre RS BRAZIL

Fax: 5551 3308 5535 Tel: 5551 3308 5565

E-mail: cgottfried@ufrgs.br

ABSTRACT

Green tea contains polyphenolic compounds that have important biological properties, including strong antioxidant activity. Oxidative stress is recognized as a major contributing factor for the development of brain pathologies. The present study was undertaken to evaluate the effect of one of the major green tea polyphenols, epicatechin-gallate (ECG), at 0.1, 1 and 10 μM , on genotoxicity induced by hydrogen peroxide in C6 astroglial cells. We have employed the comet assay to measure permanent DNA strand breaks in individual cells and the micronucleus assay to investigate DNA damage at the chromosome level in binucleated cells. Interestingly, ECG 10 μM showed genotoxic effects depending on concentration and time in both methods, comet ($F_{(3,9)} = 336,148$; $P < 0.001$) and micronucleus ($F_{(3,9)} = 23,228$; $P < 0.001$). In contrast, smaller doses of ECG (0.1 and 1 μM) were able to almost completely prevent genotoxicity induced by H_2O_2 . In summary, this study demonstrates that different concentrations of ECG can exert genoprotective and genotoxic effects in C6 cells. It indicates that small doses of polyphenols from diet could have beneficial effects on neural cells, contributing to counteract brain pathologies associated with oxidative stress. Also, the consumption of large quantities of antioxidants in fortified foods or supplements needs caution and should not be encouraged.

1. INTRODUCTION:

Green tea, derived from the plant *Camellia sinensis*, is widely consumed throughout the world and has received a great deal of attention because tea polyphenols are strong antioxidants (Khan and Mukhtar, 2007). The chemopreventive effects of green tea have been attributed to the biochemical activities of its polyphenolic constituents such as (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG), and (-)-epigallocatechin (EGC) (Henning et al., 2006; Tipoe et al., 2007). The relative antioxidant activity among tea catechins is $EGCG = ECG > EGC > EC$ (Haque et al., 2006). Tea polyphenols are retained in the brain and may exert neuroprotective effects simply by their ingestion (Mandel et al., 2006). Numerous studies have reported increased reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxidative stress in various neurodegenerative disorders (see Nakamura and Lipton, 2007 for a review). Studies have demonstrated that intracellular ROS can lead to the destruction of cellular components, including lipid, protein and DNA (Hwang and Kim, 2007), or that cell still survive due to activated repair and/or diverse antioxidant mechanisms (Gorbunova et al., 2007). The brain penetrating property of polyphenols, as well as their antioxidant and iron-chelating properties may make such compounds an important class of drug to be developed for treatment of neurodegenerative diseases where oxidative stress has been implicated (Levites et al., 2001).

Glial cells, particularly astrocytes are known to interact extensively with neuronal elements in the brain, influencing their activity and exerting a prominent role in protection and repair of nervous tissue after damage (Suzumura et al., 2006). The C6 cell line was originally derived from rat glial tumors induced by N-nitrosomethylurea (Benda et al.,

1968) and is widely used as an astrocyte-like cell line (Mangoura et al., 1989; Feng and Zhang, 2004; Cechin et al., 2005; Funchal et al., 2005; Chen et al., 2006; Dos Santos et al., 2006). In our preparations, more than 95% of the C6 cells exhibited immunoreactivity positive to GFAP, as previously demonstrated (Dos Santos et al., 2006).

The main aims of this study were to elucidate the effects of ECG *per se* in C6 cells and also against genotoxicity induced by H₂O₂ by measuring DNA strand breaks and chromosome loss.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Ethidium bromide, material for cell culture and (-)-epicatechin gallate (ECG) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Calbiochem (La Jolla, CA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA) and fetal bovine serum (FBS) was from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). All other chemicals were purchased from regular commercial suppliers.

2.2 Methods

2.2.1 Cell Culture

C6 glioma cells were cultured essentially accordingly to the procedure previously described (Dos Santos et al., 2006). Late passage cells (i.e. after at least 100 passages) were seeded in flasks and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5 mg/mL Fungizone® and 100 U/L gentamicin. Exponentially growing cells were incubated for 1, 6, 12 and 24 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM (pH 7.4) without serum in the absence or presence of ECG (0.1, 1 or 10 µM). The concentrations of

ECG used in these experiments were obtained from previous determinations (Abib et al., 2008).

2.2.2 Hydrogen Peroxide Treatment

In order to investigate the genoprotective effects of ECG against oxidative stress induced by H₂O₂, cells were pre-incubated with different concentrations of ECG (0.1, 1 and 10 µM) for 1 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/ 95% air in DMEM (pH 7.4) without serum. After this time, the medium was maintained and 1 mM H₂O₂ was added (Quincozes-Santos et al., 2007). Cells were incubated at the same conditions for more 30 min.

2.2.3 Nuclear Morphology Assay

C6 cells were cultured on circular glass coverslips and treated with or without 1 and 10 µM of ECG for 1, 6, 12 and 24 h. The Cell cultures were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS), stained with 0.2 µg/ml of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 1 h and visualized under a fluorescent microscope (Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory). Apoptotic cells could be morphologically identified by nuclear shrinkage and chromatin condensation and/or fragmentation.

2.2.4 Comet Assay

After different treatments as described above, C6 cells were detached by incubating in the presence of trypsin/EDTA 0.05%. During trypsinization, cells were carefully manipulated to avoid mechanical stress. Comet assay (single-cell gel electrophoresis) was performed as previously described (Quincozes-Santos, et al., 2007). Briefly, slides were prepared by mixing 30 µL of C6 glioma suspension with 70 µL of low melting point agarose (0.75%).

Following electrophoresis, slides were incubated with 5 µg/mL ethidium bromide and left in the dark for 20 min to stain the DNA. Images of 100 randomly selected nuclei were analyzed for each treatment in duplicate. Nuclei were scored visually for comet tail size based on an arbitrary scale of 0–4, ranging from no damage to extensive damage of DNA. Slides were viewed on a Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory and images were transferred to a computer with a digital camera (Sound Vision Inc., Wayland, MA).

2.2.5 Cytokinesis-block Micronucleus Assay

Micronuclei are DNA-containing structures that result from chromosomal loss during mitosis. They represent a subgroup of all chromosomal aberrations. This makes the micronucleus frequency test a widely accepted method for investigating *in vitro* and *in vivo* genotoxicity in human biomonitoring studies (Fink et al., 2007). The cytokinesis-block micronucleus technique was performed as described by Fenech, (2000) and Reyes et al., (2001) with some modifications. After treatment, cells were incubated with 2 µg/ml cytochalasin B for 24 h, fixed with chilled methanol/glacial acetic acid (3:1) for 5 min and stained with Giemsa. Each data point represents the mean of eight independent experiments. In each experiment 1000 binucleated cells/sample were analysed.

2.2.6 Statistical Analysis

To verify the main effect of time course and different doses of ECG we used analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, followed by a post hoc analysis (Tukey's test). ECG x different doses of H₂O₂ were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by a post hoc analysis (Tukey's test). Data are presented as mean ± S.E.M. Values of

$P < 0.001$ were considered to be significant. All analyses were carried out in a PC-compatible computer using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

3. RESULTS

3.1 Effect of ECG on nuclear morphology and DNA strand-breaks in C6 cells.

To assess the direct effect of ECG on DNA integrity, cells were incubated with 0.1, 1 and 10 μM of ECG for 1, 6, 12 and 24 h. As shown in Figure 1, ECG induced DNA damage ($F_{(3,64)} = 1946,747$; $P < 0.001$). This effect was concentration and time dependent ($F_{(3,9)} = 336,148$; $P < 0.001$). Only 2% of cells exposed to 10 μM ECG after 24 h presented nuclear fragmentation by DAPI staining assay (data not shown).

3.2 Effects of ECG on chromosome loss in C6 cells.

Micronucleus frequency was increased by ECG, compared to their respective control values ($F_{(3,48)} = 262,381$; $P < 0.001$). The analysis also indicate a significant interaction between concentration and time ($F_{(3,9)} = 23,228$; $P < 0.001$).

3.3 Genoprotective effects of ECG against H_2O_2 -induced DNA damage in C6 glioma cells

To investigate the effect of ECG on DNA damage induced by H_2O_2 , cells were pre-incubated with different concentrations of ECG (0.1, 1 and 10 μM) for 1 h. After this time, 1 mM H_2O_2 was added and maintained for 30 min (Figure 2A). This assay was performed at 1 h taking into account that at this time ECG *per se* had minimal influence on DNA integrity, as observed in Figure 1. Genoprotective effects of ECG after treatment are shown in Figure 2B. The index of DNA damage observed when cells were incubated in the

presence of H₂O₂ without ECG was 42.5 ± 3.9. In this context, ECG was able to almost totally prevent the genotoxicity induced by H₂O₂ at 0.1 and 1.0 μM (F=47,529; P<0.001).

4. DISCUSSION

It is very well documented that several redox active compounds could have a dual effect, been beneficial or toxic depending on their concentration (De la Lastra and Villegas, 2007; Dos Santos et al., 2006; Halliwell, 2007; Quincozes-Santos et al., 2007). The ability of polyphenols to scavenge ROS and superoxide radicals depends on their chemical structures (Yamamoto et al., 2003). Also, the anti-oxidant/prooxidant activity of the redox-active compounds, such as polyphenols from diet, largely depends upon the levels consumed and may sometimes cause DNA damage (Noel et al., 2006), that may be triggered by the direct binding of polyphenol to DNA (Kuzuhara et al., 2007).

As reported previously in our group (Abib et al., 2008), 10 μM ECG induces alteration in C6 cell morphology (process-bearing cells) with a small increase in PI incorporation after 24 h of incubation (up to 4%). In the present work, we observed that at least up to 24 h, ECG did not induce alterations in nuclear morphology indicative of apoptosis (data not shown). These data demonstrated that in this experimental model, ECG was not cytotoxic to C6 cells. However, we showed that ECG can affect DNA in these cells, playing genoprotective and genotoxic roles, depending on concentration and time of exposure. DNA strand breaks in individual cells resulting from events such as direct scission of the DNA backbone was assessed by the comet assay. It is important to mention that index values below 30 are obtained from less prominent DNA strand breaks. In this context, the

first 6 h of ECG incubation resulted in slight DNA damage. After this time ECG clearly induced a time and dose dependent genotoxicity.

The degree of chromosome loss, analyzed by the micronucleus frequency test, reflects the capacity of the cells to resist oxidative stress and repair single strand breaks (Noel et al., 2006). As ECG *per se* induced DNA damage at higher doses, we decided to investigate if this genotoxic effect impaired DNA repair. Actually, micronuclei frequency values from ECG exposure were significantly higher than control values. The highest dose of ECG induced an increase (about 60%) in all times of incubation. It indicates that ECG genotoxicity at higher doses affects the repair system, probably via a pro-oxidant effect (Halliwell, 2007).

In order to investigate genoprotective effects of ECG against DNA damage induced by oxidant conditions, we used an experimental procedure previously established in our group (Quincozes-Santos et al., 2007). In this model, cells were pre-incubated with antioxidant for 1 h before the insult with H₂O₂. Hydrogen peroxide is particularly attractive as a model oxidant because its cellular actions and its fate are well understood due to the observations that it readily crosses the cellular membranes, and gives rise to the highly reactive hydroxyl radical, which has the ability to react with macromolecules, including DNA, proteins, and lipids, and to ultimately damage a cell (Halliwell et al., 2000).

Following the observation that 1 h of ECG exposure in C6 cells did not induce prominent genotoxic effects *per se*, we decided to use this time of ECG pre-incubation, before 30 min H₂O₂ pulse, which we know is enough to induce genotoxic properties (Quincozes-Santos et al., 2007). We found that genotoxicity induced by H₂O₂ was almost completely prevented by 0.1 and 1 μM ECG. This indicates that at these concentrations

ECG plays a benefic effect probably by its antioxidant properties. The reaction between ECG and the hydroxyl radical is particularly important for preventing oxidative injury because the hydroxyl radical has been shown to be highly responsible for pathogenesis under a diversity of disease conditions.

In summary, this study demonstrated that ECG can exerts genoprotective and genotoxic effects in C6 cells, depending on concentration and time of exposure. It indicates that small doses of polyphenols from diet could play genoprotective effects at neural cells, contributing to ameliorate brain pathologies associated with oxidative stress. Also, the consumption of large quantities of antioxidants or supplements in foods needs caution and should not be encouraged.

Acknowledgements. We would like to thank Dr Richard Rodnight for his careful reading and helpful comments concerning this manuscript. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00.

REFERENCES

- Abib, R.T., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Wofchuk, S.T., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., 2008. Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *In press*
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-371.
- Cechin, S.R., Dunkley, P.R., Rodnight, R., 2005. Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. *Neurochemical Research* 30, 603-611.
- Chen, T.J., Jeng, J.Y., Lin, C.W., Wu, C.Y., Chen, Y.C., 2006. Quercetin inhibition of ROSdependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 223, 113-126.
- De la Lastra, C.A., Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society transactions* 35, 1156-1160.
- Dos Santos, A.Q., Nardin, P., Funchal, C., de Almeida, L.M., Jacques-Silva, M.C., Wofchuk, S.T., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453, 161-167.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2, 1084-1104.
- Feng, Z., Zhang, J.T., 2004. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astroglioma C6 cells and its mechanism. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1790–1801.

- Fink, K., Brink, A., Vienken, J., Heidland, A., Stopper, H., 2007. Homocysteine exerts genotoxic and antioxidative effects in vitro. *Toxicology In Vitro* 21, 1402-1408.
- Funchal, C., Dos Santos, A.Q., Jacques-Silva, M.C., Zamoner, A., Gottfried, C., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2005. Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metabolic Brain Disease* 20, 205–217.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., Hine, C., 2007. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Research* 35, 7466-7474.
- Halliwel, B., 2007. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research* 73, 341-347.
- Halliwel, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 486, 10–13.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., Shido, O., 2006. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *The Journal of Nutrition* 136, 1043-1047.
- Henning, S.M., Aronson, W., Niu, Y., Conde, F., Lee, N.H., Seeram, N.P., Lee, R.P., Lu, J., Harris, D.M., Moro, A., Hong, J., Pak-Shan, L., Barnard, R.J., Ziaee, H.G., Csathy, G., Go, V.L., Wang, H., Heber, D., 2006. Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *The Journal of Nutrition* 136, 1839-1843.
- Hwang, E.S., Kim, G.H., 2007. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* 229, 1-10.

- Khan, N., Mukhtar, H., 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* 81, 519-533.
- Kuzuhara, T., Tanabe, A., Sei, Y., Yamaguchi, K., Suganuma, M., Fujiki, H., 2007. Synergistic effects of multiple treatments, and both DNA and RNA direct bindings on, green tea catechins. *Molecular Carcinogenesis* 46, 640-645.
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M.B., Mandel, S., 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *The Journal of Neurochemistry* 78, 1073-1082.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., Youdim, M.B., 2006. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 229-34.
- Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J., Vernadakis, A., 1989. Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Research* 14, 941-947.
- Nakamura, T., Lipton, S.A., 2007. Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 1609-1620.
- Noel, S., Kasinathan, M., Rath, S.K., 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology In Vitro* 20, 1168-1172.
- Quincozes-Santos, A., Andreazza, A.C., Nardin, P., Funchal, C., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2007. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* 28, 886-891.

- Reyes, S., Herrera, L.A., Ostrosky, P., Sotelo, J., 2001. Quinacrine enhances carmustine therapy of experimental rat glioma. *Neurosurgery* 49, 969-973.
- Suzumura, A., Takeuchi, H., Zhang, G., Kuno, R., Mizuno, T., 2006. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088, 219-229.
- Tipoe, G.L., Leung, T.M., Hung, M.W., Fung, M.L., 2007. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets* 7, 135-144.
- Yamamoto, T., Lewis, J., Wataha, J., Dickinson, D., Singh, B., Bollag, W.B., Ueta, E., Osaki, T., Athar, M., Schuster, G., Hsu, S., 2003. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemopreventive effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Theratology* 308, 317-323.

Frequency of micronucleus in 1000 binucleated cells				
Time (h)	ECG [μ M]			
	0	0.1	1	10
1	1.0 \pm 0.09a	1.3 \pm 0.11b	1.4 \pm 0.12b	1.6 \pm 0.12c
6	1.0 \pm 0.07a	1.3 \pm 0.09b	1.3 \pm 0.11b	1.7 \pm 0.12c
12	1.4 \pm 0.11b	2.0 \pm 0.15d	2.0 \pm 0.19d	2.3 \pm 0.17e
24	1.6 \pm 0.13c	2.3 \pm 0.14e	2.4 \pm 0.17e	2.7 \pm 0.19f

Table 1. Micronucleus frequency in C6 cells after incubation with ECG. Cells were incubated with ECG (0.1, 1.0 and 10 μ M) for 1, 6, 12 and 24 h. Each value (mean \pm S.E.M) indicates micronucleus frequency in 1000 binucleated cells, from eight independent experiments performed in duplicate To verify the main effect of time course and different doses of ECG, ANOVA of repeated measures was used, followed by a post hoc analysis of Tukey's test. Values that are not sharing a common letter differ significantly at $P < 0.001$.

Figure 1. Effect of different concentrations of ECG on DNA damage in C6 glioma cells. Cells were incubated for different times (1-24 h) in the presence of different concentrations (0.1, 1 and 10 μM) of ECG. The extent of damage to DNA was assessed by the comet assay and the index of DNA damage was calculated as described in Material and Methods section. Data represent the mean \pm S.E.M. of the sixteen experimental determinations performed in duplicate. To verify the main effect of time course and different doses of ECG it was used ANOVA of repeated measures, followed by a post hoc analysis of Tukey's test. Bar values that are not sharing a common superscript differ significantly at $P < 0.001$.

Figure 2. Inhibitory effect of ECG on H₂O₂-induced DNA damage in C6 glioma cells. Cells were pre-incubated for 1 h in the presence of ECG (0.1, 1 and 10 μM) before the addition of H₂O₂. After this time, the medium was maintained and 1 mM H₂O₂ was added. Cells were incubated in the same conditions for more 30 min. The extent of damage to DNA was assessed by the comet assay and calculated as described Material and Methods section . Data from the experiments are presented as means \pm S.E.M. and were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Tukey's test. *Significant differences from control values ($P < 0.001$).

Figure 1

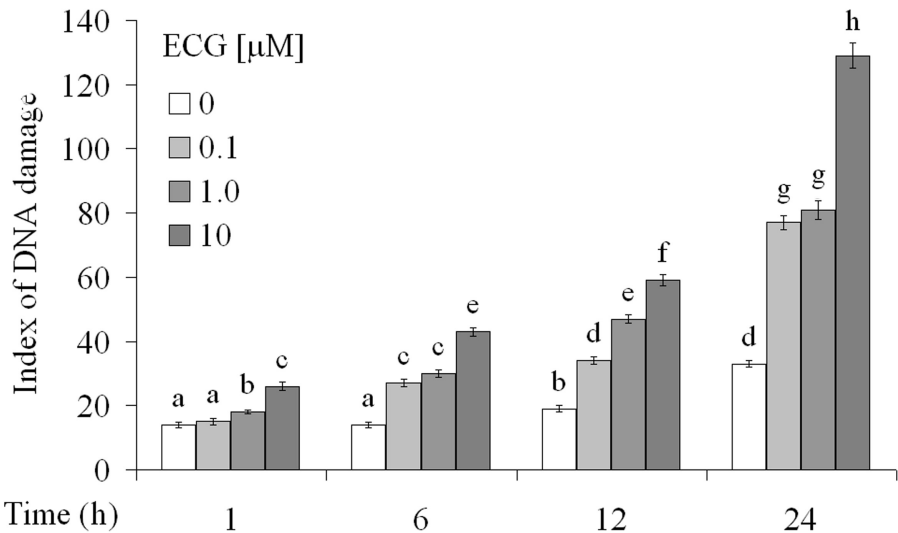
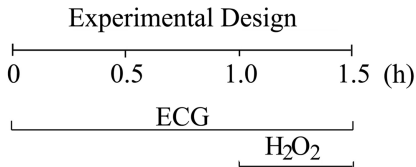
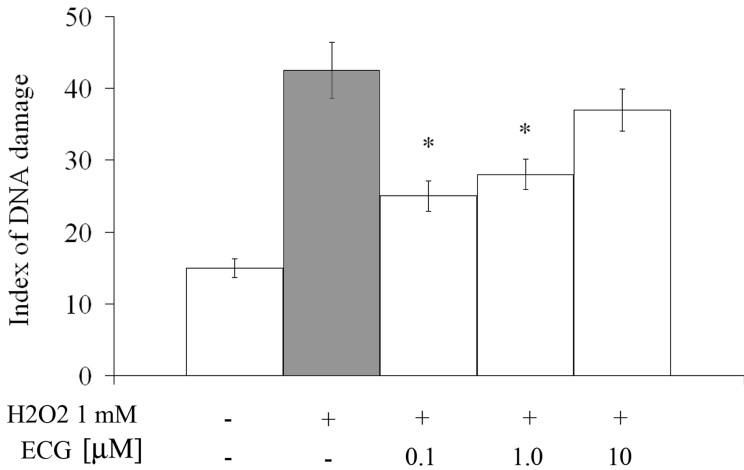


Figure 2
A



B



Time (h)	Frequency of micronucleus in 1000 binucleated cells			
	ECG [μ M]			
	0	0.1	1	10
1	1.0 \pm 0.09a	1.3 \pm 0.11b	1.4 \pm 0.12b	1.6 \pm 0.12c
6	1.0 \pm 0.07a	1.3 \pm 0.09b	1.3 \pm 0.11b	1.7 \pm 0.12c
12	1.4 \pm 0.11b	2.0 \pm 0.15d	2.0 \pm 0.19d	2.3 \pm 0.17e
24	1.6 \pm 0.13c	2.3 \pm 0.14e	2.4 \pm 0.17e	2.7 \pm 0.19f

Table 1. Micronucleus frequency in C6 cells after incubation with ECG. Cells were incubated with ECG (0.1, 1.0 and 10 μ M) for 1, 6, 12 and 24 h. Each value (mean \pm S.E.M) indicates micronucleus frequency in 1000 binucleated cells, from eight independent experiments performed in duplicate. To verify the main effect of time course and different doses of ECG, ANOVA of repeated measures was used, followed by a post hoc analysis of Tukey's test. Values that are not sharing a common letter differ significantly at $P < 0.001$.

V. DISCUSSÃO

Sabe-se que hábitos alimentares influenciam a saúde da população, e dependendo da quantidade e da qualidade dos componentes ingeridos, os alimentos podem tanto proteger quanto contribuir com o desenvolvimento de doenças. Em função disso, a área de *nutracêuticos*¹ está cada vez mais ganhando a atenção de pesquisadores, com o objetivo de compreender os efeitos que os alimentos causam no organismo. O estudo de substâncias isoladas de plantas tem mostrado um papel importante na prevenção de patologias e no aumento da longevidade (Mukhtar & Ahmad, 2000; Sinclair, 2005).

Embora um considerável número de estudos evidencie um importante papel do chá na prevenção do câncer, o entendimento do mecanismo pelo qual os polifenóis do chá reduzem o risco das doenças é extremamente importante para se desenvolver estratégias para melhorar a saúde (Mukhtar & Ahmad, 2000). Enquanto as catequinas do chá são muito eficientes na prevenção da aterosclerose devido ao seu efeito antioxidante, sua ação no cérebro ainda está um pouco confusa (Kakuda, 2002).

Atualmente, o conhecimento popular e também científico tem voltado a atenção principalmente para as propriedades benéficas das catequinas do chá verde, o que contribui para o aumento do consumo de suplementos e de alimentos enriquecidos com estes componentes, porém em certas concentrações, os

¹ Nutracêutico: Alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença e pode ser classificado como fibra dietética, ácido graxo poliinsaturado, proteína, peptídeo, aminoácido ou cetoácido, mineral, antioxidante, etc. (Andlauer & Furst, 2002).

mesmos podem exercer efeitos potencialmente tóxicos, oferecendo risco à saúde (Elbling et al, 2005). Desde que foram atribuídos vários benefícios à ECG, muitos estudos passaram a ser realizados para elucidar os seus mecanismos de ação. Sabe-se que as catequinas exercem um papel protetor em doenças neurodegenerativas (Komatsu & Hiramatsu, 2000; Levites et al, 2001; Mandel et al, 2006). Assim, tratamentos promissores para doenças neurodegenerativas e relacionadas com a idade dependem da disponibilidade de drogas neuroprotetoras, que sejam permeáveis ao cérebro e que possam prevenir a progressão da neurodegeneração. O consumo de chá verde, a longo prazo, pode resultar na absorção e na retenção de níveis suficientes de flavonóides para exercer efeitos benéficos diretamente nos tecidos ou, indiretamente, por modular vias de sinalização celular (Friedman et al, 2007).

1. Concentrações de ECG em modelos *in vivo* e *in vitro*

Investigamos a ECG em concentrações de 0,1 a 10 μ M basendo-nos em outros ensaios *in vitro* (Lamy et al, 2002; Sigisawa & Umegaki, 2002), contudo os níveis plasmáticos deste polifenol em humanos é mais baixo (aproximadamente 20 nM) (Tsang et al, 2005). É importante salientar que o efeito *in vivo* de compostos derivados da dieta é desencadeado por níveis plasmáticos baixos, mas crônicos, algo que não se pode fazer com ensaios em células isoladas, devido às limitações de tempo. Portanto, para visualizar efeitos agudos num modelo com cultura de células, uma dose menor, próxima do que se obtém no plasma, seria insuficiente para desencadear um mecanismo de sinalização em apenas algumas

horas. Assim, se costuma usar *in vitro*, doses maiores por minutos ou horas e desta forma as células respondem. Diante disso, é muito importante fazer estudos de citotoxicidade, onde se faz uma curva de concentração e de tempo de incubação, com ensaios de vida e morte celular e se escolhe doses que não sejam citotóxicas. Com esta estratégia metodológica, se consegue investigar nestes modelos com células em cultura, vias metabólicas e rotas de sinalização que podem ser moduladas por um composto isolado. Desta forma, os resultados obtidos *in vitro* e principalmente as hipóteses geradas, necessitam num segundo momento, investigações *in vivo*, onde se obtenham doses plasmáticas na mesma ordem de grandeza das que se obtêm com tratamentos em humanos. Com estas abordagens, se tenta então, correlacionar os resultados obtidos e validar as hipóteses. Com esta linha de raciocínio, estudos posteriores em nosso grupo já estão sendo planejados, visando uma abordagem *in vivo*, em ratos Wistar com as catequinas do chá verde.

2. Efeitos da ECG sobre morfologia e viabilidade celular em C6

Nosso trabalho demonstra que em quase todas as doses e tempos testados a ECG não alterou a morfologia das células C6. Contudo, na concentração de 10 μM de ECG a células passaram a apresentar um formato estrelado após 6 h de incubação. E em 24 h, todas as concentrações testadas alteraram a morfologia das células. Este efeito encontrado deve ser mais investigado para esclarecer qual a influência de altas concentrações de ECG sobre o citoesqueleto. Estudos mostram que a EGCG, especialmente, inibe a proliferação celular por se ligar a

proteínas estruturais intracelulares e prevenir sua fosforilação, como à vimentina (Ermacova et al, 2005).

Há grandes evidências que sugerem que os componentes do chá podem atuar diretamente interrompendo o ciclo celular, causando apoptose (Park & Dong, 2003). Porém, no nosso modelo experimental, demonstramos que a ECG não interferiu na morfologia nuclear, indicando a ausência de apoptose, nem induziu morte por necrose, a não ser uma pequena parcela de morte com a dose mais alta e no maior tempo. Pode-se concluir que doses entre 0,1 e 10 μ M de ECG não são citotóxicas em células C6. Baseando-se nesta alteração morfológica observada após 24 h de tratamento, decidimos investigar a captação de glutamato e a secreção de S100B somente em 1 e 6 h.

3. Efeito da ECG sobre captação de glutamato

Estudos mostram que há aumento dos níveis extracelulares de glutamato em certas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral e derrame (Campiani et al, 2003). Também já está descrito que em doenças neurológicas ocorre aumento nos níveis de ERO, os quais estão associados com o aumento da liberação e diminuição da captação de glutamato (Bowling & Beal, 1995). Além disso, a regulação dos níveis de glutamato na fenda sináptica pelos transportadores de glutamato, localizados principalmente nos astrócitos, é um ponto crítico para evitar a excitotoxicidade.

Demonstramos previamente que o H_2O_2 induz a diminuição na captação de glutamato por astrócitos em cultura (De Almeida et al, 2008). Baseado nestes

resultados, pode-se supor que a ECG poderia induzir inicialmente a geração de ERO, inclusive H_2O_2 , como previamente demonstrado com EGCG, em linhagens de células tumorais humanas e em linhagem celulares de astrogliomas humanos. Considerando esta possibilidade, supõe-se que células astrogliais, na presença de ECG, tornam-se mais preparadas para aumentar a captação de glutamato num segundo momento, onde todo o H_2O_2 gerado endogenamente, teria sido metabolizado e removido, como observado após 6 h de incubação em C6. Portanto, a ECG pode afetar direta ou indiretamente o ambiente redox dos transportadores de glutamato modulando suas atividades. É possível que durante o processo de oxidação inicial, a diminuição da captação de glutamato observada em 1 h possa ser mediada pela oxidação do grupamento sulfidril (SH) de proteínas relacionadas com a modulação do transportador glial (Volterra et al, 1994).

A ECG nas concentrações de 1 a 10 μM induziu uma diminuição de 36% na captação de glutamato após 1 h de incubação. Contudo, após 6 h, a ECG nas concentrações de 0,1 a 10 μM induziu um grande aumento na captação de glutamato de aproximadamente 70%. Estudos mostram que a captação de glutamato pelas células gliais é regulado pelo ambiente em que se encontra, sendo diminuída em condições oxidantes (Trotti et al, 1998). Apesar do efeito inicial observado com a ECG sobre a captação do glutamato, resultados mostram que após 6 h há uma resposta benéfica destas células induzida por este polifenol,

indicando que a catequina ECG pode estar apta para proteção do cérebro contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato.

4. Efeito da ECG sobre secreção de S100B

Sabe-se que a S100B extracelular pode proteger neurônios hipocâmpais contra dano induzido por glutamato por aumentar a recaptação glial (Ahlemeyer et al, 2000). A secreção de S100B foi avaliada após 1 h e 6 h de exposição de ECG. Após a incubação de 1 h, houve aumento significativo de aproximadamente 36% de S100B na concentração de 1 μ M de ECG, e de aproximadamente 69% na concentração de 10 μ M de ECG. Após 6 h de tratamento, houve um aumento de aproximadamente 60% na secreção de S100B tanto na concentração de 0.1 quanto na de 10 μ M de ECG. De acordo com resultados anteriores, a S100B extracelular pode aumentar a captação de glutamato (Tramontina et al, 2006). Assim, pode-se sugerir que o aumento de S100B induzido por ECG possa também estar modulando o transporte de glutamato glial.

5. ECG como composto redox ativo

Uma produção exacerbada de ERO é comum em doenças como as neurodegenerativas, cardiovasculares e reações inflamatórias (Huang et al, 2005). O estresse oxidativo, uma condição de desbalanço no estado redox, a favor do estado pró-oxidante, também induz a produção de ERO, levando a sérias complicações funcionais como o declínio cognitivo (Haque et al, 2006). A atividade antioxidante/pro-oxidante de compostos redox-ativo, como os polifenóis da dieta,

depende dos níveis consumidos e por vezes podem causar dano ao DNA (Noel et al, 2006).

Estudos *in vitro* mostram que as catequinas do chá verde possuem alta atividade em reduzir a quantidade de dano oxidativo ao DNA, por reagirem com radicais hidroxil (OH[•]) e peroxil (ROO[•]) (Liu et al., 2000; Khan & Mukhtar, 2007). A geração de altas concentrações ERO leva ao dano de proteínas, de lipídios e de ácidos nucleicos. Como consequência disto, as células podem sofrer apoptose ou sobreviver ativando mecanismos de reparo e/ou antioxidantes (Elbling et al, 2005). A atividade antioxidante relativa entre as catequinas é EGCG=ECG>EGC>EC. Estes polifenóis possuem um efeito protetor contra doenças neurológicas associadas à ERO. Este sistema de defesa antioxidante pode prevenir o dano oxidativo encefálico. A ingestão a longo-prazo das catequinas do chá verde pode ser importante, pois as células estão constantemente expostas ao estresse oxidativo. Os polifenóis podem ser retidos no cérebro e exercer efeitos neuroprotetores simplesmente através de sua ingestão (Haque et al, 2006). Levites et al (2001) demonstrou o efeito neuroprotetor de catequinas em modelos de Parkinson em ratos, sugerindo que este efeito ocorra por aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e da catalase. Chan et al (2002) comprovou que as catequinas realmente aumentam a atividade da SOD em astrócitos, protegendo assim os neurônios do dano pelos radicais livres (Etus et al, 2003).

6. Efeito da ECG sobre dano ao DNA em C6

Em nosso estudo comprovamos que a ECG pode afetar o DNA, exercendo um efeito genoprotetor ou genotóxico, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Para estes ensaios, utilizamos a técnica do Cometa, que mede índice de dano ocorrido por quebra das fitas de DNA. O DNA fragmentado é submetido a um campo elétrico e quanto maior a quantidade de fragmentos que migram a partir do núcleo, maior o grau de dano. Durante as primeiras 6 h de incubação com ECG, as células C6 sofreram um dano mínimo ao DNA, mas após este período a ECG claramente induziu um efeito genotóxico tempo-dose-dependente, assim como também demonstrado em outro estudo com a EGCG sobre outra linhagem celular de rato (Elbling et al, 2005).

Como a ECG *per se* induziu dano ao DNA em altas concentrações, decidimos investigar se este efeito genotóxico prejudicou a capacidade de reparo celular, pelo ensaio de medida da freqüência de micronúcleos em células binucleadas. Este ensaio mede diversas alterações cromossomais, entre os diferentes tipos, avaliamos a perda de cromatina. Quando uma célula perde a capacidade de reparo durante a divisão celular, parte da cromatina pode ser liberada para fora do núcleo e este aglomerado de cromatina é chamado então de micronúcleo. A ECG na dose mais alta induziu aumento de freqüência de micronúcleos² (aproximadamente 60%) em todos os tempos estudados, indicando

² Este índice é referente ao número de células que contém micronúcleos em cada 1000 células binucleadas. O índice final é resultado da média de oito amostragens.

que a genotoxicidade da ECG em altas concentrações afeta o sistema de reparo celular, provavelmente por meio de um efeito pró-oxidante.

7. Efeito da ECG contra a genotoxicidade induzida por H₂O₂

Para investigar o efeito genoprotetor da ECG contra o dano ao DNA induzido por condições oxidantes, usamos um procedimento experimental previamente estabelecido por nosso grupo (Quincozes-Santos et al., 2007). Neste modelo, as células são pré-incubadas com o antioxidante por 1 h antes do insulto com o H₂O₂.

Sabe-se que o H₂O₂ difunde-se facilmente através das membranas (Halliwell et al., 2000) e para o núcleo das células, causando dano ao DNA por gerar radical OH[•]. Esse dano pode ser fatal às células, se não for devidamente reparado. Sabendo então, que em 1 h a ECG não induziu efeito genotóxico *per se* sobre as células C6, decidimos pré-incubar a ECG neste tempo, antes dos 30 minutos do pulso com H₂O₂, que sabemos que é o suficiente para induzir efeitos genotóxicos em C6 (Quincozes-Santos et al, 2007). Observamos que a genotoxicidade induzida pelo H₂O₂ foi quase totalmente prevenido por 0,1 e 1 μM de ECG, indicando que nestas concentrações a ECG desempenha um efeito benéfico, provavelmente por sua ação antioxidante.

Mais investigações são necessárias para confirmar esta hipótese e caracterizar quais vias de sinalização e quais fatores medeiam este efeito, como por exemplo a hipótese de que as catequinas possam agir especificamente sobre fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) ou fator nuclear kappa B (NF-kB) (Park & Dong, 2003).

8. Hipóteses e Mecanismos

O estresse oxidativo ativa várias vias de transdução de sinal, mas uma das mais estudadas é a via do NF- κ B, o qual existe amplamente nas células e participa da regulação de respostas inflamatórias, sobrevivência e diferenciação celular (Huang et al, 2005). Muitas doenças crônicas estão associadas com a ativação do NF- κ B e assim, muitas estratégias terapêuticas estão voltadas para a inativação deste fator, visando o tratamento da inflamação e de doenças neurodegenerativas. Muitos estudos comprovam que o H_2O_2 causa a dissociação do inibidor (I κ B) do NF κ B, promovendo sua translocação para o núcleo e sua ativação. Foi mostrado que as catequinas inibem esta translocação para o núcleo em certos tipos celulares, atuando desta forma como moduladores negativos da atividade de NF- κ B (Huang et al, 2005).

As catequinas apresentam um caráter parcial lipofílico, podendo atravessar a bicamada lipídica que compõe a membrana plasmática. É provável que elas estejam localizadas principalmente perto e/ou no interior das superfícies das membranas, onde o principal iniciador da oxidação lipídica – o radical hidroxil - prende-se facilmente e está acessível para iniciar a cadeia de radicais peroxil. (Sugisawa, 2002)

Lee e colaboradores (2000) sugere alguns mecanismos de ação que podem contribuir para ação antioxidante das catequinas: atividade seqüestradora de radicais livres; atenuação da peroxidação lipídica; inibição da xantina oxidase; bloqueio da indução da oxido nítrico sintase (Etus et al, 2003).

Alguns mecanismos já foram sugeridos para explicar os efeitos da catequinas, tais como: indução da formação de ERO que levam a morte celular (apoptose); inibição do citocromo P450 (CYP), enzimas envolvidas na ativação da pro-carcinogênese e ativação das enzimas da fase 2 como a glutathione-S-transferase e quinona redutase, que cataliza a detoxificação de carcinógenos; modulação de proteínas de transdução de sinal; ligação às proteínas plasmáticas e outras que levam supressão da secreção de metaloproteinases necessárias ao funcionamento normal das células; ligação e dano ao DNA e RNA; inibição da expressão e da liberação do fator de necrose tumoral e inibição da angiogênese em células cancerosas (Friedman et al, 2007).

Vários mecanismos estão sendo apresentados como hipóteses para explicar os efeitos do chá verde, incluindo um que sugere que a estrutura galato é importante para a inibição do crescimento de células tumorais (Park & Dong, 2003). As catequinas com a estrutura galato, que apresentam mais grupamentos fenólicos hidroxilados, possuem maior habilidade de quelar metais, do que as catequinas que não possuem a estrutura galato (Chen et al, 2003).

V I. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os papéis neuroprotetores previamente demonstrados para os polifenóis do chá verde (Kakuda, 2002), nós demonstramos, pela primeira vez, que tratamentos com ECG resultam em um significativo aumento na captação de glutamato e na secreção de S100B pela linhagem celular C6, indicando que a ECG pode contribuir para neuroproteção em células astrogliais.

Demonstramos também que a ECG pode exercer efeitos genoprotetores e genotóxicos, dependendo da concentração e do tempo de exposição, indicando que o consumo de pequenas doses deste polifenol pela dieta pode apresentar um efeito genoprotetor, contribuindo para atenuar patologias neurais associadas ao estresse oxidativo. Contudo, é necessário ter bastante atenção em relação ao consumo de grandes quantidades de suplementos ou alimentos acrescidos de antioxidantes.

O consumo de polifenóis da dieta ou em bebidas pode não ter efeito genotóxicos em animais e humanos que tenham uma dieta normal, porém o consumo de grandes quantidades de polifenóis através de suplementos alimentares pode tornar altos os níveis deste componente nos tecidos podendo afetar o DNA (Fang et al, 2007).

Embora tenhamos achado um benefício promissor da ECG em células C6, estes resultados não poderão automaticamente se estender para outras células neurais, como neurônios; e também investigações sobre a atividade neuroprotetora da ECG, assim como de outras catequinas em outros modelos experimentais e outros tipos celulares são necessários.

É importante conhecer a biodisponibilidade dos flavonóides quando se pretende extrapolar de estudos *in vitro* para situações *in vivo*. Devido ao número limitado de informações sobre a biodisponibilidade dos polifenóis do chá após o consumo, estudos sobre a absorção, distribuição e metabolismo dos polifenóis do chá verde em animais e em humanos são necessários (Vaidyanathan & Walle, 2003). Após uma cuidadosa avaliação destes aspectos, recomendações específicas poderão ser feitas para o consumo do chá e de suplementos como forma de prevenção e tratamento para humanos (Mukhtar & Ahmad, 2000).

Finalmente é muito importante confirmar os mecanismos e aplicações clínicas dos efeitos neuroprotetores das catequinas para manter e promover a saúde do cérebro em uma sociedade que está envelhecendo (Kakuda, 2002).

VII. CONCLUSÕES

Conclusão Geral

Os resultados obtidos com células da linhagem C6 nos permitem concluir que a ECG pode atuar tanto como modulador de funções gliais (captação de glutamato e secreção de S100B) quanto exercer efeito genoprotetor contra insultos oxidativos.

Conclusões Específicas

Capítulo I

1. Doses entre 0,1 e 10 mM de ECG não foram citotóxicas no modelo estudado.
2. A ECG interferiu na morfologia celular, o que pode estar relacionado com diferenciação celular, pois não alterou a integridade de membrana.
3. Apesar do efeito negativo inicial da ECG sobre a captação do glutamato, mostramos que após 6 h há uma resposta benéfica induzida por este polifenol, observado com aumento na captação de glutamato, indicando que a ECG pode participar dos mecanismos de proteção neural contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato.
5. A secreção de S100B foi aumentada por ECG, evidenciando um possível papel trófico deste composto.

Capítulo II

1. A ECG induziu dano ao DNA em células C6 em doses maiores, indicando que a genotoxicidade da ECG em altas concentrações afeta o sistema de reparo celular, provavelmente por meio de um efeito pró-oxidante.
2. A ECG protegeu a linhagem celular C6 do dano ao DNA induzido por H₂O₂, sugerindo que nas concentrações de 0,1 e 1 µM, a ECG desempenha um efeito benéfico, provavelmente por sua ação antioxidante.
3. A ECG pode exercer efeito genoprotetor e genotóxico em células C6, dependendo da concentração e do tempo de exposição.
5. Doses moderadas deste polifenol podem apresentar efeitos protetores em células neurais, contribuindo para prevenção de patologias associadas ao estresse oxidativo.
6. O consumo indiscriminado deste antioxidante como suplemento na dieta não deve ser estimulado.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000, 858:121-8.

Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int.* 2002, 41:313-8.

Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1992, 663:85-96.

Andlauer, W.; Fürst, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International.* 2002, 35:171-176.

Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 2000, 32:1-14.

Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci.* 1981, 8:325-31.

Beart PM, O'Shea RD. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 2007, 150:5-17.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 1968, 161:370-371.

- Benda P, Someda K, Messer J, Sweet W. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 1971, 34:310-323.
- Bowling AC, Beal MF .Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 1995, 56:1151–1171.
- Campiani G, Fattorusso C, De Angelis M et al. Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases. *Curr Pharm.* 2003, 9:599–625
- Caturla N, Vera-Samper E, Villalaín J, Mateo CR, Micol V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic Biol Med.* 2003, 34:648-62.
- Cechin SR, Dunkley PR, Rodnight R. Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. *Neurochem Res.* 2005, 30:603-11.
- Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, Liu JC, Chen YJ, Hsieh MH. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Lett.* 2002, 328:281-4.

- Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B. Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells. *Chem Res Toxicol.* 2003, 16:1155-61.
- Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, Gatta V, Perticone P, De Salvia R. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis.* 1997, 18:223-8.
- Davey Ge, Murmann P, Heizmann Cw. Intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 2001, 276:30819-30826.
- De Almeida LMV, Piñeiro CC, Leite MC et al. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res.* 2008, 33:8-15.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003, 60:540-551.
- Doronicheva N, Yasui H, Sakurai H. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30:213-7.
- Dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol increases glutamate uptake and

- glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2006, 453:161-167.
- Duarte AI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes*. 2004, 53:2110-2116.
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J*. 2005, 19:807-9.
- Emanuelli T, Pagel FW, Porciúncula LO, Souza DO. Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int*. 2003. 42:115-21.
- Ermakova S, Choi BY, Choi HS, Kang BS, Bode AM, Dong Z.m The intermediate filament protein vimentin is a new target for epigallocatechin gallate. *J Biol Chem*. 2005, 280:16882-90
- Etus V, Altug T, Belce A, Ceylan S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus. *Tohoku J Exp Med*. 2003, 200:203-9.
- Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr*. 2007. 137:223S-228S.

- Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:1790-1801.
- Fridovich I. The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci.* 1998, 7:2688-90.
- Friedman M, Mackey BE, Kim HJ, Lee IS, Lee KR, Lee SU, Kozukue E, Kozukue N. Structure-activity relationships of tea compounds against human cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2007,55:243-53.
- Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Gonçalves CA. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res.* 2004, 29:735-740.
- Funchal C, Dos Santos AQ, Jacques-Silva MC, Zamoner A, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis.* 2005, 20:205-217.
- Gottfried C, Cechin SR, Gonzalez MA, Vaccaro TS, Rodnight R. The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. *Neuroscience.* 2003, 121:553-62.

- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002, 310:257-70.
- Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr.* 2003, 33:3303S-3309S.
- Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000, 486:10-3.
- Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem.* 2006, 54:9966-77.
- Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr.* 2006, 136:1043-7.
- Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Gao HY, Onodera S, Ikejima T. (+)-Catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest. *J Pharmacol Sci.* 2005, 98:16-24.
- Kakuda T. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol Pharm Bull.* 2002, 25:1513-8.

Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 2007. 81:519-33.

Kim YJ, Hwang SY, Oh ES, Oh S, Han IO. IL-1beta, an immediate early protein secreted by activated microglia, induces iNOS/NO in C6 astrocytoma cells through p38 MAPK and NF-kappaB pathways. *J Neurosci Res.* 2006, 84:1037-46.

Komatsu M, Hiramatsu M. The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicology* 2000, 148:143–148.

Lee JH, Song DK, Jung CH, Shin DH, Park J, Kwon TK, Jang BC, Mun KC, Kim SP, Suh SI, Bae JH. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates glutamate-induced cytotoxicity via intracellular Ca modulation in PC12 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004, 31:530-6.

Lamy S, Gingras D, Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res.* 2002, 62:381-5.

Leite MC, Brolese G, De Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C, Goncalves CA. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull.* 2006, 70:179-85.

- Levites Y, Weinreb O, Maor G et al. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem.*2001. 78:1073–1082.
- Liu Z, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids.* 2000. 106:53-63.
- Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 2006, 209:2304-11.
- Maluf S. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 2004, 347:15-24.
- Mandel S, Amit T, Reznichenko L et al (2006) Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50:229–34.
- Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A. Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* 1989, 14:941-947.
- McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother.* 2005, 59:139-42.

- Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1965, 19:739-744.
- Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000, 71:1698S-702S.
- Noel, S., Kasinathan, M., Rath, S.K. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicol In Vitro.* 2006. 20:1168-1172.
- Park AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol.* 2003, 36:66-77.
- Parker JC, Parris EL, Reyes PF. Clinicomorphologic markers for predicting behavior and guiding therapy for brain tumors. *J Surg Oncol.* 1980, 14:21-34.
- Pinto S, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA, Wofchuk S, Rodnight R. Immunoprotein content and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *Febs Lett.* 2000, 486:23-207.
- Porciuncula LO, Rocha JB, Ghisleni G, Tavares RG, Souza DO. The effects of selenium on [³H]glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Brain Res.* 2004, 1027:192-5.
- Quincozes-Santos A, Andreazza AC, Nardin P, Funchal C, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology.* 2007, 28:886-91.

- Ravindranath MH, Saravanan TS, Monteclaro CC, Presser N, Ye X, Selvan SR, Brosman S. Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006, 3:237-47.
- Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev.* 2005, 126:987-1002.
- Spencer JP. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr.* 2003, 133:3255S-3261S.
- Steinmetz, K. A.; Potter, J. D. Vegetables, fruit, and cancer epidemiology. *Cancer Causes Control.* 1991, 2:325-357.
- Sugisawa A, Umegaki K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J Nutr.* 2002, 132:1836-9.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nadergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Medicine.* 2001, 7:1010-1015.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2004, 72:111-27
- Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res.* 2000, 37:15-19.

- Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Gonçalves CA. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2002, 22:373-378.
- Tramontina F, Leite MC, Goncalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Goncalves CA. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 2006, 31:815-20.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* 1998. 19:328–334.
- Tsang C, Auger C, Mullen W et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* , 2005, 94:170–181.
- Vaidyanathan JB, Walle T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-) epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307:745-52.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003, 21:97-108.

- Van Eldik LJ, Zimmer DB. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res.* 1987, 436:367-70.
- Volterra A, Trotti D, Floridi S et al. Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci.* 1994. 738:153–162.
- Yamamoto T, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Ueta E, Osaki T, Athar M, Schuster G, Hsu S. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemopreventive effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 308:317-23.
- Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 1998, 19:611-6.
- Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.* 1999, 59:4383-91.
- Zhou J, Sutherland ML. Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci.* 2004, 24:6301-6.
- Zimmer DB, Van Eldik LJ. Levels and distribution of the calcium-modulated proteins S100 and calmodulin in rat C6 glioma cells. *J Neurochem.* 1988, 50:72-9.

IX. ANEXO I

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Ilustração da planta <i>Camellia sinensis</i>	01
Figura 2. Estrutura básica de flavonóides e de flavonóis.....	02
Figura 3. Estruturas características dos principais derivados de catequinas.....	03
Figura 4. Estruturas características de dois polímeros de catequinas.....	04
Figura 5. Modelo de acoplamento metabólico entre neurônios e astrócitos.....	08
Figura 6. Reação de Fenton.....	11