



Literatura técnica

PteroVita[®]

Sua dose diária de Longevidade e *Wellness*



Uso: Interno

12,5 a 22,5mg
(de uma a duas vezes ao dia)

CAS-No: Pterostilbene: 537-42-8 / Picolinic acid: 98-98-6.

Sumário

Introdução	pág. 3
PteroVita®	pág. 6
Mecanismo de ação	pág. 9
Estudos comprovam	pág. 11
Sugestão de fórmulas	pág. 36
Ficha técnica	pág. 37
Referência bibliográficas	pág. 40

Introdução

O aumento da expectativa de vida no último século e o crescimento da população idosa, traz consigo uma maior incidência de doenças relacionadas a idade. Por esse motivo, tem-se ganhado muita relevância na medicina a procura por substâncias capazes de minimizar o acúmulo dos danos celulares que ocorrem com o avanço da idade, otimizando a saúde e consequentemente, promovendo a longevidade da população [1,2].

Inúmeros compostos naturais são classificados como promotores da longevidade, como é o caso dos polifenóis, carnitina, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais, entre outros [3].

Dentro da classe dos polifenóis, os estilbenos são compostos fenólicos que possuem dois anéis aromáticos com grupos -OH e são ligados por uma ponte de etileno. Correspondem a uma família de compostos encontrados em diversas plantas, como videiras, mirtilos, *cranberries*, amoras, uvas e amendoim [4, 25].

Os estilbenos são moléculas reconhecidas por compor o mecanismo de resposta a fatores estressores ambientais em plantas, como infecções por patógenos, lesões mecânicas, ou exposição à radiação ultravioleta. Desde as primeiras caracterizações até os dias atuais, os estilbenos têm sido estudados quanto as suas propriedades biológicas na saúde humana e animal [5].

Dentre os 400 derivados estilbenos descobertos, o resveratrol foi um dos mais extensivamente estudados. Descoberto em 1976, e amplamente investigado a partir de 1992, o resveratrol ganhou destaque na medicina devido as suas propriedades anticâncer, antiestrogênica, vasodilatadora, quelante de cobre, anti-inflamatória, antioxidante, anti-agregante plaquetário, entre outros [6, 7].

Também pertencente à família dos estilbenos, o Pterostilbeno (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) é uma variante metoxilada do resveratrol e, devido a essa presença dos dois grupos metoxi (-OCH₃) ao invés de dois grupos hidroxila (-OH), o pterostilbeno quando comparado ao resveratrol, apresenta melhor biodisponibilidade, lipofilicidade e maior tempo de meia vida [9-11].

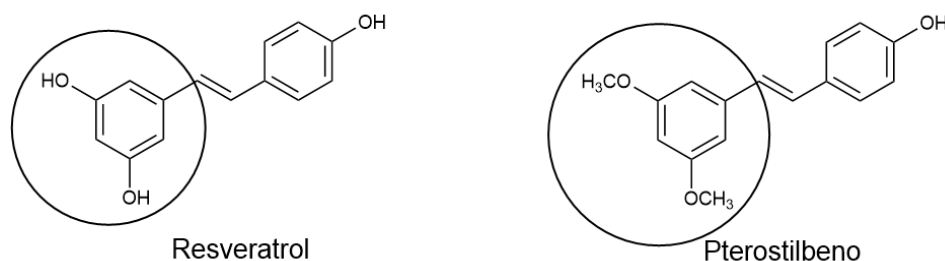


Figura 1. Estrutura química do resveratrol e pterostilbeno. As diferenças estruturais estão evidenciadas nos círculos, hidroxilas (resveratrol) e metoxilas (pterostilbeno). **Fonte:** elaboração própria.

Tanto o pterostilbeno quanto o resveratrol possuem diversas propriedades benéficas para a saúde humana. No entanto, devido às diferenças em suas estruturas químicas, as propriedades benéficas do pterostilbeno são frequentemente mais potentes quando comparadas às do resveratrol, como demonstrado na Tabela 1 [5, 8].

Pterostilbeno superior ao Resveratrol



Figura 2. Diferenças entre o pterostilbeno e resveratrol. **Fonte:** Adaptado do fabricante.

Estudos têm evidenciado que as propriedades preventivas e terapêuticas do pterostilbeno auxiliam em uma ampla gama de condições de saúde humana, incluindo desordens cardiovasculares, metabólicas, neurológicas e hematológicas, devido às suas contribuições anti-inflamatórias, antioxidantes, analgésicas, anticâncer, antidiabéticas, anti-hiperlipidêmicas, antiarteroscleróticas, anti-hipertensivas, antiobesidade e antiesteatose [25].

Tabela 1. Tabela comparativa entre as propriedades salutaras do pterostilbeno (PS) e resveratrol (RV).

Activity	Pharmacological property	Reference
Anti-cancer	Against HT-29 human colon cancer cells, PS (IC ₅₀ = 22.4 μmol/l) was a more potent inhibitor of proliferation when compared with resveratrol (IC ₅₀ = 43.8 μmol/l).	(Paul <i>et al.</i> , 2009)
Anti-cancer	PS displayed stronger growth inhibitory activities than RV against HT-29, HCT-116 and Caco-2 human colon cancer cells. With IC ₅₀ values of 15, 12, and 75 μM, PS was 4.3, 2.1, and >1.3 times stronger than RV, respectively.	(Nutakul <i>et al.</i> , 2011)
Anti-cancer	Against HeLa human cervical cancer cells, the cytotoxicity of PS (IC ₅₀ = 42.3 μM) was almost two times that of RV (IC ₅₀ = 83.5 μM).	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2018)
Antioxidant	PS protected human erythrocytes against lipid peroxidation with IC ₅₀ value of 44.5 μM. RV was significantly less effective.	(Mikstacka <i>et al.</i> , 2010)
Antioxidant	Against mammalian cells with oxidative DNA damage induced by hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), results on the protective effects of RV and PS showed the strongest inhibition in PS (85.5%) followed by RV (21.1%).	(Rossi <i>et al.</i> , 2013)
Neuroprotective	Among 21 resveratrol derivatives tested for their inhibitory effects on lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) production in microglia, the strongest activity was observed in PS (IC ₅₀ value of 1.9 μM). Its IC ₅₀ value was 8.2 times stronger than RV (IC ₅₀ value of 15.5 μM).	(Meng <i>et al.</i> , 2012)
Neuroprotective	In mice, PS is a more potent neuro-modulator of cognition function and cellular stress than RV, suggesting that PS can be used as a drug to improve cognitive function in aging and to slow down the progress of Alzheimer's disease.	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
Anti-diabetic	PS is relatively more effective than RV in improving the metabolic parameters of streptozotocin-induced diabetic rats.	(Tastekin <i>et al.</i> , 2018)
Hypolipidemic	PS is more potent as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and as a stronger hypolipidemic and glucose-lowering agent than RV.	(Rimando <i>et al.</i> , 2005)
Anti-inflammatory	Anti-inflammatory activities of PS were stronger than RV when assessed using human subjects with rheumatoid arthritis.	(Choo <i>et al.</i> , 2014)
Anti-platelet aggregation	Both RV and PS strongly inhibited platelet aggregation, and stimulated NO production in platelets.	(Messina <i>et al.</i> , 2015)
Anti-androgenic	Among the analogs of RV tested, PS exhibited the strongest anti-androgenic activity. Its hydrogen bonding interactions pattern and binding energy resembled that of anti-androgenic flutamide.	(Chakraborty <i>et al.</i> , 2014)
Antifungal	PS was 5–10 times more effective than RV in inhibiting the germination of <i>Botrytis cinerea</i> conidia and <i>Plasmopara viticola</i> sporangia.	(Jeandet <i>et al.</i> , 2002)
Bioavailability	The half-life of PS in rat serum was 1.73 hours, while those of RV and RV glucuronide 1.31 and 1.52 hours in rat plasma, respectively. The half-life of RV was only 0.24 hours in rabbit plasma. The significantly longer half-life of PS can be translated into greater bioavailability.	(Asensi <i>et al.</i> , 2002; Remsberg <i>et al.</i> , 2008)
Bioavailability	Higher oral bioavailability was observed in PS (80%) vs. RV (20%) of rats. Following oral administration, plasma levels of PS and PS sulfate were markedly higher than those of RV and RV sulfate.	(Kapetanovic <i>et al.</i> , 2011)
Pharmacokinetics	Following equimolar dose administration to rats, PS displayed superior pharmacokinetic profile than RV. The oral bioavailability of PS (67%) was 2.2 times that of RV (30%).	(Kapetanovic <i>et al.</i> , 2011)
Pharmacokinetics	RV and PS were mainly excreted as metabolites in the faeces (non-renal) and not in the urine (renal), suggesting the importance of enterohepatic cycling in their metabolism.	(Marier <i>et al.</i> , 2002; Remsberg <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: Chag *et al.*, 2019.

Como demonstrado na tabela, podemos observar que o pterostilbeno possui propriedades muito mais potentes comparado com o próprio resveratrol e, em quesito de neuroproteção, foi observado que o pterostilbeno possui atividade mais potente que 21 outros derivados do resveratrol, e se apresentando 8,2 vezes mais potente que o resveratrol [4].

Outros estudos demonstraram que o pterostilbeno pode ser utilizado como uma excelente alternativa ao resveratrol, apresentando atividades superiores e adjuvantes para: [4, 26-28]

- Melhora da função cognitiva no envelhecimento
- Retardo da progressão do Alzheimer
- Manutenção dos níveis saudáveis de glicose e lipídeos na corrente sanguínea
- Redução da inflamação em indivíduos com artrite reumatoide
- Redução da produção de androgênios

- Inibição da germinação de fungos (pterostilbeno se apresentou de 5 a 10 vezes mais eficaz quando comparado ao resveratrol).

Além disso, estudos demonstraram que o pterostilbeno possui maior tempo de meia vida e biodisponibilidade oral 2,2 vezes superior ao resveratrol [29,30].

Em estudos de segurança, o pterostilbeno mostrou-se ser bem tolerado e seguro para humanos em dosagens de até 250 mg/dia. Além disso, análises bioquímicas apontam que o pterostilbeno não apresentou nenhuma reação adversa no fígado, rins e marcadores de glicose [4, 9, 10].

Ainda que apresente uma biodisponibilidade maior que o resveratrol, um dos desafios para o uso do pterostilbeno na clínica é a sua absorção oral. Frente a crescente busca por compostos com propriedades de longevidade e a intenção de melhorar a absorção do pterostilbeno, muitos pesquisadores tem se debruçado para desenvolver uma tecnologia que solucione o problema da absorção e otimize ainda mais o acesso do nosso organismo ao pterostilbeno e suas propriedades salutares [8].

PteroVita®

Sua dose diária de Longevidade e *Wellness*

99% biodisponível e até 5x mais solúvel, graças à engenharia de cocristais!

A engenharia de cocristais foi descoberta há mais de um século e tem sido utilizada industrialmente há cerca de 15 anos. Cientistas farmacêuticos descobriram que os cocristais correspondem a um meio seguro, confiável e muito eficaz para aumentar a biodisponibilidade e estabilidade de algumas substâncias.

O PteroVita® é um novo produto patenteado e formado pelo pterostilbeno em combinação com o ácido picolínico. Apresenta 99% de biodisponibilidade, sendo capaz de oferecer benefícios aprimorados mesmo em comparação ao resveratrol.

Graças as suas diferenças estruturais e à engenharia de cocristais, o pterostilbeno presente no PteroVita® apresenta melhor solubilidade e biodisponibilidade, bem como um tempo de meia vida

estendida, o que contribui para uma alta atividade biológica.

A tecnologia de cocrystalização entre o ácido picolínico e pterostilbeno presente no PteroVita®, soluciona o problema de absorção do pterostilbeno, ao mesmo tempo que soma aos benefícios do ácido picolínico.

Dentre as contribuições do ácido picolínico, podemos destacar seu auxílio na absorção de minerais essenciais; no desempenho de um papel crucial na regulação do metabolismo; contribuição para a prevenção da osteoporose em pessoas idosas por fortalecer os ossos e aprimorar a densidade mineral óssea; fortalecimento do sistema imunológico, auxiliando nosso organismo a combater infecções e doenças; participação nas vias metabólicas, promovendo a produção de NAD no cérebro, o que realça sua importância na saúde cerebral e para o funcionamento cognitivo adequado ^[24].

O ácido picolínico é naturalmente encontrado em nosso organismo, sendo um metabólito endógeno do L-triptofano. Sua estrutura química apresenta uma configuração de anel com seis membros e sua composição inclui cinco átomos de carbono, um átomo de nitrogênio e um grupo carboxila situado na posição 2 da estrutura ^[24].

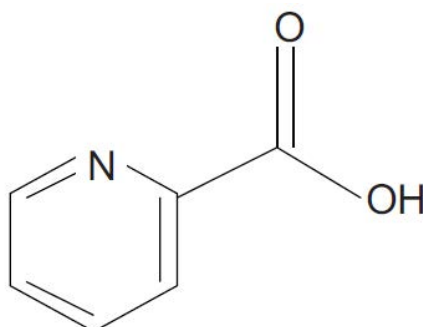


Figura 2. Estrutura química do ácido picolínico. **Fonte:** adaptado de GRANT, R. S.; COGGAN, S. E.; SMYTHE, G. A, 2009.

Após muito tempo dedicado à pesquisa, os cientistas da CIRCE *Scientific* (*Center for Intelligent Research in Crystal Engineering*) identificaram o ácido picolínico como um coformador ideal facilitar a absorção do pterostilbeno pelo nosso organismo.



Figura 2. Representação esquemática da cocrystalização entre as moléculas de ácido picolínico e pterostilbene na proporção 1:1.

Graças à aplicação da tecnologia de cocrystalos, o PteroVita® ganha características químicas que permite um melhor aproveitamento do pterostilbene pelo nosso organismo.

Frente ao pterostilbene, o PteroVita® possui solubilidade em água superior a até 5 vezes, o que corresponde a uma taxa de dissolução 40 vezes mais elevada.

Tabela 2. Tabela comparativa entre o pterostilbene e o PteroVita®.

	What	Antioxidant	Anti-inflammatory	Boosts sirtuins and AMPK	Anti-Aging	Soluble in Water	Bioavailable	Research
Pterostilbene	Found in nature	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Limited	No
PteroVita®	Patented bioengineered cocrystal of Pterostilbene + Picolinic Acid	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes; 40-fold increase in dissolution rate; 2-5 times more soluble	Yes; relative oral bioavailability 9.9-fold higher than commercial pterostilbene	Yes; NOAEL of 300 mg/Kg/day and GRAS certified by independent experts

Mecanismo de ação

Mecanismos de longevidade #1:

- Síntese de colágeno

Análises realizadas em células humanas mostraram que o PteroVita®, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de auxiliar o aumento da produção de colágeno em fibroblastos humanos, mesmo quando expostos a luz UV. Desse modo, o cocristal pode ser uma alternativa nutricional significativo na produção de colágeno.

Mecanismo de longevidade #2:

- Contribuição do PteroVita® no Sistema de Defesa Antioxidante Inato

O oxigênio, além de essencial para a sobrevivência de diversos organismos, é também um importante gerador de radicais livres que causam danos às células. PteroVita® é um poderoso antioxidante que não só auxilia na proteção frente aos radicais livres estressores, mas também fortalece as defesas antioxidantes inatas das células.

Mecanismo de longevidade #3:

- Contribuição do PteroVita® em SIRTuins, as Enzimas da Longevidade

O PteroVita® mostrou-se como um potencial adjuvante na longevidade celular por aumentar a expressão de SIRT1 e SIRT3, enzimas amplamente conhecidas por suas ações no desenvolvimento celular, metabolismo, silenciamento gênico, reparo do DNA, progressão do ciclo celular, apoptose, formação de heterocromatina e longevidade.

As proteínas SIRT1 e SIRT3 possuem papéis chaves na regulação de diversos processos celulares, incluindo metabolismo energético, reparo de DNA, resposta ao estresse, defesas e sobrevivência celular sob estresse, além de auxiliar as mitocôndrias celulares a manter uma atividade saudável em condições de estresse.

A SIRT1 é encontrada principalmente no núcleo das células. Dentre suas funções importantes destacam-se: regulação do metabolismo, homeostase energética, resposta ao estresse, longevidade e gerenciamento da resposta inflamatória. Já a SIRT3 está localizada principalmente nas mitocôndrias e desempenha funções fundamentais na regulação do metabolismo energético e na proteção contra o estresse oxidativo, como por exemplo: regulação mitocondrial, promovendo produção de ATP; defesa ao estresse oxidativo, através da ativação da SOD2; promoção da longevidade, proteção contra doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e metabólicas.

Mecanismo de longevidade #4:

- Contribuição do PteroVita® na Função Mitocondrial

A maior expressão das enzimas SIRT1 e SIRT3 pelo PteroVita® auxilia no aumento do número e da função das mitocôndrias, que por sua vez impacta diretamente na melhora da saúde e longevidade de células musculares, intestinais, hepáticas, ósseas e cerebrais.

Mecanismos de longevidade #5:

- Contribuição do PteroVita® na Resposta Imune

As moléculas pró-inflamatórias, assim como os radicais livres, compõem mecanismos cruciais de sobrevivência do organismo. Porém, o controle da inflamação e uma resposta imune equilibrada são chaves para minimizar o dano e prolongar a vida das células.

Foi demonstrado que Pterostilbeno ajuda a reduzir a resposta pró-inflamatória dependente de NF- κ B, assim como reduz moléculas sinalizadoras inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-6. Desse modo, a suplementação com PteroVita® auxilia significativamente a modulação da inflamação e o suporte de uma resposta imune equilibrada.

Mecanismos de longevidade #6:

- Contribuição do PteroVita® na Ativação da AMPK

A enzima Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato 5 (AMPK do inglês 5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) é responsável por controlar a regulação da homeostase celular, metabolismo, resistência ao estresse, sobrevivência e crescimento celular, morte celular e autofagia, que são alguns dos fatores mais críticos do envelhecimento.

Diversos estudos tem mostrado que o PteroVita® auxilia as células a ativar a AMPK, a qual junto com a SIRT1, garante mais um dos mecanismos de longevidade.

Estudos comprovam

Maior biodisponibilidade e menores doses: PteroVita® possui biodisponibilidade 10x superior ao Pterostilbeno (99% biodisponível) [9, 25]

Método: Dez ratos Sprague–Dawley machos, com peso médio de 420g receberam por gavagem oral (10 mL/kg de peso corporal) formulações contendo pterostilbeno (20 mg/kg, base livre) ou cocrystal de pterostilbeno:ácido picolínico (20 mg/kg, correspondendo a 13,5 mg/kg de pterostilbeno) na forma de suspensões aquosas com 0,5% carboximetilcelulose (CMC).

Amostras de sangue foram coletadas antes da administração das suspensões contendo pterostilbeno, nos tempos 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a administração. As amostras de plasma foram posteriormente analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficência acoplada a espectrometria de massas.

Resultados:

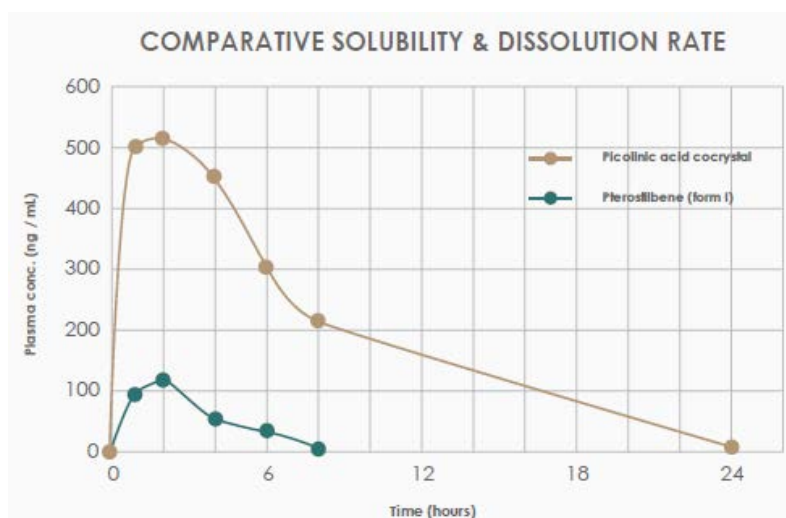


Figura 3. Farmacocinética do pterostilbeno em ratos machos *sprague-dawley* (SD) após uma única administração oral de pterostilbeno (20 mg/kg) e cocrystal de pterostilbeno:ácido picolínico (20 mg/kg, correspondendo a 13,5 mg de pterostilbeno). Valores médios (n = 5). **Fonte:** Material do fabricante. Retirado e adaptado de: BOFILL, L et al. 2021.

A concentração plasmática de pterostilbeno alcançada pela administração oral de PteroVita® foi 10 vezes maior em comparação ao pterostilbeno. Além disso, os resultados deste estudo demonstram que a biodisponibilidade do PteroVita® é excelente e está muito próxima a 100%.

Conclusão: Os resultados confirmam que, devido a formação de cocrystal de ácido picolínico com o pterostilbeno, o PteroVita® se apresenta como uma excelente alternativa ao pterostilbeno, devido possuir maior biodisponibilidade, representando uma das melhores formulações orais de pterostilbeno em humanos e possibilitando doses menores.

PteroVita® apresenta maior solubilidade e taxa de dissolução [9, 25]

Método: Foram realizados testes de dissolução de comprimidos contendo de 10 a 15mg de PteroVita® ou de pterostilbeno, em Fluido Intestinal Simulado em Estado de Jejum versão 2 (FaSSIF v2 do inglês *Fasted State Simulated Intestinal Fluid version 2*) com titulador GlpKa. Os dados foram coletados a cada 30 segundos, durante 120 minutos.

Resultados:

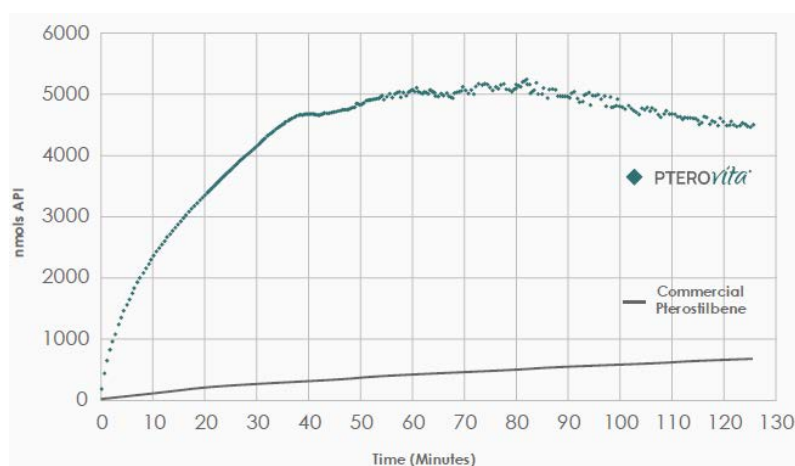


Figura 4. Solubilidade comparativa e taxa de dissolução do PteroVita® vs. Pterostilbeno comercial. **Fonte:** Material do fabricante. Retirado e adaptado de: BOFILL, L et al. 2021.

Quando comparada a solubilidade do PteroVita® com um pterostilbeno comercialmente disponível, foi observado que a nova tecnologia presente no PteroVita® foi capaz de aumentar a solubilidade de 2 a 5 vezes.

Acrescentando-se a isso, a taxa de dissolução registrada do pterostilbeno comparado ao PteroVita® foi de 12 nmol/min, contra 427 nmol/min, respectivamente, o que demonstra um ganho na velocidade de dissolução correspondente a 40 vezes para o PteroVita®.

Conclusão: O aumento da solubilidade e da taxa de dissolução vista como resultado da associação do pterostilbeno com o ácido picolínico, reforça a potencialidade do PteroVita® em proporcionar

maior biodisponibilidade e conseqüentemente, em melhorar o acesso do organismo aos benefícios de ambos os compostos.

PteroVita®: o estilbenoide mais biodisponível do mercado [9]

Resultados:

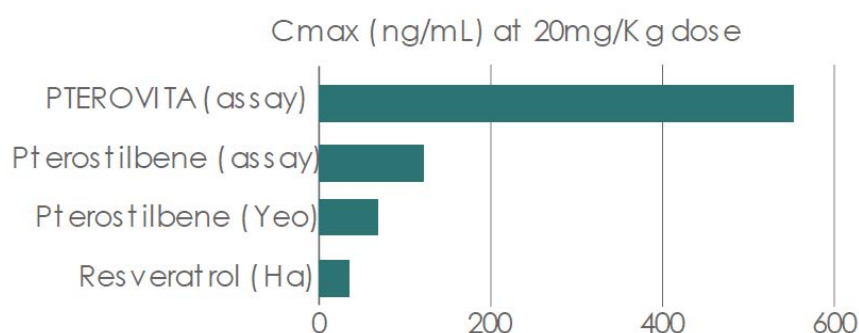


Figura 5. Concentração sanguínea máxima (Cmax) de PteroVita® vs pterostilbene de diversas fontes comerciais, após administração oral de 20mg/kg da substância do grupo correspondente. Fonte: Material do fabricante.

O estudo demonstra que PteroVita® atinge níveis séricos muito mais altos quando comparado com pterostilbene e resveratrol de fonte comercial, na mesma dosagem. Esse resultado representa a maior biodisponibilidade do PteroVita® frente ao pterostilbene, que está diretamente associada as suas contribuições salutares superiores.

Conclusão: O PteroVita® apresenta-se como a forma mais potente e biodisponível de pterostilbene disponível no mercado.

PteroVita® estimula a produção de colágeno, mesmo em condições de estresse celular

Método: Nesse estudo, células humanas foram expostas a radiação UV-A por 10 minutos e então tratadas com PteroVita® nas concentrações 0.1 – 1 µM. As células foram cultivadas por uma semana com suplementação com ácido ascórbico.

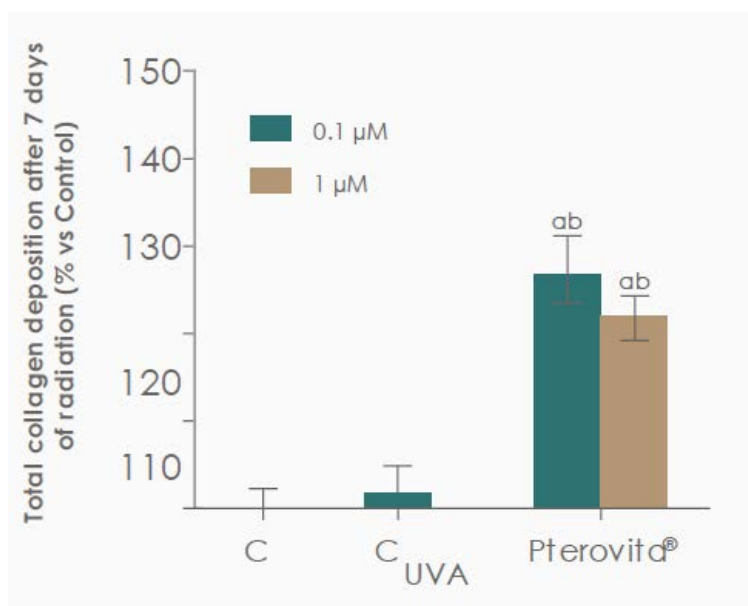
Resultados:

Figura 7. Total de deposição de colágeno após 7 dias de exposição à radiação UVA (% vs Controle). C: Controle; C UVA: Controle com irradiação UVA. **Fonte:** Material do fabricante.

Como podemos observar no gráfico acima, mesmo em baixas concentrações o PteroVita® auxilia no aumento dos níveis de deposição de colágeno em fibroblastos humanos. Na concentração de 0,1 µM foi observado um aumento de 26% na deposição total de colágeno em comparação ao controle.

Conclusão: A contribuição do PteroVita® na produção de colágeno traz benefício a todos os tecidos onde há a presença de colágeno, como pele, articulações, olhos e vasos sanguíneos, mesmo sob condições de estresse.

- AMPK – Enzima da longevidade

Resultados: Estudos demonstram que o pterostilbeno é capaz de auxiliar na ativação da via de AMPK, e por esse motivo tem o potencial de melhorar a saúde e de tratar diversas patologias relacionadas a essa enzima. A ativação da AMPK tem diferentes efeitos a depender do órgão e das características celulares, mas o aumento de sua atividade pode resultar em vasodilatação, oxidação de ácidos graxos, biogênese mitocondrial, regulação do apetite, aumento da captação de glicose e inibição da inflamação, por exemplo [14-18].

Conclusão: Os estudos analisados suportam evidências de que o pterostilbeno estimula a AMPK, apresentando-se, portanto, como potencial ativador dessa via crítica da longevidade.

- Aumento do número de mitocôndrias e otimização de seu funcionamento

Resultados: Um estudo sobre o efeito do pterostilbeno na lesão oxidativa e disfunção mitocondrial nos músculos esqueléticos induzida pela lesão isquêmica e reperfusão, mostrou que o composto foi capaz de proteger as mitocôndrias, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando a taxa de respiração mitocondrial. Além disso, o pterostilbeno ativou a via de sinalização SIRT1-FOXO1/p53, que desempenha um papel importante na proteção contra danos e estresse oxidativo nas mitocôndrias musculares [13].

Outro estudo, dessa vez realizado em ratos, com o objetivo de avaliar a melhora da termogênese e biogênese mitocondrial, mostrou que a suplementação com pterostilbeno promoveu redução do peso corporal e lipólise, aumentando a biogênese mitocondrial e a termogênese pela ativação da via de SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 [19].

Conclusão: Em vista desses achados, fica evidente o potencial do pterostilbeno como adjuvante promissor de acometimentos relacionados a disfunção mitocondrial e sua capacidade de melhora da saúde dessa organela. Por conta desses benefícios, o pterostilbeno impacta promovendo a longevidade celular, sendo, portanto, um composto de escolha inteligente na composição de fórmulas para vitalidade prolongada e envelhecimento saudável [19-20].

Contribui do pterostilbeno na manutenção de neurorônios

- Pterostilbeno atenua inflamação astrocítica e lesão oxidativa neuronal após isquemia-reperfusão por inibição da fosforilação de NF- κ B [21]

Método: O estudo foi realizado em duas etapas, uma *in vivo* e a outra *in vitro*.

In vivo

Camundongos C57BL/6 machos com idades entre 8-12 semanas e pesando 20-25g foram aclimatados em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12h, com acesso livre a ração e a água. Os animais foram randomicamente distribuídos em 4 diferentes grupos:

- Sham + Veículo
- MCAO/R + Veículo
- MCAO/R + 5mg/kg PTE
- MCAO/R + 10mg/kg PTE

Todos os camundongos foram submetidos a cirurgia, porém, apenas 3 grupos passaram pelo procedimento de oclusão-reperfusão da artéria medial cerebral (MCAO/R do inglês *Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion*), enquanto 1 grupo (Sham + veículo) passou apenas por simulação. Os camundongos que passaram pelo procedimento MCAO/R foram divididos em três grupos, sendo dois deles suplementados com diferentes concentrações de pterostilbeno (PTE) e o outro suplementado apenas com o veículo. Ao final do estudo, os animais foram sacrificados e características morfológicas cerebrais e neurológicas foram analisadas.

In vitro

Células de neurônios de hipocampo HT22 e astrocitoma U251 foram cultivadas e tratadas com PTE nas concentrações 2.5 ou 5 μM , ou veículo por 4 horas. Após isso, as células foram co-cultivadas por 24 horas, em seguida as células HT22 foram retiradas e os tratamentos de hipóxia e restrição de glicose (OGD/R) foram aplicados às células U251 por 2h, seguida da rápida reintrodução de oxigênio e glicose.

Resultados:

In vivo

- Análise do volume de infarto cerebral, edema cerebral e resultados neurológicos

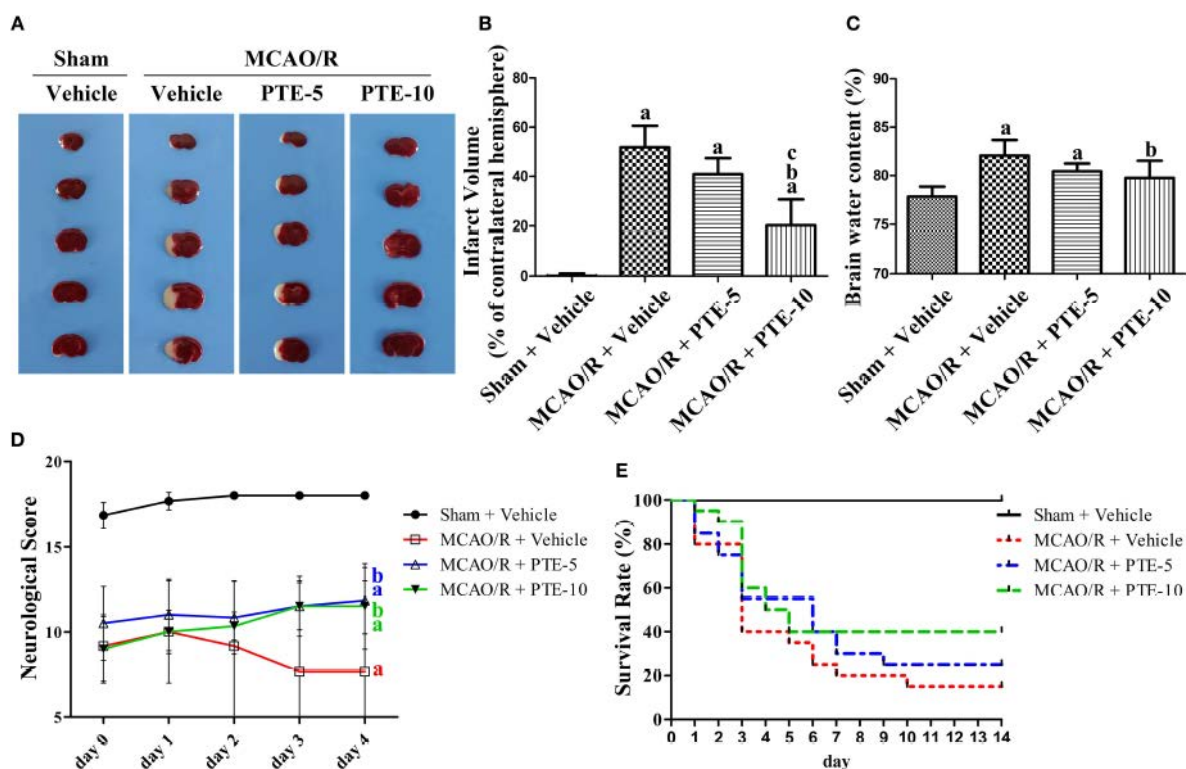


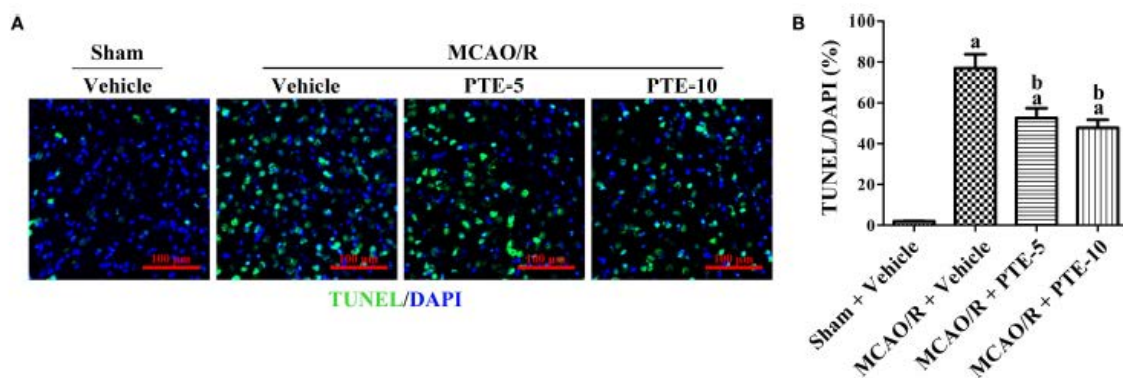
Figura 9. Volume de infarto cerebral, edema cerebral e resultados neurológicos em camundongos com oclusão e

reperfusão da artéria cerebral média (MCAO/R) com ou sem administração de PTE. (A) O volume de infarto cerebral foi avaliado por coloração com 2, 3, 5-trifeniltetrazólio (TTC) 24 horas após a operação de MCAO/R ou operação simulada, e (B) a razão do volume de infarto foi calculada para cada grupo. (C) O conteúdo de água do cérebro do hemisfério infartado (sem epencéfalo) foi analisado para avaliar o edema cerebral. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 8). ap < 0,05, comparado com Sham + Veículo. bp < 0,05, comparado com MCAO/R + Veículo. cp < 0,05, comparado com MCAO/R + PTE-5. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. (D) A função neurológica foi avaliada usando o sistema de pontuação de 18 pontos de Garcia em 2 horas e 1, 2, 3 e 4 dias (D) após a operação de MCAO/R ou operação simulada; os camundongos que morreram dentro de 4 dias após a operação foram excluídos da análise. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 8). ap < 0,01, comparado com Sham + Veículo no dia 3 e dia 4. bp < 0,01, comparado com MCAO/R + Veículo no dia 3 e dia 4. A significância foi determinada usando uma análise de variância de duas vias. (E) A taxa de sobrevivência de 14 dias foi analisada para cada grupo. PTE (na dose de 5 mg/kg e 10 mg/kg para os grupos PTE-5 e PTE-10, respectivamente) e o mesmo volume de veículo foram administrados todos os dias após a cirurgia. Os valores são expressos como a porcentagem de sobrevivência (n = 20). A significância foi determinada usando um teste log-rank. MCAO/R, oclusão e reperfusão da artéria cerebral média; PTE-5/10, pterostilbeno 5 ou 10 mg/kg. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

A análise morfológica revelou que o grupo MCAO/R apresentou volume de infarto (proporção entre área vermelha e branca nos cortes, figura 9A) e o conteúdo de água cerebral maiores em comparação ao grupo Sham. Contudo, ambos os grupos suplementados com PTE apresentaram valores reduzidos desses parâmetros em comparação ao grupo MCAO/R + veículo.

O score neurológico foi outro parâmetro que apresentou melhora nos grupos suplementados com PTE em comparação ao grupo MCAO/R + veículo no terceiro e quarto dia após a operação. A taxa de sobrevivência em duas semanas no grupo PTE-10 dobrou em comparação ao grupo MCAO/R + Veículo (figura 9E), porém essa diferença não foi suficiente para gerar significância estatística.

- Taxa de apoptose neural



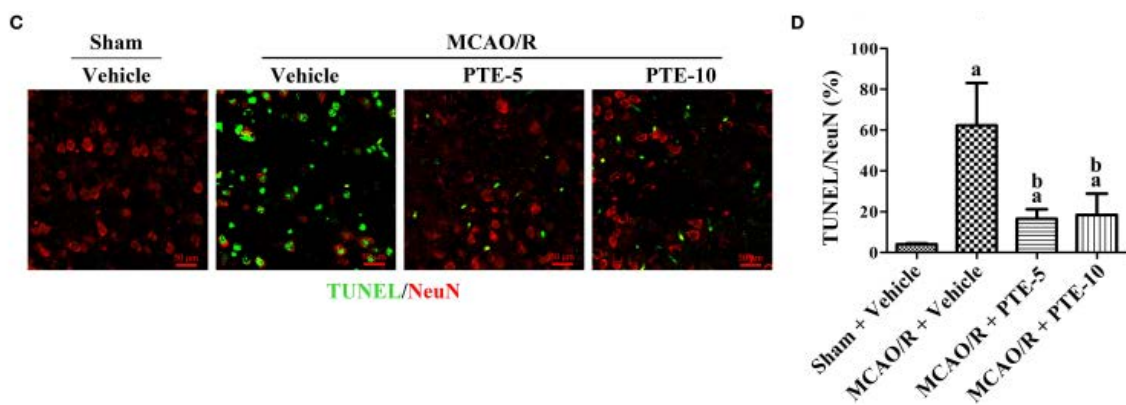
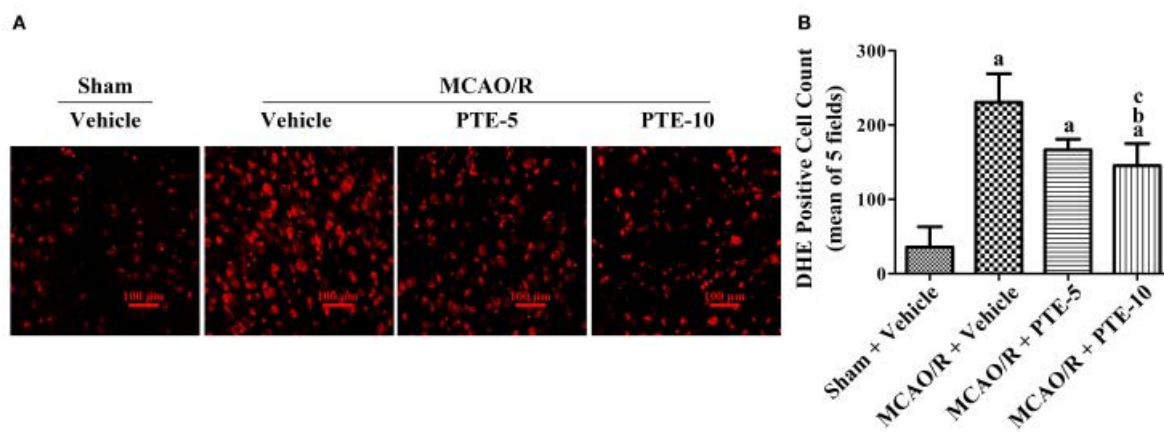


Figura 10. Apoptose neural na área peri-infarto 24 horas após MCAO/R com ou sem administração de PTE. (A) A dupla marcação por imunofluorescência de TUNEL (verde) e DAPI (azul) foi realizada em seções congeladas fixadas 24 horas após MCAO/R ou cirurgia simulada. As barras de escala = 100µm. (B) A porcentagem de células positivas para TUNEL na área peri-infarto foi contada sob microscopia de fluorescência como uma média de cinco campos visuais. (C) A taxa de apoptose neuronal foi avaliada usando dupla marcação por imunofluorescência de células apoptóticas (TUNEL, verde) e neurônios (NeuN, vermelho) nas mesmas condições. As barras de escala = 50µm. (D) A porcentagem de neurônios positivos para TUNEL na área peri-infarto foi contada sob microscopia de fluorescência como uma média de cinco campos visuais aleatórios. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 8). ap < 0,01, comparado com Sham + Veículo. bp < 0,01, comparado com MCAO/R + Veículo. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. MCAO/R, oclusão e reperusão da artéria cerebral média; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; PTE-5/10, pterostilbeno 5 ou 10 mg/kg; TUNEL, marcação de extremidades de nick de dUTP pela transferase terminal deoxynucleotidil. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

Para a avaliação do efeito protetivo do pterostilbeno na área peri-infarto, as células da região foram coletadas e marcadas por imuno-histoquímica, na qual a marcação TUNEL corresponde a núcleos apoptóticos, DAPI marca todos os núcleos, e NeuN é um antígeno nuclear neuronal. Os resultados mostraram que a taxa de células apoptóticas aumentou de forma significativa nos grupos MCAO/R, porém esse aumento mostrou-se menos pronunciado nos grupos suplementados com PTE.

- Avaliação dos níveis de estresse oxidativo nas áreas peri-infarto



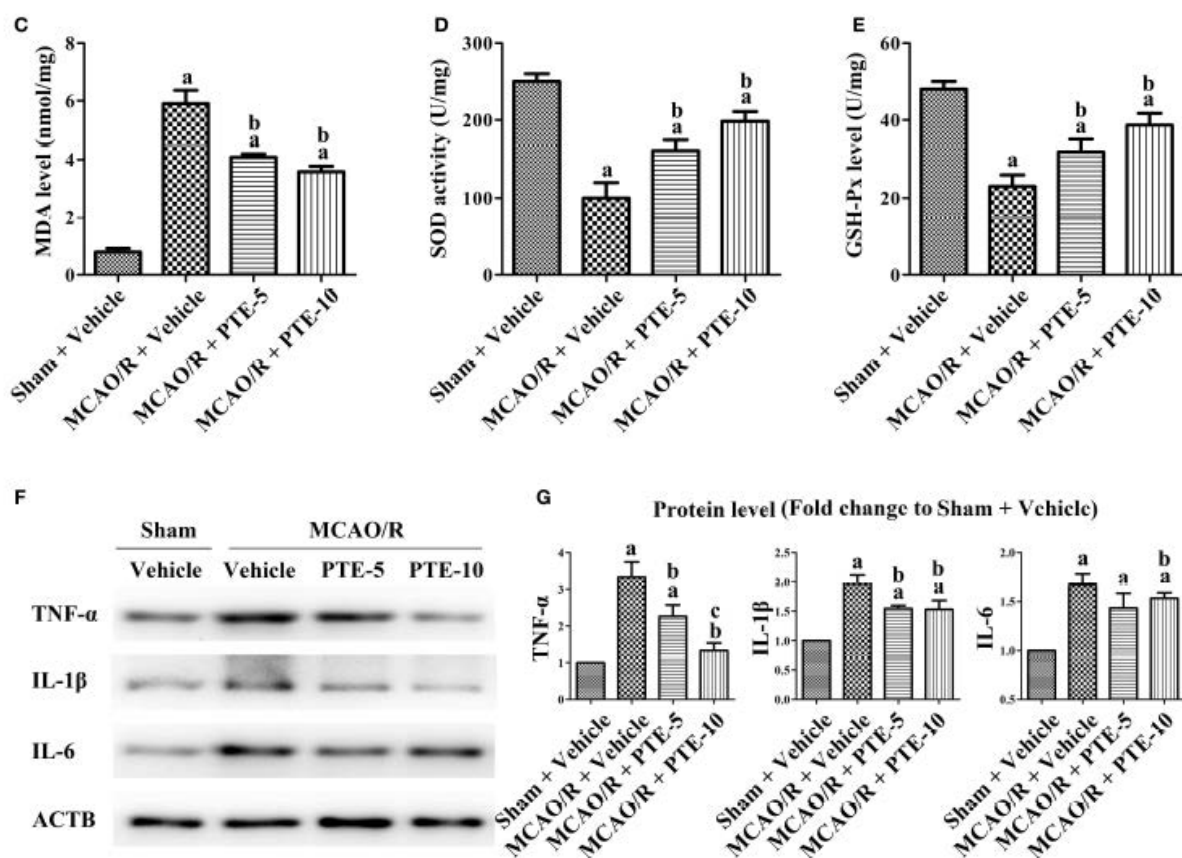


Figura 11. Estresse oxidativo e níveis inflamatórios em camundongos com MCAO/R com ou sem administração de PTE. (A) O nível de estresse oxidativo cerebral na área peri-infarto foi avaliado usando coloração com DHE (vermelho) 24 horas após MCAO/R ou cirurgia simulada. Barras de escala = 100 μ m. (B) As células positivas para DHE na área peri-infarto foram contadas por um observador cego para as atribuições dos grupos e analisadas como a média de cinco campos visuais aleatórios. (C-E) Os níveis de MDA, SOD e GSH-Px no hemisfério infartado foram avaliados usando kits de teste relevantes 24 horas após MCAO/R ou cirurgia simulada. (F,G) Os níveis dos fatores pró-inflamatórios TNF- α , IL-6 e IL-1 β na área peri-infarto foram analisados usando western blotting 24 horas após a cirurgia. ACTB foi usado como controle de carga, e o nível de proteína foi normalizado para o grupo Sham + Veículo. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). ap < 0,05, comparado com Sham + Veículo. bp < 0,05, comparado com MCAO/R + Veículo. cp < 0,05, comparado com MCAO/R + PTE-5. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. ACTB, β -actina; MCAO/R, oclusão e reperusão da artéria cerebral média; DHE, di-hidroetídio; GSH-Px, glutathiona peroxidase; MDA, aldeído dicarboxílico metano; PTE-5/10, pterostilbeno 5 ou 10 mg/kg; SOD, superóxido dismutase. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

O nível de estresse oxidativo das células pode ser medido pelo aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de aldeído dicarboxílico metano (MDA), e pela diminuição da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e atividade da superóxido dismutase (SOD).

Os dados mostraram que nos grupos MCAO/R a contagem de células marcadas com DHE (di-hidroetídio, marcador de espécies reativas de oxigênio) foi significativamente mais elevada que no

grupo Sham. Apesar disso, no grupo PTE-10 esse aumento foi substancialmente mais baixo que o observado nos outros dois grupos (MCAO/R + Veículo ou PTE-5).

No que tange os níveis de MDA, SOD e GSH-Px, foi observado alterações significativas nos grupos suplementados com pterostilbeno comparado ao grupo MCAO/R + Veículo. Como demonstrado nos gráficos C, D e E da figura 3, a suplementação com PTE em ambas concentrações foi capaz de reduzir MDA e aumentar a atividade de SOD e a quantidade de GSH-Px, respectivamente.

Na mesma linha, fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e IL-1 β que tiveram seus valores elevados com o a intervenção cirúrgica MCAO/R em comparação ao grupo Sham, apresentaram aumento menos expressivo nos grupos tratados com PTE, sobretudo no PTE-10mg/Kg.

In vitro

- Contribuições do pterostilbeno na ativação dos astrócitos ao redor da área de infarto em camundongos MCAO/R.

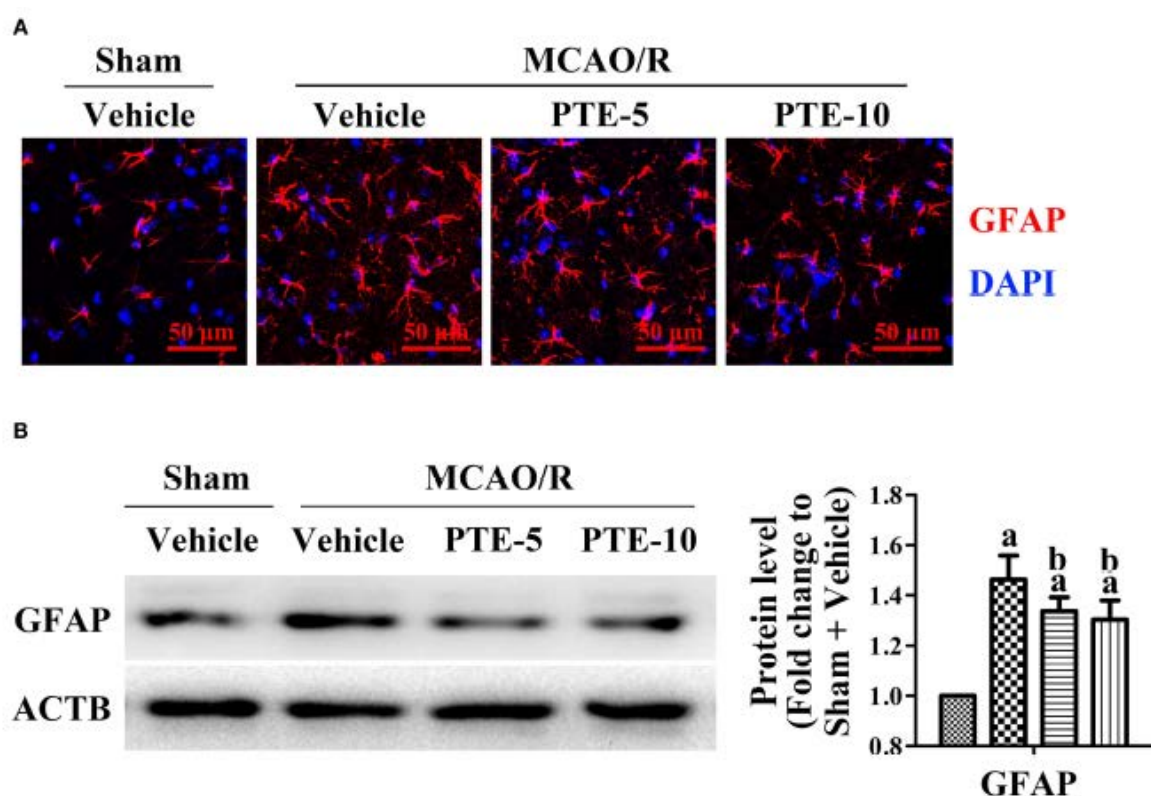


Figura 12. Astrócitos e micróglia na área peri-infarto após MCAO/R com ou sem administração de PTE. (A) Ativação, proliferação e agregação de astrócitos (GFAP, verde) foram observadas por um observador cego, utilizando coloração por imunofluorescência em seções congeladas fixadas 24 horas após MCAO/R ou cirurgia simulada. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Barras de escala = 50 μ m. (B) O nível de proteína de GFAP foi analisado com western blot 24 horas após a cirurgia. ACTB foi usado como controle de carregamento, e o nível de proteína foi normalizado para o

grupo Sham + Veículo. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). $ap < 0.05$, comparado com Sham + Veículo. $bp < 0.05$, comparado com MCAO/R + Veículo. A significância foi determinada usando uma análise de variância unidirecional. ACTB, β -actina; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; MCAO/R, oclusão e reperfusão da artéria cerebral média; PTE-5/10, pterostilbeno 5 ou 10 mg/kg. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

Foram observados uma aparente agregação, proliferação e ativação dos astrócitos na área peri-infartada, tanto na análise por imunofluorescência quanto por Western-blot. O procedimento de MCAO/R levou a um aumento de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) maior no grupo veículo do que nos grupos tratados com PTE.

- Contribuições do pterostilbeno na expressão, fosforilação e translocação da subunidade NF- κ B p65 na área peri-infartada de camundongos MCAO/R

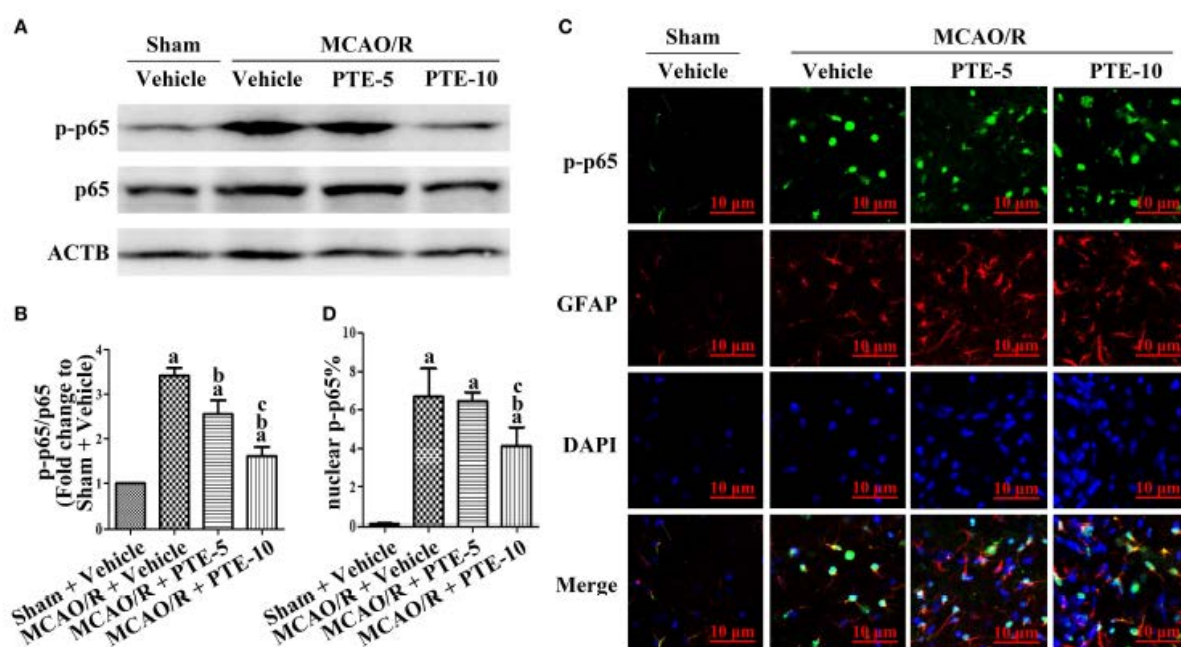


Figura 13. Astrócitos e microglia na área peri-infarto após MCAO/R com ou sem administração de PTE. (A) A ativação, proliferação e agregação de astrócitos (GFAP, verde) foram observadas por um observador cego, usando coloração por imunofluorescência em seções congeladas fixadas 24 horas após MCAO/R ou cirurgia simulada. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Barras de escala = 50 μ m. (B) O nível de proteína GFAP foi analisado com western blot 24 horas após a cirurgia. ACTB foi usado como controle de carga, e o nível de proteína foi normalizado para o grupo Sham + Veículo. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 6). $ap < 0,05$, comparado com Sham + Veículo. $bp < 0,05$, comparado com MCAO/R + Veículo. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. ACTB, β -actina; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; MCAO/R, oclusão e reperfusão da artéria cerebral média; PTE-5/10, pterostilbeno 5 ou 10 mg/kg. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

O teste de western-blot revelou que o nível de p65 no grupo MCAO/R + veículo foi maior quando comparado ao grupo Sham + veículo. O tratamento com PTE resultou em uma redução expressiva dos níveis de p65 celular.

A distribuição de p-p65 foi investigada usando imuno-histoquímica e os resultados mostraram que o tratamento com PTE teve efeito redutor nos níveis de p-p65 nos astrócitos, principalmente no núcleo.

- Contribuições do pterostilbena na expressão, fosforilação e translocação nuclear da subunidade NF- κ B p65 em células de astroglioma U251 submetidas a OGD/R.

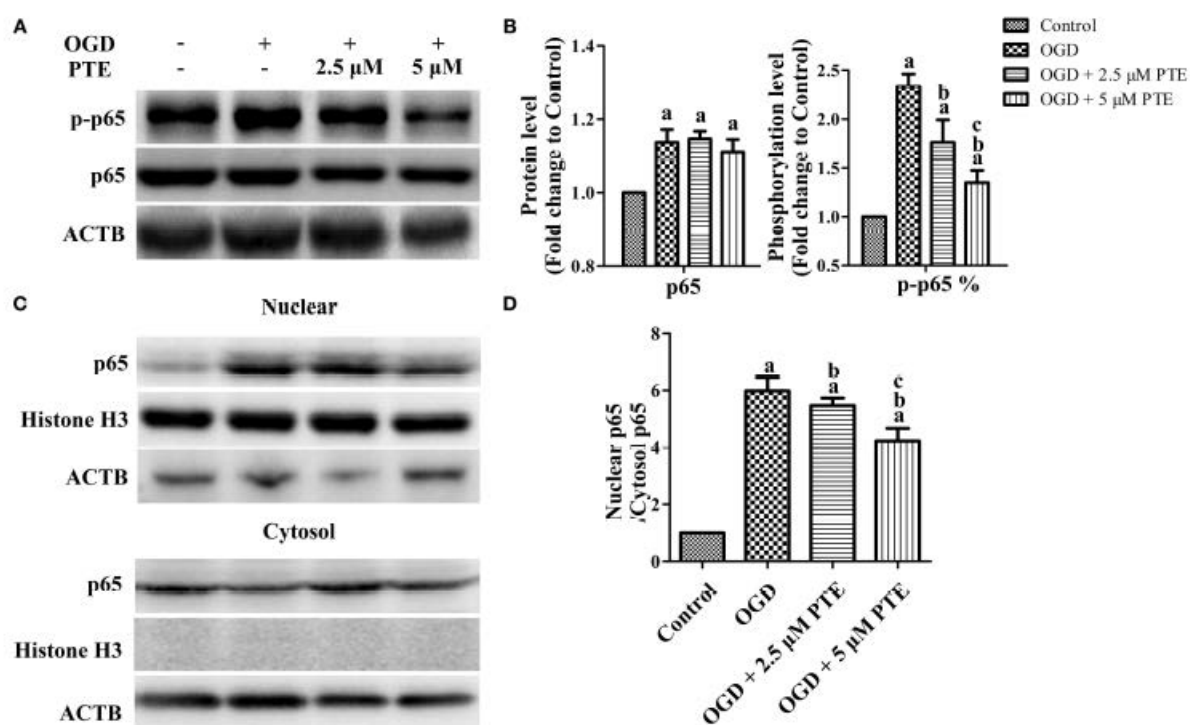


Figura 14. Níveis de expressão, fosforilação e translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B em células de astroglioma U251 submetidas a OGD com ou sem tratamento com PTE. (A,B) Os níveis de proteína e fosforilação de p65 foram avaliados usando análise de western blot 24 horas após OGR em células U251 submetidas a 4 horas de OGD com ou sem pré-tratamento com PTE. ACTB foi usado como controle de carga. Ao mesmo tempo (C,D), a translocação nuclear de p65 foi avaliada usando extração nuclear e citoplasmática seguida de análise de western blot. A histona H3 foi usada como controle de carga para proteínas nucleares e ACTB para proteínas citoplasmáticas. A expressão, fosforilação (S536) e nível de translocação nuclear de p65 foram normalizados para o Controle. Os valores são expressos como média \pm DP (n = 6). ap < 0,05 comparado com Controle. bp < 0,05 comparado com OGD. cp < 0,05 comparado com OGD + 2,5 μ M PTE. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. ACTB, β -actina; OGR, reintrodução de oxigênio e glicose; OGD, privação de oxigênio e glicose; PTE, pterostilbena. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

Nos testes *in vitro* no qual as células U251 foram submetidas a privação e reperusão de oxigênio e glicose não foram observados efeitos na expressão de p65. Porém o nível de p65 fosforilado foi significativamente menor nos grupos PTE tratados com 2.5 e 5 μ M (Fig. 14 A e B). Além disso, foi observado que os níveis de translocação nuclear de p65 nos grupos tratados com PTE (pterostilbena) foram menores do que no grupo OGD/R (Fig. 14 C e D).

- Translocação nuclear NF-κB p65

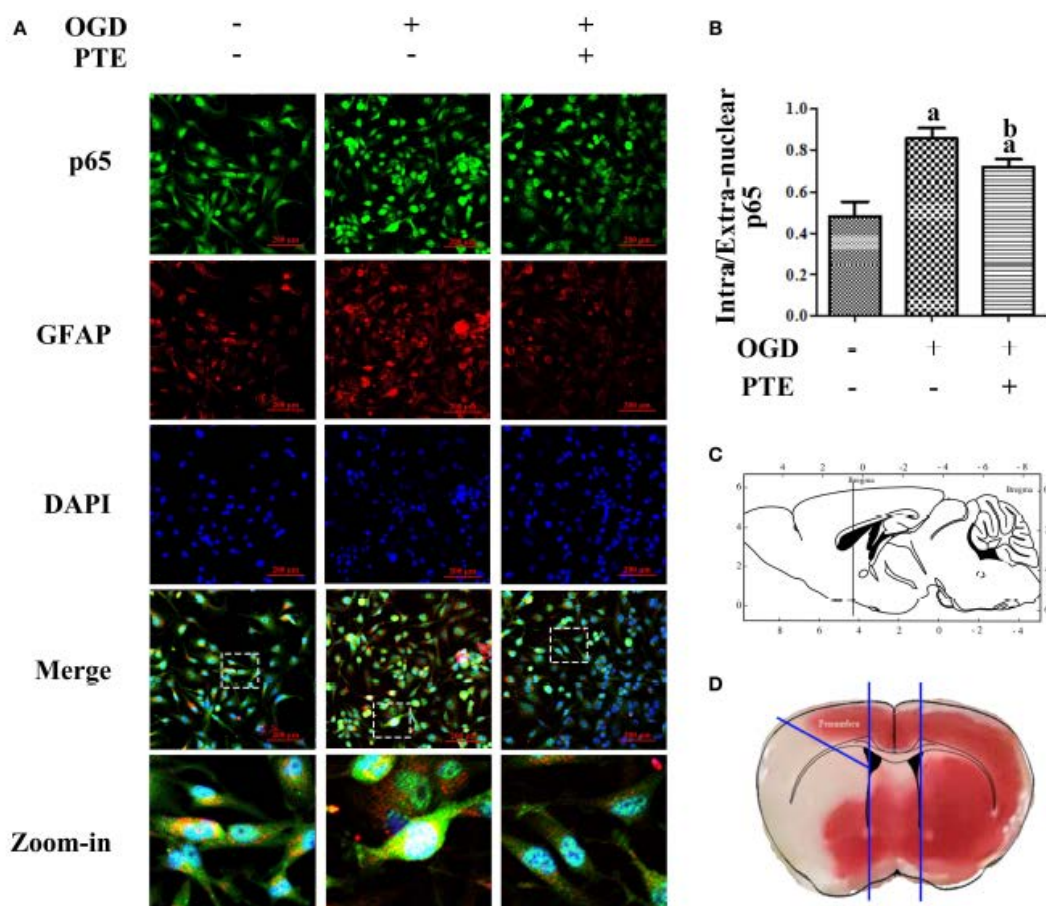


Figura 15. A distribuição intracelular de p65 nas células U251 de astroglioma submetidas a OGD/R com ou sem pré-tratamento com PTE (pterostilbeno) foi investigada. (A,B) A translocação nuclear de p65 induzida por OGD/R foi observada por um observador cego aos grupos, utilizando dupla marcação por imunofluorescência de p65 (verde) e GFAP (proteína ácida fibrilar glial, vermelho) sob a intervenção de PTE (5 μ M). Os núcleos foram restainados com DAPI (azul), e as barras de escala são de 200 μ m. (C,D) Diagrama esquemático da localização da penumbra onde a visão representativa foi adquirida. O esboço em (C) é referenciado da Página 77, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (segunda edição), 2001, ACADEMIC PRESS. GFAP, proteína ácida fibrilar glial; OGD/R, privação de oxigênio e glicose e reintrodução; PTE, pterostilbeno. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

O conjunto de dados mostram que o tratamento com 5 μ M de pterostilbeno diminuiu marcadamente a translocação nuclear de p65 induzida por OGD, o que indica uma possível proteção a respostas imunes e inflamatórias exacerbadas.

- Contribuições do pterostilbeno na inflamação, estresse oxidativo e morte de neurônios em células do hipocampo HT22 cocultivadas com células de astroglioma U251 submetidas a OGD/R

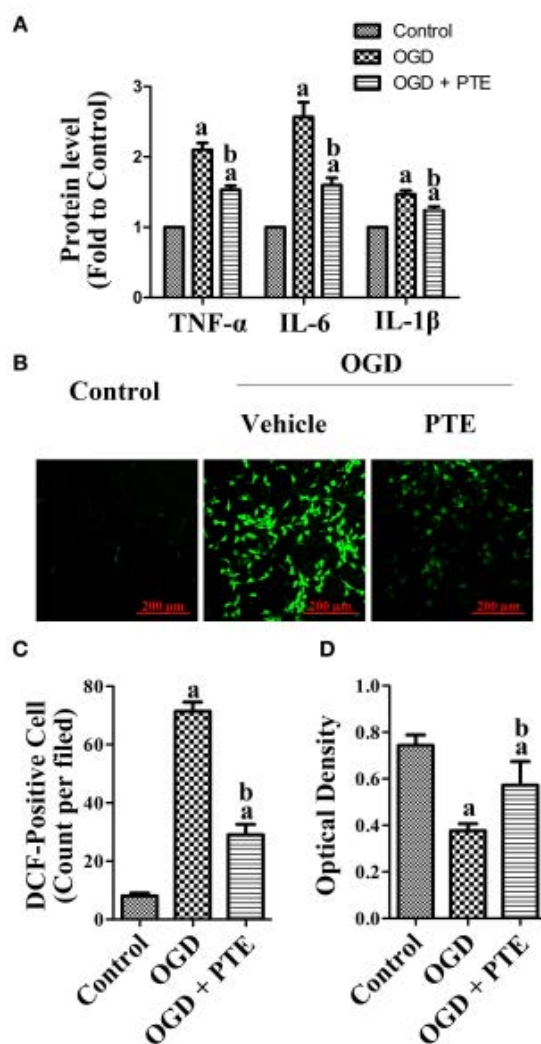


Figura 16. Geração de fatores pró-inflamatórios no meio de cultura de células de astroglioma U251 submetidas a OGD/R, e morte neural induzida por estresse oxidativo em células HT22 co-cultivadas com U251 pré-tratadas com OGD/R. (A) Os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no meio de cultura foram avaliados usando kits de ELISA 24 horas após OGD/R para cada grupo. Os resultados foram normalizados para o Controle. (B) A geração de ROS em células hipocampais HT22 foi observada por um observador cegado, usando coloração com DCF. (C) As células positivas para DCF foram contadas manualmente e calculadas como uma média de cinco campos visuais aleatórios para cada placa. (D) A viabilidade celular das HT22 foi avaliada usando o ensaio CCK-8 após co-cultivo com U251 pré-tratadas com OGD por 24 horas. A concentração de PTE é 5 μ M. Os valores são expressos como média \pm DP (n = 6). ap < 0,05, comparado com o Controle. bp < 0,05, comparado com OGD. A significância foi determinada usando uma análise de variância de uma via. CCK-8, kit de contagem de células-8; DCF, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína; ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; IL, interleucina; OGR, reintrodução de oxigênio e glicose; OGD/R, privação e reintrodução de oxigênio e glicose; PTE, pterostilbeno; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral. **Fonte:** LIU, Haixiao et al. 2019.

Sob fatores relacionados a inflamação, o tratamento das células HT22 com PTE 5µM impactou de forma significativa na redução de TNF-α IL-1β e IL-6 em comparação ao grupo OGD. Nesse mesmo grupo, também foi observado viabilidade celular maior em comparação com o grupo OGD.

O pré-tratamento com PTE diminuiu significativamente o número de células U251 positivas para diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) 24 horas após OGD/R em comparação com o veículo, o que indica o PTE foi capaz de reduzir a presença de espécies reativas de oxigênio nessas células.

Conclusão: Os achados do presente estudo, evidenciaram a capacidade do pterostilbeno em diminuir o volume do infarto, o edema cerebral e de melhorar os parâmetros neurológicos pós-isquemia em camundongos, desempenhando assim um papel neuroprotetivo. Além disso, na análise em *in vitro* levou a uma redução da apoptose das células da área infartada e melhorou a taxa de sobrevivência neuronal.

Portanto, pode-se inferir que o pterostilbeno apresenta efeitos neuroprotetivos promissores e potencial capacidade de melhorar o prognóstico e a qualidade de sobrevivência em isquemia cerebral devido a suas excelentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Pterostilbeno contribui para a diminuição de lesão oxidativa neuronal SH-SY5Y mediada por inflamação microglial BV-2 cocultivada via sinalização SIRT-1 [22]

Método: Células humanas de neuroblastoma da linhagem SH-SY5S e micróglia murinas da linhagem BV-2 foram utilizadas para avaliar a possível atividade moduladora do pterostilbeno (PTE) na inflamação e injúria oxidativa neuronal mediada pela micróglia, e para explorar os mecanismos de sinalização mediados pela SIRT-1.

O estudo foi dividido em três etapas:

1ª etapa - Avaliação da influência do PTE no sistema de cocultivo BV-2/SH-SY5S, contando os efeitos na sobrevivência das células SH-SY5S e a expressão de SIRT-1 em BV-2. As células foram randomizadas e divididas nos seguintes grupos:

- Controle
- PTE 2.5 µM
- PTE 5.0 µM
- PTE 10.0 µM

2ª etapa - Investigação se o tratamento com PTE é capaz de aliviar a lesão de células SH-SY5Y induzida por células BV-2 ativadas por lipopolissacárideos (LPS). Nessa segunda etapa os grupos experimentais foram:

- SH-SY5Y Controle
- SH-SY5Y + BV-2 isoladas
- SH-SY5Y + LPS isolado
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS

Em seguida foi testado o efeito protetivo do PTE e para isso as células BV-2 estimuladas com LPS foram pré-tratadas com PTE ou veículo por 2 horas, seguido pela cocultura com SH-SY5Y por 24h. Após as intervenções descritas, realizou-se novos ensaios para mensurar a sobrevivência celular, apoptose, estresse oxidativo e fatores inflamatórios.

Grupos:

- SH-SY5Y Controle
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + Veículo
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + PTE 2.5 µM
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + PTE 5.0 µM
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + PTE 10.0 µM

3ª etapa - Investigação do papel da proteína Sirtuina 1 (SIRT-1) no efeito protetivo frente a injúria induzida pelas micróglias BV-2 ativadas por LPS. Para isso, as células BV-2 foram tratadas previamente com EX527 (inibidor específico da enzima SIRT-1) e posteriormente prosseguiu-se as outras intervenções seguindo o procedimento descrito no passo 2 (tratamento das células BV-2 com LPS, seguido de tratamento com PTE ou veículo por 2 horas, e cocultura com SH-SY5Y por 24h)

Após as intervenções descritas, realizou-se novos ensaios para mensurar a expressão de proteínas, sobrevivência celular, apoptose, estresse oxidativo e fatores inflamatórios.

Grupos:

- SH-SY5Y Controle
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + Veículo
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + PTE 5.0 µM
- SH-SY5Y + BV-2 ativada por LPS + PTE 5.0 µM + EX527

Resultados:

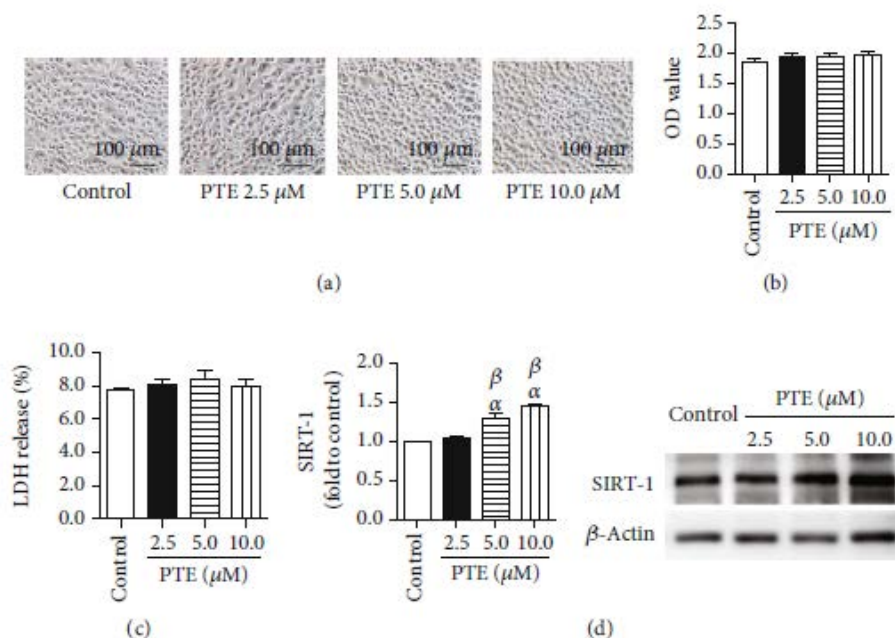
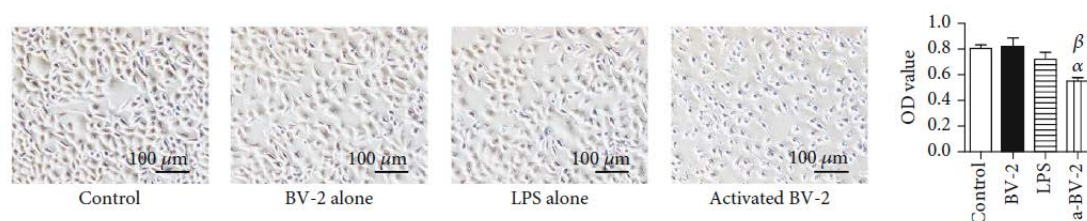


Figura 17. Efeitos do PTE nos sistemas de cocultura SH-SY5Y e BV-2. As células BV-2 foram incubadas com controle do veículo ou PTE (2,5, 5,0 ou 10,0 µM) por 2 horas, seguido pela cocultivação com células SH-SY5Y por 24 horas. (a) A morfologia das células SH-SY5Y foi fotografada sob um microscópio invertido/de contraste de fase, e (b) a viabilidade foi quantificada usando um ensaio CCK-8. (c) A liberação de LDH nos sobrenadantes foi determinada usando um ensaio de liberação de LDH e expressa como porcentagem do máximo. (d) A expressão de SIRT-1 nas células BV-2 foi medida usando análise de western blot e normalizada para a de β-actina. Os dados são apresentados como média ± DP. n = 6. ap < 0,05, comparado com o controle. βp < 0,05, comparado com PTE 2,5 µM. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

A co-cultura de células SH-SY5Y e BV-2 sem estimulação por LPS tratadas com PTE (2,5, 5,0 ou 10 µM) não mostrou nenhum efeito na viabilidade celular de SH-SY5Y ou na liberação de lactato desidrogenase (LDH). Por outro lado, a expressão de SIRT-1 em células BV-2 aumentou significativamente com PTE nas concentrações de 5,0 and 10,0 µM.

- Contribuições do pterostilbenona viabilidade celular, liberação de LDH, e taxa de apoptose de células SH-SY5Y em sistema de co-cultura com células BV-2 ativadas por LPS



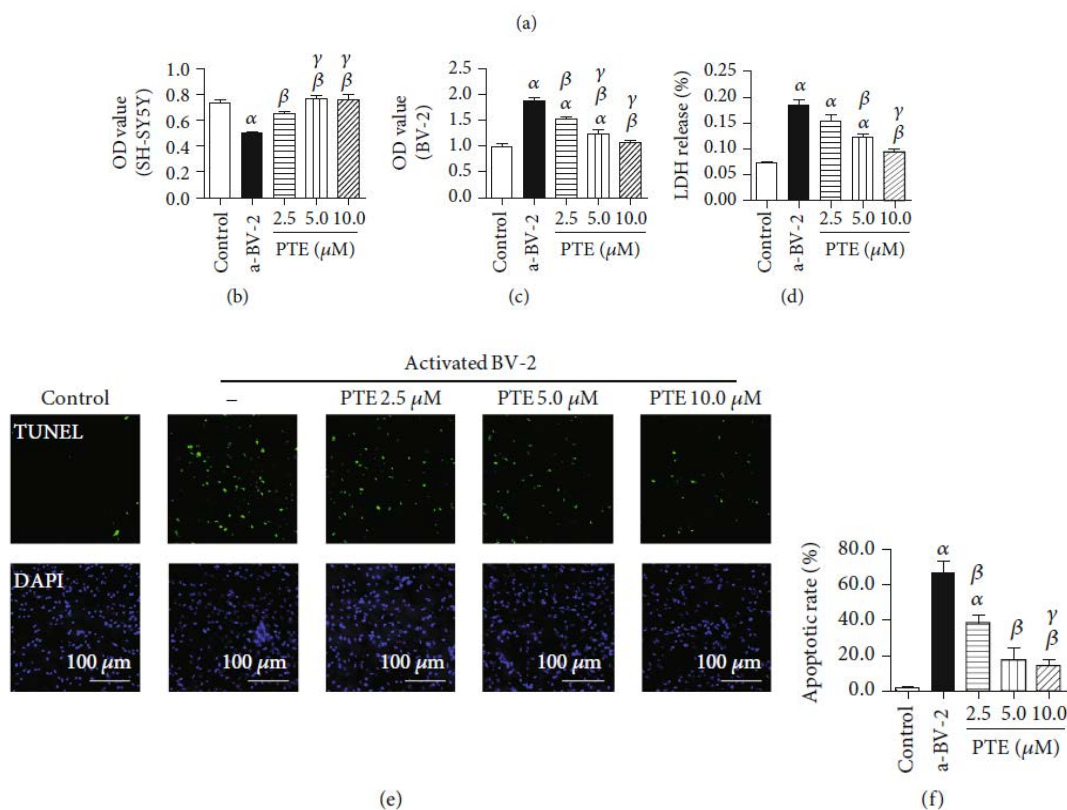


Figura 18. O LPS induz a ativação de células BV-2 e lesão de células SH-SY5Y no sistema de cocultura, e o PTE demonstra efeitos protetores após estimulação por LPS. As células SH-SY5Y foram cocultivadas com células BV-2, LPS (100 ng/mL) ou ambas as células BV-2 e LPS por 24 horas, separadamente. (a) A morfologia e a viabilidade das células SH-SY5Y foram observadas sob um microscópio invertido/de contraste de fase ou avaliadas usando um ensaio CCK-8, respectivamente.

As células BV-2 foram pré-incubadas com controle do veículo ou PTE (2,5, 5,0 ou 10,0 μM) por 2 horas, seguido pela estimulação com LPS e cocultivo com células SH-SY5Y por 24 horas. A viabilidade das células (b) SH-SY5Y e (c) BV-2 foi medida usando um ensaio CCK-8. (d) A liberação de LDH nos sobrenadantes foi determinada usando um ensaio de liberação de LDH e expressa como porcentagem do máximo. (e) A apoptose das células SH-SY5Y foi avaliada usando um ensaio TUNEL. Os núcleos apoptóticos foram corados com TUNEL (verde), e todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). (f) A taxa de apoptose foi calculada como porcentagem dos núcleos positivos para TUNEL em relação aos positivos para DAPI. Os dados são apresentados como média ± DP. n = 6. αp < 0,05, comparado com o controle. βp < 0,05, comparado com o grupo a-BV-2. γp < 0,05, comparado com PTE 2,5 μM. LPS: lipopolissacarídeo; a-BV-2: grupo de cocultura de BV-2 ativado por LPS. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

As análises revelaram que o co-cultivo das células SH-SY5Y com BV-2 e LPS isolados não foi capaz de alterar a morfologia e a viabilidade celular de SH-SY5Y. Em contrapartida, quando expostas a co-cultura com células BV-2 ativadas por LPS, ocorreram mudanças morfológicas e diminuição da viabilidade das células SH-SY5Y.

No sistema de cultura celular com ambas as linhagens, a estimulação por LPS promoveu a viabilidade das células BV-2 ao mesmo tempo que prejudicou a viabilidade das células SH-SY5Y. Porém, o tratamento com PTE melhorou de forma significativa os valores de densidade óptica (OD)

para as células SH-SY5Y e diminuiu para as BV-2.

Foi observado também uma redução na secreção de LDH por células SH-SY5Y quando tratadas com pterostilbeno, comparado ao grupo BV-2 ativada por LPS (Fig. 18 d), o que indica uma redução do dano celular. A taxa de células SH-SY5Y apoptóticas na co-cultura com BV-2 ativada por LPS foi substancialmente menor quando tratadas com PTE, em comparação a ausência de tratamento (Fig. 18 e, f).

Tais achados evidenciam a potencialidade adjuvante do pterostilbeno na neuroproteção, frente aos fatores estressores, como acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas.

- Contribuições do pterostilbeno no estresse oxidativo de SH-SY5Y e fatores inflamatórios no sobrenadante no sistema de co-cultura

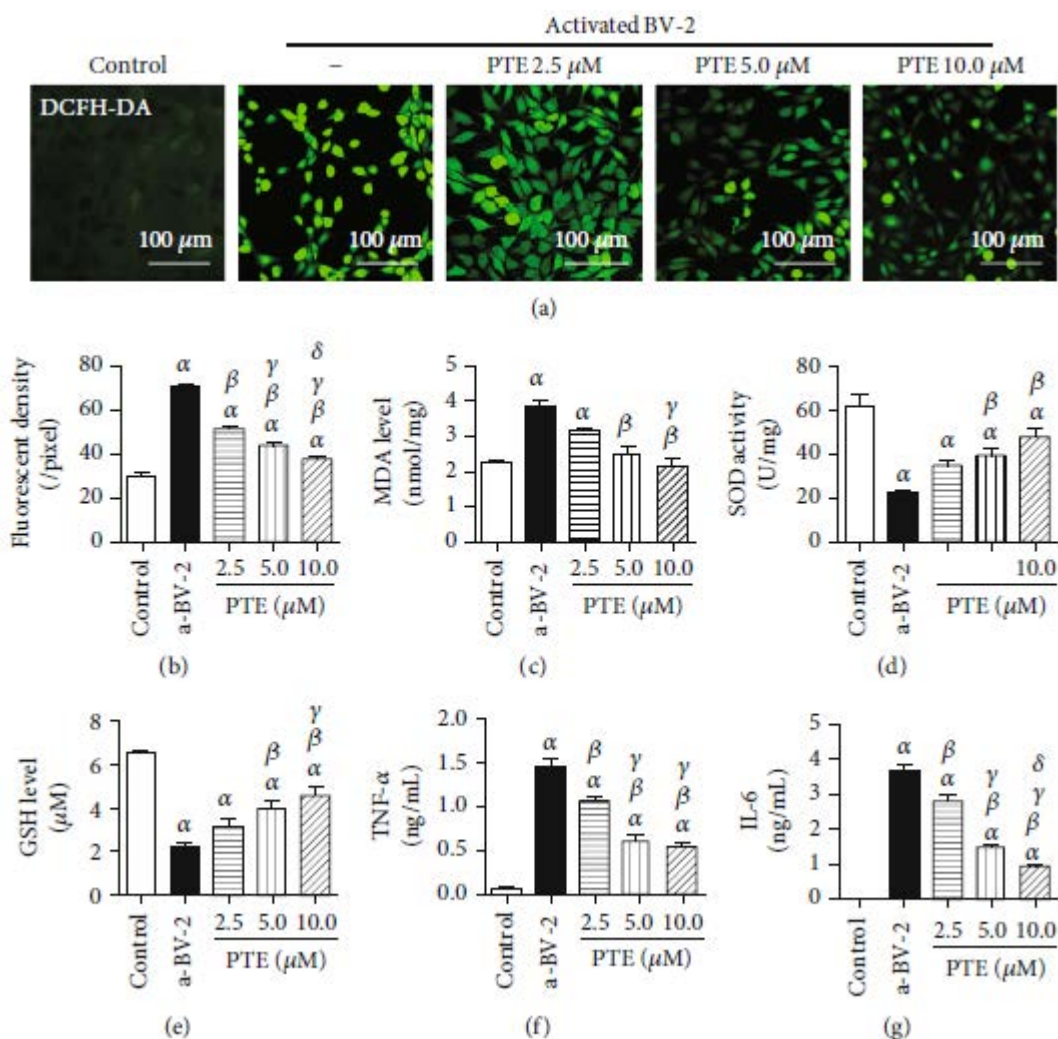


Figura 19. PTE reduz os fatores inflamatórios liberados por células BV-2 ativadas por LPS e atenua o nível de estresse oxidativo das células SH-SY5Y. As células BV-2 foram pré-tratadas com veículo ou PTE (2,5, 5,0 ou 10,0 μM) por 2 horas,

seguido pela estimulação com LPS e cocultivo com células SH-SY5Y por 24 horas. (a) O ROS nas células SH-SY5Y foi corado com DCFH-DA (verde), e (b) o nível de ROS foi calculado como a densidade fluorescente média intracelular. (c) O nível de MDA, (d) a atividade de SOD e (e) o nível de GSH nas células SH-SY5Y foram avaliados usando kits comerciais padronizados, e (f) TNF- α e (g) IL-6 nos sobrenadantes foram determinados usando um ensaio de ELISA. Os dados são apresentados como média \pm DP. $n = 6$. $\alpha p < 0,05$, comparado com o controle. $\beta p < 0,05$, comparado com o grupo a-BV-2. $\gamma p < 0,05$, comparado com PTE 2,5 μ M. $\delta p < 0,05$, comparado com PTE 5,0 μ M. LPS: lipopolissacarídeo; a-BV-2: grupo de cocultura de BV-2 ativado por LPS; ROS: espécies reativas de oxigênio; MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; GSH: glutatona. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

No ensaio de densidade por pixel, utilizando o marcador Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), a co-cultura com BV-2 ativada por LPS mostrou aumento significativo desse parâmetro em comparação ao grupo controle. Já os grupos tratados com pterostilbeno apresentaram menor densidade de fluorescência de forma dose dependente, indicando redução do estresse oxidativo. Concomitantemente, nos grupos tratados foi observado diminuição nos níveis de MDA e aumento na quantidade de GSH e na atividade de SOD em células SH-SY5Y, reforçando ainda mais o efeito antioxidante do PTE.

A presença das células BV-2 ativadas resultou em aumento de fatores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6, em comparação ao grupo sem a estimulação por LPS. No entanto, para os grupos tratados com PTE observou-se redução nos níveis desses fatores de forma dose dependente.

- Contribuições do pterostilbeno na expressão de SIRT-1 e p65 acetilado em microglia BV-2 ativada por LPS

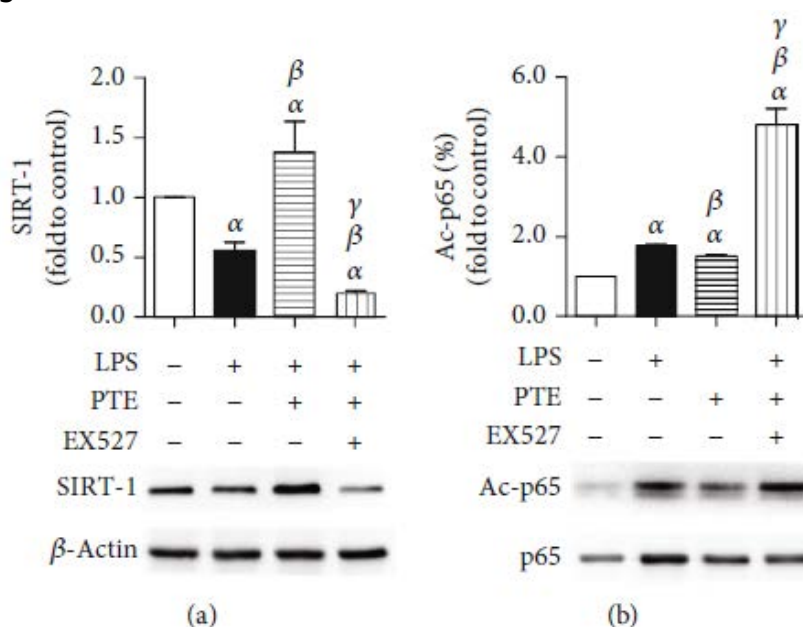


Figura 20. O PTE promove a expressão de SIRT-1, suprime a acetilação da unidade p65 do NF- κ B e reduz a liberação de fatores inflamatórios em células BV-2 ativadas por LPS, o que pode ser abolido por EX527. As células microgliciais BV-2 foram pré-tratadas com veículo ou EX527 (100 nM) por 24 horas e depois incubadas com veículo ou PTE (5,0 μ M) por 2 horas, seguidas pelo cocultivo com células SH-SY5Y com ou sem a presença de LPS (100 ng/mL) por 24 horas. (a) A

expressão de SIRT-1 nas células BV-2 foi medida usando análise de western blot e normalizada para a de β -actina. (b) A p65 acetilada (L310) nas células BV-2 foi medida usando análise de western blot e normalizada para a de p65 total. Os dados são apresentados como média \pm DP. $n = 6$. $\alpha p < 0,05$, comparado com o controle. $\beta p < 0,05$, comparado com o grupo a-BV-2. $\gamma p < 0,05$, comparado com PTE 2,5 μ M. LPS: lipopolissacarídeo; a-BV-2: grupo de cocultura de BV-2 ativado por LPS. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

A expressão de SIRT-1 foi inibida em células BV-2 ativada por LPS, enquanto a acetilação de p65 foi estimulada. O tratamento com PTE apresentou efeito reversor para a expressão de SIRT-1 ao mesmo tempo que diminuiu a acetilação de p65, em comparação ao grupo controle. Entretanto, a presença de EX527 reverteu os efeitos benéficos observado com o pterostilbeno, como já era esperado.

- Contribuições do pterostilbeno e na excreção de fatores inflamatórios

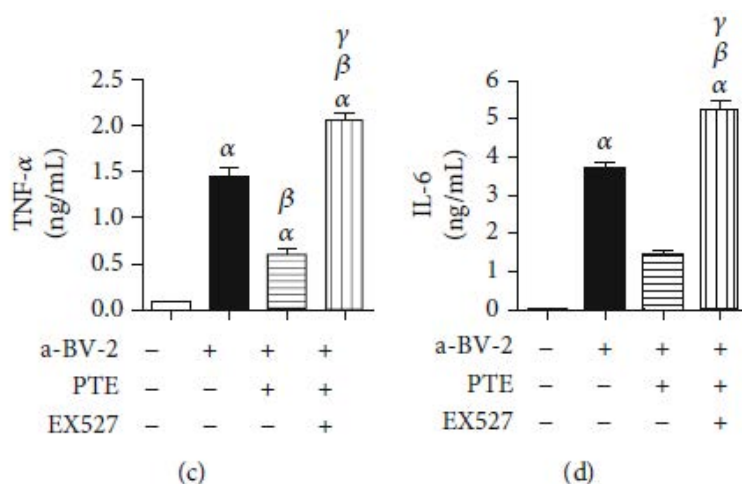


Figura 21. O PTE promove a expressão de SIRT-1, suprime a acetilação da unidade p65 do NF- κ B e reduz a liberação de fatores inflamatórios em células BV-2 ativadas por LPS, o que pode ser abolido por EX527. As células microglias BV-2 foram pré-tratadas com veículo ou EX527 (100 nM) por 24 horas e depois incubadas com veículo ou PTE (5,0 μ M) por 2 horas, seguidas pelo cocultivo com células SH-SY5Y com ou sem a presença de LPS (100 ng/mL) por 24 horas. (c) O TNF- α e (d) a IL-6 nos sobrenadantes foram determinados usando um ensaio de ELISA. Os dados são apresentados como média \pm DP. $n = 6$. $\alpha p < 0,05$, comparado com o controle. $\beta p < 0,05$, comparado com o grupo a-BV-2. $\gamma p < 0,05$, comparado com PTE 2,5 μ M. LPS: lipopolissacarídeo; a-BV-2: grupo de cocultura de BV-2 ativado por LPS. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

De acordo com os gráficos, os níveis dos fatores inflamatórios TNF- α e IL-6 aumentaram significativamente na presença de BV-2 ativadas. Tais parâmetros foram expressivamente diminuídos com o tratamento de PTE 5,0 μ M e revertidos para valores mais altos na presença de EX527.

Os achados indicam que o possível mecanismo benéfico do pterostilbeno está associado ao aumento da expressão de SIRT-1 e inibição da acetilação de p65 em células BV-2, a qual resulta na diminuição de fatores inflamatórios como TNF- α e IL-6.

- Contribuições do pterostilbene na apoptose e estresse oxidativo de SH-SY5Y em sistema de cocultura BV

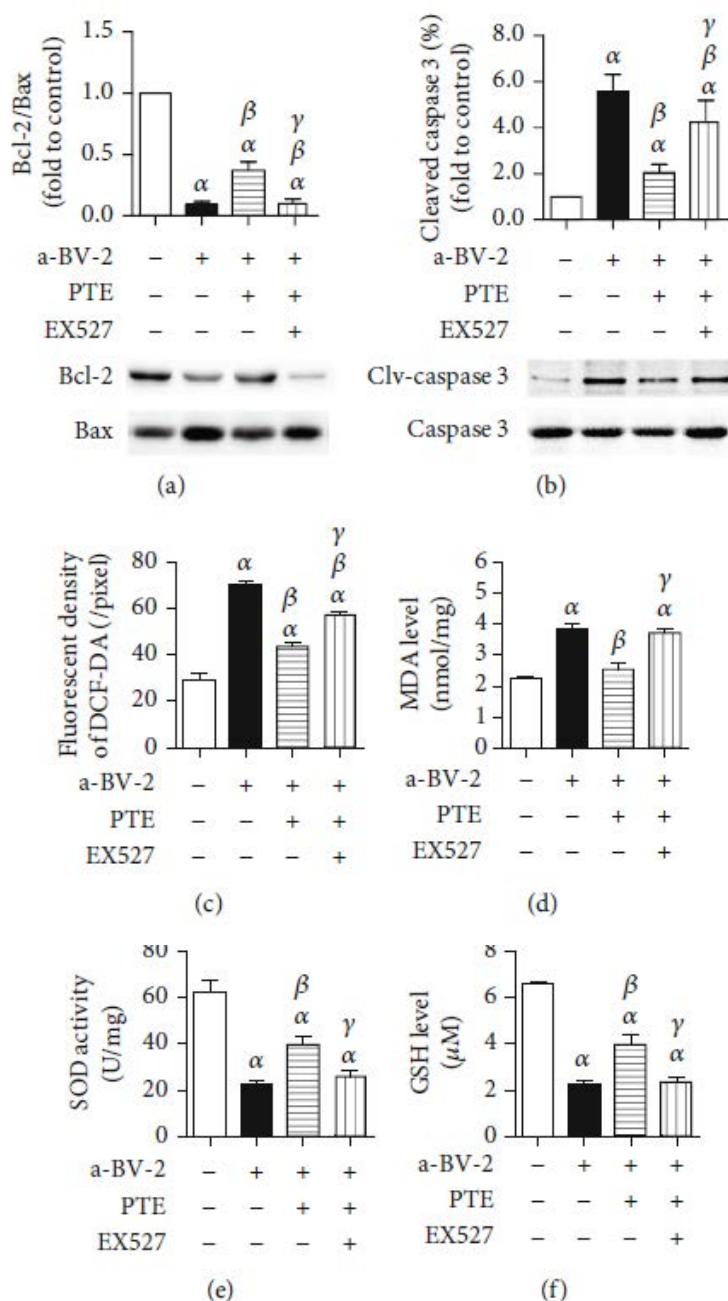


Figura 22. PTE (pterostilbene) atenua a apoptose e o estresse oxidativo das células SH-SY5Y no sistema de cocultura com células BV-2 ativadas por LPS (lipopolissacarídeo), um efeito que pode ser abolido por EX527. As células BV-2 foram pré-tratadas com veículo ou EX527 (100 nM) por 24 horas e, em seguida, incubadas com veículo ou PTE (5,0 μM) por 2 horas, seguidas pela cocultura com células SH-SY5Y na presença ou ausência de LPS (100 ng/mL) por 24 horas. (a) A expressão de Bcl-2 e Bax nas células SH-SY5Y foi medida utilizando análise de western blot e apresentada como a razão entre Bcl-2 e Bax. (b) A caspase 3 clivada nas células SH-SY5Y foi medida utilizando análise de western blot e normalizada em relação

à caspase 3 total. (c) O nível de ROS foi medido utilizando coloração DCFH-DA e expresso como densidade fluorescente intracelular média. (d) O nível de MDA, a atividade de SOD e o nível de GSH nas células SH-SY5Y foram medidos utilizando kits comerciais padronizados. Os dados são apresentados como média \pm DP, n = 6. $\alpha p < 0:05$, comparado com o controle.

$\beta p < 0:05$, comparado com o grupo a-BV-2. $\gamma p < 0:05$, comparado com o PTE 2,5 μ M. LPS: lipopolissacarídeo; a-BV-2: grupo de cocultura de BV-2 ativadas por LPS; ROS: espécies reativas de oxigênio; MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; GSH: glutationa. **Fonte:** ZHU, Qiang et al. 2020.

O tratamento com pterostilbeno (PTE) 5.0 μ M reverteu a diminuição da proporção entre Bcl-2 e Bax (*Bcl-2 assoated protein*) e o aumento da porcentagem de caspase 3 clivada, induzida por BV-2 ativada por LPS. A diminuição da relação dentre Bcl-2/Bax e aumento dos níveis de caspase 3 clivada (enzima relacionada a apoptose) nas células SH-SY5Y em cocultura, indicam a indução da apoptose provocada pelas células BV-2 ativadas, ao mesmo tempo que evidenciam a capacidade do pterostibeno de restaurar as proporções desses indicadores.

De modo semelhante, o tratamento com o estilbeno (PTE) também melhorou a atividade de SOD e os níveis de GSH e diminuiu a densidade de fluorescência para DCFH-DA e malondialdeído (MDA), em comparação aos efeitos provocados pelas BV-2 ativadas por LPS. Tais resultados apontam, portanto, redução do estresse e dano oxidativo, e melhora da viabilidade celular.

Para todos os fatores anteriormente mencionados, a presença do EX527 na cocultura celular aboliu os efeitos benéficos alcançados com o PTE.

Conclusão: As evidencias obtidas nesse estudo reforçam as propriedades neuro-protetoras e neuro-regulatórias do pterostilbeno, por atenuar a apoptose neuronal e o dano oxidativo através do estímulo de fatores chave e inibição da ativação microglial induzida por LPS. Sendo assim, o pterostilbeno apresenta-se como uma alternativa adjuvante promissora para acometimentos relacionadas à inflamação e oxidação no sistema nervoso central.

Defesas antioxidantes inatas fortalecidas e desempenho aprimorado das Enzimas da Longevidade [12,13]

Resultados:

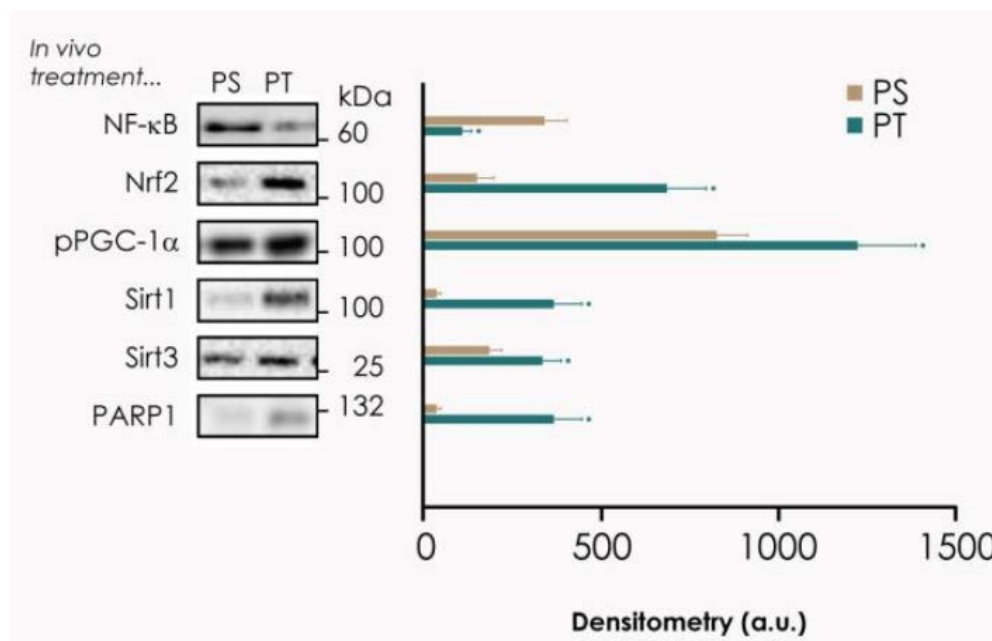


Figura 8. Resultados da ação do pterostilbeno no nível de proteínas celulares em ratos após injeção de 100mg/kgas. PS: Injeção de solução salina fisiológica. PT: Injeção pterostilbeno. **Fonte:** Material do fabricante. Retirado e adaptado de: OBRADOR et al., 2023.

Os testes *in vivo* mostram que a administração intravenosa de pterostilbeno em ratos aumentou significativamente a expressão de Nrf2, PARP1, SIRT1 e SIRT3, pPGC-1alfa e reduziu a expressão de NF-κB.

O gene Nrf2 (nuclear factor erythroid 2–related factor 2) é um fator de transcrição que desempenha um papel fundamental na regulação da resposta celular frente ao estresse oxidativo. Ele atua na manutenção da homeostase redox por controlar a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e proteínas de defesa celular, como a heme oxigenase-1 (HO-1), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST) e, devido sua função na regulação de genes antioxidantes e de detoxificação, o Nrf2 é considerado um fator de proteção contra o câncer, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), doenças cardiovasculares e inflamações crônicas.

Já o pPGC-1alfa é uma proteína que possui função crucial na regulação do metabolismo energético e na biogênese mitocondrial em células. Essa proteína coordena respostas metabólicas adaptativas a diversos estímulos, como exercício físico, jejum e alterações ambientais, contribuindo no

aumento da capacidade oxidativa das células e na promoção da adaptação a diferentes condições metabólicas.

Conclusão: A partir dos resultados deste estudo podemos observar a contribuição do pterostilbeno para o aumento do sistema de defesa antioxidante celular; aumento da vida útil celular; efeitos benéficos no reparo do DNA; melhora do metabolismo energético, da pressão sanguínea e controle do peso; efeitos anti-inflamatórios e de retardo da senescência celular.

Escaneie para ter acesso
a todas as nossas

SUGESTÕES DE FÓRMULAS



Ficha técnica

Principais benefícios

- Aumento do número e melhora da função mitocondrial
- Aumento da concentração de Glutathiona, SOD e CAT – excelente antioxidante
- Ótimo funcionamento das “vias da longevidade” mediadas por AMPK, SIRT1 e SIRT3
- Aumento da vida útil celular e retardo da senescência celular
- Melhora da função cognitiva, da saúde cerebral e no retardo da progressão do Alzheimer
- Neuroproteção frente a fatores estressores, como acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas
- Redução do risco de doenças cardíacas
- Aumento dos níveis das enzimas da longevidade: SIRT1 e SIRT3
- Aumento da expressão de Nrf2, regulando os genes de desintoxicação
- Aumento da atividade de PARP1, promovendo benefícios de reparação do DNA
- Aumento da atividade de pPGC-1 alfa, promovendo benefícios no metabolismo energético, pressão arterial e controle de peso
- Redução da atividade de NF-KB, promovendo benefícios anti-inflamatórios e prevenindo a senescência celular
- Fortalecimento das defesas antioxidantes inatas, apoiando a resposta imune a determinadas infecções (ácido picolínico)
- Excelente antioxidante, comprovadamente superior ao resveratrol e ao pterostilbeno
- Wellness e longevidade
- Melhora da mobilidade e da performance esportiva
- Auxílio no gerenciamento da inflamação e redução de moléculas de sinalização pró-inflamatórias

- Prevenção da osteoporose, otimiza a absorção e a utilização do cálcio (ácido picolínico)
- Melhora da saúde circulatória e metabólica
- Controle dos níveis da glicemia, por contribuir na sensibilização da insulina
- Otimização das funções do organismo
- Combate aos radicais livres provocados pelo estresse oxidativo
- Combate aos danos associados à radiação
- Aumento da produção de colágeno pelos fibroblastos, retardando o processo de envelhecimento

Uso recomendado

INTERNO / 12,5 a 22,5mg, de uma a duas vezes ao dia.

Obs.: em alimentos fortificados/enriquecidos, a dose recomendada é de 5mg por porção.

Aplicações

- Suplementos alimentares
- Alimentos fortificados/enriquecidos
- Cápsulas, sachês, mistura, goma

Características do ativo

Aspecto: Pó ligeiramente amarelo

pH de estabilidade: 5 a 8

Solubilidade: Muito pouco solúvel

CAS: Pterostilbene: 537-42-8 / Picolinic acid: 98-98-6

INCI: Resveratrol Dimethyl Ether, Picolinic Acid

Fator de correção: Não se aplica (o PteroVita® não requer de aplicação de fator de correção, devido sua dose já ser ajustada conforme sua biodisponibilidade e padronização).

Recomendações farmacotécnicas

Recomendações de armazenamento e transporte:

Mantenha o recipiente devidamente fechado em ambiente seco e bem ventilado, a temperatura ambiente.

Lote e validade

Vide a embalagem.

Referências bibliográficas

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ageing and health. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>. Acesso em: 07 jun. 2024.
- [2] RUSSO, GL *et al.* Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. **Biochemical pharmacology**, v. 173, p. 113719, 2020.
- [3] BJØRKLUND, G *et al.* Natural compounds and products from an anti-aging perspective. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7084, 2022.
- [4] CHAN, EWC *et al.* Resveratrol and pterostilbene: A comparative overview of their chemistry, biosynthesis, plant sources and pharmacological properties. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 07, p. 124-129, July 2019.
- [5] EL KHAWAND, T *et al.* A review of dietary stilbenes: Sources and bioavailability. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 5, p. 1007-1029, 2018.
- [6] FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.
- [7] KING, RE; BOMSER, JA; MIN, DB. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5, n. 3, p. 65-70, 2006.
- [8] LIN, W *et al.* Occurrence, bioavailability, anti-inflammatory, and anticancer effects of pterostilbene. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12788-12799, 2020.
- [9] Material do fabricante
- [10] RICHE, DM *et al.* Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. **Journal of toxicology**, v. 2013, 2013.
- [11] GÓMEZ-ZORITA, S. *et al.* Comparative Effects of Pterostilbene and Its Parent Compound Resveratrol on Oxidative Stress and Inflammation in Steatohepatitis Induced by High-Fat High-Fructose Feeding. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 11, p. 1042, nov. 2020.
- [12] OBRADOR, E *et al.* Combination of natural polyphenols with a precursor of NAD⁺ and a TLR2/6 ligand lipopeptide protects mice against lethal γ radiation. **Journal of Advanced Research**, v. 45, p. 73-86, 2023.
- [13] CHENG, Y *et al.* SIRT1 activation by pterostilbene attenuates the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury. **Apoptosis**, v. 21, p. 905-916, 2016.
- [14] STEINBERG, Gregory R.; CARLING, David. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 7, p. 527-551, 2019.
- [15] REN, G; RIMANDO, AM; MATHEWS, ST. AMPK activation by pterostilbene contributes to suppression of hepatic gluconeogenic gene expression and glucose production in H4IIE cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 498, n. 3, p. 640-645, 2018.
- [16] MEI, H *et al.* Pterostilbene inhibits nutrient metabolism and induces apoptosis through AMPK activation in

- multiple myeloma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 5, p. 2676-2688, 2018.
- [17] STANCU, AL. AMPK activation can delay aging. **Discoveries**, v. 3, n. 4, 2015.
 - [18] XU, C *et al.* Pterostilbene suppresses oxidative stress and allergic airway inflammation through AMPK/SIRT1 and Nrf2/HO-1 pathways. **Immunity, inflammation and disease**, v. 9, n. 4, p. 1406-1417, 2021.
 - [19] KOH, YC *et al.* Pterostilbene Enhances Thermogenesis and Mitochondrial Biogenesis by Activating the SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 Pathway to Prevent Western Diet-Induced Obesity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 67, n. 18, p. 2300370, 2023.
 - [20] KOSURU, R; VIJAYAKUMAR, MR; SINGH, S. Preclinical evidence of the therapeutic role of pterostilbene: Focus on the mitochondria. In: **Mitochondrial Physiology and Vegetal Molecules**. Academic Press, 2021. p. 301-315.
 - [21] LIU, H *et al.* Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- κ B phosphorylation. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2408, 2019.
 - [22] ZHU, Q *et al.* Pterostilbene attenuates cocultured BV-2 microglial inflammation-mediated SH-SY5Y neuronal oxidative injury via SIRT-1 signalling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, n. 1, p. 3986348, 2020.
 - [23] FRANKLIN, KBJ; PAXINOS, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2. ed. San Diego: **Academic Press**, 2001.
 - [24] GRANT, R. S.; COGGAN, S. E.; SMYTHE, G. A. The physiological action of picolinic Acid in the human brain. **Int J Tryptophan Res**, 2009, 2, 71-9.
 - [25] BOFILL, L *et al.* A Novel, Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene. **Crystal Growth & Design**, v. 21, n. 4, p. 2315-2323, 2021.
 - [26] CHANG, J *et al.* Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuro-modulator in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 2062-2071, 2012.
 - [27] RIMANDO, AM *et al.* Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3403-3407, 2005.
 - [28] CHOO, QY *et al.* Pterostilbene surpassed resveratrol for anti-inflammatory application: potency consideration and pharmacokinetics perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 352-362, 2014.
 - [29] KAPETANOVIC, IM *et al.* Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, p. 593-601, 2011.
 - [30] REMSBERG, CM *et al.* Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant and analgesic activity. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 169-179, 2008.
 - [31] RAFACHO, BPM. Pterostilbeno Pós Infarto Agudo do Miocárdio: Efeito no Coração e Pulmão. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 118, n. 2, p. 446-447, fev. 2022.

