

## ANTOCIANINAS SUPRIMEM A SECREÇÃO DE MEDIADORES PRÓ- INFLAMATÓRIOS EM DESMIELINIZAÇÃO INDUZIDA POR BROMETO DE ETÍDIO

ANA CAROLINA PEITER<sup>1</sup>; FABIANO CARVALHO<sup>2</sup>; JESSIÉ MARTINS  
GUTIERRES<sup>2</sup>; CINTHIA MELAZZO DE ANDRADE MASSANTI<sup>2</sup>; CAROLINE  
RIZZI<sup>3</sup>; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – [acpeiter@gmail.com](mailto:acpeiter@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria

<sup>3</sup>UFPel – [ccrizzi@yahoo.com.br](mailto:ccrizzi@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>UFPel – [odir@ufpel.edu.br](mailto:odir@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso que afeta predominantemente adultos jovens. O declínio neurológico irreversível na EM é causado principalmente pela degeneração de axônios desmielinizados (Kipp et al, 2012).

As terapias tradicionais não podem efetivamente evitar a progressão crônica e irreversível da doença, e a descoberta de agentes terapêuticos que previnam a destruição das bainhas de mielina ou aceleram o processo de remielinização e reparo de tecidos tornou-se indispensável. Fitonutrientes possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e têm grande potencial no terapêutico pois estes fatores possuem um papel importante no desenvolvimento de um número de doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e a própria EM (Acar et al, 2012; Tasset et al, 2012). As antocianinas (ANT) são fitonutrientes que possuem grupos fenólicos em sua estrutura e têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (Williams e Grayer, 2004; Williamson e Clifford, 2010).

Considerando-se que a EM é uma doença desmielinizante inflamatória acompanhada por fenômenos excitotóxicos que levam a uma perda na neurotransmissão e à produção de mediadores pró-inflamatórios, foi investigado se as ANT são capazes de suprimir a secreção de efeitos pró-inflamatórios induzidos pela desmielinização na ponte em ratos.

### 2. METODOLOGIA

Ratos Wistar machos (3 meses de idade) pesando 300-350g foram utilizados no estudo. A desmielinização causada por brometo de etídio (BE) foi realizada da

seguinte maneira: injeções de BE (0,1% de solução salina, 10mL) na ponte cisterna (basal) foram feitas a fim de induzir lesões desmielinizantes que comprometessem de 1/3 a 1/2 da ponte, conforme Graca 2001. Os ratos foram tratados por sonda gástrica com ANT (30 e 100mg/kg de peso corporal), durante este período (cerca de 10:00 h). Os ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de 10 animais: 1: controle, 2: ANT 30mg/kg, 3: ANT 100mg/kg, 4: BE, 5: BE mais ANT 30mg/kg e 6: BE mais ANT 100mg/kg. As antocianinas e o brometo de etídio foram dissolvidos em solução salina.

Os animais foram anestesiados e depois sacrificados; o cérebro foi removido, e a ponte foi separada. Em seguida, a ponte foi colocada numa solução de 10mM Tris-HCl e 0,1mM EDTA, pH 7,4, em gelo. A estrutura do cérebro foi homogeneizada em um frasco de vidro na solução de Tris-HCl. Após a centrifugação de 1.500g a 4°C durante 15 minutos, alíquotas de sobrenadante foram armazenadas a -80 °C para análises posteriores.

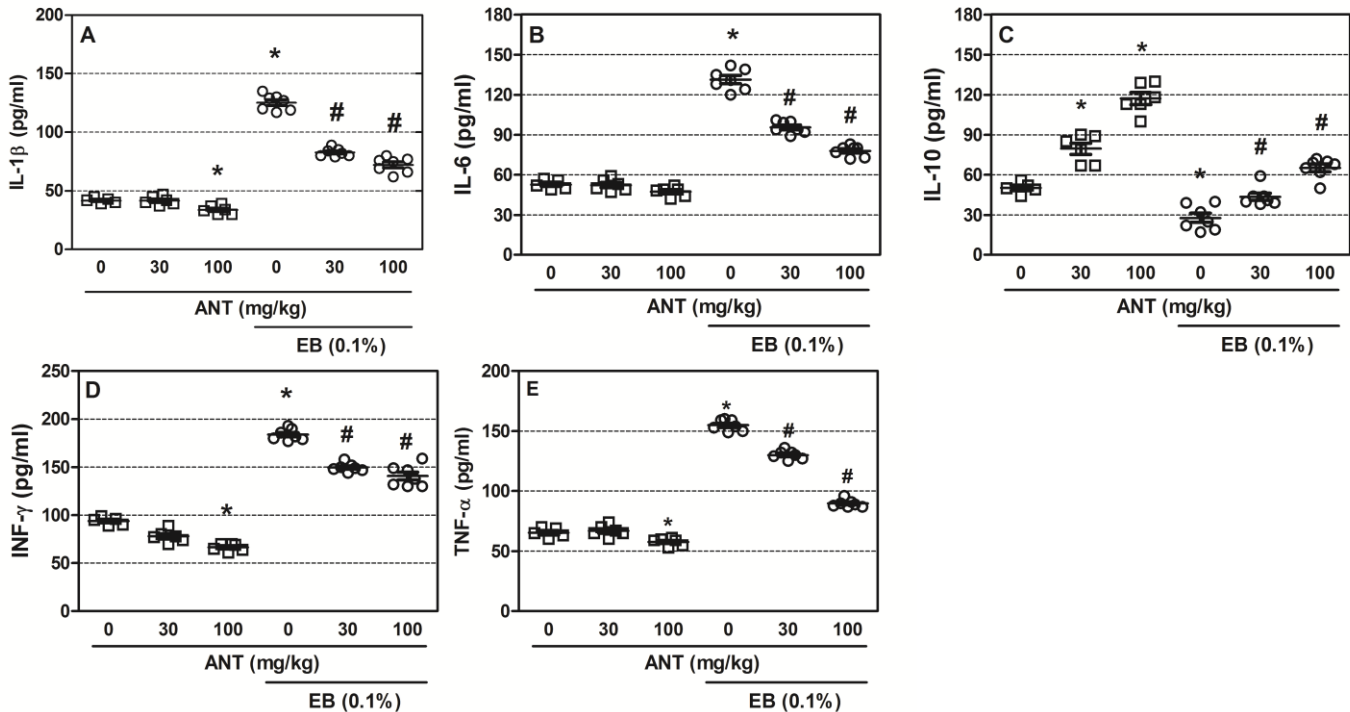
A quantificação de citocinas na ponte foi avaliada por ELISA utilizando kits comerciais para IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (eBioscience, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo primário, à temperatura ambiente durante 30 minutos, e, em seguida, a amostra foi adicionada e incubou-se a 37°C durante 30 min. Após a lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase e incubou-se. A presença e concentração de citocinas foram determinadas pela intensidade da cor medida por espectrometria de um leitor de ELISA.

A análise estatística dos testes foi realizada por ANOVA de um ou dois fatores.  $P < 0,05$  foi considerado para representar uma diferença significativa em todos os experimentos. Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desmielinização experimental aumentou os índices de IL-1 $\beta$ , e os tratamentos de 30 e 100 mg/kg foram capazes de frear o aumento de IL-1 $\beta$  [F2, 32 = 80,95;  $p < 0,001$ , gráfico A], como mostra a Figura 1. O mesmo efeito foi observado para níveis de IL-6 [F2, 32 = 70,84;  $p < 0,001$ , gráfico B]. O gráfico C mostra que a desmielinização experimental reduziu o teor de IL-10, uma importante molécula anti-inflamatória. O tratamento com ANT em ambas as doses impediu a redução do nível de IL-10 no grupo EB [F2, 32 = 8,88;  $p < 0,001$ , gráfico C]. Além disso, a ANT 100mg/kg reduziu a IL-1 $\beta$ , e 30 e 100mg/kg proporcionou um aumento na produção de IL-10. Pode ser visto que a desmielinização experimental promoveu um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . As doses de 30 e 100mg/kg de ANT foram capazes de impedir o aumento de INF- $\gamma$  [F2, 32 = 4,92;  $p < 0,05$ , gráfico D] e TNF- $\alpha$  [F2, 32 = 165,70,  $p < 0,05$ , gráfico E] na ponte de ratos

experimentalmente desmielinizados. Além disso, a ANT 100mg/kg reduziu os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .



**Figura 1:** níveis de marcadores inflamatórios nos animais experimentalmente desmielinizados com EB e tratados com ANT.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, verificou-se que o tratamento com antocianinas inibiu parcialmente a exacerbação da inflamação induzida pelas interleucinas na ponte dos animais. Finalmente, podemos sugerir que as ANT poderiam ser candidatas promissoras para as novas engenharias de fármacos adjuvantes ao tratamento convencional para a esclerose múltipla, bem como um possível alvo para ensaios clínicos de flavonoides.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KIPP, M.; VAN DER VALK, P.; AMOR, S. Pathology of multiple sclerosis. **CNS CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, v.11, n.5, p.506-17, 2012.
- ACAR, A. et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Belgica**, v.112, n.3, p.275-80, 2012.

TASSET, I. et al. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v.45, n.6, p.440-444, 2012.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **British Journal of Nutrition**, v.104, n.3, p.S48-66, 2010.

WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v.21, n 4, p 539-573, 2004.

GRACA, D. L. et al. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.59, n.2-B, p.358-361, 2001.