

Extrato de mirtilo previne lipoperoxidação em modelo experimental de síndrome metabólica

PATHISE SOUTO OLIVEIRA¹; NATÁLIA PORTO FLORES²; PÂMELA GONÇALVES DA SILVA³; LAIZ XAVIER RODRIGUES⁴; CLAITON LEONETTI LENCINA⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – pathisesouto@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nataliahporto@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – pamela.gsilva@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – laizinha152009@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – claiton.ufpel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos Brasil tem sido observado um aumento progressivo da prevalência da síndrome metabólica (SM) devido às alterações demográfico-populacionais, tais como envelhecimento da população, aumento da expectativa de vida e principalmente ao aumento da obesidade, relacionado às mudanças comportamentais e culturais, como o aumento do sedentarismo e a alimentação inadequada (XAVIER; MONTE, 2005).

A SM é caracterizada por uma combinação de fatores de risco cardiovascular que incluem hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão (MAYUKO et al. 2013). Outros fatores que também estão relacionados à SM desempenham um papel de agressão ao miocárdio por meio de produção de substâncias com ações cardiovasculares e sistêmicas, como a leptina, fator de necrose tumoral, interleucina-1 β , interleucina-6, proteína C reativa, hiposecreção de adiponectina (RUDOLF et al. 2014). Além disso, na SM ocorre um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios, o qual leva ao aumento na produção de espécies reativas e diminuição das defesas antioxidantes o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas (FRANÇA et al. 2013).

Estudos apontam que o aumento da ingestão energética pode induzir o estresse oxidativo e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos adipócitos (WELLEN; THOMPSON, 2010). Ainda, a hiperglicemia leva ao aumento na produção de ERO na mitocôndria, por aumentar o gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna (CHOI et al. 2008). Além disso, o aumento nos níveis de ácidos graxos livres nos tecidos e na circulação também leva a um aumento na produção de ERO causando um desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies pelos sistemas de defesa celular (AVIGNON et al. 2012).

Estudos epidemiológicos revelam que compostos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário de alimentos de origem vegetal como as antocianinas, flavonóides e outros compostos fenólicos mostraram várias funções biológicas presentes na SM, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva, anti-hipertensiva, anti-hiperlipidêmica e hipoglicemiante (OSAMA et al. 2011; KUMAR et al. 2012).

O mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) é conhecido por conter altos níveis de compostos fenólicos, especialmente antocianinas, flavonóides e ácidos fenólicos (GIOVANELLI; BURATTI, 2009; YOU et al. 2011). Extratos de raízes, caules, folhas e frutos de mirtilo contêm várias substâncias ativas que podem reduzir as complicações da SM

(SASAKI et al. 2007). Ainda, esses extratos demonstraram proteção contra os danos do estresse oxidativo em diferentes condições patológicas (MOSKAUG et al. 2005). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de extratos de frutos de mirtilo sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de camundongos alimentados com dieta hiperpalatável.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação das soluções extrativas: Os extratos foram preparados de acordo com BORDIGNON et al. (2009), com modificações. Os frutos de mirtilo foram sonicados com 90 mL de etanol 70° GL acidificado (pH 1,0) por 30 min. Os extratos foram filtrados, neutralizados, evaporados e liofilizados até a secura.

2.2. Animais: Foram utilizados 40 camundongos machos C57/BL6 de 21 dias de vida, obtidos e mantidos no Biotério da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas e ciclos claro-escuro de 12 horas.

2.3. Delineamento experimental: Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Grupo controle dieta normal (DN): recebeu ração padrão e solução salina por gavagem durante 120 dias; (2) Grupo tratado com extratos de mirtilo e dieta normal (DN+Mir): recebeu ração padrão e solução do extrato de mirtilo por gavagem durante 120 dias, na dose de 200 mg/Kg; (3) Grupo controle dieta hiperpalatável (DHP): recebeu ração hiperpalatável enriquecida com sacarose e solução salina por gavagem durante 120 dias; (4) Grupo tratado com extrato de mirtilo e dieta hiperpalatável (DHP+Mir): recebeu ração hiperpalatável enriquecida com sacarose e solução do extrato de mirtilo por gavagem durante 120 dias, na dose de 200 mg/Kg. Todos os animais tiveram livre acesso a água e comida. A dieta hiperpalatável seguiu o modelo descrito por SOUZA et al. (2007). Após 120 dias de tratamento, os animais foram decapitados e o córtex cerebral dissecado.

2.4. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): O efeito antioxidante do extrato do mirtilo sobre a lipoperoxidação foi avaliado utilizando a medida do TBARS em córtex cerebral segundo o método de OHKAWA et al. (1979). Os resultados foram calculados em nmol de TBARS/mg proteína.

2.5. Determinação do conteúdo tiólico total: A medida foi realizada segundo o método de AKSENOV; MARKESBERY (2001), o qual determina o conteúdo total de tióis na amostra, sendo um parâmetro de avaliação de dano oxidativo a proteínas presentes na amostra. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

2.6. Determinação da atividade da catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada em córtex cerebral conforme o método descrito por AEBI (1984), baseado na decomposição de H₂O₂, acompanhada a 240 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de CAT. Sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H₂O₂/min/mg de proteína.

2.7. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por MISRA; FRIDOVICH (1972). Este método baseia-se na inibição de superóxido dependente da auto-

oxidação de adrenalina realizada em espectrofotômetro ajustado a 480 nm. A atividade específica da enzima SOD foi avaliada como unidades por mg de proteína.

2.8. Dosagem de proteínas: As proteínas foram determinadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

2.9. Análise estatística: Os resultados foram expressos como média \pm erro médio padrão. A comparação de dados entre os grupos foi efetuada utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni, quando apropriado. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM® 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi possível observar que a administração de extrato de mirtilo foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de TBARS induzido pela DHP em córtex cerebral, sugerindo que o aumento da ingestão energética pode estar envolvido com o aumento das ERO (tratamento com mirtilo: [F (1,35) = 19,63; $P < 0,001$], DHP: [F (1,35) = 1,39; $P = 0,24$], a interação: [F (1,35) = 12,15; $P < 0,01$]). Por outro lado, nem administração de extrato de mirtilo nem o consumo da DHP alteraram os níveis tiólicos totais no córtex cerebral dos animais testados (tratamento com mirtilo: [F (1,31) = 0,73; $P = 0,39$], DHP: [F (1,31) = 0,03; $P = 0,86$], interação: [F (1,31) = 0,99; $P = 0,32$]).

Também avaliamos a atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral de animais submetidos à DHP e tratados com extrato de mirtilo. No entanto, não observamos diferenças significativas na atividade da CAT em nenhum dos grupos testados (tratamento com mirtilo: [F (1,30) = 6,02; $P < 0,05$], HPD: [F (1,30) = 4,73; $P < 0,05$], interação: [F (1,30) = 0,01; $P = 0,92$]). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas na atividade da SOD após o consumo de DHP ou administração de mirtilo (tratamento com mirtilo: [F (1,30) = 0,79; $P = 0,38$], DHP: [F (1,30) = 3,52; $P = 0,07$], interação: [F (1,30) = 0,32; $P = 0,57$]). Em contrapartida, um estudo realizado por SINHA et al. (2014) com uma linhagem de ratos obesos (WNIN/Ob) demonstrou uma diminuição significativa das enzimas antioxidantes SOD e CAT no cérebro, sugerindo que os componentes presentes na SM possam estar envolvidos na diminuição das defesas antioxidantes.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que a DHP aumentou significativamente os níveis de TBARS em córtex cerebral de camundongos. O extrato de mirtilo foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica. Com esses achados podemos sugerir que o consumo crônico de mirtilo pode atenuar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo na SM. Dentro desse contexto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos benéficos de extratos de mirtilo nessa desordem metabólica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y., MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.
- AVIGNON, A.; HOKAYEM, M.; BISBAL, C.; LAMBERT, K. Dietary antioxidants: do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? **Nutrition**, v. 28, p. 715-721, 2012.
- BORDIGNON Jr., C.L.; FRANCESCOTTO, V.; NIENOW, A.A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 183-188, 2009.
- CHOI, S.; BENZIE, I.F.F.; MA, S.; STRAIN, J.J.; HANNIGAN, B.M. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1217- 1231, 2008.
- FRANCA, B.K.; ALVES, M.R.M.; SOUTO, F.M.S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R.F.; GUIMARÃES, A.; JR, A.A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, p. 109-206, 2013.
- GIOVANELLI, G; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2009.
- KUMAR, B; ARORA, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Vaccinium myrtillus Ameliorates Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression: Possible Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 488-497, 2012.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAYUKO, I.; SHIGEKO, K.; KOICHI, T.; SACHIKO, M.; MAI, K.; ERI, H.; et. al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, p. 397-405, 2013.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.
- MOSKAUG, J. O.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M. C.; LOMHOFF, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 277S-283S, 2005.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annual Review Medicine**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OSAMA, M. A.; AHMED A. E.; ABDULRAHMAN, M. A.; AMEEN, M. A. M.; AYMAN, A. N.; ASHRAF, B., et.al. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. **Medical Science Monitor**, v. 17, p.110-115, 2011.
- RUDOLF, S.; GREGGERSEN, W.; KAHL, K.G.; HUPPE, U.S. Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression. **Psychiatry Research**, 2014, *in press*.
- SASAKI, R.; NISHIMURA, N.; HOSHINO, H.; ISA, Y.; KADOWAKI, M.; ICHI, T., TANAKA, A.; NISHIUMI, S.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; HORIO, F.; TSUDA, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to down regulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 1619-1627, 2007.
- SINHA, J. K., GHOSH, S., SWAIN, U., GIRDHARAN, N.V., RAGHUNATH, M. Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/OB, a novel rat model of premature aging. **Neuroscience**, v. 269, p. 256-264, 2014.
- SOUZA, C.G.; MOREIRA, J.D.; SIQUEIRA, I.R.; PEREIRA, A.G.; RIEGER, D.K.; SOUZA, D.O.; SOUZA, T.M.; PORTELA, L.V.; PERRY, M.L.S. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sciences**, v. 81, p. 198-203, 2007.
- XAVIER, H. T.; MONTE, O. Prevenção das complicações da aterosclerose na síndrome metabólica: da fisiopatologia à farmacoeconomia da terapia hipolipemiante com estatinas. **RBM – Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, n.5, p. 197-204, 2005.
- YOU, Q.; WANG, B.W.; CHEN, F.; HUANG, Z.L.; WANG, X.; LUO, P.G. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v.125, p. 201-208, 2011.
- WELLEN, K.E.; THOMPSON, C.B. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. **Molecular Cell**, v.40, p. 323-332, 2010.