

Efeito de duas doses de trans-resveratrol em biomarcadores de estresse oxidativo hepático usando um modelo de camundongos no caute para LDLr

Tamires Miranda Santana ,Sarah Jorge Caria

Inar Alves Castro

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF USP

Sarahcaria@usp.br

Objetivos

O trans-resveratrol é um estilbeno amplamente utilizado como suplemento para humanos com o objetivo de melhorar a defesa antioxidante. No entanto, sua potencial atividade antioxidante depende da dose e pode ocorrer por diferentes vias metabólicas, incluindo a ativação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de duas doses de trans-resveratrol em biomarcadores de estresse oxidativo hepático mediados por Nrf2 usando um modelo de camundongos LDLr(-/-).

Métodos e Procedimentos

Camundongos homozigotos LDLr(-/-) machos de três meses de idade no background C57BL/6 foram adquiridos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O protocolo experimental animal foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF 595). Camundongos LDLr(-/-) têm sido aplicados como modelo para avaliar estresse oxidativo e inflamação, pois essas duas condições estão presentes na progressão da aterosclerose (1,2). Os camundongos foram alojados em gaiolas plásticas (4 - 5 animais por gaiola) em temperatura ambiente constante ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$), sob um ciclo de 12 h claro-12 h escuro. Camundongos

com peso corporal inicial de $25,49 \pm 1,73$ g foram alocados aleatoriamente em três grupos ($n = 13/\text{grupo}$) e alimentados com uma dieta padrão AIN-93M por 8 semanas sem suplementação (CONT), ou a mesma dieta mista com 250 mg de trans-resveratrol por kg de dieta/dia (LRD) ou 400 mg de trans-resveratrol por kg de dieta/dia (HRD). Após 8 semanas, a dieta padrão foi substituída por uma dieta ocidental (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) para promover o processo aterosclerótico por 24 semanas, seguindo a mesma suplementação. O trans-resveratrol adicionado às dietas apresentou alto grau de pureza em comparação com o padrão (Sigma - PHL89539) (Tabela Complementar 1). A dose de LRD foi baseada na concentração mais frequente nos ensaios clínicos (3) e também recomendada no rótulo comercial das cápsulas (500 mg/dia), enquanto a dose de HRD (800 mg/dia) foi baseada em um ensaio clínico relatado por Seyyedebrahimi et al. (4) que mostraram aumento da expressão de genes envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo (Nrf2 e SOD), bem como aumento da capacidade antioxidante total do plasma e do conteúdo total de tiol em pacientes com diabetes tipo 2. A formulação das dietas e a composição química são mostradas nas Tabelas Complementares 2 e 3. O peso corporal individual e a ingestão de alimentos por gaiola foram registrados duas vezes por semana. Após o período experimental, os camundongos foram privados de alimento por 8h, anestesiados com isoflurano 3% e eutanasiados. O sangue foi coletado para

análise do perfil lipídico plasmático. O fígado foi excisado e pesado e pequenos pedaços do lóbulo maior foram armazenados a -80°C.

Lipídios plasmáticos

A concentração de lipídios plasmáticos (colesterol total [CT]; triglicerídeos [TG]; lipoproteína de alta densidade [HDL]; lipoproteína de baixa densidade [LDL]) foi quantificada usando kits comerciais da Labtest Diagnóstica SA (Lagoa Santa, MG, Brasil) para colorimetria enzimática testes de acordo com as instruções do fabricante (n=11-12/grupo).

Atividade antioxidante e biomarcadores de estresse oxidativo

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Ewing e Janero (5) a atividade da catalase foi determinada de acordo com Bonaventura et al. (6) e atividade da glutationa peroxidase (GPx) de acordo com Flohé e Günzler (7). A razão GSH/GSSG foi quantificada usando um kit para glutationa oxidada e reduzida da Sigma-Aldrich (38185). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados no homogenato de fígado usando Synergy HTX Multi-Detection Microplate Reader (BioTekInstruments Inc., Winooski, VT, EUA) e integrados com o software Gen 5. A concentração hepática de malondialdeído (MDA) foi determinada por HPLC de fase reversa (Hong et al., 2000), com pequenas modificações. A concentração de proteína foi determinada pelo kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) e expressa em µg/mL. Os resultados foram expressos como µM de MDA/mg de proteína. A análise foi realizada em triplicado (n=10 - 13/grupo).

PCR em tempo real

O RNA total de amostras de homogenato de fígado foi extraído com TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de incubação em DNase I RNase-free (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e depois transcrição reversa usando 2 µg de RNA total, SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e iniciadores aleatórios p(dN)6 (Roche Applied Science). Real-time PCR foi realizado usando o

7500TM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK), Power SYBR Green Gene Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems) e primers específicos para genes alvo: Actb (forward: gctccggcatgtcaaag; reverse: catcacaccctgggccta), Gapdh (forward: cttggcggagggtcttagat; reverse: aggactcgtgcacccatcac), Nfe2l2 (forward: tgaccatgagtcgcgtgcc; reverse: cctgatgagggcagtgaag), NfkB1 (forward: agcaacaaaacagaggggat; reverse: cttgcaggccccacatagt), Ppia (forward: ccgtcagctctggatgac; reverse: gggcagcccagaacatcat), Sod1 (forward : ggaaccatccacttcgagca; reverso: cccatgctggccttcagta) e Sod2 (frente: gcctgcttaatcaggaccc; reverso: tagtaagcgtgctcccacac). A família superóxido dismutase (SOD) sequestra radicais superóxido (O₂^{•-}) por dismutação em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A isoforma SOD1 (Cu, ZnSOD) tem sido tipicamente considerada uma enzima citosólica, enquanto a SOD2 (MnSOD) está localizada dentro da matriz mitocondrial e é considerada a principal barreira protetora contra o superóxido produzido durante a respiração mitocondrial (8). Os dados foram normalizados para a média geométrica de Actb, Gapdh e Ppia. A quantificação relativa de mRNA foi calculada por 2-ΔΔC_t (n=8/grupo).

Análise estatística

Os dados foram avaliados por ANOVA one-way seguido de teste de Tukey ou testes equivalentes não paramétricos, dependendo de sua distribuição e homogeneidade das variâncias avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Hartley, respectivamente. As dietas foram comparadas pelo teste t para variáveis independentes. O mapa de calor foi baseado em Análise de Cluster, considerando o método de Wards e distância Euclidiana usando as colunas padronizadas e o software R Studio. Os valores foram expressos como média ± DP. Um valor de p de 0,05 foi adotado para rejeitar a hipótese nula. Os cálculos foram realizados com o software Statistica v.13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, EUA) e os gráficos com o GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, CA, EUA).

Resultados

Ingestão alimentar, peso corporal e biomarcadores de lipidemia

Conforme mostrado na Figura 1, a suplementação de trans-resveratrol não alterou a ingestão alimentar entre os grupos. Após as primeiras 8 semanas, a ingestão alimentar foi reduzida em 15,7% ($p < 0,001$) quando a dieta padrão foi substituída pela dieta ocidental (Figura 1A). Os grupos iniciaram ($25,49 \pm 1,73$ g; $p = 0,971$) e terminaram o tratamento com pesos corporais semelhantes ($47,07 \pm 5,26$ g; $p = 0,254$). Após a intervenção dietética com a dieta ocidental, a alimentação foi associada a um aumento mais pronunciado e mais rápido do peso corporal do que a alimentação padrão (Figura 1B). Durante o tratamento, o ganho de peso corporal ($21,57 \pm 5,46$ g; $p = 0,245$) não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Figura 1C). O peso do fígado ($2,05 \pm 0,46$ g; $p = 0,134$) e o peso relativo do fígado ($4,31 \pm 0,60\%$; $p = 0,121$) não se alteraram entre os grupos. Em relação ao perfil lipídico, a Figura 2 mostra que a suplementação com trans-resveratrol não alterou as concentrações plasmáticas de colesterol total ($p = 0,243$), triglicerídeos ($p = 0,298$), HDL ($p = 0,920$) e LDL ($p = 0,331$).

Efeito da suplementação de trans-resveratrol no estresse oxidativo e biomarcadores inflamatórios

As concentrações de glutatona total e GSH não foram diferentes em nenhum dos grupos (Figura 3A e 3B), mas houve diminuição da GSSG no grupo LRD ($p < 0,001$) quando comparado com CONT ($p < 0,001$) e HRD ($p = 0,037$) grupos. (Figura 3C). Como consequência, o grupo LRD apresentou maior relação GSH/GSSG em comparação aos grupos CONT ($p < 0,001$) e HRD ($p < 0,001$) (Figura 3D). Este resultado foi corroborado pela concentração de malondialdeído (MDA) avaliada no homogenato de fígado. Quando comparado com o grupo controle, a concentração de MDA foi 37% menor no grupo LRD ($p = 0,022$), mas não se alterou em comparação com o grupo HRD ($p = 0,758$) (Figura 3E). Nós hipotetizamos que o resveratrol medeia a proteção redox via regulação do gene antioxidante pelo Nrf2. A

expressão de mRNA de Nrf2 (Figura 4A) foi reduzida em ambos os grupos HRD e LRD. Assim, era esperado que SOD1 e SOD2 também diminuíssem. No entanto, não foi encontrada diferença na expressão de SOD1 entre os grupos (Figura 4B), enquanto a expressão do gene SOD2 (Figura 4C) foi reduzida apenas no grupo HRD, mas não no grupo LRD quando comparado ao grupo controle. No entanto, esses resultados devem ser discutidos com cautela devido à variação entre os grupos quando a expressão de albumina foi aplicada como controle (Figura 4D). O tratamento com trans-resveratrol não afeta as atividades enzimáticas de CAT (Figura 5A), SOD (Figura 5B) e GPx (Figura 5C) em comparação ao grupo controle. Em relação aos biomarcadores inflamatórios, houve redução da expressão gênica do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Figura 6A) apenas no grupo LRD em comparação ao grupo CONT. A citocina pró-inflamatória IL-6 (Figura 6B) foi aumentada pela suplementação em ambas as doses, enquanto nenhuma diferença foi encontrada para TNF- α (Figura 6C) e IL-10 (Figura 6D). Além disso, não foi observada diferença na relação TNF- α /IL-10 (Figura 6E). A Figura 7 resume a variação dos biomarcadores de acordo com os três grupos experimentais.

Conclusões

Levando em consideração todos os resultados (Figura 7), pode-se sugerir que o trans-resveratrol em dose baixa mostrou um efeito mais promissor do que uma dose alta na melhora do estado oxidativo no fígado, e que esse efeito benéfico não foi associado a um aumento na expressão Nrf2. A relevância desta informação deve ser considerada em ensaios clínicos posteriores, uma vez que o trans-resveratrol tem sido consumido como antioxidante sem qualquer controle de dose.

Referências Bibliográficas

1. Klafke JZ, Pereira RLD, Hirsch GE et al. (2016) Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of Campomanesia

xanthocarpa and acetylsalicylic acid. *Phytomedicine* **23**, 1227-1234.

2. Paim BA, Velho JA, Castilho RF *et al.* (2008) Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med* **44**, 444-451.
3. Santana TM, Ogawa LY, Rogero MM *et al.* (2022) Effect of resveratrol supplementation on biomarkers associated with atherosclerosis in humans. *Complement Ther Clin Pract* **46**, 101491.
4. Seyyedebrahimi S, Khodabandehloo H, Nasli Esfahani E *et al.* (2018) The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetol* **55**, 341-353.
5. Ewing JF, Janero DR (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem* **232**, 243-248.
6. Bonaventura J, Schroeder WA, Fang S (1972) Human erythrocyte catalase: an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties. *Arch Biochem Biophys* **150**, 606-617.
7. Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **105**, 114-120.
8. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* **15**, 1583-1606.

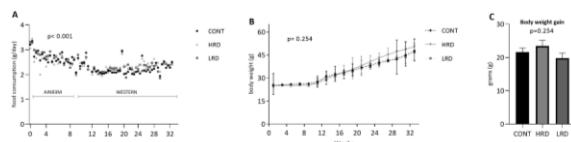


Figura 1: Efeitos do trans-resveratrol no consumo alimentar e no peso corporal durante o período experimental. (A) consumo alimentar, (B) peso corporal e (C) ganho de peso corporal. CONT: grupo controle; HRD: grupo de alta dose de resveratrol; LRD: grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média ± DP.

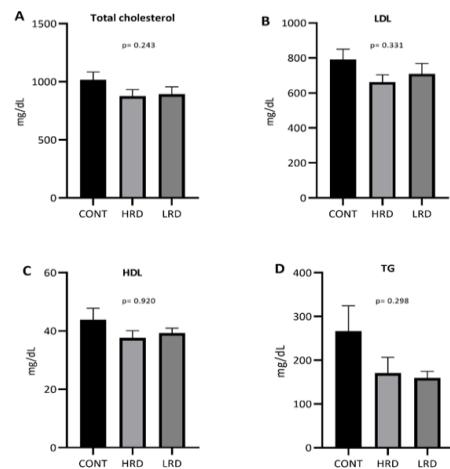


Figura 2: Efeitos do trans-resveratrol nos parâmetros lipídicos. (A) colesterol total, (B) lipoproteína de baixa densidade, (C) lipoproteína de alta densidade e (D) triglicerídeos. CONT, grupo controle; HRD, grupo de alta dose de resveratrol; LRD, grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média ± DP.

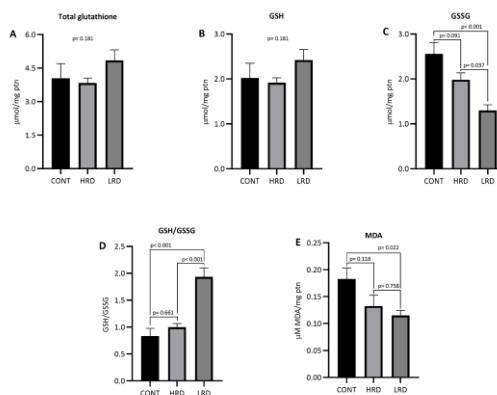


Figura 3: Efeitos do trans-resveratrol no estresse oxidativo no fígado. (A) Glutathiona total, (B) GSH, (C) GSSG, (D) GSH/GSSG e (E) MDA. CONT, grupo controle; HRD, grupo de alta dose de resveratrol; LRD, grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média ± DP.

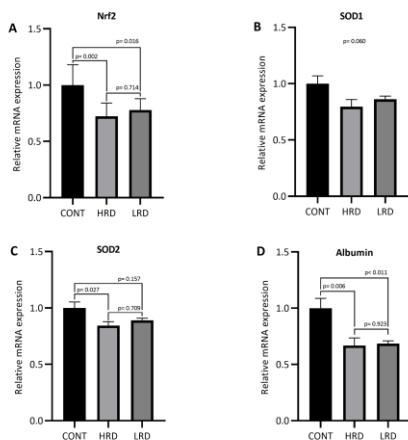


Figura 4: Efeito do trans-resveratrol nos níveis de expressão de mRNA no fígado. (A) Nrf2, (B) SOD1, (C) SOD2 e (D) Albumina. CONT, grupo controle; HRD, grupo de alta dose de resveratrol; LRD, grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média \pm DP.

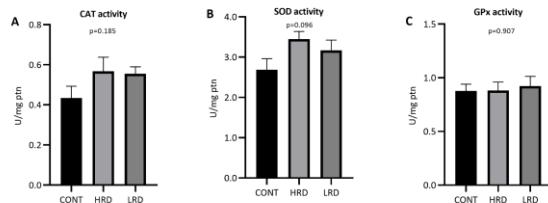


Figura 5: Efeitos do trans-resveratrol na atividade das enzimas antioxidantes no fígado. (A) CAT, (B) SOD e (C) GPx. CONT, grupo controle; HRD, grupo de alta dose de resveratrol; LRD, grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média \pm DP.

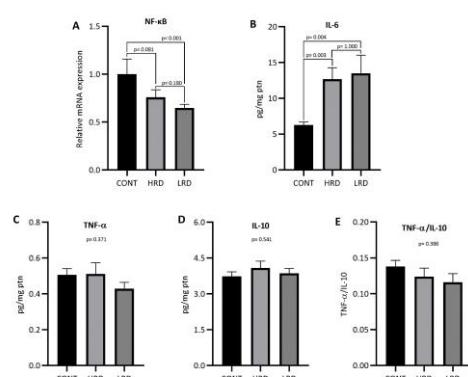


Figura 6: Efeitos do trans-resveratrol na expressão de NF-κB e níveis de pró-citocinas no fígado. (A) NF-κB, (B) IL-6, (C) TNF-α, (D) IL-10 e (E) razão TNF-α/IL-10. CONT, grupo controle; HRD, grupo de alta dose de resveratrol; LRD, grupo de baixa dose de resveratrol. Os valores são expressos como média \pm DP.

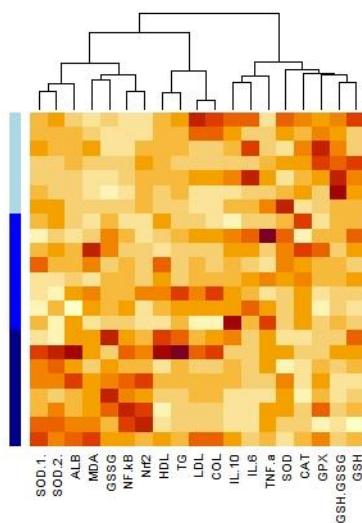


Figura 7: Mapa de calor dos biomarcadores de acordo com os três grupos experimentais (CONT: azul escuro, HDR: azul e LDR: azul claro), obtido pela análise de cluster dos valores padronizados. Abreviaturas: SOD1, expressão de mRNA de superóxido dismutase citoplasmática; SOD2, expressão de mRNA de superóxido dismutase mitocondrial; ALB, albumina; MDA, malondialdeído; GSSG, dissulfureto de glutationa; NF-κB, fator nuclear-κB; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG, triglicéridos; LDL, lipoproteína de baixa densidade; COL, colesterol total; IL-10, interleucina-10; IL-6, interleucina-6; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; SOD, atividade da superóxido dismutase; CAT, atividade da catalase; GPx, glutationa peroxidase; GSH, glutationa; Razão GSG:GSSG.

Material Complementar:

Tabela Complementar 1: Concentração esperada e observada da amostra de trans-resveratrol aplicada no ensaio biológico.

Expected concentration (mg/L)	Observed concentration ¹ (mg/L)
5	5.46 ± 0.23
25	26.28 ± 0.56
60	61.72 ± 4.26

Curva padrão: 5 – 60 mg/L; R²=0,9961

Valores expressos como média ± SD

Tabela Complementar 2: Composição das dietas

Ingredient (g)	AIN93M ¹	WESTERN ²
Cornstarch	620.692	-
Maltodextrin	-	161.530
Casein (>85% protein)	140.000	258.448
Sucrose	100.000	88.900
Lard	-	316.600
Soybean oil (no additives)	40.000	32.300
Fiber	50.000	64.600
Cholesterol	-	6.250
Mineral mix (AIN93M – MX)	35.000	-
Mineral mix (S10026)	-	12.900
Dicalcium Phosphate	-	16.800
Calcium carbonate	-	7.100
Potassium citrate	-	21.300
Vitamin mix (AIN93M – VX)	10.000	-
Vitamin mix (V10001)	-	12.900
L-Cistine	1.800	3.870
Choline bitartrate (41,1% colina)	2.500	2.600
TBHQ (Terg-butylhydroquinone)	0.008	-
Total	1.000.000	1.000.000

¹Com base em Reeves et al. (1993)

²Dieta ocidental (D12492) de acordo com Research Diets (2017)

Tabela Complementar 3: Composição química das dietas.

Diet	Moisture	Ash	Nutrients ³			
			Lipid	Protein	Carbohydrate ²	Energy ³
AIN93M – CONT	10.07 ± 0.12	3.05 ± 0.00	6.35 ± 0.52	16.17 ± 0.32	64.63 ± 0.43	380.75 ± 0.31
AIN93M – HRD	12.16 ± 0.12	2.97 ± 0.07	6.23 ± 0.52	13.75 ± 0.53	64.89 ± 0.93	369.44 ± 1.53
AIN93M – LRD	11.35 ± 0.09	3.05 ± 0.13	6.21 ± 0.54	13.62 ± 0.63	65.76 ± 1.09	371.74 ± 0.29
Western – CONT	3.80 ± 0.12	2.45 ± 0.13	36.46 ± 2.54	28.36 ± 0.99	28.94 ± 2.30	564.22 ± 5.97
Western – HRD	3.86 ± 0.03	3.13 ± 0.08	36.51 ± 0.32	32.06 ± 1.53	24.44 ± 1.24	554.54 ± 168
Western – LRD	3.82 ± 0.03	3.00 ± 0.06	37.30 ± 0.27	31.58 ± 0.94	24.29 ± 0.78	559.20 ± 1.68

¹ Valores expressos em média ± SD

² Obtido por diferença

³ Energia em Kcal/100g