



Editora UNIJUI

Departamento de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde

Volume 20, Número 39

Edição Especial – Estresse Oxidativo

ISSN 2176-7114

Qualis B2

REVISTA ELETRÔNICA



Contexto & Saúde



Reitora

*Cátia Maria Nehring*

Vice-Reitora de Graduação

*Fabiana Fachineto*

Vice-Reitor de Pós-Graduação  
Pesquisa e Extensão

*Fernando Jaime González*

Vice-Reitor de Administração

*Dieter Rugard Siedenberg*



Editora Unijuí da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuí, Ijuí, RS, Brasil)

Rua do Comércio, 3000

Bairro Universitário

98700-000 – Ijuí – RS – Brasil

Fone: (0\_\_55) 3332-0217

[editora@unijui.edu.br](mailto:editora@unijui.edu.br)

[www.editoraunijui.com.br](http://www.editoraunijui.com.br)

[www.facebook.com/unijuieditora/](https://www.facebook.com/unijuieditora/)

Editor

Fernando Jaime González

Diretor Administrativo

Anderson Konagevski

Programador Visual

Alexandre Sadi Dallepiane



ISSN 2176-7114

Ano 20 • nº 39 • Edição Especial • 2020

Departamento de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde

Contato

[secrevista@unijui.edu.br](mailto:secrevista@unijui.edu.br)

Editores

Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz

Dr. Thiago Gomes Heck

Editora de texto e de layout  
e leitora de prova

Rosemeri Lazzari, Editora Unijuí, Ijuí, RS, Brasil

Revisão

Editora Unijuí

Conselho Editorial

- Dr. Anderson Zampier Ulbrich, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Brasil
- Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Christiane Colet, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Eliane Roseli Winkelmann, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Evelise Moraes Berlezi, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Eniva Miladi Fernandes Stumm, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Gabriela Elisa Hirsch, Bolsista PNPd/Capes – PPGAIS – Unijuí/Unicruz, Brasil
- Dra. Ligia Beatriz Bento Franz, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Mirna Stela Ludwig, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dr. Thiago Gomes Heck, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Brasil
- Dra. Neila Santini de Souza, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões – UFSM/RS, Brasil
- Dr. Jonatas Zeni Klafke, Instituto de Cardiologia de Cruz Alta – ICCA, Brasil
- Dra. Ingrid Schweigert Perry, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Unesc, Brasil
- Dra. Nadia Rosana Fernandes de Oliveira, Universidade Federal do Pampa – Unipampa, Brasil
- Dra. Crhis Netto de Brum, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó – UFFS/SC, Brasil

## Sumário

### EDITORIAL

Oxidative Stress and the Biological and Chemical Processes in Health

*Julia Matzenbacher dos Santos*

---

**4**

Bioquímica Mitocondrial e Estresse Oxidativo no Transtorno Bipolar: Novos Horizontes

*Luiz Arthur Rangel Cyrino, Daniela Delwing de Lima, Oliver Matheus Ullmann, Thayna Patatchini Maia, Ana Carolina Sardo*

---

**6**

Extrato Hidroetanólico de Gengibre (*Zingiber officinale*) Inibe a Oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), *In Vitro*

*Stéfani de Moraes, Amanda Felipe Portella, Andressa Leal Zambra, Bruna Morgan da Silva, Natacha Cossetin Mori, Isadora Aguirre Rosa, Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle, Josiane Woutheres Bortolotto, Gabriela Bonfanti Azzolin*

---

**19**

Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe no Modelo Experimental de Sepsis

*Renata Campos, Andressa Antunes Bortoti, Chelin Auswaldt Steclan, Pollyana Weber da Maia Pawlowytsch, Miriam Cristina José Valério, Cinthia Helena Paluch, Luiz Cláudio Fernandes*

---

**27**

Efeito Antioxidante da *Ilex paraguariensis* e Condimentos na Oxidação Lipídica de Filés de *Oreochromis niloticus*

*Nilce Coelho Peixoto, Amanda A. R. Machado, Tiffany P. Hautrive, Juliano Uczay, Aline S. Bezerra*

---

**35**

The Consumption of Fruits as a Potential Alternative to Accelerate the Recovery Process After High Intensity Exercise

*Sonja Skinner, Madison Wade, Courtney Iaccobaci, Roderick Hutcherson, Julia Matzenbacher dos Santos*

---

**41**

Efeito *In Vitro* do Extrato de *Camellia Sinensis* Sobre o DNA de Leucócitos Humanos

*Daniele Scherer Drews, Ivana Beatrice Manica da Cruz, Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner*

---

**49**

Effects of Type 2 Diabetes Mellitus Induction and of Moderate Physical Exercise on the Hepatic Metabolism and Oxidative Stress in Wistar Rats

*Denise Silva de Oliveira, Júlia Matzenbacher dos Santos, Kayorany Gomes Galvão do Prado, Andreia Vitor Couto Amaral, Sandra Aparecida Benite-Ribeiro*

---

**55**

L-Glutamine Supplementation Associated With Moderate Aerobic Training Improves Biometric, Glycemic Profile and the Antioxidant Defense

*Analú Bender dos Santos, Lílian Corrêa Costa-Beber, Eloisa Gabriela de Pelegrin Basso, Pauline Brendler Goettems Fiorin, Renan Daniel Bueno Basso, Maicon Machado Sulzbacher, Mirna Stela Ludwig, Thiago Gomes Heck*

---

**62**

## EDITORIAL

# Oxidative Stress and the Biological and Chemical Processes in Health

### THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS

Oxidative stress is the result of reactive oxygen species (ROS) overproduction or/and a decline in antioxidant defense mechanisms. ROS are generated by highly reactive elements with unpaired electrons e.g.  $O_2^-$  (superoxide radical), OH (hydroxyl radical) and  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide). Overall excessive generation of ROS results in deleterious effects causing damage to DNA, proteins, and lipids, ultimately leading to cell death (JARRET *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011). Therefore, agents counteracting excess ROS and/or increasing the antioxidant defenses represent an appealing strategy for the treatment of different complications (DOS SANTOS *et al.*, 2019). On the other hand, ROS have important functions in cellular signaling as participants and modifiers of signaling pathways, essential for the proper development and proliferation of cells. Indeed, ROS play an important role in the immunologic system and on the increment of the antioxidant response (DOS SANTOS *et al.*, 2019). For instance, physical exercise, a therapeutic approach for several diseases, induce the production of ROS, leading to an increase in the antioxidant defense in rest condition (JI *et al.*, 1988).

The current understanding of the complex role of ROS is necessary for developing multi-functional antioxidants, which can maintain ROS in a non-pathological level. In this context, numerous research groups have focused on the characterization of the ROS source and their pathway triggered. Therefore, multi-aspects ROS in health and disease have been addressed in the current issue. This special issue includes 8 original research and review articles focusing on the role of ROS and antioxidant defense on the development of diabetes and its associated diseases. The guest editors are pleased to present a selective group of these cutting-edge original research and review articles as follows.

In the review “Mitochondrial biochemistry and oxidative stress in bipolar disorder: New horizons” the author discusses recent articles on the effect of ROS on Bipolar Disorder (BD), a disease characterized by high suicide rates. Mitochondria is a specialized organelle that generates adenosine triphosphate but also is considered the primary source of ROS. Mitochondrial ROS plays a critical role in BD. Recent literature consistently reported changes in antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and nitric oxide levels induced by in BD.

In the original article “ginger hydroethanolic extract inhibits oxidation of low-density lipoprotein (LDL) in-vitro” the authors used an isolated fraction of LDL of patient serum samples, the LDL fraction was isolated, previously treated with Ginger Rhizome Hydroethanolic Extract (EHEG). They concluded that ginger has protective activity against the formation of oxidized LDL, suggesting that its phytochemical compounds confer antioxidant activity, and may be effective in the prevention and/or treatment of cardiovascular diseases, especially those related to the process of atherosclerosis.

In the original article “The effect of fish oil supplementation on sepsis” the authors induced sepsis by puncture and cecal ligation after several days of fish oil (FO) administration in rats. Follow they assessed lipid peroxidation, lung and renal histology were analyzed regarding its structure and presence of polymorphonuclear (PMN), lung edema index, renal function and survival rate. They concluded that FO supplementation, in the dose and period studied, did not improve renal, pulmonary and mortality rate in rats with sepsis.

In the article “Antioxidant effect of LLes paraguariensis and condiments of lipid oxidation of oreochromis niloticus steak” aimed to evaluate the antioxidant potential of yerba mate extract, in association with rosemary, oregano and thyme condiments, in tilapia fillets submitted to different preparation forms, in face of lipid oxidation of

fish. The extracts were evaluated for the percentage reduction of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical and for the content of total phenolic compounds. The lipid oxidation of the fish was analyzed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test. Based on the result, they suggest the effectiveness of the association of condiments with yerba mate in the reduction of oxidative rancidity of the tilapia fillets submitted to the different thermal processes applied, as well as the in natura product.

In the review of literature “The consumption of fruits as a potential alternative to accelerate the recovery process after high intensity exercise” the authors discussed the recent literature that used fruits to abbreviate the recovery process after high intensity exercise in different sports modalities by reducing ROS and muscle damage markers. According to the authors, nutrient supplementation can enhance recovery after high intensity exercise, particularly fruits of red-blue color such as cherries and blueberries seem to decrease oxidative stress, inflammation, and muscle damage.

In the original article “In-vitro effect of *Camellia sinensis* extract in human DNA leukocytes” the authors aimed to evaluate the possible genotoxic activity of the green tea extract through the evaluation of DNA damage by the Comet Assay. They concluded that the use of green tea in the diet could have many benefits for the organism, mainly for its bioactive compounds. However, they suggest that studies are necessary to evaluate its toxicity to better evaluate the safety in its use.

In the article “Effects of type 2 diabetes mellitus induction and of moderate physical exercise on the hepatic metabolism and oxidative stress in Wistar rats” the authors tested the hypothesis that the induction of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) by the association of streptozotocin and high-fat diet causes hepatic alterations and that physical exercise can influence these alterations. They tested the hypothesis using males Wistar rats and induced T2DM by offering a high-fat group (HF) for 8 weeks and on the 14<sup>th</sup> received a single dose of streptozotocin (25mg/kg). After T2DM induction, a group performed aerobic exercise. They found that the used protocol induced T2DM but not liver diseases or an increase in blood oxidative stress. Besides, physical exercise acted in synergy with high-fat diet and STZ inducing accumulation of triacylglycerol and VLDL in hepatic tissue, an effect that could either represents lipotoxicity or a protective mechanism to conserve energy.

In the study “L-glutamine supplementation associated with moderate aerobic training improves biometric, glycemic profile and antioxidant defense” the authors aimed to verify whether the L-glutamine supplementation (in its free form) could provide additional improvement in biometric, glycemic and redox parameters in animals undergoing moderate aerobic training (MAT). They found that L-glutamine supplementation increased the gastrocnemius mass and improved the glucose tolerance in animals submitted to MAT. It improved the antioxidant status in gastrocnemius, liver and pancreas, and declined it in adipose tissue in animals undergoing MAT. The drop of adipose antioxidant defense was associated with adiposity, while pancreas antioxidant activity was inversely associated with glucose intolerance.

The editors anticipate this special issue to be of interest to the scientific community. We hope researchers benefit in this issue to make further progress in the understanding of the role of ROS in the development of diseases or for the use of potential therapeutic approaches. The editors would like to thank the authors for submitting their research for publication and the reviewers for their important input and critiques to improve the manuscripts.

*Julia Matzenbacher dos Santos*

## REFERENCES

- DOS SANTOS, Julia M.; TEWARI, Shikha; MENDES, Roberta H. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications. *Journal of Diabetes Research*, v. 2.019, 2019. DOI: 10.1155/2019/4189813
- DOS SANTOS, Julia Matzenbacher *et al.* The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 449, n. 1-2, p. 251-255, 2018. DOI: 10.1007/s11010-018-3361-5.
- JARRETT, S. G. *et al.* Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 27, n. 6, p. 596-607, 2008. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.001.
- Jl, L. L. *et al.* Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 263, n. 1, p. 150-160, 1988. DOI: 10.1016/0003-9861(88)90623-6.
- SANTOS J. M. *et al.* Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants. *Curr Pharm Biotechnol.*, 12(3), p. 352-61, 1<sup>o</sup> Mar. 2011. DOI: 10.2174/138920111794480507. PMID: 20939803; PMCID: PMC3214730.

## Bioquímica Mitocondrial e Estresse Oxidativo no Transtorno Bipolar: Novos Horizontes

Luiz Arthur Rangel Cyrino<sup>1</sup>, Daniela Delwing-de-Lima<sup>2</sup>, Oliver Matheus Ullmann<sup>1</sup>,  
Thayna Patachini Maia<sup>1</sup>, Ana Carolina Sardo<sup>1</sup>

### RESUMO

Este artigo é uma revisão do efeito do estresse oxidativo (EO) no Transtorno Bipolar (TB). Esta doença é caracterizada como sendo crônica, grave, com alta morbidade, mortalidade e altas taxas de suicídio. É uma doença progressiva, com episódios cada vez mais curtos e frequentes ao longo do tempo. Modificações ocorrem no encéfalo, como alterações na neuroplasticidade, neurotransmissão, falhas na apoptose, ativação no processo imunoinflamatório, com alterações na via de sinalização do cálcio e, mais recentemente, sobre o EO. Esses eventos envolvem uma reorganização patológica no encéfalo e, portanto, estão associados a alterações morfológicas, tais como redução do volume do córtex pré-frontal, do hipocampo e da amígdala aumentada. Essas alterações estruturais e bioquímicas são conhecidas como neuroprogressão, e apresentam diferenças entre o estágio inicial e o final do TB. Neurônios e células da glia têm uma das mais altas demandas de energia, quando estas alterações bioquímicas e anômicas afetam essas células e, principalmente, organelas, como as mitocôndrias. A mitocôndria é uma organela especializada que gera trifosfato de adenosina (ATP) sendo considerada a principal fonte de espécies reativas produzidas principalmente pela cadeia de transporte de elétrons (CTE), levando, assim, ao EO. O papel do EO na fisiopatologia da TB tem sido investigado em vários estudos, relatando mudanças nos níveis das enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e do óxido nítrico (NO). Os mecanismos fisiopatológicos do TB contribuem para uma melhor compreensão da atividade da doença e podem revelar possíveis soluções para o diagnóstico e prognóstico.

**Palavras-chave:** Radicais livres. Metabolismo energético. Mitocôndrias. Transtorno bipolar. Estresse oxidativo. Sistema nervoso central.

### MITOCHONDRIAL BIOCHEMISTRY AND OXIDATIVE STRESS IN BIPOLAR DISORDER: NEW HORIZONS

### ABSTRACT

This article is a review of the effect of oxidative stress on Bipolar Disorder (BD). This disease is characterized as being chronic, severe with high morbidity, mortality, and high suicide rates. It is a progressive disease with episodes becoming successively shorter and frequent over time. Multiple alterations occur in the brain such as changes in neuroplasticity, neurotransmission, failures in apoptosis, activation in the immune-inflammatory process, with changes in the calcium signaling pathway; and more recently, on oxidative stress. These events involve a pathological reorganization in the brain and therefore are associated with morphological changes such as, a reduction in the volume of the prefrontal cortex, hippocampus, and an enlarged amygdala. These structural and biochemical changes are known as neuroprogression, with a difference between the initial and final stages of BD. Neurons and glial cells have a high energy demand, where biochemical and anatomic changes affect these cells and mainly organelles such as mitochondria. Mitochondria is a specialized organelle that generates adenosine triphosphate. It is considered the primary source of reactive oxygen species, produced through the electron transport chain, leading to oxidative stress. The role of oxidative stress in the pathophysiology of BD has been investigated in several studies, and consistently reported changes in antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and nitric oxide levels. Pathophysiological mechanisms of BD contributes to an improved understanding of disease activity and may reveal possible solutions for diagnosis and prognosis.

**Keywords:** Free radicals. Energy metabolism. Mitochondria. Bipolar disorder. Oxidative stress. Central nervous system.

RECEBIDO EM: 29/6/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 25/8/2019

ACEITO EM: 6/9/2019

<sup>1</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille. Joinville/SC, Brasil.

<sup>2</sup> Autora correspondente. Universidade da Região de Joinville – Univille. Rua Paulo Malschitzki, 10 – Zona Industrial Norte. Joinville/SC, Brasil. CEP 89219-710. <http://lattes.cnpq.br/5765728791389269>. <https://orcid.org/0000-0001-5335-5102>. [danielwing@hotmail.com](mailto:danielwing@hotmail.com)

## INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença crônica e grave que afeta aproximadamente 1,1% da população mundial e está associado a uma alta taxa de comorbidades clínicas. Sua fisiopatologia é complexa, multifatorial e não é totalmente compreendida, sendo influenciada, de forma consistente, por fatores genéticos e ambientais (CLEMENTE *et al.*, 2015). Caracteriza-se por múltiplas alterações no encéfalo, entre as quais a neuroplasticidade, a cronobiologia, falhas na apoptose, o desenvolvimento cerebral alterado, a neurotransmissão e o processo imune-inflamatório, além da via de sinalização do cálcio, e, mais recentemente, o EO, com fortes alterações na bioenergética celular (SIGITOVA *et al.*, 2017). A doença também inclui déficits cognitivos, resistência ao tratamento e alterações biológicas periféricas e em estruturas cerebrais, como atrofia cortical e dilatação dos ventrículos. Tais alterações tornam-se mais pronunciadas após múltiplos episódios de humor (mania ou depressão). Uma hipótese para explicar essas fortes mudanças do estado de humor a partir do dano cumulativo e patologias relacionadas ao TB, é conhecida como carga alostática (VIETA *et al.*, 2013). Essa teoria busca entender como as mudanças cumulativas associadas às doenças psiquiátricas refletem-se na progressão da doença (KAPCZINSKI *et al.*, 2008). Assim, a alostase é a capacidade de obter estabilidade por meio de alterações, o que permite ao organismo responder a várias situações mediante alterações fisiológicas. Se, no entanto, esses processos se tornarem extremos ou ineficientes, a responsividade do corpo diminui e os processos acumulam-se para que mais sistemas regulatórios sejam comprometidos (carga alostática), prejudicando a plasticidade neuronal e a neurotransmissão (MCEWEN, 2000). Esse conjunto de mudanças fisiológicas, que ocorre com o curso da doença, foi associado a outro conceito recentemente desenvolvido, chamado neuroprogressão (BERK *et al.*, 2011). Dessa forma, este termo é utilizado para explicar a progressão dos distúrbios e a consequente aceleração dos mecanismos de doença (GRANDE *et al.*, 2012; MCEWEN; GIANAROS, 2011). Neste contexto, com a progressão da doença, ocorre um aumento na frequência e gravidade dos episódios de mania e depressão ao longo dos anos, levando ao aumento no número de comorbidades médicas e psiquiátricas associadas, desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios, redução das neurotrofinas e aumento do EO. Este processo intoxica o corpo, liberando compostos e produzindo um remodelamento patológico do encéfalo e pior funcionamento cognitivo e emocional, com diminuição da produtividade na vida

pessoal e profissional e de recuperação clínica (GAMA *et al.*, 2013). Assim, o TB pode ser visto como uma doença inflamatória multissistêmica, sendo representado por alterações em biomarcadores séricos (SYLVIA *et al.*, 2015) que poderiam funcionar como indicadores de toxicidade celular nestes pacientes (ROWLAND *et al.*, 2018). A análise de um conjunto de biomarcadores (marcadores inflamatórios, EO e neurotrofinas) mostrou que pacientes com TB de início agudo têm uma taxa de toxicidade sistêmica significativamente maior do que controles saudáveis, mas menor do que pacientes com sepse (PFAFFENSELLER *et al.*, 2013). Desse modo, compreender os mecanismos fisiopatológicos sistêmicos que contribuem para a disfunção resultante de múltiplos episódios de humor do TB, e identificar as vias associadas aos mediadores alostáticos envolvidos na neuroproteção, EO e inflamação, podem ser importantes para melhorar nossa compreensão da atividade da doença. Os diferentes biomarcadores podem estar associados à atividade da doença e à neuroprogressão, indicando se a doença está ativa ou em remissão. Vale ressaltar que marcadores sistêmicos já foram implicados no TB como mediadores da alostase (JUSTER *et al.*, 2013). Entre os mediadores da alostase e da neuroprogressão, destacam-se os glicocorticoides. Estes hormônios promovem adaptação dinâmica do organismo principalmente por meio da regulação da disponibilidade de compostos energéticos, entre outros efeitos. Quando em excesso e de forma crônica, podem causar disfunções em compartimentos celulares essenciais, tais como as mitocôndrias, produzindo um aumento do EO e de marcadores pró-inflamatórios, assim como a diminuição de fatores neurotróficos; processos esses já evidenciados em pacientes bipolares. Esta exposição excessiva aos glicocorticoides, observada no TB, acaba produzindo alterações neuroanatômicas, cognitivas e funcionais, que são mais pronunciadas em pacientes crônicos com múltiplos episódios, mas são, geralmente, sutis naqueles em estágios iniciais (BERK *et al.*, 2011). Apesar da psiquiatria necessitar de biomarcadores confiáveis e acessíveis, que facilitem o diagnóstico de forma precoce, estes ainda são insuficientes e caem em aproximadamente três categorias promissoras: 1 – genética, 2 – descobertas de imagens e 3 – níveis de metabólitos de moléculas. Neste último grupo encontram-se dosagens periféricas de diversas substâncias oriundas de células neuronais e gliais, tais como: 1 – as neurotrofinas: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF); Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) e Fator de Crescimento Neuronal (NGF); 2 – as citocinas pró-inflamatórias: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral

Alfa (TNF-  $\alpha$ ), 3 – substâncias relacionadas ao EO: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), 3-nitrotirosina (3-NT), e as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS), e o último grupo: 4 – marcadores de disfunção do Ciclo de Krebs (CK), tais como citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase (GRANDE *et al.*, 2014; DE SOUSA *et al.*, 2015; SCAINI *et al.*, 2016).

Todas essas alterações bioquímicas estudadas impactam diretamente no encéfalo e, principalmente, nas células neuronais e em organelas como as mitocôndrias. Os neurônios são células de alta demanda energética. Um único neurônio cortical em repouso consome aproximadamente 4,7 milhões de moléculas de ATP por segundo para processar várias funções biológicas. A taxa de utilização de ATP é três vezes maior na substância cinzenta do que na substância branca no cérebro humano (ZHU; LEE; CHEN, 2018). Isso torna os neurônios responsáveis por 20% a 25% de todo o oxigênio e glicose consumidos pelo organismo (MANSUR; BRIETZKE, 2012). Em algumas porções dos neurônios ocorre uma demanda maior de fornecimento de energia, tais como os terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos que regulam a neurotransmissão, os cones ativos de crescimento ou ramos axonais que regulam a plasticidade sináptica de curto prazo e, finalmente, os nódulos de Ranvier (ZHANG *et al.*, 2010). Para que estas mitocôndrias cheguem aos seus destinos, é necessário que ocorra o transporte mitocondrial neuronal. Este é bidirecional e de longo alcance, e depende dos microtúbulos, ocorrendo com uma velocidade média entre 0,32 e 0,91  $\mu\text{m/s}$  (MACASKILL; KITTLER, 2010). A maior parte da biogênese das mitocôndrias neuronais acontece principalmente no soma do neurônio, quando são, então, distribuídas ao longo do axônio. Os mecanismos que regulam o transporte direcional das mitocôndrias são baseados em receptores na membrana. Eles capturam a informação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por meio da concentração de íons ou substâncias, como  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, difostato de adenosina (ADP), piruvato e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH). Após a sinalização, as vias de transdução são ativadas de diferentes formas. Uma vez formadas e transportadas, as mitocôndrias podem ficar ancoradas em certas regiões ou apresentar mudança de direção. Assim, para manter a plasticidade neuronal e a confiabilidade da neurotransmissão, é necessário ter algumas das mitocôndrias ancoradas no terminal pré-sináptico. Estas mitocôndrias fornecem uma quantidade estável e contínua de ATP. Cerca, no entanto, de 20% a 30% das mitocôndrias axonais são móveis (CHEN; SHENG,

2013). Ao passarem por esses terminais de forma rápida e temporária, estas fornecem ATP, alterando, assim, a energia sináptica e influenciando as atividades das mesmas. Nessa direção, Sun *et al.* (2013) demonstraram pela primeira vez que este é um dos principais mecanismos subjacentes à variação pré-sináptica, quando a falta de mitocôndrias no terminal axonal prejudica a neurotransmissão pela diminuição de ATP e, conseqüentemente, da força de liberação das vesículas sinápticas, assim como a capacidade de bloquear e tamponar o cálcio ionizado da terminação axônica (IVANNIKOV; SUGIMORI; LLINÁS, 2013). Quanto à região pós-sináptica, pesquisas realizadas com métodos proteômicos, baseados em espectrometria de massa (FÖCKING *et al.*, 2016), observaram proteínas do citoesqueleto facilitando o movimento e a sinalização de alta densidade de receptores e complexos ativados que são críticos para a neurotransmissão normal e plasticidade sináptica. Desta forma, sabemos que a plasticidade sináptica é altamente dependente da função mitocondrial e do metabolismo energético. Quando as mitocôndrias alteram sua motilidade ou distribuição, ou quando sua integridade é prejudicada sob certas condições de estresse fisiopatológico, estas podem ser implicadas na patogênese de vários distúrbios neuropsiquiátricos importantes, como no TB e na esquizofrenia (CHU, 2019). Outras células fortemente envolvidas no processo da neuroprogressão são as células microgliais. Elas fazem contato íntimo com as sinapses, produzindo a degeneração sináptica, como nas doenças neurodegenerativas (HONG; DISSING-OLESEN; STEVENS, 2016). Estas células também estão relacionadas com a formação, proliferação e diferenciação de circuitos neurais, e ainda com a poda de conexões sinápticas em redes neurais. Quando esta comunicação é interrompida, pode-se observar efeitos devastadores na memória, sociabilidade, ansiedade e outros domínios comportamentais (WU *et al.*, 2014). Graças às recentes pesquisas desenvolvidas por Herz *et al.* (2017), sabemos hoje que células microgliais e macrófagos não parenquimais, que se apresentam nas meninges, espaços perivascularares e plexo coroide, representam duas populações mieloides ontogeneticamente distintas. As células da microglia aparecem precocemente durante o desenvolvimento embrionário derivado do saco vitelino (E) 8.5 (GOMEZ *et al.*, 2015), semeando o tecido cerebral antes do nascimento e permanecendo com uma população estável até o envelhecimento. Todos os outros macrófagos do sistema nervoso central (SNC) provavelmente originam-se de monócitos derivados da medula óssea. O volume de reposição da microglia é rápido, permitindo a renovação várias vezes ao longo da vida, a partir



de processos associados à proliferação e apoptose (ASKEW *et al.*, 2017). Apesar das origens distintas, microglia e macrófagos, que derivaram de monócitos, têm morfologias e funções fagocíticas semelhantes, contudo existe um subconjunto de funções exclusivas da microglia (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; PRINZ; PRILLER, 2017). Como são células imunes inatas do encéfalo, elas estão, de fato, procurando continuamente sinais que indiquem potenciais ameaças ao SNC, mesmo quando estas se encontram em seu estado de repouso (inativado) (HELLWIG; HEINRICH; BIBER, 2013). A presença de sinais químicos de infecções, traumas, substâncias endógenas e exógenas, ou a perda de sinais constitutivos anti-inflamatórios, podem ativar múltiplas vias de respostas. Estudos mostraram que a microglia e os macrófagos podem ser ativados em dois fenótipos significativos: classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) (GEISSMANN *et al.*, 2010). Esses diferentes fenótipos reativos, constituídos por transcrição e perfis não transcripcionais, são caracterizados por liberação de citocinas, quimiocinas e fagocitose. No estágio inicial da doença, os sintomas podem ser seguidos pela polarização microglial M1, induzida por hiperativação neuronal (NAKAGAWA; CHIBA, 2014; GINHOUX *et al.*, 2016). O fenótipo M1 pode produzir citocinas pró-inflamatórias e metabólitos oxidativos, como o TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e NO, fatores que podem causar danos adicionais e remover fibras nervosas danificadas pela fagocitose. A polarização microglial M2 anti-inflamatória, entretanto, é ativada em resposta a IL-4, IL-13 ou IL-10 (NGUYEN *et al.*, 2011), que regula negativamente a função microglial M1, restaurando o tecido da homeostase, conseqüentemente atenuando os sintomas, suprimindo a inflamação, reparando o tecido e promovendo a cicatrização de feridas (KAWABORI; YENARI, 2014). Se a polarização M2 é insuficiente, as funções microgliais M1 são mantidas e induzem disfunções da rede neural continuamente. A gravidade dos sintomas pode aumentar gradualmente de acordo com a frequência da polarização M1 (NAKAGAWA; CHIBA, 2014). Essas células poderiam manter mudanças sutis, como na atividade transcripcional, o que afetaria sua sensibilidade a sinais anti-inflamatórios ou alteraria respostas a estímulos subseqüentes, podendo até levar à morte de neurônios. É importante lembrar que a microglia ativada sempre esteve associada a efeitos neurotóxicos, e esse mecanismo está relacionado com a neuroprogressão, em que a ativação microglial é desregulada e a inflamação induzida pela microglia é intensa, ocorrendo efeitos diretos sobre os neurônios. Estes mecanismos são observados em todas as patologias no encéfalo, contribuindo para a

progressão das doenças mentais, quando dano tecidual ou estresse celular produzem sinais de ativação microglial (KETTENMANN *et al.*, 2011). Indivíduos com TB nos distintos estágios da doença (precoce e tardia) e nas diferentes fases (depressiva, maníaca e eutímica), apresentam alterações de alguns destes mediadores no sangue periférico. Assim, a neuroprogressão, a partir do remodelamento da estrutura cerebral, associada a essas alterações químicas, tem importantes implicações clínicas, posto que estágios iniciais e tardios da doença parecem apresentar diferentes características biológicas e, assim, possivelmente requerem diferentes estratégias de tratamento (FERENSZTAJN; RYBAKOWSKI, 2012). Os mecanismos que levam à diminuição da resistência orgânica em situações de estresse nos episódios agudos no TB, provavelmente envolvem vias de sinalização celular e organelas, por exemplo as mitocôndrias e retículo endoplasmático, que afetariam as células neuronais e gliais. Evidências sugerem um papel importante da disfunção mitocondrial no TB, produzindo um metabolismo energético alterado, mudanças nas enzimas da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) da cadeia respiratória, níveis alterados do cálcio citoplasmático e alterações na ativação de genes mitocôndrias. O influxo de cálcio do citosol controla a taxa de produção mitocondrial de ATP. O cálcio intramitocondrial ativa três desidrogenases acopladas ao CK, que são o piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. Além disso, a captação de cálcio modula o perfil espacial e temporal da sinalização intracelular de cálcio, regulando a motilidade e a morfologia mitocondrial, podendo levar à morte celular (HOPPE, 2010). Alterações nas concentrações de lactato também são significativamente mais altas em pacientes com TB do que os controles, o que indica o aumento do metabolismo mitocondrial e a utilização anaeróbica da glicose, consistente com o metabolismo mitocondrial alterado no TB. Assim, pesquisas têm contribuído para a compreensão destes mecanismos, explicando parcialmente a toxicidade relacionada com episódios de humor cumulativos no TB, considerando que esta revisão busca, principalmente, explicar alguns destes mecanismos a partir do EO no TB e sua relação com as alterações bioquímicas subjacentes à mitocôndria.

## METODOLOGIA

As informações coletadas para essa revisão foram pesquisadas nas seguintes bases de dados disponíveis: ScienceDirect, PubMed/Medline, Embase e Google Scholar, Scopus e SciELO, levando-se em con-

sideração apenas artigos nos idiomas inglês e português. Foram utilizados os seguintes termos para pesquisa: transtorno bipolar, estresse oxidativo, EROs, ERNs, radicais livres (RL), antioxidante, NO, peroxidação lipídica, TBA-RS, proteína carbonil 3-nitrotirosina, catalase, glutatona, oxidação do DNA e neuroprogressão. As publicações foram selecionadas por título e conteúdo no resumo inicialmente, e, depois, por conteúdo completo. Como critério de seleção foram usados os artigos a partir de 2000 até 2019, com exceção de trabalhos clássicos, priorizando os artigos dos últimos cinco anos.

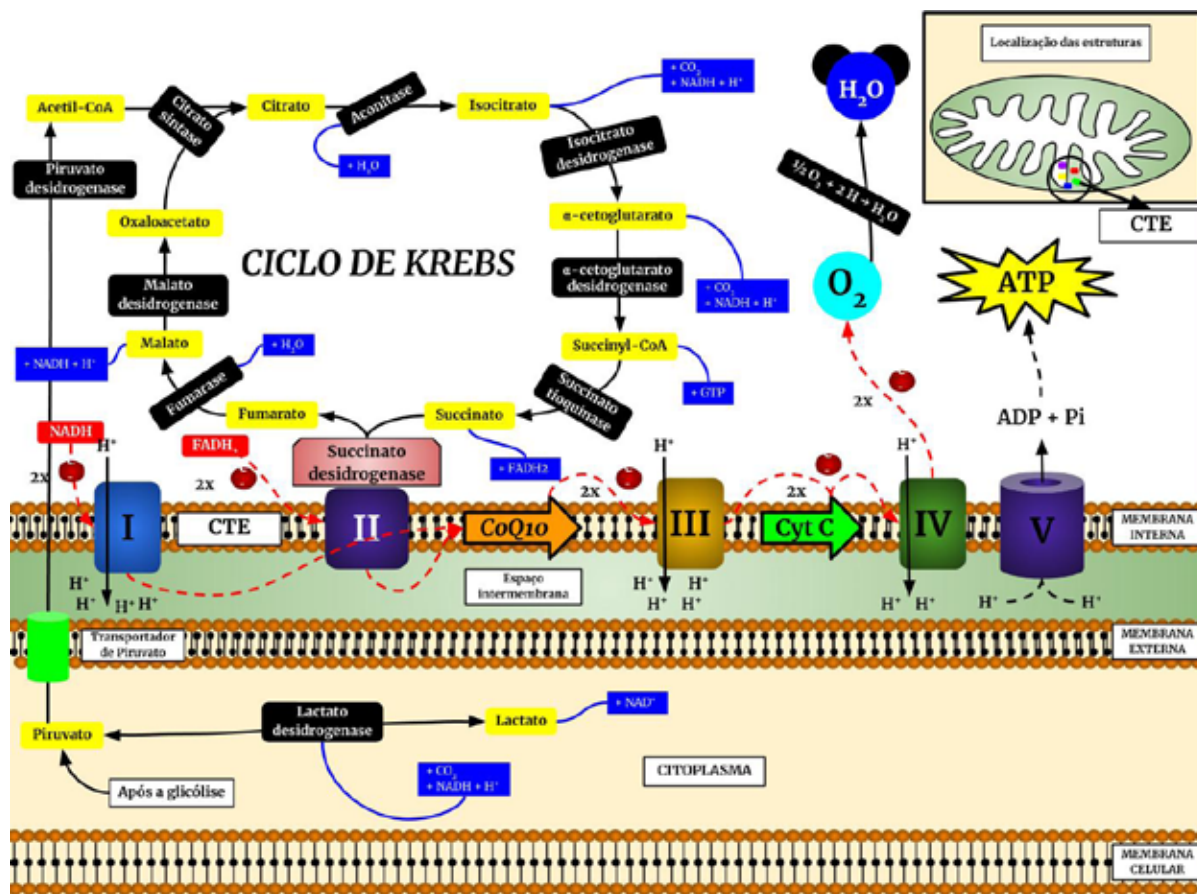
## MITOCÔNDRIA

Mitocôndrias são organelas especializadas, encontradas somente em células eucariontes, sendo responsáveis por várias funções celulares, como modulação da atividade neuronal, morfogênese, neuroplasticidade e produção energética, sendo cruciais na morte celular. No geral, são compostas por dois complexos de membranas, separados por um espaço intermembrana, o qual possui inúmeras invaginações que formam as cristas mitocondriais, em que estão presentes as proteínas da CTE, cujo número e morfologia refletem a demanda de energia (DING *et al.*, 2012). A síntese de proteínas mitocondriais envolve a expressão do DNA nuclear (nDNA) e do mtDNA, dando origem ao complexo mitocondrial (WIEDEMANN; PFANNER, 2017). O nDNA codifica a vasta maioria de proteínas mitocondriais, sendo responsável por sintetizá-las no citosol e importar para a membrana interna e externa da mitocôndria por meio da translocação de proteínas (KANG; FIELDEN; STOJANOVSKI, 2018). O mtDNA é composto por uma cadeia pesada e uma cadeia leve, contendo 28 genes e 9 genes, respectivamente (HÄLLBERG; LARSSON, 2014). Esses 37 genes são responsáveis pela síntese RNAs, sendo 2 genes responsáveis pelo RNA ribossômico, 22 genes responsáveis pelos RNAs transportadores e 13 pelos RNAs mensageiros que, após translação, geram polipeptídeos que estão envolvidos na fosforilação oxidativa (Oxphos) (BJÖRKHOLM *et al.*, 2015). As proteínas geradas pelo mtDNA estão presentes em quatro das cinco proteínas da CTE, posto que mudanças em sua estrutura podem afetar o metabolismo. Conforme demonstrado na Figura 1, as mitocôndrias metabolizam carboidratos e ácidos graxos, produzindo energia por intermédio da geração de ATP. Essa geração ocorre na matriz mitocondrial, enquanto as etapas iniciais do metabolismo de carboidratos acontecem fora da organela e, para que isso ocorra, dois processos são necessários: CK e Oxphos. Inicialmente, a glicose é

convertida em piruvato e, então, transportada para a matriz. Já os ácidos graxos, no entanto, são oxidados no interior da matriz mitocondrial. O ATP é produzido mediante três etapas interconectadas. Na primeira, o piruvato e os ácidos graxos são convertidos em moléculas conhecidas como acetil-CoA por meio de enzimas presentes na matriz. Na segunda etapa, essa substância torna-se a base para a cadeia de reações químicas conhecida como CK (PEI; WALLACE; 2018). Por fim, o ciclo é formado por uma série de reações químicas em que o dióxido de carbono e duas moléculas, ricas em elétrons, o NADH e o dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>), são produzidos. Na terceira etapa, o NADH e FADH<sub>2</sub> são movidos para o interior da membrana mitocondrial. Na última etapa química, ocorre a doação de elétrons para a CTE, o que leva à produção de ATP. Para a execução desse processo, o complexo I e o II recebem elétrons do NADH e FADH<sub>2</sub>, respectivamente (ENRÍQUEZ, 2016). Ambos transferem esses para a Coenzima Q10, que é uma enzima essencial em virtude das suas propriedades antioxidantes. A Coenzima Q10 transfere os elétrons para o complexo III, quando são transportados para o complexo IV pelo Citocromo C (ALVAREZ-PAGGI *et al.*, 2017). No complexo IV, elétrons são transferidos para o oxigênio molecular formando água (MILENKOVIC *et al.*, 2017; ENRÍQUEZ, 2016). Finalmente, o hidrogênio é transportado pelo complexo V, também chamado de ATP sintase, de volta à matriz mitocondrial, para a formação de ATP por meio do ADP e do fosfato inorgânico. O ATP alimenta várias funções da célula e do organismo como um todo (VIDYASAGAR, 2015). Podemos ver que todas as estruturas da CTE dependem de certos níveis de codificação nuclear e mitocondrial, com exceção do Complexo II, que é codificado exclusivamente por mtDNA. O complexo II tem especial importância no metabolismo energético, posto que este complexo possui dois domínios catalíticos especializados: um deles transfere os elétrons recebidos do FADH<sub>2</sub> para a Coenzima Q10, e o outro converte succinato em fumarato – gerando uma molécula de FADH<sub>2</sub>, participando tanto no CK quanto na CTE.

Com o passar do tempo, as funções mitocôndrias vão se tornando menos efetivas, o que inclui o desemparelhamento do complexo I e, com menor frequência, a diminuição da atividade do complexo III (SCAINI *et al.*, 2016). A atividade alterada dos complexos da CTE leva à produção aumentada de EROs e ERNs (VALVASSORI *et al.*, 2018), ao comprometimento do equilíbrio de cálcio intracelular e a mutações do DNA (MONICZEWSKI *et al.*, 2015). Com isso, estas dis-

Figura 1 – Produção energética pelas mitocôndrias



\* Em organismos aeróbicos, a glicose é oxidada em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O piruvato apresentado no citosol da célula é oxidado em acetil-CoA e pode, assim, entrar no CK, que é composto de um complexo de enzimas, localizado no citosol mitocondrial de células eucarióticas. Com isso há a produção de NADH e  $\text{FADH}_2$  que serão encaminhados para a CTE na membrana interna mitocondrial. O fluxo de elétrons ocorre por meio dos complexos proteicos, sendo acompanhado por um fluxo de prótons para o espaço intermembrana, que produz um gradiente químico e elétrico e que retorna pela ATP sintase, produzindo a força necessária para a síntese de ATP.

funções mitocondriais têm sido implicadas na neuroprogressão e no prejuízo cognitivo, que, conjuntamente com estudos clínicos, têm demonstrado alterações nos parâmetros do EO presentes na fisiopatologia das doenças psiquiátricas (MOYLAN *et al.*, 2013).

Outro ponto importante a ser lembrado é que as células produzem potenciais na membrana plasmática após estímulo, e, da mesma forma, quando não são excitadas, não há mudanças nas cargas iônicas que produzam a despolarização, mas mostram alguma queda de eletronegatividade. Isso é o suficiente para ativar a proliferação de genes da célula e iniciar o processo de fissão mitocondrial (PEREIRA, 2015). Além disso, o fluxo de prótons, que produz um gradiente eletroquímico, é iniciado pela mudança do potencial de membrana mitocondrial (PMM). Estudos mostram que, com o baixo PMM, a mitocôndria pode aumentar a atividade da CTE entre complexos enzimáticos (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

### Mitocôndria e Estresse Oxidativo

A produção de RL é um processo fisiológico e constante, mas quando em desequilíbrio, seja aumentando a produção de RL ou reduzindo a atividade de sistemas antioxidantes, pode ser prejudicial e levar ao EO (CEMILE; ÇIGDEM, 2016). Também pode danificar a membrana celular, gerando peroxidação lipídica e alterando o transporte transmembrana (OBEAGU, 2018). Os RLs são moléculas instáveis e altamente reativas com outras moléculas, produzidas pelo metabolismo aeróbico celular e possuem, pelo menos, um elétron desemparelhado na camada mais externa. Os RLs mais comumente relatados são: superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), peróxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e peróxil-lipídeo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) (LUSHCHAK, 2015). O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é formado a partir da primeira redução de  $\text{O}_2$  com um elétron e produzido basicamente em mitocôndrias, microsomas e peroxissomas. Possui pouca reatividade em meio aquoso, e

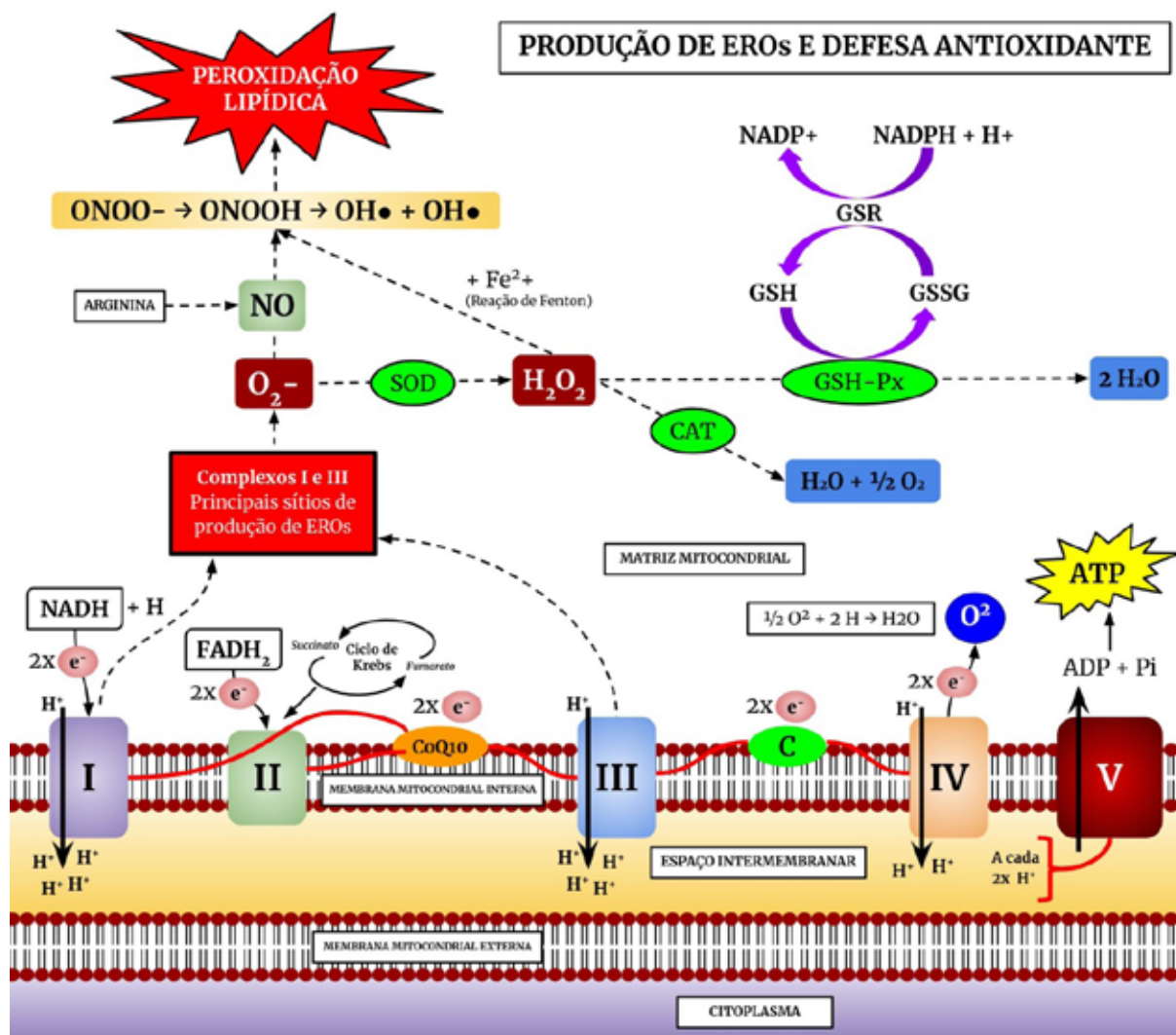
suas reações podem desencadear a formação de  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e, quando em meio ácido, de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é altamente tóxico para as células em razão da sua longa meia-vida e sua capacidade de atravessar as membranas lipídicas, também reagindo com a membrana eritrocitária e proteínas ligadas ao ferro, causando danos às moléculas por meio da geração de novas EROs, como  $\text{OH}^\bullet$  (MONICZEWSKI *et al.*, 2015). Conforme observado na Figura 2, as membranas plasmáticas são as estruturas celulares mais susceptíveis aos efeitos deletérios dos RLs, uma vez que a peroxidação lipídica altera sua estrutura, reduzindo a seletividade no transporte iônico e a sinalização transmembrana, prejudicando sua permeabilidade e, conseqüentemente, o transporte celular. Essas alterações podem resultar em morte celular, uma vez que há a liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos da lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA), causado principalmente por radicais  $\text{OH}^\bullet$ , e que pode ser mensurado mediante análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Os níveis de MDA são largamente utilizados como marcadores da peroxidação lipídica nos estados de EO (FRANÇA *et al.*, 2013). Também EROs e ERNs apresentam ação sobre o DNA, principalmente o radical  $\text{OH}^\bullet$ , que leva às alterações na expressão gênica, propiciando o desenvolvimento de numerosos processos patológicos crônicos, como câncer e doenças neurodegenerativas. A CTE, na membrana mitocondrial interna, sob condições normais, converte 1-5% de  $\text{O}_2$  em EROs (GHEZZI; ZEVIANI, 2012). Além disso, a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e outras EROs ocorrem, principalmente, em dois pontos na CTE: no complexo I (NADH) e no complexo III (ubiquinona – citocromo c redutase). O complexo I e o III podem ser danificados pelo radical  $\text{OH}^\bullet$ . Este radical é altamente reativo e pode causar danos irreparáveis ao mtDNA (KAUPPILA; STEWART, 2015). Concentrações aumentadas de radicais superóxidos, que podem ocorrer em razão de danos no mtDNA, contribuem para a geração do EO, diminuindo a síntese de proteínas importantes para o transporte de elétrons (CASTRO *et al.*, 2012). A formação de RL pode ocorrer de maneira enzimática e não enzimática. São exemplos de reações enzimáticas que envolvem a produção de EROs: a cadeia respiratória mitocondrial, a síntese de prostaglandinas e o sistema do citocromo P450 (SALIM, 2014). Reações não enzimáticas incluem a produção de RL por meio da interação do oxigênio com compostos inorgânicos, como radiação ionizante e Oxphos na mitocôndria. A forma oxidada de  $\text{NAD}^+$  na membrana mitocondrial interna é consequência da Oxphos, que é uma das principais fontes de produção de EROs (SHAFIQUE *et al.*, 2017).

Para reduzir os danos causados pela produção de RL, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em enzimático e não enzimático. Antioxidantes não enzimáticos incluem endógenos como glutathiona (GSH), que têm a função de remover RLs tóxicos, ou seja, convertê-los em produtos intermediários não tóxicos, e os exógenos, em que a grande maioria deles são obtidos a partir de fontes alimentares, que podem incluir vitaminas C, E ( $\alpha$ -tocoferol), carotenoides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que são importante na manutenção da saúde humana (AWAD; ALDOSARI; ABID, 2018). Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e abrangem um grupo diverso de enzimas que metaboliza RL, repara estruturas celulares ou conjuga diretamente xenobióticos e lipídios peroxidados. Os antioxidantes dessa fase incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona S-transferase (GST),  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase (GCS), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR) (JEEVA *et al.*, 2015). A SOD é a primeira enzima que atua como um componente primário contra as EROs. É responsável por catalisar e dismutar moléculas  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) (DAYAL *et al.*, 2017), exercendo uma ação protetora contra danos no DNA. Outras enzimas antioxidantes no sistema endógeno, essenciais para evitar a morte celular, são a CAT e a GSH-Px (KRISHNAMURTHY; WADHWANI, 2012). A CAT é abundante em quase todos os tecidos, localizados principalmente em peroxissomas, catalisando a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , reduzindo o dano oxidativo (TODOROVIĆ *et al.*, 2016). O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em baixas concentrações, tende a regular processos fisiológicos como proliferação celular, metabolismo de carboidratos, ativação plaquetária e função mitocondrial. Em altas concentrações, no entanto, causam danos às células. A GSH-Px é uma importante enzima intracelular que desempenha um papel crucial na inibição do processo de peroxidação lipídica e, portanto, protege as células do EO. Da mesma forma que a CAT, ela age catalisando a detoxificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Este processo consiste na redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por GSH na presença de GSH-Px, formando um composto chamado glutathiona oxidada (GSSG), que possui uma ponte dissulfeto (UYS; MULHOLLAND; TOWNSEND, 2014). Conforme mostrado na Figura 2, a GSSG é reduzida pela enzima glutathiona redutase, usando elétrons derivados da NADPH, que é formada na via das pentoses fosfato sob a ação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (CASSIA *et al.*, 2018). O SNC é particularmente vulnerável a danos oxidativos porque o encéfalo usa grandes quantidades de oxigênio, produzindo um excesso de EROs, e tem capacidade antioxidante limitada.

Também no cérebro, os níveis de glutatona são baixos, comparativamente com outros tecidos e/ou células, e estes valores diminuídos podem torná-lo mais sensível a substâncias tóxicas, evidenciando que a glutatona é essencial para o funcionamento do SNC (TODOROVIC *et al.*, 2016). Evidências recentes demonstram que a sinalização por EROs tem um papel importante como segundo mensageiro em células imunes inatas e adaptativas. O sistema imune inato responde a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ativando receptores de vigilância, como receptores Toll-like (TLRs), receptores semelhantes a NOD (NLRs) e receptores de helicase RIG-like (RLR).

EROs são necessárias para a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , interleucina 8 (IL-8), interferon beta (IFN $\beta$ ) para uma resposta imunológica adequada, controle de patógenos ou reparo de dano tecidual, uma vez que baixos níveis de EROs mantêm um sistema imunológico saudável (MITTAL *et al.*, 2014). Uma diminuição significativa ou aumento nos níveis de EROs, no entanto, inibem ou hiperativam as respostas imunes inflamatórias adequadas, levando a patologias. A exposição crônica às EROs promove diversas alterações na CTE, ocasionando a perda da formação de ATP, produzindo graves danos em proteínas, lipídios e DNA, e, com isso, produzindo diversas pato-

Figura 2 – Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes



\* Sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) e defesa antioxidante enzimática. Os elétrons derivados do metabolismo celular atingem o complexo I ou II por meio de NADH ou FADH<sub>2</sub>, respectivamente. Esses elétrons são, então, transferidos para a coenzima Q (ubiquinona), uma transportadora de elétrons do complexo I ou II, para III. Neste último, os elétrons são deslocados do citocromo b para o citocromo c e consequentemente transferidos para o Complexo IV (citocromo C oxidase), quando reduzem o O<sub>2</sub>. Esses elétrons são transportados por intermédio de complexos de proteínas mitocondriais e são acoplados para enviar prótons para o espaço intermembranar. O gradiente eletroquímico gerado é usado pelo Complexo V para a síntese de ATP. Os complexos I e II são responsáveis pela produção do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que é removido pela enzima antioxidante SOD e, em seguida, produz peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é removido pelas enzimas CAT e GSH-Px. O superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem levar à produção de radicais hidroxila (OH•), causando lipoperoxidação e lesão celular.

logias psiquiátricas dentre elas o TB (SCOLA *et al.*, 2016). Para finalizar, este processo foi demonstrado em um importante estudo realizado por Wollenhaupt-Aguiar *et al.* (2016), que observaram que alterações bioquímicas do soro de pacientes com TB, tanto nos estágios iniciais quanto nos tardios, induziram uma neurotoxicidade em cultura de células neuronais SH-SY5Y. Foi observada uma diminuição da viabilidade celular com forte redução da densidade de neuritos, principalmente nos estágios tardios da doença.

### Estresse Oxidativo e Transtorno Bipolar

Como já descrito anteriormente, o SNC é particularmente vulnerável ao EO, isso em razão do elevado consumo de oxigênio e, conseqüentemente, da geração de RL, e também por causa da capacidade antioxidante relativamente baixa desta estrutura. Níveis oxidativos neuronais aumentados podem ter efeitos deletérios na transdução de sinal, plasticidade e resiliência celular (OLMEZ; OZYURT, 2012). Diferentes estudos sugerem que a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante na fisiopatologia do TB. Estes estudos mostraram que o aumento do EO serve para sinalizar a disfunção mitocondrial, produzindo uma diminuição na atividade da CTE, podendo ser mensurado tanto no sangue periférico quanto em cérebros *post mortem* de pacientes com TB (DE SOUSA *et al.*, 2014). Desta forma, o CK é crítico para a atividade mitocondrial, pois produz substratos que alimentam a Oxphos na CTE mitocondrial. Apesar, entretanto, da importância, poucos estudos foram realizados para avaliar a atividade destas enzimas do CK em pacientes com TB. Um destes estudos foi realizado com 18 pacientes com TB em depressão em fase inicial da doença e virgens de tratamento (DE SOUSA *et al.*, 2015). Observou-se que não houve alteração na atividade enzimática no CK em comparação aos controles, provavelmente em virtude dos mecanismos compensatórios que impediram, nas fases iniciais da doença, que elas ocorressem. Não há estudos, entretanto, demonstrando alterações em fases mais tardias da doença. Também é possível que as alterações nas enzimas no CK estejam presentes apenas em fases maníacas, mas não nas fases depressivas, como sugerido em estudo com modelo animal em mania, que apresentou diminuição da atividade das enzimas do CK (FEIER *et al.*, 2013). Da mesma forma, ocorreu diminuição da enzima malato desidrogenase em cérebro *post mortem* de pacientes com maior tempo de evolução da doença (LEE *et al.*, 2007). O papel do EO na fisiopatologia do TB tem sido investigado em vários estudos que relatam, consistentemente, mudanças

nas enzimas antioxidantes, na peroxidação lipídica e nos níveis de NO•, importantes marcadores do EO (TUNÇEL *et al.*, 2015). Os níveis séricos de TBA-RS, durante as fases de mania ou depressão, foram relatados como sendo maiores quando comparados a controles saudáveis (SIWEK *et al.*, 2016). A exposição aguda a EROs levaria ao mau funcionamento dos complexos centrais de elétrons Fe-S na CTE, nos complexos I, II e III, resultando na decomposição da produção de energia mitocondrial (FREDERICO *et al.*, 2012). Além disso, mudanças nas enzimas antioxidantes, CAT, SOD, GSH-Px e peroxidação lipídica, identificada pelo aumento do TBA-RS e danos ao DNA, foram relatadas no TB. No TB ocorre uma diminuição dos níveis de GSH principalmente no córtex pré-frontal dos pacientes (GAWRYLUK *et al.*, 2011). Quanto às enzimas antioxidantes, aumentos séricos foram observados em pacientes tanto em fase maníaca quanto depressiva em relação aos controles saudáveis na maior parte das pesquisas. Halliwell (2006) demonstrou aumento dos níveis de SOD, CAT e GSH-Px em pacientes com TB tanto em fase maníaca quanto depressiva. Salim *et al.* (2011) também relataram um aumento na atividade do SOD em pacientes medicados ou não com TB durante um episódio maníaco. Outro estudo encontrou um aumento na atividade da SOD em pacientes durante episódios agudos de depressão bipolar, mas não em pacientes eutímicos (SINGH; SINGH; CHAN, 2010). A atividade da catalase também diminuiu em pacientes eutímicos, mas aumentou em pacientes sem medicação durante a mania (RAFFA *et al.*, 2012). Curiosamente, Vasconcelos-Moreno *et al.* (2017) encontraram a atividade da GSH-Px diminuída em pacientes com TB em comparação com pacientes saudáveis, e demonstraram um aumento de danos no DNA em pacientes com depressão bipolar. Isso demonstra que a gravidade dos sintomas depressivos e maníacos tem uma correlação positiva com os danos no DNA (ANDREAZZA *et al.*, 2010). Em relação à oxidação da proteína mitocondrial, foi demonstrado que os pacientes com TB apresentam níveis mais elevados do que os encontrados nos controles (CHUNG *et al.*, 2013). Também foi observado que existe uma correlação negativa entre a intensidade da depressão e a atividade do complexo II nos linfócitos de pacientes bipolares em depressão, assim como uma correlação positiva entre a depressão e os níveis de SOD, TBA-RS e proteínas carboniladas. Os parâmetros do EO mitocondrial e da atividade do complexo II desempenham papéis importantes no TB (VALVASSORI *et al.*, 2018). Todos estes resultados sugerem que as alterações nas enzimas antioxidantes podem mudar em virtude do tratamento e as fases da doença. As disfunções mitocondriais, a partir

da ativação das vias inflamatórias, estão presentes no TB. Níveis mais altos de citocinas inflamatórias e diminuição da atividade do complexo I da CTE foram encontrados no cérebro e células periféricas de pacientes com TB, levando ao aumento da produção de EROs mitocondriais (KIM; CHEN; ANDREAZZA, 2015). O mesmo foi encontrado por Kim *et al.* (2016), mostrando que a ativação do sistema inflamatório, por meio de níveis aumentados de caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$ , induz à produção de EROs, provocando alterações mitocondriais na CTE. Em recente meta-análise exploratória realizada por Rowland *et al.* (2018), que incluiu 53 estudos, compreendendo 2.467 pacientes com TB e 2.360 controles saudáveis, separados por estado afetivo (eutímia, mania, depressão) e avaliando 14 diferentes biomarcadores para TB, tais como neurotrofinas, marcadores inflamatórios e de EO, observaram que uma combinação de diferentes biomarcadores, como IL-6, BDNF, TNF- $\alpha$  e sTNFR1, apresentavam taxas alteradas de forma diferenciada durante cada estágio de humor. Este resultado pode diferenciar pacientes com TB de controles saudáveis e indicar uma fase específica de humor. Finalmente, o uso de medicações podem interferir no EO. O carbonato de lítio e o ácido valpróico são drogas utilizadas no tratamento do TB, apresentando a estabilização do humor, proporcionando efeitos antioxidantes e protetores para os sintomas do TB, produzindo aumento da função mitocondrial. O lítio aumentou diretamente a atividade do complexo I da CTE mitocondrial (SUN *et al.*, 2006) e ambas as substâncias podem induzir a fosforilação do complexo III e V, aumentando a produção energética (CORENA-McLEOD *et al.*, 2013). Assim, o EO piora a função mitocondrial e a disfunção gera EO, um influenciando o outro. Contudo, os medicamentos atuam melhorando a função mitocondrial como um todo, o que poderia explicar a modulação do humor com o tratamento.

## CONCLUSÃO

Compreender os mecanismos fisiopatológicos e sistêmicos do TB contribui significativamente para melhorar a compreensão da atividade da doença. A disfunção que decorre de múltiplos episódios de humor do TB demonstra evidências fortes que sugerem seu envolvimento com EO e, conseqüentemente, com os danos da função mitocondrial. A exposição aguda à EROs e ERNs leva a um mau funcionamento dos complexos centrais de elétrons Fe-S na CTE, resultando na queda de produção de energia mitocondrial. Além disso, mudanças nas enzimas antioxidantes CAT, SOD e

GSH-Px, peroxidação lipídica identificada pelo aumento do TBA-RS e danos ao mtDNA, foram relatados nos episódios de depressão e mania bipolar.

Essa revisão contribui para a compreensão deste transtorno complexo e multidimensional, e pode revelar alvos para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença bipolar.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PAGGI, D. *et al.* Multifunctional cytochrome *c*: learning new tricks from an old dog. *Chem Rev*, v. 117, n. 21, p. 13.382-13.460, 2017.
- ANDREAZZA, A. C. *et al.* Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 67, p. 360-368, 2010.
- ANGRIMANI, D. S. R. *et al.* Tools for evaluating the functionality of sperm mitochondria. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 39, n. 2, p. 277-283, 2015.
- ASKEW, K. *et al.* Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell reports*, v. 18, p. 391-405, 2017.
- AWAD, M. A.; ALDOSARI, S. R.; ABID, M. R. Genetic alterations in oxidant and anti-oxidant enzymes in the vascular system. *Front Cardiovasc Med*, v. 9, p. 105-107, 2018.
- BERK, M. *et al.* Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v. 35, p. 804-817, 2011.
- BJÖRKHOLM, P. *et al.* Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 112, n. 33, p. 10.154-10.161, 2015.
- CASSIA, R. *et al.* Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO<sub>2</sub> and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers Plant Sci*, v. 9, p. 1-11, 2018.
- CASTRO, M. D. R. *et al.* Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Exp. Gerontol*, v. 47, n. 1, p. 29-37, 2012.
- CEMILE, M. S.; ÇIGDEM, E. The effects of oxidative stress and some of the popular antioxidants on reproductive system: A Mini Review. *J Nutr Food Sci*, v. 6, n. 2, p. 1-3, 2016.
- CHEN, Y.; SHENG, Z. Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *Journal of Cell Bio*, v. 202, n. 2, p. 351-364, 2013.
- CHU, C. T. Mechanisms of selective autophagy and mitophagy: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, v. 122, p. 23-34, 2019.
- CHUNG, C. P. *et al.* Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Res*, v. 206, n. 2, p. 213-216, 2013.
- CLEMENTE, A. *et al.* Bipolar disorder prevalence: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2015.

- CORENA-MCLEOD, M. *et al.* New model of action for mood stabilizers: phosphoproteome from rat pre-frontal cortex synaptoneurosomal preparations. *PLoS One* v. 8, n. 5, e52147, 2013.
- DAYAL, S. *et al.* Deficiency of superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy and vascular dysfunction in hyperhomocysteinemia. *PLoS One*, v. 12, n. 4, p. 1-15, 2017.
- DE SOUSA, R. T. *et al.* Targeting mitochondrially mediated plasticity to develop improved therapeutics for bipolar disorder. *Expert Opin. Ther. Targets*, v. 18, p. 1.131-1.147, 2014.
- DE SOUSA, R. T. *et al.* Regulation of leukocyte tricarboxylic acid cycle in drug-naïve Bipolar Disorder. *Neurosci Lett*, v. 605, p. 65-68, 2015.
- DING, W. X. *et al.* Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J Biol Chem*, v. 7, p. 42.373-42.378, 2012.
- ENRÍQUEZ, J. A. Supramolecular organization of respiratory complexes. *Annu Rev Physiol*, v. 78, p. 533-561, 2016.
- FEIER, G. *et al.* Lithium and valproate modulate energy metabolism in an animal model of mania induced by methamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav*, v. 103, p. 589-596, 2013.
- FERENSZTAJN, E.; RYBAKOWSKI, J. Staging of bipolar affective illness. *Psychiatria Polska*, v. 46, n. 4, p. 613-626, 2012.
- FÖCKING, M. *et al.* Proteomic analysis of the postsynaptic density implicate synaptic function and energy pathways in bipolar disorder. *Translational Psychiatry*, v. 6, p. 1-9, 2016.
- FRANÇA, B. K. *et al.* Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma. *Jornal Português de Gastrenterologia*, v. 20, n. 5, p. 199-200, 2013.
- FREDERICO, A. *et al.* Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Neurol. Sci*, v. 322, p. 254-262, 2012.
- GAMA, C. S. *et al.* Staging and neuroprogression in bipolar disorder: a systematic review of the literature. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 35, p. 70-74, 2013.
- GAWRYLUK, J. W. *et al.* Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 14, n. 1, p. 123-130, 2011.
- GEISSMANN, F. *et al.* Unraveling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 6, p. 453-460, 2010.
- GHEZZI, D.; ZEVIANI, M. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*, v. 748, p. 65-106, 2012.
- GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity*, v. 44, p. 439-449, 2016.
- GINHOUX, F. *et al.* New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation, and function. *Nat Immunol*, v. 17, p. 34-40, 2016.
- GOMEZ, P. E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, v. 518, p. 547-551, 2015.
- GRANDE, I. *et al.* Mediators of allostasis and systemic toxicity in bipolar disorder. *Physiol Behav*, v. 106, n. 1, p. 46-50, 2012.
- GRANDE, I. *et al.* Staging bipolar disorder: clinical, biochemical, and functional correlates. *Acta Psychiatr Scand*, v. 129, n. 6, p. 437-444, 2014.
- HÄLLBERG, B. M.; LARSSON, N. G. Making proteins in the powerhouse. *Cell Metab*, v. 20, n. 2, p. 226-240, 2014.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant. Physiol*, v. 141, p. 312-322, 2006.
- HELLWIG, S.; HEINRICH, A.; BIBER, K. The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Front. Cell Neurosci*, v. 16, p. 7-71, 2013.
- HERZ, J. *et al.* Myeloid cells and their relationship with the central nervous system. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 943-956, 2017.
- HONG, S.; DISSING-OLESEN, L.; STEVENS, B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current opinion in neurobiology*, v. 36, p. 128-134, 2016.
- HOPPE, H. C. Mitochondrial calcium channels. *Febs Letters*, v. 584, n. 10, p. 1.975-1.981, 2010.
- IVANNIKOV, M. V.; SUGIMORI, M.; LLINÁS, R. R. Synaptic vesicle exocytosis in hippocampal synaptosomes correlates directly with total mitochondrial volume. *J. Mol. Neurosci*, v. 49, p. 223-230, 2013.
- JEEVA, J. S. *et al.* Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 7, n. 2, p. 331-333, 2015.
- JUSTER, R. *et al.* Sexual orientation and disclosure in relation to psychiatric symptoms, diurnal cortisol, and allostatic load. *Psychosomatic Medicine*, v. 75, n. 2, p. 103-116, 2013.
- KANG, Y.; FIELDEN, L. F.; STOJANOVSKI, D. Mitochondrial protein transport in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 76, p. 142-153, 2018.
- KAPCZINSKI, F. *et al.* Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neuroscience & Biobehavioral*, v. 32, n. 4, p. 675-692, 2008.
- KAUPPILA, J. H.; STEWART, J. B. Mitochondrial DNA: radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, v. 1847, n. 11, p. 1.354-1.361, 2015.
- KAWABORI, M.; YENARI, M. A. The role of the microglia in acute CNS injury. *Metabolic brain disease*, v. 30, n. 2, p. 381-392, 2014.
- KETTENMANN, H. *et al.* Physiology of microglia. *Physiol. Rev*, v. 91, p. 461-553, 2011.
- KIM, H. K.; CHEN, W.; ANDREAZZA, A. C. The potential role of the NLRP3 inflammasome as a link between mitochondrial complex I dysfunction and inflammation in bipolar disorder. *Neural Plasticity*, v. 2015, p. 1-10, 2015.



- KIM, H. K. *et al.* Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post mortem frontal cortex from patients with bipolar disorder: A potential mediator between mitochondria and immune-activation. *Journal of Psychiatric Research*, v. 72, p. 43-50, 2016.
- KRISHNAMURTHY, P.; WADHWANI, A. Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. *InTech*, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health>. Acesso em: 21 jun. 2019.
- LEE, B. D. *et al.* Malic enzyme 2 and susceptibility to psychosis and mania. *Psychiatry Res.* v. 150, n. 1, p. 1-11, 2007.
- LUSHCHAK, V. Free radicals reactive oxygens species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological Interactions*, v. 224, p. 164-175, 2015.
- MACASKILL, A. F.; KITTLER, J. T. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol.* v. 20, n. 2, p. 102-112, 2010.
- MANSUR, R. B.; BRIETZKE, E. The “selfish brain” hypothesis for metabolic abnormalities in bipolar disorder and schizophrenia *Trends Psychiatry Psychother.* v. 34, n. 3, 2012.
- MCEWEN, B. S. Allostasis, allostatic load, and the aging nervous system: role of excitatory amino acids and excitotoxicity. *Neurochem Res*, v. 25, p. 1.219-1.231, 2000.
- MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu.Rev. Med.* v. 62, p. 431-445, 2011.
- MILENKOVIC, D. *et al.* The enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metab.* v. 25, p. 765-776, 2017.
- MITTAL, M. *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, v. 20, n. 7, p. 1.126-1.167, 2014.
- MONICZEWSKI, A. *et al.* Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports*, v. 67, p. 560-568, 2015.
- MOYLAN, S. *et al.* The neuroprogressive nature of the major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implication. *Mol Psychiatry*, v. 18, n. 5, p. 595-606, 2013.
- NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Review role of microglial M1/M2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 12, p. 1.028-1.048, 2014.
- NGUYEN, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, v. 480, p. 104-108, 2011.
- OBEAGU, E. I. A review on free radicals and antioxidants. *Int. J Curr Res Med Sci*, v. 4, n. 2, p. 123-133, 2018.
- OLMEZ I.; OZYURT H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem. Int.*, v. 60, n. 2, p. 208-212, 2012.
- PEI, L.; WALLACE, D. C. Mitochondrial etiology of neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry*, v. 83, n. 9, p. 722-730, 2018.
- PEREIRA, B. Biogênese mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcripcional *Rev Bras Educ Fis Esporte*, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 687-703, 2015.
- PFAFFENSELLER, B. *et al.* Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*, v. 13, n. 7, p. 827-842, 2013.
- PRINZ, M.; PRILLER, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci*, v. 20, p. 136-144, 2017.
- RAFFA, M. *et al.* Reduced antioxidante defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* v. 39, n. 2, p. 371-375, 2012.
- ROWLAND, T. *et al.* Neurotrophins, cytokines, oxidative stress mediators and mood state in bipolar disorder: systematic review and meta-analyses. *Br J Psychiatry*, v. 213, n. 3, p. 514-525, 2018.
- SALIM, S. *et al.* Novel role of RGS2 in regulation of antioxidant homeostasis in neuronal cells. *FEBS Lett*, v. 585, n. 9, p. 1.375-1.381, 2011.
- SALIM, S. Oxidative stress and psychological disorders. *Curr Neuropharmacol*, v. 12, n. 2, p. 140-147, 2014.
- SCAINI, G. *et al.* Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: Evidence, pathophysiology and translational implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 68, p. 694-713, 2016.
- SCOLA, G. *et al.* Lipid peroxidation biomarkers in adolescents with or at high-risk for bipolar disorder. *J. Affect. Disord*, v. 192, p. 176-183, 2016.
- SHAFIQUE, E. *et al.* Mitochondrial redox plays a critical role in the paradoxical effects of NADPH oxidase derived ROS on coronary endothelium. *Cardiovasc Res*, v. 113, p. 234-246, 2017.
- SIGITOVA, E. *et al.* Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 71, n. 2, p. 77-103, 2017.
- SINGH, V.; SINGH, S. P.; CHAN, K. Review and meta-analysis of usage of ginkgo as an adjunct therapy in chronic schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol*, v. 13, n. 2, p. 257-271, 2010.
- SIWEK, M. *et al.* Thiobarbituric Acid-Reactive Substances: Markers of an Acute Episode and a Late Stage of Bipolar Disorder. *Neuropsychobiology*, v. 73, p. 116-122, 2016.
- SUN, X. *et al.* Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* v. 31, p. 189-196, 2006.
- SUN, T. *et al.* Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength. *Cell Rep*, v. 4, n. 3, p. 413-419, 2013.
- SYLVIA, L. G. *et al.* Medical burden in bipolar disorder: findings from the Clinical and Health Outcomes Initiative in Comparative Effectiveness for Bipolar Disorder study. *Bipolar Disord*, v. 17, n. 2, p. 212-223, 2015.
- TODOROVIĆ, N. *et al.* Olanzapine modulation of hepatic oxidative stress and inflammation in socially isolated rats. *Pharmaceutical Sciences*, v. 81, p. 94-102, 2016.

TUNÇEL, Ö. K. *et al.* Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. *Psychiatry Research*, v. 228, n. 3, p. 688-694, 2015.

UYS, J. D.; MULHOLLAND, P. J.; TOWNSEND, D. M. Glutathione and redox signaling in substance abuse, *Biomed. Pharmacother*, v. 68, n. 6, p. 799-807, 2014.

VALVASSORI, S. *et al.* Increased oxidative stress in the mitochondria isolated from lymphocytes of bipolar disorder patients during depressive episodes. *Psychiatry Research*, v. 264, p. 192-201, 2018.

VASCONCELOS-MORENO, M. P. *et al.* Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 6, p. 445-454, 2017.

VIDYASAGAR, A. What are mitochondria? *Live Science*. 2015. Disponível em: <http://www.livescience.com/50679-mitochondria.html> 2015. Acesso em: 21 jun. 2019.

VIETA, E. *et al.* The clinical implications of cognitive impairment and allostatic load in bipolar disorder. *Eur Psychiatry*, v. 28, n. 1, p. 21-29, 2013.

WIEDEMANN, N.; PFANNER, N. Mitochondrial machineries for protein import and assembly. *Annu Rev Biochem*, v. 20, n. 86, p. 685-714, 2017.

WOLLENHAUPT-AGUIAR, B. *et al.* Reduced Neurite Density in Neuronal Cell Cultures Exposed to Serum of Patients with Bipolar Disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology Rapid Communication*, v. 19, n. 10, p. 1-5, 2016.

WU, R. *et al.* The relationship between neurotrophins and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*, v. 14, p. 51-65, 2014.

ZHANG, C. L. *et al.* Activity-dependent regulation of mitochondrial motility by calcium and Na/K-ATPase at nodes of Ranvier of myelinated nerves. *J Neurosci*, v. 30, p. 3.555-3.566, 2010.

ZHU, X.; LEE, B.; CHEN, W. Functional energetic responses and individual variance of the human brain revealed by quantitative imaging of adenosine triphosphate production rates. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 38, n. 6, p. 959-972, 2018.

## Extrato Hidroetanólico de Gengibre (*Zingiber officinale*) Inibe a Oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), *In Vitro*

Stéfani de Moraes<sup>1</sup>, Amanda Felipe Portella<sup>1</sup>, Andressa Leal Zambra<sup>1</sup>, Bruna Morgan da Silva<sup>1</sup>,  
Natacha Cossetin Mori<sup>1</sup>, Isadora Aguirre Rosa<sup>2</sup>, Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle<sup>1</sup>,  
Josiane Woutheres Bortolotto<sup>1</sup>, Gabriela Bonfanti Azzolin<sup>3</sup>

### RESUMO

**Introdução:** O uso de antioxidantes naturais para prevenir a ocorrência de aterosclerose e reduzir o risco de doenças cardiovasculares é uma tendência em ascensão. **Objetivo:** Considerando a oxidação da LDL como fator crucial no desenvolvimento da aterosclerose, e as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiangiogênicas do gengibre (*Zingiber officinale*), o objetivo do presente estudo é avaliar o conteúdo fitoquímico, mecanismos antioxidantes e o potencial do Extrato Hidroetanólico de Rizoma de Gengibre (EHEG) sobre a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) de pacientes hipercolesterolêmicos, *in vitro*. **Método:** No EHEG foram avaliados teores de compostos fitoquímicos e mecanismos antioxidantes. A partir de amostras de soro dos pacientes (n=12), a fração LDL foi isolada, previamente tratada com EHEG (10 - 100 µg/ml) e submetida à indução oxidativa com dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH- 10 mM). Após, o nível de lipoperoxidação foi medido por meio da determinação espectrofotométrica de substâncias relativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). **Resultados:** O EHEG possui compostos fenólicos totais (357,68 ± 39,80 mg AG/g), flavonoides (30,37 ± 5,10 mg Q/g), taninos (51,99 ± 11,88 mg CA/g) e vitamina C (21,53 ± 1,43 mg Vit C/g), além de apresentar atividade removedora de radicais de NO (IC<sub>50</sub> = 40,53 µg/mL) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 1,42 mg/mL). Quanto à inibição da oxidação de LDL, observou-se que o EHEG, a partir da concentração de 50 µg/ml, foi efetivo em reduzir o dano oxidativo causado pelo AAPH. **Conclusão:** O gengibre possui atividade protetora contra a formação de LDL oxidada, sugerindo que seus compostos fitoquímicos conferem-lhe atividade antioxidante, podendo ser efetivo na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares, especialmente as relacionadas ao processo de aterosclerose.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Aterosclerose. Hipercolesterolemia. Produtos naturais. Estresse oxidativo.

### GINGER HYDROETHANOLIC EXTRACT INHIBITS OXIDATION OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL), IN VITRO

### ABSTRACT

**Introduction:** The use of natural antioxidants to prevent atherosclerosis and reduce the risk of cardiovascular disease is a growing trend. **Purpose:** Considering LDL oxidation as a crucial factor in the development of atherosclerosis, and the antioxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of ginger (*Zingiber officinale*), the aim of the present study is to evaluate the phytochemical content, antioxidant mechanisms and the potential of Ginger Rhizome Hydroethanolic Extract (EHEG), on low density lipoprotein (LDL) oxidation of hypercholesterolemic patients, *in vitro*. **Method:** In EHEG were evaluated contents of phytochemical compounds and antioxidant mechanisms. From patient serum samples (n = 12), the LDL fraction was isolated, previously treated with EHEG (10- 100 µg / ml) and subjected to oxidative induction with 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH- 10 mM). Afterwards, the lipoperoxidation level was measured through spectrophotometric determination of thiobarbituric acid-related substances (TBARS). **Results:** EHEG has total phenolic compounds (357.68 ± 39.80 mg AG/g), flavonoids (30.37 ± 5.10 mg Q/g), tannins (51.99 ± 11.88 mg CA/g) and vitamin C (21.53 ± 1.43 mg Vit C/g), besides presents NO (IC<sub>50</sub> = 40.53 µg / mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 1.42 mg/mL) radical scavenging activity. Regarding inhibition of LDL oxidation, it was observed that the EHEG, from the concentration of 50 µg/ml was effective in reducing the oxidative damage caused by AAPH. **Conclusion:** Ginger has protective activity against the formation of oxidized LDL, suggesting that its phytochemical compounds confer antioxidant activity, and may be effective in the prevention and/or treatment of cardiovascular diseases, especially those related to the process.

**Keywords:** Antioxidant. Atherosclerosis. Hypercholesterolemia. Natural products. Oxidative stress.

RECEBIDO EM: 27/9/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 11/11/2019

ACEITO EM: 6/2/2020

<sup>1</sup> Universidade de Cruz Alta – Unicruz. Cruz Alta/RS, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil.

<sup>3</sup> Autora correspondente. Universidade de Cruz Alta – Unicruz. Rodovia Municipal Jacob Della Mea, s/n, km 5,6 – Parada Benito, Cruz Alta/RS, Brasil. CEP 98020-290. <http://lattes.cnpq.br/1516086893514285>. <https://orcid.org/0000-0003-2602-6092>. [gbonfanti@unicruz.edu.br](mailto:gbonfanti@unicruz.edu.br)

## INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morbidade e mortalidade em populações ocidentais (NETO *et al.*, 2016), e, no Brasil, são a causa mais prevalente de morte dentre as doenças crônicas não transmissíveis (MALTA *et al.*, 2019). As DCVs promovem altos custos que implicam impactos socioeconômicos importantes, divididos entre pacientes, familiares e o Estado, em razão da elevada frequência de internações hospitalares, carência de profissionais e aposentadoria antecipada (NETO *et al.*, 2016).

O aumento do colesterol plasmático total é um importante fator de risco para a evolução das DCVs (MCCORMACK; DENT; BLAGDEN, 2016), posto que os efeitos patológicos da hipercolesterolemia devem-se especialmente à elevação dos níveis das lipoproteínas de baixa-densidade (LDL) na circulação (YAO *et al.*, 2017). Essas, por sua vez, podem acumular-se no espaço subendotelial, quando estarão expostas aos produtos oxidativos das células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas, que provocam o processo de lipoperoxidação, gerando, assim, a forma oxidada da LDL (LDL-ox), crucial na patogênese da aterosclerose. A LDL-ox induz as células a produzirem potentes ativadores celulares, promovendo a migração de células para o espaço subendotelial, que iniciam o processo de fagocitose das partículas de LDL-ox, formando as células espumosas. Posteriormente, há a ativação de uma cascata inflamatória e de coagulação, que dá origem à placa aterosclerótica. A placa tem um núcleo de material lipídico necrótico envolto por uma capa fibrosa suscetível a rupturas, as quais são responsáveis por ocasionar trombos, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e até morte súbita (CARVAJAL, 2015; CHERNYAVSKIY *et al.*, 2016).

A busca por estratégias eficazes usando antioxidantes naturais para prevenir a oxidação da LDL e reduzir o risco de DCVs, é uma tendência em ascensão. Investigações científicas demonstram o possível papel dos antioxidantes naturais, encontrados abundantemente em plantas, o reforço do mecanismo antioxidante endógeno e, ainda, o atraso ou supressão do estresse oxidativo envolvido no processo de aterogênese (ASSIS *et al.*, 2017; SRINIVASAN, 2014).

Nesse contexto, o gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta perene, endêmica da Índia e cultivada no Sul e Sudeste da Ásia, África, América Latina e Austrália (KHODAIE; SADEGHPOOR, 2015), sendo amplamente utilizada como tempero e alimento, bem como agente terapêutico na medicina tradicional de diver-

sas populações (AHMAD *et al.*, 2015). No Brasil é encontrada em regiões quentes e úmidas, desde o Amazonas até o Paraná (CORREA JUNIOR, 1994).

Preparações fitoquímicas dessa espécie vegetal vêm mostrando-se efetivas na ação antioxidante, antiangiogênica (TABIBI *et al.*, 2016), anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica (SHIRISH *et al.*, 2016), antitrombótica, imunomoduladora (AHMAD *et al.*, 2015), analgésica e antibacteriana (KHODAIE; SADEGHPOOR, 2015), além de atuar em distúrbios gastrointestinais e renais (YANG *et al.*, 2014).

Considerando, portanto, a LDL-ox um fator importante no processo patogênico da aterosclerose e consequentes DCVs, é de grande valor científico o estudo de compostos que possam atenuar esse processo e serem propostos como formas de tratamento e prevenção. Dessa forma, conhecendo a ampla utilização do gengibre e suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiangiogênica já descritas, o objetivo do presente estudo é avaliar o conteúdo fitoquímico, mecanismos antioxidantes e o potencial do Extrato Hidroetanólico de Rizoma de Gengibre (*Zingiber officinale*) (EHEG) sobre a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) de pacientes hipercolesterolêmicos, *in vitro*.

## METODOLOGIA

### Amostra

Foram selecionados 12 pacientes hipercolesterolêmicos que não faziam uso de medicamentos de forma contínua durante a coleta sanguínea para a realização de seus exames de rotina no Laboratório Escola de Análises Clínicas da Unicruz. Os dados gerais e de perfil lipídico dos pacientes encontram-se apresentados na Tabela 1. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicruz sob parecer número 991.132.

Tabela 1 – Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo

Variável	Dados
Sexo (F/M)	9/3
Idade (anos)	55,5 ± 21,16
Colesterol total (mg/dL)	217,58 ± 18,93
Triglicerídeos (mg/dL)	110,00 ± 22,83
Colesterol HDL (mg/dL)	68,57 ± 21,47
Colesterol LDL (mg/dL)	114,85 ± 28,56

Fonte: Os autores.

## Material vegetal

O material vegetal (rizomas) foi obtido de fontes comerciais, devidamente identificado na Universidade de Cruz Alta (Unicruz) e utilizado imediatamente. As amostras de rizoma foram secas em estufa com circulação de ar ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ), trituradas em moinho de facas e submetidas à maceração. Foi realizada a maceração hidroetanólica (EtOH:H<sub>2</sub>O 3:2, v/v) do material e o macerado foi submetido a agitações manuais diárias, por um período de sete dias (primeira maceração). Ao fim desse período, o material foi filtrado em algodão, seguindo-se de concentração em evaporador rotatório, à temperatura inferior a  $40^{\circ}\text{C}$ , para eliminação do etanol. O material vegetal foi novamente recoberto com nova quantidade do mesmo solvente (segunda maceração) por mais sete dias. Este segundo líquido extrativo também foi filtrado, concentrado e reunido ao primeiro, obtendo-se, assim, o extrato hidroetanólico do rizoma de gengibre (EHEG) (SIMÕES *et al.*, 2016). Esse foi seco até evaporação do líquido para obtenção do extrato na forma de pó.

## Quantificação espectrofotométrica de compostos fitoquímicos

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino, utilizando-se, para isto, a curva analítica com ácido gálico e a leitura em comprimento de onda de 725nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato em pó (mg AG/g) (SUBRAMANIAN; PADMANABAN; SARMA, 1965).

O teor de flavonoides totais foi medido com base no método de cloreto de alumínio colorimétrico. A análise foi realizada em triplicata, as absorbâncias determinadas em 510 nm e os resultados expressos em miligramas de quercetina por grama de extrato em pó (mg Q/g) (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999).

A quantificação de taninos condensados foi realizada a partir de uma modificação do método de Morrison *et al.* (1995). As análises foram realizadas em triplicata e as absorbâncias foram determinadas a 500 nm. O teor de taninos foi expresso em miligramas de catequina por grama de extrato em pó (mg C/g), baseado na curva padrão de catequina.

O teor de vitamina C foi determinado utilizando o método descrito por Benderitter *et al.* (1998), com base na reação com 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), e calculado com base na curva padrão. As análises fo-

ram realizadas em triplicata, determinadas a 520nm e os resultados expressos como miligramas de vitamina C por grama de extrato em pó (mg de VIT C/g).

## Determinação de compostos fenólicos por Clae

A análise foi realizada em triplicata por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (Clae), com coluna de fase reversa (C18). O método cromatográfico foi, de acordo com Evaristo e Leitão (2001), com algumas modificações. Foi utilizada fase móvel composta por ácido acético 1% (v/v) em água (A) e metanol (B), de acordo com um gradiente de eluição, volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ , temperatura da coluna de  $40^{\circ}\text{C}$  e vazão de 1,2 mL/min. O tempo da corrida foi de 45min e a detecção foi realizada em 280 nm. O extrato foi avaliado para a presença dos seguintes compostos fenólicos: rutina, quercetina, ácido clorogênico, (-)-epicatequina, ácido gálico, apigenina, ácido elágico e ácido rosmarínico. A identificação foi feita utilizando os cromatogramas obtidos em cada injeção, comparando-os com o espectro de absorção e tempo de retenção dos padrões.

## Avaliação dos mecanismos antioxidantes

O efeito de remoção do EHEG sobre o radical óxido nítrico (NO) foi medido de acordo com o método de Sreejayan e Rao (1997). Para o ensaio, o nitroprussiato de sódio (10 mM) foi misturado com extrato em diferentes concentrações, incubado por 150min e depois misturado com 0,5 mL de reagente de Griess, seguido de medida de absorbância a 546nm. No controle negativo, o extrato foi substituído por PBS (tampão fosfato salina). A capacidade de remoção de NO foi calculada usando a seguinte equação: Scavenger de NO (%) =  $[1 - (\text{Absorbância do extrato}/\text{Absorbância do controle})] \times 100$ . A expressão dos resultados foi dada pela IC50 (em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), calculada com auxílio da equação da reta interpolada com os dados de concentração (eixo das abcissas) e Scavenger de NO (%) (eixo das ordenadas). Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de ácido gálico.

A habilidade do EHEG de remover peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinada por meio do acompanhamento da taxa de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 230 nm, quando incubado com diferentes concentrações do extrato, conforme Ruch, Cheng e Klauinig (1989). A capacidade de remoção foi calculada usando a seguinte equação: Scavenger de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%) =  $[(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância do teste})/\text{Absorbância do controle}] \times 100$ . A expressão dos resultados foi dada pela IC50 (em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), calculada com auxí-

lio da equação da reta interpolada com os dados de concentração (eixo das abscissas) e Scavenger de  $H_2O_2$  (%) (eixo das ordenadas). Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de ácido gálico.

### Ensaio de oxidação de LDL

As amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante e, após, centrifugadas por 10 minutos a 3.000 RPMs para a obtenção do soro. Para o isolamento da LDL, a cada 100  $\mu$ L de soro foi adicionado 1 ml de tampão citrato de sódio (0,064 M) e heparina (50.000 UI/L) em pH 5,04. Após centrifugação a 3.000 RPM por 10 minutos, as lipoproteínas insolúveis foram precipitadas e posteriormente diluídas em 1ml de PBS, sendo o sobrenadante descartado (WIELAND; SEIDEL, 1983). O conteúdo de proteínas presente na amostra, então, foi medido pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

As lipoproteínas ajustadas a 100  $\mu$ g/mL foram pré-incubadas com o EHEG nas concentrações de 10 – 100  $\mu$ g/mL, por 30min. Após os pré-tratamentos, a modificação oxidativa da LDL deu-se por incubação com 10 mM de dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH), por 2 horas a 37°C. Para fins de comparação do efeito do EHEG com um composto fitoquímico de conhecida atividade antioxidante, utilizou-se ácido gálico (50  $\mu$ g/mL) como controle positivo.

Ao final do período de incubação foi avaliado o nível de peroxidação lipídica pela medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) espectrofotometricamente, usando ácido Tiobarbitúrico 0,67% (TBA) e ácido tricloroacético 20% (TCA). Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mL (OKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

### Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram avaliadas utilizando Anova de uma via seguida do pós-teste Tukey de comparações múltiplas. Os valores com  $p \leq 0,05$  foram considerados significativamente diferentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a capacidade do extrato hidroetanólico do rizoma de gengibre (EHEG) de proteger partículas de LDL de pacientes hipercolesterolêmicos do processo de oxidação *in vitro*, sugerindo seu papel benéfico na prevenção e terapia da aterosclerose.

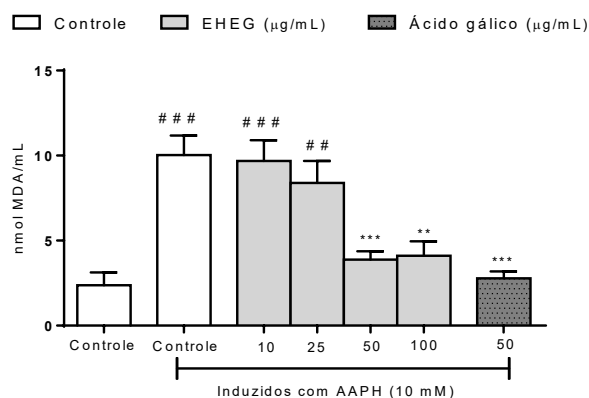
Analisando a Figura 1, podemos observar que o composto dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) foi efetivo na concentração utilizada para a indução da lipoperoxidação, demonstrada por meio dos níveis elevados de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais desse processo. O AAPH gera radicais peroxila que levam à oxidação de lipídeos a uma temperatura fisiológica (37°C em pH neutro) e a uma velocidade constante e reprodutível (PELUSO *et al.*, 2002). Diante disso, o AAPH tem sido extensivamente utilizado como uma fonte previsível e controlável de radicais livres, mimetizando o estresse oxidativo fisiológico em estudos de oxidação de eritrócitos, plasma, sangue total, células, tecidos e, até mesmo, de forma sistêmica (HE *et al.*, 2003), e em injúrias oxidativas que ocorrem em lipídeos e proteínas de LDL durante o processo aterogênico (BARCELOS *et al.*, 2011).

Quanto ao efeito do EHEG, podemos observar que o mesmo se mostrou eficaz em reduzir a oxidação das LDLs a partir da concentração de 50  $\mu$ g/ml (Figura 1), tornando os níveis de MDA nesses grupos semelhantes aos do grupo controle não induzido, e sugerindo uma completa proteção dessas partículas. Além disso, pode-se observar que o EHEG preveniu a oxidação das LDLs de forma semelhante ao ácido gálico, um antioxidante bem-estabelecido e fundamentado na literatura (NAKSURIYA; OKONOGI, 2015), que foi utilizado no presente trabalho como controle positivo de ação antioxidante. Existem vários ensaios para a avaliação da oxidação de LDL. Dentre eles, o TBARS quantifica espectrofotometricamente o nível de MDA, que é um dos produtos finais da reação em cadeia da lipoperoxidação (OKAWA; OHISHI; YAGI, 1979) e, portanto, demonstra o nível de oxidação da LDL ao final do período de incubação. Dessa forma, esse ensaio tem sido utilizado em outros estudos que avaliam a capacidade de produtos naturais de inibir a oxidação de LDL (DOS SANTOS *et al.*, 2018; CAI; CHEN; JIANG, 2018).

O papel do estresse oxidativo na formação de LDL-ox e seu envolvimento no processo de aterogênese já é amplamente discutido na literatura (CARVALAL, 2015; CHERNYAVSKIY *et al.*, 2016). Assim, a busca de antioxidantes provenientes de fontes naturais que possam retardar ou inibir esse processo, é importante estratégia de promoção à saúde da população.

Nesse contexto, há um interesse renovado no gengibre por suas propriedades antioxidantes e cardioprotetoras que vêm sendo demonstradas. No estudo de Fuhrman *et al.* (2013) investigou-se o efeito *in vivo* do extrato de gengibre sobre o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos com deficiência

Figura 1 – Efeito protetor do extrato hidroetanólico do gengibre (EHEG) na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL)



Efeito protetor do extrato hidroetanólico do gengibre (EHEG) na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), verificado a partir dos níveis de malondialdeído (MDA). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , diferentes do controle induzido; ### $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , diferentes do controle não induzido. Os dados foram verificados por análise de variância (Anova) seguida de teste de Tukey, e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=12$ ).

Fonte: Os autores.

de Apolipoproteína E, chegando ao resultado de que o consumo de diferentes concentrações de extrato de gengibre reduzia em até 60% a oxidação do colesterol LDL. Já outro estudo acerca das atividades antioxidantes do rizoma do gengibre, demonstrou a capacidade de diferentes extratos de impedir a oxidação de LDL induzida por íon  $\text{Cu}^{2+}$  e atribuiu tal efeito à presença de compostos bioativos fenólicos encontrados no gengibre, tais como o 6-gingerols, 8-gingerols, 10-gingerols e 6-shogaol (GUNATHILAKE; RUPASINGHE, 2014). Esse, entretanto, é o primeiro estudo que demonstra tais resultados com um extrato hidroetanólico e em modelo de indução com AAPH, que mimetiza o processo de oxidação fisiológica.

De fato, o gengibre é conhecido como um recurso natural de ampla distribuição e baixo custo, com altos teores de compostos fitoquímicos, que conferem a ele pronunciado efeito antioxidante (AKINOLA; AHMAD; MAZIAH, 2014; GHASEMZADEH; JAAFAR; RAHMAT, 2010). No presente estudo foi possível quantificar teores de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados e vitamina C (Tabela 1).

Dentre os compostos quantificados, destacam-se os flavonoides que possuem dois anéis aromáticos ligados por meio de três carbonos que formam um heterociclo oxigenado, e que apresentam propriedades antioxidantes à medida que inativam os radicais livres, convertendo-os em radicais livres relativamente inofensivos (VESKOUKIS; TSATSAKIS; KOURETAS, 2012). São encontrados em diversos alimentos do

Tabela 1 – Conteúdo de compostos fitoquímicos do Extrato Hidroetanólico de Gengibre (EHEG)

Compostos fenólicos totais (mg AG/g)	357,68 $\pm$ 39,80
Compostos flavonoides totais (mg Q/g)	30,37 $\pm$ 5,10
Taninos condensados (mg CA/g)	51,99 $\pm$ 11,88
Vitamina C (mg Vit C/g)	21,53 $\pm$ 1,43

Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM de três determinações. AG = ácido gálico; Q = quercetina; CA = catequina, Vit C = vitamina C.

Fonte: Os autores.

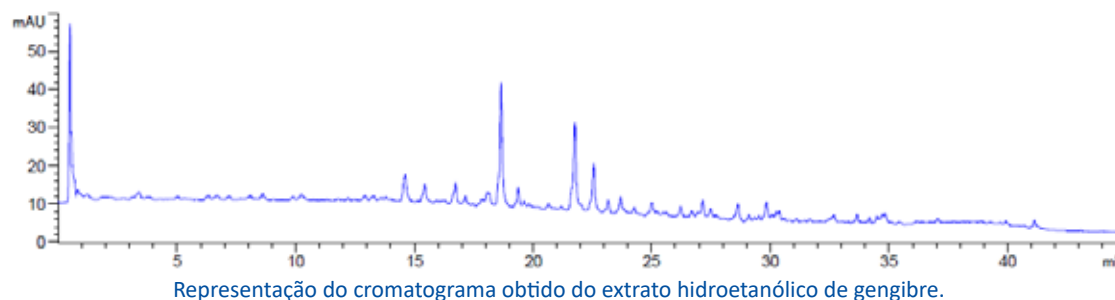
reino vegetal, e demonstram possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras que contribuem significativamente para a saúde humana, reduzindo o risco de DCV (FERRERA *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* mostraram a grande capacidade dos flavonoides em inibir a oxidação da LDL, chegando a ser superior à de antioxidantes clássicos, como o alfa-tocoferol, sugerindo efeito antiaterogênico dos flavonoides (ABOURASHED, 2013; VINSON *et al.*, 1995).

Já a Vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada a partir da glicose por plantas e muitos animais, mas, em razão da ausência de maquinaria enzimática específica, não é sintetizada pelo homem. Existem hipóteses bem-fundamentadas que a vitamina C pode desempenhar um papel fundamental na prevenção de DCV, por suas capacidades antioxidantes e o papel desses antioxidantes na prevenção de alterações oxidativas da LDL (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARÉ, 2016).

Na análise dos compostos fenólicos por Clae, foi possível verificar a ausência dos compostos testados: rutina, quercetina, ácido clorogênico, (-)-epicatequina, ácido gálico, apigenina, ácido elágico e ácido rosmarínico (Figura 2), indicando que a atividade antioxidante evidenciada se deve aos outros compostos que foram quantificados pelo método espectrofotométrico deste estudo. Tal resultado está relacionado à particularidade de conteúdo fitoquímico da espécie, que já apresenta descrito na literatura os compostos 6-gingerols, 8-gingerols, 10-gingerols e 6-shogaol como principais compostos fenólicos (GUNATHILAKE; RUPASINGHE, 2014).

Com o intuito de investigar os mecanismos da ação antioxidante do EHEG, o presente estudo avaliou sua capacidade removedora ante as espécies reativas peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical óxido nítrico (NO) (Tabela 2). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o óxido nítrico, conferem regulação redox de funções celulares essenciais, envolvidas na diferenciação, proliferação, migração e apoptose, além de iniciar e catalisar respostas de es-

Figura 2 – Determinação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta eficiência



Representação do cromatograma obtido do extrato hidroetanólico de gengibre.

Fonte: Os autores.

Tabela 2 – Mecanismos antioxidantes avaliados no Extrato Hidroetanólico de Gengibre (EHEG) e controle positivo Ácido Gálico

	EHEG	Ácido gálico
Capacidade removedora de NO ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50 = 40,53	IC50 = 2,04
Capacidade removedora $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50 = 1,42	IC50 = 210,61

EHEG = extrato hidroetanólico de gengibre; NO = radical óxido nítrico;  $\text{H}_2\text{O}_2$  = peróxido de hidrogênio.

Fonte: Os autores.

três adaptativo, entretanto, quando em excesso, podem atacar biomoléculas, causando danos e alterando sua funcionalidade, o que está relacionado com diversas patologias associadas ao estresse oxidativo, dentre elas a aterosclerose (DAIBER *et al.*, 2017).

O NO é um radical livre considerado tóxico ou protetor, dependendo da sua concentração, localização e reação com as demais espécies reativas (TAIN; HSU, 2017). É descrito como um importante mediador do sistema imunológico na resposta inflamatória, e apresenta múltiplos efeitos biológicos, relacionados com a regulação da pressão arterial por meio do relaxamento do músculo liso e inibição da agregação plaquetária (CABALLANO-INFANTES *et al.*, 2017). De maneira contraditória, entretanto, pode estar envolvido na produção de radicais citotóxicos, uma vez que pode reagir com o radical superóxido e produzir o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio, que iniciam a peroxidação lipídica e potencializam a lesão inflamatória (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Sabendo, portanto, que o EHEG aqui estudado demonstrou ação removedora de radicais NO, pode-se sugerir que esse mecanismo antioxidante esteja envolvido nas suas ações terapêuticas já descritas na literatura e exploradas pela medicina popular como ação anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante e de atenuação da peroxidação lipídica. Observa-se, no entanto, que a capacidade removedora desse radical é menor no extrato do que no ácido gálico isolado, utilizado como controle positivo. Considerando que no extrato não foi identificada a presença de ácido gálico, sugere-se que os compostos

presentes no extrato, apesar de exercerem essa atividade antioxidante, o fazem com menor potência do que o controle positivo utilizado.

Da mesma forma, o EHEG também demonstrou capacidade removedora de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , espécie reativa de oxigênio que, apesar de essencial em vias de sinalização que determinam a viabilidade celular e capacidade da célula de combater patógenos (SIES, 2017), em condições patológicas, como na hipercolesterolemia, seu nível aumentado leva à infiltração de células inflamatórias, oxidação lipídica e formação de células em espuma que contribuem significativamente para a inflamação vascular e o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (BYON; HEATH; CHEN, 2016). Cabe ressaltar que o extrato apresentou capacidade tal removedora maior que o controle positivo utilizado, sugerindo que o material vegetal possui compostos fenólicos que podem exercer tal efeito antioxidante de forma aditiva ou sinérgica, apresentando-se como uma vantagem a compostos antioxidantes isolados.

## CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico de gengibre possui propriedades antioxidantes, sendo capaz de proteger a LDL humana da oxidação e ser efetivo na prevenção e/ou terapia de doenças cardiovasculares decorrentes do processo de aterosclerose. Tal ação antioxidante pode ser mediada pela capacidade de remoção de radicais de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, demonstradas nesse estudo, dentre outros mecanismos. Ainda, é notável a presença de compostos fito-



químicos com mecanismos antioxidantes que podem ter efeitos benéficos complementares sobre a saúde cardiovascular. Dessa forma, exalta-se o potencial do gengibre para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos que atuem de forma complementar e integrativa, melhorando a saúde da população, especialmente no âmbito das doenças cardiovasculares.

## REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A. Bioavailability of plant-derived antioxidants. *Antioxidants*, v. 2, n. 4, p. 309-325, 2013.
- AHMAD, B. *et al.* A review on pharmacological properties of zingerone (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone). *The Scientific World Journal*, v. 2.015, p. 1-6, 2015.
- AKINOLA, A. A.; AHMAD, S.; MAZIAH, M. Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 11, n. 3, p. 7-13, 2014.
- ASSIS, R. P. *et al.* Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 332, 2017.
- BARCELOS, R. P. *et al.* Thiosemicarbazone derivate protects from AAPH and Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation. *Life Sciences*, v. 89, n. 1, p. 20-28, 2011.
- BENDERITTER, M. *et al.* Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 12, n. 5, p. 510-516, 1998.
- BYON, C. H.; HEATH, J. M.; CHEN, Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biology*, v. 9, p. 244-253, 2016.
- CABALLANO-INFANTES, E. *et al.* Regulation of mitochondrial function and endoplasmic reticulum stress by nitric oxide in pluripotent stem cells. *World Journal of Stem Cells*, v. 9, n. 2, p. 26-36, 2017.
- CAI, R.; CHEN, S.; JIANG, S. Chlorogenic acid inhibits non-enzymatic glycation and oxidation of low density lipoprotein. *Journal of Zhejiang University, Medical Sciences*, v. 47, n. 1, p. 27-34, 2018.
- CARVAJAL, C. C. LDL oxidada y la aterosclerosis. *Medicina Legal de Costa Rica*, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2015.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- CHERNYAVSKIY, I. *et al.* Atherogenesis: hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1.363, n. 1, p. 138-154, 2016.
- CORREA JUNIOR, C. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 1994.
- DAIBER, A. *et al.* Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. *Redox Biology*, v. 12, p. 35-49, 2017.
- DOS SANTOS, M. M. *et al.* Syzygium cumini leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the lipoprotein from glycation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 210, p. 69-79, 2018.
- EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.
- FERRERA, T. S. *et al.* Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erveiras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. 2, suppl.1, p. 588-596, 2016.
- FUHRMAN, B. *et al.* Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 5, p. 1.124-1.131, 2000.
- GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Identification and concentration of some flavonoid components in Malaysian young ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) varieties by a high performance liquid chromatography method. *Molecules*, v. 15, n. 9, p. 6.231-6.243, 2010.
- GUNATHILAKE, K. D. P.; RUPASINGHE, H. P. V. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in vitro by ginger extracts. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n. 4, p. 424-431, 2014.
- HE, R. *et al.* A new oxidative stress model, 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride induces cardiovascular damages in chicken embryo. *PLoS One*, v. 8, n. 3, 2003.
- KHODAI, L.; SADEGHPOOR, O. Ginger from ancient times to the new outlook. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, v. 10, n. 1, 2015.
- MALTA, D. C. *et al.* Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e Regiões, projeções para 2025. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 22, 2019.
- MCCORMACK, T.; DENT, R.; BLAGDEN, M. Very low LDL-C levels may safely provide additional clinical cardiovascular benefit: the evidence to date. *International Journal of Clinical Practice*, v. 70, n. 11, p. 886-887, 2016.
- MORRISON, M. *et al.* Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany*, v. 76, n. 1, p. 287-290, 1995.
- NAKSURIYA, O.; OKONOJI, S. Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug discoveries & therapeutics*, v. 9, n. 2, p. 136-141, 2015.
- NETO, J. R. F. *et al.* Erica: prevalence of dyslipidemia in Brazilian adolescents. *Revista de Saúde Pública*, v. 50, p. 1-10, 2016.
- OKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

- PELUSO, I. *et al.* Intestinal motility disorder induced by free radicals: a new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacological Research*, v. 46, n. 6, p. 533-538, 2002.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- RUCH, R. J.; CHENG, S.; KLAUNIG, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, v. 10, n. 6, p. 1.003-1.008, 1989.
- SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A.; CAMARÉ, C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie*, v. 125, p. 281-296, 2016.
- SHIRISH, D. *et al.* Zingiber officinale attenuates retinal microvascular changes in diabetic rats via anti-inflammatory and antiangiogenic mechanisms. *Molecular Vision*, v. 22, p. 599-609, 2016.
- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, v. 11, p. 613-619, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.
- SREEJAYAN, N.; RAO, M. N. A. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 49, p. 105-107, 1997.
- SRINIVASAN, K. Antioxidant potential of spices and their active constituents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 54, n. 3, p. 352-372, 2014.
- SUBRAMANIAN, K. N.; PADMANABAN, G.; SARMA, P. S. Folin-Ciocalteu reagent for the estimation of siderochromes. *Analytical Biochemistry*, v. 12, p. 106-112, 1965.
- TABIBI, H. *et al.* Effects of ginger on serum lipids and lipoproteins in peritoneal dialysis patients: a randomized controlled trial. *Peritoneal Dialysis International*, v. 36, n. 2, p. 140-145, 2016.
- TAIN, Y.; HSU, C. Interplay between Oxidative Stress and Nutrient Sensing Signaling in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 841, 2017.
- VEKOUKIS, A. S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, v. 17, n. 1, p. 11-21, 2012.
- VINSON, J. A. *et al.* Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of agricultural and Food chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2.798-2.799, 1995.
- WIELAND, H.; SEIDEL, D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 24, n. 7, p. 904-909, 1983.
- YANG, M. *et al.* Ginger extract diminishes chronic fructose consumption-induced kidney injury through suppression of renal overexpression of proinflammatory cytokines in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 174, p. 1-12, 2014.
- YAO, Y. *et al.* Klotho ameliorates oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) – induced oxidative stress via regulating LOX-1 and PI3K/Akt/eNOS pathways. *Lipids in Health and Disease*, v. 16, n. 1, p. 77, 2017.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

## Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe no Modelo Experimental de Sepsis

Renata Campos<sup>1</sup>, Andressa Antunes Bortoti<sup>2</sup>, Chelin Auswaldt Steclan<sup>2</sup>, Pollyana Weber da Maia Pawlowytsch<sup>2</sup>, Miriam Cristina José Valério<sup>2</sup>, Cinthia Helena Paluch<sup>2</sup>, Luiz Cláudio Fernandes<sup>3</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe (OP), rico em ácido graxo ômega-3, sobre as variáveis renal e pulmonar, a mortalidade e a lipoperoxidação em ratos com sepsis. **Método:** A sepsis foi induzida por punção e ligadura cecal (CLP). OP (1 g/kg/dia, via oral) foi administrado sete dias antes da CLP. Foram estudados os grupos CLP (CLP sem OP, n=10) e CLP+OP (suplementado com OP, n=10). Foram mensurados a peroxidação lipídica, a histologia pulmonar e renal, quanto à sua estrutura e presença de polimorfonucleares (PMN), índice de edema pulmonar, função renal e sobrevivência em 72 horas. **Resultados:** A peroxidação lipídica não foi diferente para o grupo CLP+OP (p=0,06). A histologia, quanto à estrutura, evidenciou que o grupo CLP+OP teve menor lesão estrutural tanto no tecido pulmonar quanto no renal, entretanto a contagem de PMN não foi diferente entre os grupos para ambos os sistemas. O índice de edema pulmonar, embora menor no grupo CLP+OP, não foi significativamente diferente do encontrado no grupo CLP (p=0,59). Não houve alterações quanto à melhora da sobrevivência causada pela suplementação com OP. A função renal, estudada pela concentração de ureia e pela creatinina, não foi diferente entre os grupos. **Conclusão:** A suplementação com OP, na dose e tempos empregados, não provocou efeitos positivos nas variáveis renais, pulmonares e taxa de mortalidade de ratos com sepsis.

**Palavras-chave:** Sepsis. Mortalidade. Ácidos graxos. Peroxidação de lipídios. Sistema imunitário. Edema pulmonar.

### EFFECT OF FISH OIL SUPPLEMENTATION ON SEPSIS

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effect of supplementation with fish oil (FO) rich in omega-3 fatty acids, on renal and pulmonary variables, mortality and, lipid peroxidation in rats with sepsis. **Methods:** Sepsis was induced by puncture and cecal ligation (CLP). FO (1 g/kg/day, orally) was given for seven days before CLP. CLP groups (CLP without FO, n=10) and CLP+FO (supplemented with FO, n=10) were studied. The variables lipid peroxidation, lung and renal histology were analyzed regarding its structure and presence of polymorphonuclear (PMN), lung edema index, renal function and survival rate. **Results:** The lipid peroxidation was not different for CLP+FO group (p=0.06). Histology, regarding structure, the CLP+FO group had lower structural damage, both in the lung and kidney tissues, however, the PMN cells counting was not different between the groups, for both systems. The rate of lung edema, although lower in the CLP+FO group, was not significantly different from that found in the CLP group (p=0.59). FO supplementation did not cause any change in the survival rate (p>0.05). Renal function, studied by urea and creatinine concentration was not different between the groups (p>0.05). **Conclusion:** FO supplementation, in the dose and period studied, did not improve renal, pulmonary and mortality rate in rats with sepsis.

**Keywords:** Sepsis. Mortality. Fatty acids. Lipid peroxidation. Immunity system. Lung edema.

RECEBIDO EM: 25/3/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 8/10/2019

ACEITO EM: 11/11/2019

<sup>1</sup> Autora correspondente. Universidade do Contestado – Campus Mafra. Av. Nereu Ramos, 1071, ala das coordenações/Nupesc, Jardim Moinho. Cep: 89300-000, Mafra/SC, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/1087923612231555>. <https://orcid.org/0000-0002-8018-6209>. [replug2000@gmail.com](mailto:replug2000@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade do Contestado. Campus Mafra. Mafra/SC, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O ácido graxo poli-insaturado (Agpi) alfa linolênico ômega 3 ( $\omega$ -3) é um ácido graxo essencial que não pode ser produzido pelo organismo humano (DUVALL; LEVY, 2016). Os Agpis  $\omega$ -3 são encontrados primariamente em óleos de peixe (OP) e em plantas de coloração verde escura, e seus metabólitos são capazes de reduzir ou minimizar a criticidade de algumas patologias, como as cardiovasculares (MANZANARES; LANGLOIS; HARDY, 2016).

Os dois principais componentes do OP são os ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA, 20:5  $\omega$ -3) e docosahexaenoico (DHA, 22:6  $\omega$ -3), que têm ação sobre a fluidez de membrana celular, regulam a função imunitária, diminuem a excessiva reação inflamatória, reduzem a ocorrência da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Sirs) e a disfunção múltipla de órgãos (ZHAO; WANG, 2018).

Durante a sepse, as vias pró-inflamatórias aumentam suas atividades para eliminar patógenos e tecidos mortos, frequentemente causando lesão ao hospedeiro. Há, entretanto, uma relação positiva entre o consumo de OP e a melhora nas condições anti-inflamatórias (BAKER *et al.*, 2016). A resolução do processo inflamatório inclui a inibição do infiltrado tecidual, regulação da produção e secreção das citocinas e quimiocinas, redução da dor e a ação dos macrófagos, o que pode ser fundamental no quadro da sepse (SERHAN; CHIANG, 2013).

A suplementação com OP altera a expressão e a produção das citocinas pró-inflamatórias e fornece modificações na modulação da resposta inflamatória, com mínimos efeitos colaterais (SERHAN, 2014). Em adição, pode afetar a função imunitária e estar associado com melhor resultado e redução nos custos de saúde em pacientes cirúrgicos e criticamente doentes. Há, ainda, contudo, controvérsias na indicação para pacientes em unidades de terapia intensiva (MOLFINO *et al.*, 2017). O uso de OP, via parenteral, em pacientes internados no período pós-operatório, foi considerado seguro e efetivo na redução da permanência em UTI, minimizando a taxa de mortalidade (PRADELLI *et al.*, 2012).

A capacidade anti-inflamatória do OP inclui a inibição da migração de neutrófilos, o aumento da fagocitose de neutrófilos em apoptose e a supressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, particularmente durante a doença aguda (DUVALL; LEVY, 2016). Também diminui a aderência e migração de neutrófilos e aumenta a velocidade em vênulas pós-capilares. Ainda, o OP altera os monócitos no sítio de inflamação, o que indica forte evidência do clearance apoptótico dos polimorfinucleares (PMN) em animais com sepse (KÖRNER *et al.*, 2018).

Evidências demonstram que a redução do processo inflamatório com o uso da combinação de OP e de ácido graxo de cadeia curta de ômega-6 foi efetiva para reduzir o tempo de ventilação e o tempo de hospitalização, além de aumentar a sobrevivência global (SINGER *et al.*, 2006). Ying-Hua *et al.* (2015) usaram lipopolissacarídeos para induzir o modelo de sepse e relataram drástico aumento nas concentrações de interleucinas (IL) como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), tanto no plasma quanto no intestino. Ao administrarem OP, entretanto, encontraram diminuição significativa das concentrações de citocinas, bem como da expressão de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em uma pequena porção do intestino.

Em um processo inflamatório e infeccioso ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (Eros) e a de antioxidantes. A diferença entre as espécies reativas de oxigênio nos compartimentos teciduais e subcelulares contribui para a resposta ao estresse (GO *et al.*, 2010). Vários fatores são responsáveis pelos Eros; na sepse cita-se o aumento das toxinas urêmicas associado à disfunção celular endotelial (YANG *et al.*, 2012).

Evidências mostram que o OP tem efeitos antioxidantes por modular o sinal redox, aumentando a expressão e as atividades das enzimas antioxidantes, e atenuando o dano oxidativo (ERDOGAN *et al.*, 2004). Desta forma, acredita-se que o OP pode ser considerado modulador participante da regulação do início, da duração e da resolução da inflamação, e ser efetivo em respostas inflamatórias não controladas.

A sepse é uma síndrome com elevada morbidade/mortalidade em pacientes criticamente doentes, e apresenta alto custo de tratamento. O reconhecimento de terapias adjuvantes, portanto, é fundamental para a mudança do cenário causado pela sepse. Desta forma, o uso de terapias alternativas tem sido buscado, e, por se tratar de processo inflamatório, o uso de OP configura uma boa alternativa. Sendo assim, o presente estudo investigou o efeito da suplementação com OP durante sete dias anteriores à ligadura cecal, sobre as variáveis renal e pulmonar, mortalidade e a peroxidação lipídica em ratos com sepse induzida por punção de ligadura cecal (CLP).

## MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua), sob parecer nº 1.094.

## Animais e protocolo de suplementação

Foram utilizados ratos machos Wistar (45 dias de idade com peso entre 200 a 250 g), suplementados ou não, com OP na dose de 1 g/kg, diariamente, iniciando-se sete dias antes da punção e CLP, e mantendo-se até o dia da CLP. O OP foi administrado via oral, com o auxílio de micropipeta em que, pela ponteira, o OP era gotejado na boca do animal até a completa deglutição.

Os grupos foram divididos em G1: CLP (submetido à CLP, sem OP; n=10); G2: CLP+suplementação com OP (n=10). Para avaliação da taxa de sobrevivência foram utilizados animais diferentes (n=5 para cada grupo), sendo usados somente para esta finalidade.

## Punção e ligadura cecal

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com cloridrato de cetamina e xilazina. Após tricotomia da região abdominal e laparotomia, o ceco foi exposto e ligado abaixo da válvula ileocecal, sendo puncionadas duas vezes (agulha 16) e levemente pressionado a expelir pequena quantidade de material fecal na cavidade abdominal (MIYAJI *et al.*, 2003). Após o procedimento foi realizada a sutura por planos na incisão abdominal. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único pesquisador.

Após a realização da CLP foi administrado cloreto de sódio 0,9% na dose de 25 ml/kg (i.p.) para manutenção de volemia. A reposição volêmica foi administrada 6 e 12 horas após a CLP via subcutânea (sc), assim como o antibiótico Meropenem, na dose de 30 mg/kg (sc) após 6 e 12 horas da realização da sepsis. Também foi administrada Dipirona injetável (500 mg/kg) para a dor (sc). As dosagens do antibiótico e a reposição volêmica e do analgésico foram padronizadas pelo médico veterinário que acompanhou todo o processo.

Após 24 horas da CLP, todas as avaliações do sistema renal e respiratório foram realizadas.

## Contagem de células polimorfonucleares no tecido pulmonar e renal

Morfometria convencional foi utilizada para determinar a densidade dos neutrófilos PMN. As lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) foram avaliadas por microscopia óptica em uma resolução de 100X. Após a visualização, foi realizada a contagem dos PMNs, a partir das áreas delimitadas por retículo (VIEIRA *et al.*, 2007). Foram analisados 16 campos por lâmina.

O examinador não teve prévio conhecimento dos grupos durante a análise das lâminas, garantindo uma análise não tendenciosa durante a contagem das células.

## Relação peso úmido e peso seco do pulmão

Fragmentos do pulmão foram retirados da caixa torácica, lavados superficialmente com soro fisiológico e secos para retirada de quaisquer resíduos. O tecido pulmonar foi pesado (peso úmido), colocado em um recipiente de vidro e deixado na estufa a 60°C por 48h. Passado este período, o pulmão foi novamente pesado (peso seco) e obteve-se a relação peso úmido e peso seco (W/D) (CAMPOS *et al.*, 2012).

## Dosagem de ureia e creatinina

Amostra sanguínea foi coletada 24 horas por punção intracardíaca após a CLP, para a avaliação dos marcadores renais. As amostras foram coletadas e colocadas em tubos comerciais padrões, contendo EDTA, e a concentração de ureia e creatinina foram determinadas por kits da Elitech, seguindo-se as instruções do fabricante.

## Mensuração da lipoperoxidação

A solução FOX-2 foi preparada conforme o procedimento descrito por Nourooz-Zadeh (1999). Alíquotas de 90 µl de plasma foram adicionadas em quatro tubos de ensaio, e 10 µl de Trifenilfosfina (TPP) em metanol 10 mM foram acrescentados em cada tubo. Em outros quatro tubos de ensaio foram adicionados às alíquotas de 90 µl de plasma e 10 µl de metanol. Essas amostras foram incubadas por 30 minutos, após agitação no vórtex. Em seguida, 900 µl de FOX-2 foram acrescentados a cada tubo de ensaio, e as amostras foram novamente incubadas por mais 30 minutos. A solução FOX-2, em contato com peróxidos, altera sua coloração de amarelo para azul. Então, foram centrifugadas por dez minutos e submetidas à leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. Para a curva de calibração, foram adicionadas em tubos de ensaio diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 900 µl de FOX-2. Em seguida foi feita a leitura no espectrofotômetro a 560 nm. As concentrações usadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram: 4; 4,6; 5; e 6 µmol/L.

O coeficiente de absorvidade molar é de 3.92x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Para melhor confiabilidade da curva analítica, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizado foi padronizado por titulação redox em triplicata, usando KMnO<sub>4</sub> padronizado com ácido oxálico.

## Taxa de sobrevivência

Para a análise da taxa de sobrevivência os animais (n=5 para cada grupo) foram mantidos em gaiolas com livre-acesso à comida e água, e acompanhados por 72 horas após a CLP (durante este período não houve a suplementação de OP). A avaliação aconteceu às 7 horas, 13 horas e 19 horas de cada dia.

Nos animais CLP e CLP+OP foram administrados Meropenem (30 mg/kg) e soro fisiológico (25 ml/kg) a cada 12 horas, às 7 horas e às 19 horas de cada dia. O analgésico Dipirona injetável (500 mg/kg – via sc) foi administrado de seis em seis horas.

Após as 72 horas de acompanhamento, os animais remanescentes foram sedados e mortos com cloreto de potássio 10%.

## Análise estatística

Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre médias foram realizadas pelo teste Mann-Whitney. A curva de sobrevivência foi realizada pelo teste Kaplan-Meier. Aceitou-se como nível de significância  $p < 0,05$ .

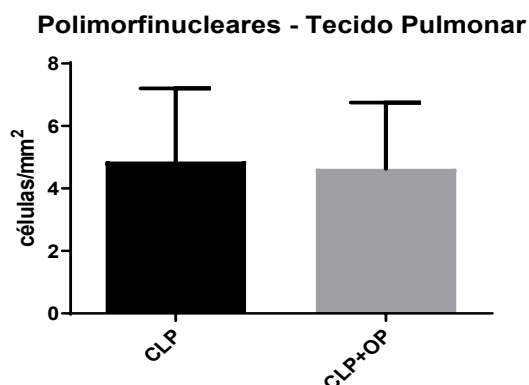
## RESULTADOS

O primeiro dado apresentado é o de inflamação tecidual, tanto no tecido pulmonar quanto no renal, estudado pela presença de neutrófilos PMN. No sistema pulmonar a quantificação de PMN foi de  $4,86 \pm 2,34$  células/mm<sup>2</sup> para o grupo CLP e  $4,63 \pm 2,11$  células/mm<sup>2</sup> para o grupo CLP+OP,  $p = 0,54$ . Para o sistema renal obteve-se  $7,13 \pm 2,04$  células/mm<sup>2</sup> para o grupo CLP e  $6,53 \pm 1,98$  células/mm<sup>2</sup> para o grupo CLP+OP,  $p = 0,55$  (Figuras 1a e 1b, respectivamente).

Figura 1 – Presença de células PMN nos pulmões (A) e rins (B) de animais do grupo CLP e CLP+OP.

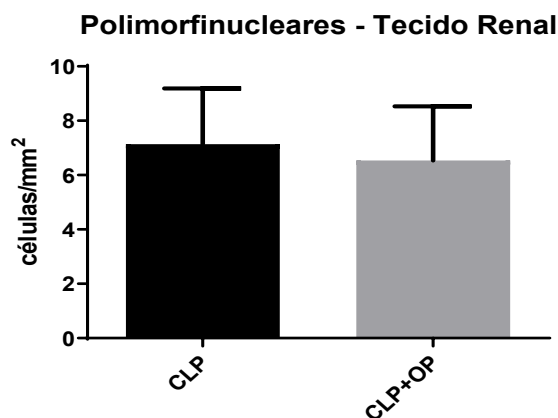
Os dados estão apresentados como células/mm<sup>2</sup>

### 1A – Polimorfinuclear no tecido pulmonar



Fonte: Os Autores (2018).

### 1B – Polimorfinuclear no tecido renal

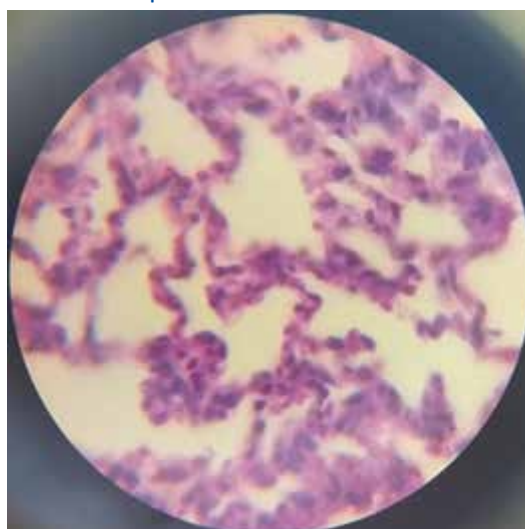


Fonte: Os Autores (2018).

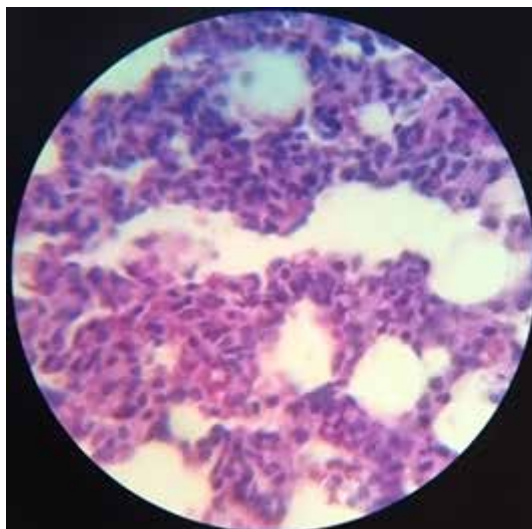
Na histologia pulmonar e renal observam-se algumas características importantes em ambos os grupos. A estrutura pulmonar do grupo CLP+OP apresentou menor número de lesões quando comparada ao grupo CLP (Figuras 2A e 2B, respectivamente). O mesmo foi observado no tecido renal, quando a suplementação com OP também provocou menor lesão no grupo suplementado (Figuras 2C e 2D, respectivamente).

Figura 2 – Histologia do tecido pulmonar e renal dos animais dos grupos CLP (B e D) e suplementados com OP (A e C, respectivamente)

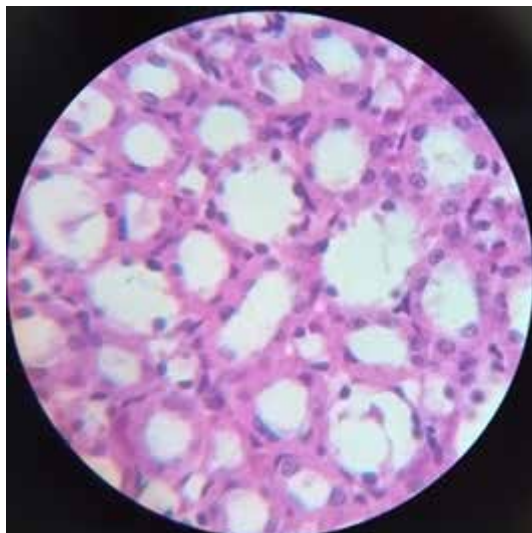
A (ômega): área pulmonar pérvia, com menor espessamento de tecido.



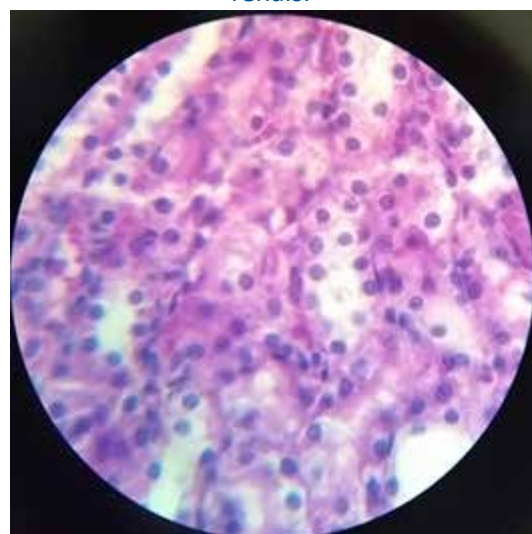
B (CLP): Espessamento de tecido com infiltração tecidual pulmonar.



C (ômega): área renal (túbulos) preservada.



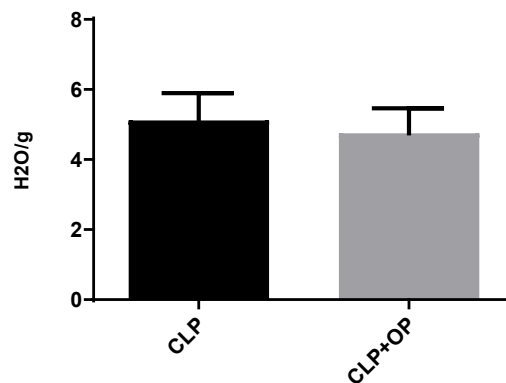
D (CLP): influxo celular e espessamento dos túbulos renais.



Fonte: Os Autores (2018).

A relação peso úmido e peso seco (Figura 3) não mostrou diferença entre os grupos estudados, embora o grupo suplementado com OP tenha valores inferiores ( $4,74 \pm 0,71 \text{ H}_2\text{O/g}$ ) quando comparado ao CLP ( $5,11 \pm 0,78 \text{ H}_2\text{O/g}$ ,  $p=0,59$ ), mas não houve diferença estatística.

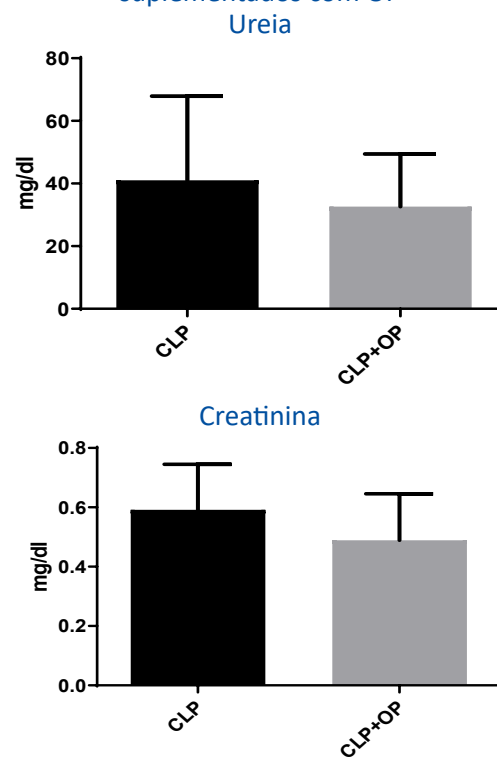
Figura 3 – Relação peso úmido e peso seco nos animais do grupo CLP e suplementados com OP



Fonte: Os Autores (2018).

Em relação aos marcadores renais (Figura 4A), observou-se que não houve diferença nos níveis de ureia no grupo CLP ( $32,6 \pm 16,8 \text{ mg/dl}$ ) e no CLP+OP ( $41,00 \pm 26,87 \text{ mg/dl}$ ,  $p=0,42$  – Figura 4A). Já a concentração de creatinina (Figura 4B) foi similar entre os grupos (CLP+OP  $0,48 \pm 0,15 \text{ mg/dl}$  e para o CLP  $0,59 \pm 0,15 \text{ mg/dl}$ ,  $p=0,29$ ).

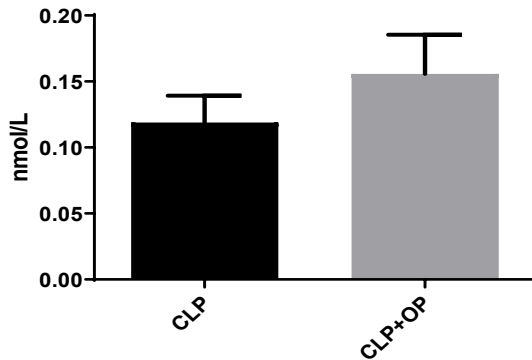
Figura 4 – Concentração plasmática de ureia (4A) e de creatinina (4B) dos animais do grupo CLP e dos suplementados com OP



Fonte: Os Autores (2018).

Em relação à peroxidação lipídica plasmática (Figura 5) não houve diferença entre os grupos CLP+OP ( $0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ) e CLP ( $0,11 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ).

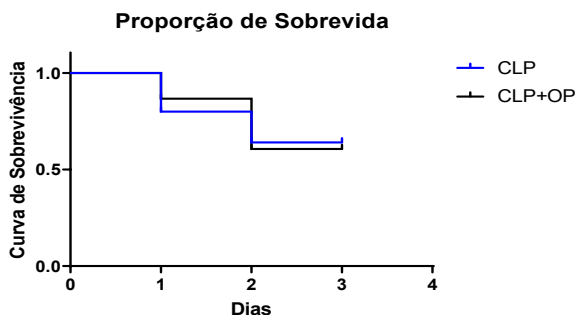
Figura 5 – Peroxidação lipídica plasmática obtida dos animais do grupo CLP e CLP suplementados com OP



Fonte: Os Autores (2018).

Todos os animais sobreviveram nas primeiras 24 horas após a CLP. A sobrevivência destes (Figura 6) não foi modificada pela suplementação com OP.

Figura 6 – Sobrevivência avaliada no 1º, 2º e 3º dias. Para cada grupo foram avaliados 5 animais



Fonte: Os Autores (2018).

## DISCUSSÃO

O Agpi  $\omega$ -3 tem sido descrito como atuante no processo inflamatório por afetar o metabolismo dos eicosanoides de diversas maneiras. O consumo de DHA e EPA resulta em aumento de suas concentrações nas membranas celulares, substituindo o ácido araquidônico (AA) nos fosfolípidos de membrana, reduzindo, dessa forma, a produção de eicosanoides pró-inflamatórios derivados do AA, exercendo importante papel de resolução e reparo no processo de inflamação (MARANGONI *et al.*, 1993).

A Sepsé é uma síndrome que causa alta mortalidade em pacientes. Ela causa lesão pulmonar aguda caracterizada por hipoxemia e infiltrados pulmonares, além da disfunção endotelial capilar e alveolar, resultando na ativação da cascata inflamatória, elevan-

do a concentração plasmática de fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas  $1\beta$  e IL-6, juntamente com a presença de macrófagos, mocócitos e neutrófilos (MARTIN; STAPLETON, 2010). Apesar de todas as evidências encontradas na literatura sobre a ação dos Agpis  $\omega$ -3 na minimização dos efeitos inflamatórios, o presente estudo verificou que a suplementação com OP não foi capaz de minimizar a quantidade de infiltração de PMN, tanto no tecido pulmonar quanto no renal. Interessantemente, contudo, na histologia encontrou-se menor lesão estrutural no grupo que foi suplementado com OP. Strandberg *et al.* (2009) descreveram que o sistema imunitário de camundongos foi negativamente afetado pela dieta rica em Agpi. A resposta imunológica pela ativação de neutrófilos é a primeira linha de defesa contra doenças bacterianas infecciosas. Moléculas derivadas de Agpi  $\omega$ -3, conhecidas como resolvinas, têm melhorado a capacidade do neutrófilo para fagocitar *Escherichia Coli* (SPITE *et al.*, 2009). Não é, portanto, somente a quantidade de neutrófilo disponível, mas é necessário que a capacidade de fagocitose também esteja preservada. A baixa atividade do sistema imunitário, associada à proliferação bacteriana, leva ao óbito na sepse (SVAHN *et al.*, 2016).

A lesão pulmonar também está associada à sepse. A suplementação com OP em ratos, cinco dias após a CLP, diminuiu o escore de lesão pulmonar, melhorou a histopatologia, modulou a imunidade e reduziu o processo inflamatório (LI *et al.*, 2015). Campos *et al.* (2012) descreveram que a CLP em roedores foi capaz de aumentar o índice de edema e a relação peso úmido/seco. Um estudo com roedores descreveu que o OP, embora tenha efeitos antioxidantes, piorou a disfunção vascular induzida pelo choque séptico (BOISRAMÉ *et al.*, 2016). O presente estudo corrobora esses dados, posto que não foi possível determinar melhora na relação peso úmido e peso seco como um fator de aprimoramento da permeabilidade vascular.

Outra possível explicação entre os achados deste estudo e os demais da literatura parece ser o tempo de tratamento com OP no modelo CLP. Um estudo com 28 dias de tratamento melhorou a sobrevivência em camundongos com sepse induzida por *Staphylococcus* (SVAHN *et al.*, 2016). Aqui, foi administrado OP oralmente por sete dias antes do início da CLP, ou seja, de forma preventiva, entretanto este tempo não provocou modificação significativa na taxa de mortalidade quando comparada à do grupo CLP ao final de três dias.



A administração de OP tem sido estudada em modelos de ablação renal, nos quais os resultados são promissores e suportam a hipótese de que OP, rico em Agpi  $\omega$ -3, tem ação protetora em ratos submetidos à ablação renal, e previne a evolução da glomeruloesclerose e a piora da função renal, levando à preservação da filtração glomerular (CLARK *et al.*, 1991). Estudo em camundongos submetidos à CLP verificou que a administração de OP não causou aumento da ureia nitrogenada, que é marcador da função renal. Em adição, relatam que o escore de lesão renal avaliado pela histologia foi menor no grupo suplementado com OP (JUEY-MING *et al.*, 2016). Miyaji *et al.* (2003) demonstraram que a CLP causa um aumento tempo-dependente dos marcadores renais. No presente estudo, as medidas plasmáticas foram realizadas 24 horas após a CLP, o que pode ter contribuído para o não aumento das escorias nitrogenadas.

Apesar de todos os esforços para minimizar os efeitos da sepse, a taxa de mortalidade ainda permanece alta, com valores aproximadamente entre 40% a 70% (ALAVI *et al.*, 2017). Existem evidências de que os Agpis  $\omega$ -3 podem diminuir a mortalidade associada à sepse. Isto, contudo, ainda é objeto de controvérsia. Em recente artigo de revisão (HUALI *et al.*, 2018), foi efetuada uma análise de correlação entre administração de Agpi  $\omega$ -3 e a mortalidade causada pela sepse. Os autores, após análise criteriosa de estudos randomizados e controlados, descreveram que a mortalidade não foi diferente para os grupos em que foi administrado Agpi  $\omega$ -3. Diversos fatores foram levantados para esta afirmação, posto que a concentração de Agpi  $\omega$ -3, a duração do tratamento e os métodos de suporte nutricional foram diferentes entre os vários estudos.

Um dos fatores que podem influenciar na criticidade da doença é a liberação de radicais livres decorrentes do processo inflamatório e infeccioso instalado em razão da sepse. O Agpi  $\omega$ -3, por modular a ativação dos genes envolvidos no processo inflamatório nas células imunitárias, pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como de espécies reativas de oxigênio (BOISRAMÉ *et al.*, 2016). Esses mesmos autores realizaram estudo em um modelo de CLP, no qual observaram que a administração de Agpi  $\omega$ -3 promoveu diminuição da produção do ânion superóxido das artérias dos ratos sépticos e elevação da produção de prostaglandinas. No presente estudo a suplementação com OP não foi capaz de minimizar a peroxidação lipídica.

Tem sido especulado que o efeito protetor do Agpi  $\omega$ -3 é efetivo somente em estado de leve imunossupressão, justamente ao contrário do que acontece na sepse (HUALI *et al.*, 2018), justificando a ausência de melhora na função renal, pulmonar, imunológica e de lipoperoxidação verificada por este trabalho.

Acredita-se que os achados deste estudo não vão ao encontro de outros dados da literatura devido ao tempo de administração de OP, que foi menor (ou seja, apenas sete dias), o que talvez não tenha provocado modificação suficiente na razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 na membrana das células. Outro fator pode ter sido a dose utilizada, que foi de 1 g/kg, a qual tem sido demonstrada ser eficiente para algumas doenças, como a cardiovascular (DELGADO-LISTA *et al.*, 2012), mas não o foi para o modelo aqui utilizado de sepse, em particular, aguda. Vale destacar, contudo, que, apesar de não se ter encontrado diferenças significativas entre o controle e o suplementado, em termos histológicos ficou claramente demonstrado que OP, neste intervalo de tempo e nesta dose, causou efeito positivo sobre o tecido pulmonar.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo mostra que o OP administrado previamente à CLP, na dose e tempo empregados, não foi eficaz em minimizar os efeitos da sepse, nos animais estudados, quanto à taxa de mortalidade, à peroxidação lipídica e aos marcadores de funções renal e pulmonar.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI, M. M. *et al.* Protocol adherence for severe Sepsis and septic shock Management in the Emergency Department; a clinical audit. *Emergency*, v. 5, n. 1, p. e16, 2017.
- BAKER, E. J. *et al.* "Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans". *Progress in Lipid Research*, v. 64, p. 30-56, 2016.
- BOISRAMÉ, H. J. *et al.* "Immunonutrition" has failed to improve peritonitis-induced septic shock in rodents. *PLoS One*, v. 11, p. e0147644, 2016.
- CAMPOS, R. *et al.* N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* v.302, p.L640-L650, 2012.
- CLARK, W. F. *et al.* Chronic Effect of  $\omega$ -3 fatty Acids (fish Oil) in a rat 5/6 Renal Ablation Model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 1, p. 1.343-1.353, 1991.
- DELGADO-LISTA, J. *et al.* Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr.*, n. 107, Supl. 2:S201-13, jun. 2012. DOI: 10.1017/S0007114512001596.

- DUVALL, M. G.; LEVY, B. D. "DHA – and EPA – derived resolvins, protectins and maresins in airway inflammation". *European Journal of Pharmacology*, v. 785, p. 144-155, 2016.
- ERDOGAN, H. *et al.* Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v. 71, p. 149-152, 2004.
- GO, Y. M. *et al.* A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 48, p. 275-283, 2010.
- HUAI, S. C. *et al.* Correlation analysis of omega-3 fatty acids and mortality of sepsis and sepsis-induced ARDS in adults: data from previous randomized controlled trials. *Nutrition Journal*, v. 17, n. 57, p. 1-14, 2018.
- JUEY-MING, S. *et al.* Fish Oil-Based Fat Emulsion Reduces Acute Kidney Injury and Inflammatory Response in Antibiotic-Treated Polymicrobial Septic Mice. *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 165, 2016. DOI: 10.3390/nu8030165.
- KÖRNER, A. *et al.* Resolution of inflammation and sepsis survival are improved by dietary  $\Omega$ -3 fatty acids. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, p. 421-431, 2018.
- LI, X. *et al.* Fish oil-supplemented parenteral nutrition could alleviate acute lung injury, modulate immunity and reduce inflammation in rats with abdominal sepsis. *Nutr. Res.*, v. 35, p. 784-791, 2015.
- MANZANARES, W.; LANGLOIS, P. L.; HARDY, G. "Intravenous lipid emulsions in the critically ill: an update". *Current Opinion in Critical Care*, v. 22, p. 308-315, 2016.
- MARANGONI, F. *et al.* Changes of n-3 and n-6 fatty acids in plasma and circulating cells of normal subjects, after prolonged administration of 20:5 (EPA) and 22:6 (DHA) ethyl esters and prolonged washout. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1.210, p. 55-62, 1993.
- MARTIN, J. M.; STAPLETON, R. D. Omega-3 fatty acids in critical illness. *Nutr. Rev.*, v. 68, n. 9, p. 531-541, 2010.
- MIYAJI, T. *et al.* Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney International*, v. 64, p. 1.620-1.631, 2003.
- MOLFINO, A. *et al.* Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2.017, article ID 5987082, 6 p. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/5987082>.
- NOUROOZ-ZADEH, J. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxides in Plasma. *Methods Enzymol.*, v. 300, p. 58-62, 1999.
- PRADELLI, L. *et al.* "N-3 fatty acid-enriched parenteral nutrition regimens in elective surgical and ICU patients: a meta-analysis". *Critical Care*, v. 16, p. R184, 2012.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N. "Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution". *Current Opinion in Pharmacology*, v. 13, p. 632-640, 2013.
- SERHAN, C. N. "Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology". *Nature*, v. 510, p. 510-592, 2014.
- SINGER, P. *et al.* "Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury". *Critical Care Medicine*, v. 34, p. 1.033-1.038, 2006.
- SPITE, M. *et al.* Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, v. 461, p. 1.287-1.291, 2009.
- STRANDBERG, L. *et al.* Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. *PLoS One*, v. 4, p. e7605, 2009.
- SVAHN, S. L. *et al.* Dietary Omega-3 fatty acids increase survival and decrease bacterial load in mice subjected to *Staphylococcus aureus*-induced Sepsis. *Infect Immun.*, v. 84, p. 1.205-1.213, 2016.
- VIEIRA, R. P. *et al.* Creatine Supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, v. 37, p. 660-667, 2007.
- YANG, L. L. *et al.* Salvianolic acid A inhibits angiotensin II – induced proliferation of human umbilical vein endothelial cells by attenuating the production of ROS. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 33, p. 41-48, 2012.
- YING-HUA, L. *et al.* Omega-3 Fatty Acid Intervention Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Weight Loss in Mice. *Mar. Drugs*, v. 13, n. 2, p. 1.026-1.036, 2015. DOI: 10.3390/md13021026.
- ZHAO, Y.; WANG, C. Effect of v-3 polyunsaturated fatty acid-supplemented parenteral nutrition on inflammatory and immune function in postoperative patients with gastrointestinal malignancy: A meta-analysis of randomized control trials in China. *Medicine*, v. 97, n. 16, p. e-0472, 2018.

## Efeito Antioxidante da *Ilex paraguariensis* e Condimentos na Oxidação Lipídica de Filés de *Oreochromis niloticus*

Amanda A. R. Machado<sup>1</sup>, Nilce Coelho Peixoto<sup>2</sup>, Tiffany P. Hautrive<sup>1</sup>,  
Juliano Uczay<sup>1</sup>, Aline S. Bezerra<sup>1</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** os compostos antioxidantes presentes naturalmente nas plantas têm sido alvo de pesquisas em substituição aos sintéticos como aditivos alimentícios. Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante de extrato de erva-mate, em associação com os condimentos alecrim, orégano e tomilho, em filés de tilápia submetidos a diferentes formas de preparo, ante a oxidação lipídica do pescado. **Método:** os extratos foram avaliados quanto ao percentual de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e quanto aos teores de compostos fenólicos totais. A oxidação lipídica do pescado foi analisada pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*). **Resultados:** os resultados mostraram que o orégano foi o condimento que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais, e a erva-mate a maior atividade antioxidante. Com relação à análise de TBARS, na adição do *mix* de erva-mate com os três condimentos aos filés de tilápia *in natura* e submetidos aos diferentes processamentos térmicos (frito ou assado), foi verificado que apresentaram os menores valores relativos às amostras controle (sem a adição do *mix*), atingindo uma diminuição de, aproximadamente, dez vezes no pescado preparado assado. Quanto ao reaquecimento, foi constatado que este fator dobra a quantidade de TBARS presentes. **Conclusões:** assim, conforme os resultados, é possível sugerir a eficácia da associação dos condimentos com a erva-mate na redução da rancidez oxidativa dos filés de tilápia submetidos aos diferentes processamentos térmicos aplicados, bem como do produto *in natura*.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Especiarias. Perciformes.

### ANTIOXIDANT EFFECT OF *ILEX PARAGUARIENSIS* AND CONDIMENTS ON LIPID OXIDATION OF *OREOCHROMIS NILOTICUS* STEAK

### ABSTRACT

**Objective:** the antioxidant compounds naturally present in plants have been the subject of research replacing synthetic ones as food additives. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of yerba mate extract, in association with rosemary, oregano and thyme condiments, in tilapia fillets submitted to different preparation forms, in face of lipid oxidation of fish. **Method:** the extracts were evaluated for the percentage reduction of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical and for the content of total phenolic compounds. The lipid oxidation of the fish was analyzed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test. **Results:** the results showed that the oregano was the condiment that presented the highest content of total phenolic compounds and the yerba mate, the highest antioxidant activity. Regarding the analysis of TBARS, the addition of the yerba mate mix with the three condiments to the fillets of *in natura* tilapia and submitted to the different thermal processes (fried or roasted), were verified that presented the smaller values relative to the control samples (without the addition of the mix), reaching a reduction of approximately ten times in prepared roasted fish. As for reheating, it was found that this factor doubles the amount of TBARS present. **Conclusions:** thus, according to the results, it is possible to suggest the effectiveness of the association of condiments with yerba mate in the reduction of oxidative rancidity of the tilapia fillets submitted to the different thermal processes applied, as well as the *in natura* product.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Spices. Perciformes.

RECEBIDO EM: 8/6/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 10/9/2019

ACEITO EM: 26/2/2020

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões. Palmeira das Missões/RS, Brasil.

<sup>2</sup> Autora correspondente. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Campus Palmeira das Missões. Av. Independência, 3751, Bairro Vista Alegre, Palmeira das Missões/RS, Brasil. CEP: 98300-000. <http://lattes.cnpq.br/6573904661865745>. <https://orcid.org/0000-0002-6982-867X>. [ncpeixoto@yahoo.com.br](mailto:ncpeixoto@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) é um pescado de grande importância mundial no setor de aquicultura. É considerada uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva, por possuir rápido crescimento, maturação sexual tardia, hábito alimentar onívoro e ser de grande rusticidade. Mercadologicamente, além de ser um peixe de baixo valor comercial e de filetagem descomplicada, sua comercialização é facilitada em virtude de sua carne branca, textura firme, sabor delicado e ausência de espinhas intramusculares, o que gera uma considerável aceitabilidade pelo público consumidor (WANG; LU, 2016). No Brasil, esta é a espécie mais cultivada na aquicultura interior, com uma produção anual superior a 283 mil toneladas (IBGE, 2017).

O alto teor lipídico da carne da tilápia, contudo, é um fator desfavorável e deve ser considerado, pois leva à rápida deterioração sensorial e nutricional se não for manuseada, transportada e armazenada de maneira correta. A rancidez oxidativa é consequência da metabolização dos lipídios pelos microrganismos que se proliferam no produto (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2017).

Conforme Kanner (2007), o nosso trato gastrointestinal é exposto a compostos químicos oxidados pela sua ingestão por meio da dieta. O consumo de gorduras oxidadas por animais e humanos acarreta em aumento na excreção urinária de malondialdeído (MDA) e de compostos carbonilados, marcadores de danos oxidativos (lipídico e proteico, respectivamente). Além destes exemplificados, nosso metabolismo normal, por intermédio de rotas bioquímicas, desencadeia a formação de quantidades pequenas destes compostos nocivos (MURUSSI *et al.*, 2014; KANNER, 2007).

Dados mostram que os polifenóis ingeridos com alimentos contendo moléculas lipídicas suscetíveis à oxidação, impedem sua conversão metabólica em produtos perniciosos (VISIOLI, 2014). Ainda, o MDA e outros produtos da oxidação têm despertado a atenção da comunidade científica por sugerir sua relação com o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias. Conforme estudo realizado por Kangari *et al.* (2018), o MDA é indicado como um dos mais abundantes e importantes aldeídos da peroxidação lipídica, podendo reagir com proteínas, DNA e outras biomoléculas e, assim, alterar sua estrutura e função, evoluindo para um tumor. Mediante avaliação dos níveis de produtos oxidados nos tecidos e no plasma, foi verificado que estes são significativamente maiores em

pacientes com câncer e em indivíduos tabagistas comparativamente com pacientes saudáveis, levando à dedução de que o estresse oxidativo, induzido por um desequilíbrio nas defesas antioxidantes e/ou a produção exacerbada de tais moléculas/radicais, podem ser um fator predisponente para tal patologia (HORN *et al.*, 2015; KANGARI *et al.*, 2018).

A erva-mate (EM (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)), originária da América do Sul, é usada no chimarrão, bebida tradicionalmente presente no cotidiano dos gaúchos, na região dos pampas, incluindo o Rio Grande do Sul. Por seu alto consumo, e aliado aos possíveis benefícios advindos deste, diversos estudos analisam o potencial antioxidante do seu extrato e a possível aplicação em alimentos (BATTISTON *et al.*, 2016; COLPO *et al.*, 2016).

A EM contém compostos químicos que apresentam propriedades antioxidantes. Entre os exemplares estão os compostos aromáticos bioativos, cuja aplicação pode controlar a oxidação lipídica durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos, beneficiando a indústria de alimentos (BATTISTON *et al.*, 2016; COLPO *et al.*, 2016).

No mesmo sentido, plantas condimentares, como salsa, manjeriço, alho, cebola, coentro e orégano, possuem propriedades antioxidantes atribuídas, entre outros fatores, à presença de compostos fenólicos e flavonoides e, além disso, sua ingestão é adequada à população hipertensa, pela substituição das especiarias e por dispensar ou diminuir o emprego de sal na dieta, o que teve boa aceitação pelos sujeitos pesquisados (MENDES; RODRIGUES-DAS-DORES; CAMPIDELLI, 2015). Plantas alimentícias, como almeirão (*Cichorium intybus*) e radite (ou *radicchio*, radiche, *Hypochaeris chillensis*) também têm um conteúdo considerável de compostos fenólicos e boa capacidade antioxidante, como já investigado por este grupo de pesquisa (BEZERRA *et al.*, 2017).

Os vegetais (incluindo especiarias, condimentos, ervas e alimentos) que contêm quantidades significativas de substâncias fenólicas e, consequentemente, dispõem do atributo antioxidante, são promissores como alimentos funcionais e por isso os aditivos sintéticos são preteridos. O mecanismo pelo qual a propriedade é atribuída conta com a capacidade de quelar espécies reativas e radicais livres endógenos ou exógenos, o que possibilita sua neutralização, conferindo um adicional ao sistema de defesa e impedimento de suas consequências danosas à saúde de quem os ingere (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; COLPO *et al.*, 2016; ZAWADZKI *et al.*, 2017; WEBER, 2018).

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos de EM em associação com condimentos reconhecidamente eficazes como antioxidantes e que melhoram o aroma e o sabor em filés de tilápia submetidos a diferentes modos de preparo.

## MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental, executado na Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* de Palmeira das Missões, RS. A elaboração dos extratos foi realizada no Laboratório de Apoio à Nutrição, e o processamento dos filés de pescado no Laboratório de Técnica Dietética. As análises químicas, feitas em triplicata, foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia.

A amostra de EM (*I. paraguariensis*) foi doada por uma indústria ervateira do município de Venâncio Aires, situado no Estado do Rio Grande do Sul. A amostra era 100% nativa e isenta de açúcar e glúten.

Os condimentos e especiarias (alecrim, orégano e tomilho), pulverizados e obtidos por meio de uma loja virtual, compuseram a mistura a ser avaliada.

As amostras de filé de tilápia (*O. niloticus*) foram cedidas por produtores da região de Palmeira das Missões/RS. As mesmas totalizaram aproximadamente 1 kg e foram transportadas congeladas (-18°C) em embalagens plásticas transparentes e acondicionadas em caixa de polietileno, armazenadas sob congelamento, até o momento das análises.

O procedimento de preparação dos extratos foi conduzido de acordo com Bezerra (2012). Para os extratos de EM foi realizada uma pré-análise para verificar a melhor extração dos compostos, utilizando a mistura de etanol e água destilada (20:80, v/v) com diferentes concentrações de EM, sendo selecionada a amostra com 30% (EM) para este trabalho. As extrações foram conduzidas em banho-maria por 30 minutos na temperatura de 40°C. Após, os macerados foram retirados do banho-maria, filtrados em algodão hidrófilo, acondicionados em tubos de 50 mL de capacidade e estocados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento das análises. O procedimento de obtenção da associação dos três condimentos foi realizado a partir da mesma técnica de extração, porém foi utilizada a concentração de 10% (planta/solvente), a qual revelou a melhor extração de compostos.

A quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos de condimentos e EM foi determinada por espectrofotometria por meio da reação de oxirredução com o reagente de Folin-Ciocalteu usando

uma curva de calibração com ácido gálico, e os valores são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato, conforme metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

O percentual de atividade antioxidante (% AA) dos extratos de EM e de condimentos foi avaliado pela diminuição na quantidade do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), conforme Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A capacidade de reduzir o DPPH é expressa em % AA, sendo calculada em relação ao controle, segundo a expressão  $\% AA DPPH = AC - (AA - AB) \times 100/AC$ , em que AC é a absorbância do DPPH, AA é a absorbância da amostra e AB é a absorbância do branco de reação.

Depois da definição da concentração do extrato de EM e da associação dos condimentos, foram aplicados, em cada filé de tilápia descongelado, 10 mL de extrato de EM e 20 mL da mistura de condimentos (alecrim, orégano e tomilho).

Após, estas foram revestidas em papel alumínio, alocadas em sacos plásticos transparentes, congeladas por sete dias, e, posteriormente, aplicados os diferentes processamentos térmicos para a execução da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances: TBARS*).

Em relação aos tratamentos térmicos das amostras de pescado (50 g), após o descongelamento foram fritas (Ft) com 3 mL de óleo de soja em uma frigideira antiaderente ou assadas em forno elétrico (Ad).

Após serem submetidas aos diferentes modos de preparo, as amostras foram revestidas em papel alumínio, acondicionadas em sacos plásticos transparentes e congeladas por sete dias. O reaquecimento (Rq) ocorreu em forno micro-ondas por 20-30 segundos em potência máxima.

As análises foram realizadas com o filé de pescado *in natura* (IN), submetidos aos diferentes modos de preparo, designados como frito (Ft), assado (Ad) e reaquecido (Rq) e, ainda, com ou sem a adição do *mix* contendo a EM e os três condimentos.

A quantificação de produtos da peroxidação lipídica (TBARS) nas diferentes formas de preparo do filé de tilápia foi executada pela metodologia descrita por Buege e Aust (1978). As amostras foram preparadas a partir de 250 mg de tecido muscular de pescado com KCl 150 mM em homogeneizador, após fervura e centrifugação, formando um extrato (homogeneizado). Os valores foram expressos em nmol por g de amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que, entre os condimentos analisados, o orégano foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais, enquanto a associação de condimentos 10% com extrato de EM 30% apresentou o menor teor. Quanto ao percentual de inibição do radical DPPH (%AA), o extrato de EM a 30%, quando empregado isoladamente, mostrou o maior percentual de atividade antioxidante, e o alecrim, a menor atividade antioxidante ante o radical livre analisado (Tabela 1).

Tabela 1 – Compostos fenólicos totais e percentual de atividade antioxidante das amostras de condimentos, erva-mate (EM) e associação (*mix*) entre estes

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Atividade antioxidante (%)
<b>Condimentos</b>		
Orégano	158,9	42,8
Tomilho	144,0	42,2
Alecrim	138,0	39,5
EM 30%	151,8	59,4
<b>Mix condimentos 10% + EM 30%</b>	133,2	42,9

EAG: equivalentes de ácido gálico.

Fonte: Dados da pesquisa/elaborada pelos autores.

Estudos recentes têm demonstrado o interesse por produtos naturais, preponderantemente de origem vegetal, com o objetivo de melhorar a conservação dos alimentos. Entre eles ameixa (JIANG; XIONG, 2016), pimenta, canela, gengibre, anis, romã, mirtilo, maçã (JIANG; XIONG, 2016), chá verde (NIKMARAM *et al.*, 2018), orégano, uva (JIANG; XIONG, 2016; NIKMARAM *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019), lichia, caqui (RIBEIRO *et al.*, 2019), entre outros. A quantidade expressiva de compostos polifenólicos presentes nestes produtos é sugerida como a razão da atividade antioxidante, proporcionando efeitos benéficos à saúde de quem os consome tanto como alimento quanto como aditivo alimentício para restringir a oxidação (KANNER, 2007; BLUM-SILVA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015; JIANG; XIONG, 2016; BEZERRA *et al.*, 2017; NIKMARAM *et al.*, 2018).

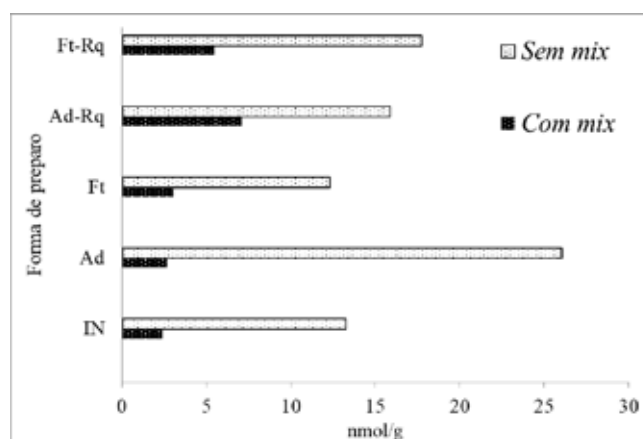
Assim como registrado no atual estudo, o alto conteúdo de moléculas fenólicas na EM está bem documentado (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; COLPO *et al.*, 2016; FERRARIO *et al.*, 2018).

O processo de oxidação dos constituintes dos alimentos contribui desfavoravelmente para a sua preservação e diminui seu tempo de validade. O intuito da inclusão de aditivos ou de algum processamen-

to é prolongar o período no qual o alimento está apto para o consumo seguro, postergando sua deterioração (LAHMAR *et al.*, 2018; POGORZELSKA *et al.*, 2018).

Na Figura 1 estão apresentados os valores de TBARS das amostras de filé de tilápia *in natura* (IN) e submetidos aos diferentes tipos de processamentos (frito (Ft), assado (Ad) e reaquecido (Rq)) e com ou sem a inclusão do *mix* de condimentos e EM.

Figura 1 – TBARS nas amostras de filés de tilápia em diferentes formas de processamento térmico (Frito: Ft, Assado: Ad, Reaquecido: Rq e IN: *in natura*) com e sem a adição do *mix* de condimentos e erva-mate (EM)



Fonte: Dados da pesquisa/elaborada pelos autores.

Os filés fritos e submetidos ao reaquecimento em micro-ondas (FtRq) exibiram um valor de TBARS aproximadamente três vezes maior do que aquele revelado pela amostra frita e reaquecida adicionada do *mix*. A forma de preparo assada e reaquecida (AdRq) apresentou o dobro da quantidade de TBARS do que aquela em que a amostra foi acondicionada com o *mix*.

Na condição frita, a adição do *mix* resultou em valores de TBARS em torno de 25% daquele apresentado pelo controle (Ft). A quantificação das TBARS do filé de tilápia assado sem *mix* (Ad) revelou que a adição da preparação de EM e condimentos diminuiu cerca de dez vezes o seu valor.

O filé *in natura* conservado com o *mix* apresentou uma redução de TBARS que atingiu cerca de 20% quando comparada àquela encontrada na preparação sem o *mix* (IN).

A condição de preparo do pescado, desde que associada ao *mix*, não altera consideravelmente o nível de TBARS (Ad = 2,67 nmol/g e Ft = 3,03 nmol/g; AdRq = 7,07 nmol/g e FtRq = 5,45 nmol/g). O reaquecimento da preparação incluída do *mix*, entretanto, dobra a quantidade de TBARS presentes (Ad = 2,67 nmol/g e AdRq = 7,07 nmol/g; Ft = 3,03 nmol/g e FtRq = 5,45 nmol/g).

O nível elevado de lipídios presentes em produtos cárneos e afins é o principal determinante que impacta na sua degradação oxidativa (JIANG; XIONG, 2016; SMAOUI *et al.*, 2016; LAHMAR *et al.*, 2018; POGORZELSKA *et al.*, 2018), fenômeno denominado rancificação, acarretando alteração de coloração, de sabor, de aroma e, conseqüentemente, prejudicando a aceitabilidade e encurtando o tempo hábil para o consumo (SMAOUI *et al.*, 2016; POGORZELSKA *et al.*, 2018). A proliferação de microrganismos imprime velocidade às vias metabólicas, gerando produtos enzimáticos finais que prejudicam a qualidade do produto (SMAOUI *et al.*, 2016; LAHMAR *et al.*, 2018).

A utilização de compostos naturais como aditivos alimentares tem sido requerida em detrimento de produtos químicos sintéticos (como BHT (butil-hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxianisol) e TBHQ (*t*-butil-hidroquinona)), com o intuito de diminuir ou anular os efeitos deletérios sobre a saúde conseqüentes do seu consumo (JIANG; XIONG, 2016; NIKMARAM *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019). Os efeitos adversos destes agentes são o motivo pelo qual são determinados limites máximos para a sua ingestão, garantindo segurança ou conseqüências mínimas à saúde (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Os resultados do ensaio das TBARS mostraram a eficácia do *mix* de EM e condimentos na redução da rancidez oxidativa dos filés de tilápia submetidos aos diferentes processamentos térmicos aplicados, bem como do produto *in natura* (IN), uma vez que, sempre que foi usado, houve diminuição da oxidação lipídica.

A adição de *I. paraguariensis* tem se mostrado efetiva em melhorar a qualidade de produtos alimentícios tanto de origem vegetal quanto animal. Em suco misto de cenoura e laranja (FERRARIO *et al.*, 2018), em ervilhas (YONNY *et al.*, 2018) e em carne bovina (ZAWADZKI *et al.*, 2017) foi demonstrada a melhora da estabilidade oxidativa. Quanto ao pescado, entretanto, os trabalhos são escassos e não consideram a EM como conservante para esta fonte alimentar proteica (HASSOUN; ÇOBAN, 2017; OZOGUL *et al.*, 2017).

Fatores oxidantes, como xenobióticos, fármacos e alimentos oxidados, levam à geração de radicais livres e demais espécies reativas, estimulam processos inflamatórios e induzem à formação de toxinas (KANNER, 2007; MURUSSI *et al.*, 2014; JIANG; XIONG, 2016), o que, indubitavelmente, acarreta, a longo prazo, o desenvolvimento de patologias/doenças e provoca impactos negativos à saúde dos seres humanos. O estresse oxidativo em proteínas e lipídios induz ao comprometimento funcional e fisiológico de moléculas enzimáticas, receptores, transportadores e de

membranas e de organelas celulares (RIBEIRO *et al.*, 2019). A exposição e/ou o consumo de compostos químicos antioxidantes mitigaria e/ou contribuiria para que tais conseqüências deletérias fossem minimizadas porque agem como *scavengers* de espécies reativas (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; COLPO *et al.*, 2016; JIANG; XIONG, 2016). Neste contexto, já se tem confirmada suas eficácias como agentes antiproliferativos (WEBER, 2018), anti-inflamatório (SOUZA *et al.*, 2015) e antimicrobiano (NIKMARAM *et al.*, 2018).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demonstração da eficiência do *mix* na redução da oxidação lipídica dos filés de tilápia, tanto sob as diferentes formas de preparo para o consumo quanto *in natura*, denota alternativas para a conservação do produto. Ademais, a revelação de que a associação entre a EM e o alecrim, o orégano e o tomilho diminuem a rancificação lipídica, mesmo após o reaquecimento do alimento previamente preparado para o consumo, prevê a possibilidade da utilização do *mix* como uma estratégia promissora na tecnologia de alimentos.

## REFERÊNCIAS

- BATTISTON, C. S. Z. *et al.* Caracterização físico-química e atividade antioxidante de chocolate branco com extrato de erva-mate. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1.878-1.888, 2016.
- BEZERRA, A. S. *Avaliação de compostos funcionais de grãos e extrato concentrado de cevada visando aplicações nutricionais*. Santa Maria, RS, Brasil. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, 2012.
- BEZERRA, A. S. *et al.* Nutritional composition and antioxidant activity of non conventional food plants of the Southern region of Brazil. *Brazilian Archives of Food*, v. 2, n. 3, p. 182-188. 2017.
- BLUM-SILVA, C. H. *et al.* The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 1-6, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-309, 1978.
- COLPO, A. C. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry*, v. 209, p. 185-195, 2016.

- EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. *Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary*, 11, n. 1, p. 60-74, 2017.
- FERRARIO, M. *et al.* Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract. *Food Chemistry*, v. 269, p. 567-576, 2018.
- HASSOUN, A.; ÇOBAN, Ö. E. Essential oils for antimicrobial and antioxidante applications in fish and other seafood products. *Trends in Food Science & Technology*, v. 68, p. 26-36, 2017.
- HORN, R. C. *et al.* Avaliação dos níveis de estresse oxidativo em pacientes fumantes crônicos. *Revista Contexto & Saúde*, v. 15, n. 29, p. 97-103, 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da pecuária municipal*. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>. Acesso em: 3 mar. 2019.
- JIANG, J.; XIONG, Y. L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: a review. *Meat Science*, v. 120, p. 107-117, 2016.
- KANGARI, P. *et al.* Enzymatic antioxidant and lipid peroxidation evaluation in the newly diagnosed breast cancer patients in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 19, n. 12, p. 3.511-3.515, 2018.
- KANNER J. Dietary advanced lipid oxidation end products are risk factors to human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 51, p. 1.094-1.101, 2007.
- LAHMAR, A. *et al.* Prolonging shelf life of lamb cutlets packed under high-oxygen modified atmosphere by spraying essential oils from North-African plants. *Meat Science*, v. 39, p. 56-64, 2018.
- MENDES, G. M.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; CAMPIDELLI, L. C. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 2, p. 297-304, 2015.
- MURUSSI, C. *et al.* Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1.186-1.193, 2014.
- NIKMARAM, N. *et al.* Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Science*, v. 145, p. 245-255, 2018.
- OZOGUL, Y. *et al.* Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT – Food Science and Technology*, v. 75, p. 677-684, 2017.
- POGORZELSKA, E. *et al.* Antioxidant potential of *Haemato-coccus pluvialis* extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage. *Meat Science*, v. 135, p. 54-61, 2018.
- RIBEIRO, J. S. *et al.* Natural antioxidants used in meat products: a brief review. *Meat Science*, v. 148, p. 181-188, 2019.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SMAOUI, S. *et al.* Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. *Meat Science*, v. 117, p. 196-204, 2016.
- SOUZA, A. H. P. *et al.* Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: an in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Research International*, v. 78, p. 286-294, 2015.
- VISIOLI, F. Rusting the pipes: Ingestion of oxidized lipids and vascular disease. *Vascular Pharmacology*, v. 62, n. 2.014, p. 47-48, 2014.
- WANG, M.; LU, M. Tilapia polyculture: a global review. *Aquaculture Research*, v. 47, p. 2.363-2.374, 2016.
- WEBER, A. V. Potencial efeito antioxidante e antiproliferativo do extrato aquoso de *Carya illinoensis* sobre células tumorais. *Revista Contexto & Saúde*, v. 18, n. 35, p. 91-94, 2018.
- YONNY, M. E. *et al.* Enhancement in the oxidative stability of green peas by *Ilex paraguariensis* addition in a blanching process before their refrigerated and frozen storage. *LWT – Food Science and Technology*, v. 91, p. 315-321, 2018.
- ZAWADZKI, A. *et al.* Mate extract as feed additive for improvement of beef quality. *Food Research International*, v. 99, p. 336-347, 2017.



## The Consumption of Fruits as a Potential Alternative to Accelerate the Recovery Process After High Intensity Exercise

Sonja Skinner<sup>1</sup>, Madison Wade<sup>1</sup>, Courtney Iacobacci<sup>1</sup>,  
Roderick Hutcherson<sup>1</sup>, Julia Matzenbacher dos Santos<sup>2</sup>

### ABSTRACT

A prevalent desire in the sports world is the acceleration of post-exercise recovery; therefore, many studies have examined the use of dietary supplements before, during, and after exercise to determine the positive effects on athletes as a catalyst for recovery. Overall, studies have found that adaptations to regular exercise promotes advantageous reactions in the body to boost the immune system, prevent dyslipidemia and muscle loss, and increase bone density. However, exercise at an increased intensity or duration usually performed under competitive settings can deplete glycogen stores, increase lactic acid, form an excess amount of reactive oxygen species (ROS), increase tissue damage, and decrease immunologic function. This review incorporated studies that tested the use of fruits as a strategy to attenuate the period by which the body buffers the increase in acidity and inflammation, scavenge ROS and to regenerate muscle damage after high intensity exercise. Therefore, the effect of fruit intake rich in vitamins and those containing polyphenolic ring-based flavonoids and carbohydrates was discussed. Nutrient supplementation can enhance recovery after high intensity exercise, particularly fruits of red-blue color such as cherries and blueberries seem to decrease oxidative stress, inflammation, and muscle damage. In summary, each fruit has specific targets to offset body regeneration, avoid over training, and improve overall performance.

**Keywords:** Body regeneration. Muscle damage. Cherry. Blueberry.

### O CONSUMO DE FRUTAS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA ACELERAR O PROCESSO DE RECUPERAÇÃO APÓS EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE

### RESUMO

A aceleração da recuperação pós-exercício é importante no mundo dos esportes; portanto, muitos estudos examinaram o uso de suplementos dietéticos antes, durante e após o exercício para determinar os efeitos como um catalisador para a recuperação. No geral, estudos demonstraram que as adaptações aos exercícios regulares promovem reações vantajosas no corpo para estimular o sistema imunológico, prevenir dislipidemia e perda de músculo e aumentar a densidade óssea. No entanto, o exercício em uma intensidade ou duração aumentada realizado em ambientes competitivos pode esgotar os estoques de glicogênio, aumentar o lactato, formar uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentar o dano ao tecido e diminuir a função imunológica. Esta revisão incorporou estudos que testaram o uso de frutas como estratégia para atenuar o período em que o corpo recupera do aumento da acidez e inflamação, diminui ROS e regenera os músculos após exercícios de alta intensidade. Foi discutido, portanto, que o efeito da ingestão de frutas contendo flavonóides polifenólicos baseados em anéis e ricos em vitaminas e carboidratos, bem como bebidas e alimentos ricos em carboidratos e proteínas. A suplementação de nutrientes pode melhorar a recuperação após exercícios de alta intensidade, especialmente frutas de cor vermelho-azulada, como cerejas e mirtilos, parecem diminuir o ROS, a inflamação e o dano muscular. Em resumo, cada fruta tem metas específicas para compensar a regeneração do corpo, evitar o excesso de treinamento e melhorar o desempenho geral.

Palavras chave: Regeneração corporal. Dano muscular. Cereja. Mirtilo.

RECEBIDO EM: 12/5/2020

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 2/6/2020

ACEITO EM: 10/6/2020

<sup>1</sup> Fairmont State University – Department of Education, Health and Human Performance, Fairmont, WV, USA. 1201 Locust Avenue, Fairmont, WV 26554.

<sup>2</sup> Autora correspondente. Detroit R&D, Inc, 2727, 2nd street, Detroit, MI, 48208 USA. Fairmont State University – Department of Education, Health and Human Performance, Fairmont, WV, USA. 1201 Locust Avenue, Fairmont, WV 26554. <http://lattes.cnpq.br/8518388745447251>. <https://orcid.org/0000-0003-2758-9452>. [julia.dossantos@fairmontstate.edu](mailto:julia.dossantos@fairmontstate.edu)

## INTRODUCTION

Proper nutrition is important for various reasons regarding human health, including maintaining a healthy body weight, decreasing risk of chronic diseases, and increasing exercise performance. Sports nutrition has shown the importance of dietary behavior on athletic performance to improve strength, power, and endurance (BECK *et al.*, 2015; RATTRAY *et al.*, 2015). Exercise induces different responses on the body depending on the intensity, duration, type and frequency.

Overall, studies have found that adaptations to regular exercise promotes advantageous reactions in the body to boost the immune system, prevent dyslipidemia and muscle loss and increase bone density (MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003; KARP *et al.*, 2006). However, exercise at an increased intensity or duration usually performed under competitive settings can promote damage to the body (MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003).

Many dietary supplements such as fruits, vegetables and beverages contain antioxidants, carbohydrates, and proteins that can facilitate a quicker recovery for the body, which can decrease recovery time necessary to avoid over training, dehydration, and oxidative damage. Therefore, the aim of this review was to analyze studies that tested the use of fruits as post-exercise recovery strategies. For complete comprehensive discussion on this topic it is necessary to briefly discuss the isolated effect of high intensity and prolonged exercise on the body system.

## EFFECT OF HIGH INTENSITY EXERCISE ON GLUCOSE METABOLISM, OXIDATIVE STRESS, MUSCULAR DAMAGE AND IMMUNOLOGICAL SYSTEM

During exercise the human body endures several changes to compensate alterations on body homeostasis. Moreover, there are increases in capillarization in the active muscles, change in blood distribution, and increases in body temperature. Hormones, for instance, adrenaline and noradrenaline, are secreted and energy demands are increased (MORO *et al.*, 2019; WADE *et al.*, 2020; BOGDANICH; KIGER; SANTOS, 2019). Several pathways are overstimulated generating accumulation of waste products.

Since skeletal muscles produce the force for all voluntary movements, the demand of energy is increased during exercise. Glucose is the first organic compound metabolized to produce ATP during high in-

tensity aerobic exercise. In the contracted muscle, the concentration of skeletal muscle glucose transporter, GLUT4, translocate to the cell membrane to increase glucose uptake (SANTOS *et al.*, 2008). To control blood glucose levels during exercise, the liver breaks down the glycogen releasing glucose to the blood stream. In the sarcoplasm, glucose is broken down, and in high intensity exercises, lactate is a byproduct of the anaerobic glycolysis process. The fatigue is characterized by glycogen depletion and an increase in lactate concentration or acidosis, and typically occurs during exercise performed above the blood lactate threshold (KARP *et al.*, 2006).

After the first minute/s of exercise (1.5 to 3 minutes) the main source of energy progressively redirects to aerobic; mitochondrial citric cycle and electron transport chain (ETC) play a central role on this process. In the process of energy production, complex I and III of ETC produce reactive oxygen species (ROS) and during exercise, with the increase in energy demand and oxygen uptake ROS generation increase exponentially (YAVARI *et al.*, 2015). ROS might activate the pathway for mitochondrial biogenesis, but also change the structure of macromolecules, such as the DNA, fatty acids, amino acids, and proteins (YAVARI *et al.*, 2015).

This energy generated with the breakdown of organic components allows the actin cytoskeleton to contract and be transmitted across the plasma membrane to the basement membrane and adjacent myofibers. Stress due to this force transmission and ROS generated might injure the sarcolemma. During high intensity exercise, if a myofiber is damaged beyond repair, it is regenerated in the following weeks through a series of steps (HORN *et al.*, 2017). Damage in the sarcolemma allows intramuscular proteins, such as myoglobin, creatine kinase (CK), and lactate dehydrogenase (LDH), to leak into the blood (LAMB *et al.*, 2019; AMMAR *et al.*, 2016).

Regular exercise promotes an improvement on the immunologic system; however, acutely prolonged, high intensity exercise could induce depression of immunologic function. Oxidative stress, change in body temperature, and damage in skeletal muscle membrane have been associated with leukocytosis after heavy exercise (DAVISON *et al.*, 2012). In addition, studies have reported that physical activity can induce an acute inflammation phase response characterized by an increase in multiple circulating cytokines and chemokines, such as Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-

6), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Epidermal Growth Factor (EGF), and Monocyte Chemoattractant-1 (MCP-1) (ACCATTATO *et al.*, 2017).

In summary, at the end of high intensity exercise the human body faces dehydration, depletion of glycogen reserve, an increase in acidity, ROS, muscle damage and pro-inflammatory cytokines. Fortunately, the human body contains a sophisticated compensatory mechanism to buffer the increase in acidity, scavenge ROS through inflammatory enzymes, and to regenerate muscle damage. After exercise, ROS act as signals in exercise activating signaling pathways that cause useful adaptations in cells. Chronically, this process might result in upregulation of antioxidant enzymes, increase in mitochondrial density, and skeletal muscle growth (DOS SANTOS *et al.*, 2015; GOMEZ-CABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Yet, the complete recovery could take several hours to days. Different strategies have been used to abbreviate the recovery period, such as fruits consumption as dietary supplements. The overall aim of this review is to analyze the use of fruits to improve post-exercise recovery and determining which type will be the most beneficial based on the published literature.

### Fruits as Dietary Supplements for Exercise Recovery

Fruits are present in the majority of diets as a potent source of essential vitamins, minerals, and fiber. Fruits provide a wide range of health-boosting antioxidants and anti-inflammatory agents including flavonoids (SEERAM, 2008). In addition, fruits are a source of carbohydrate that can fulfill the promotion of cellular and systemic damage and the deficit of glycogen faced post high intensity exercise (MCLEAY *et al.*, 2012). The fruits may be composed of potassium, vitamin B6, C, E, pro-vitamins A phenolics, carotenoids, lutein, folic acid, magnesium, catecholamines, and antioxidants; all important in reduction of oxidative stress, inflammation, and recovery post high intensity exercise (NIEMAN *et al.*, 2018a; LAPUENTE *et al.*, 2019). Thus, fruits may assist in decreasing the effects of exercise on the body due to their anti-inflammatory and antioxidant capabilities.

Studies have shown red and blue colored fruits, such as cherries, blueberries, pomegranates, and grapes, contain anthocyanins, which are polyphenolic ring-based flavonoids that decrease the risk of cardiovascular disease, might hinder the growth of many types of cancers, and activate the immunological system (MCANULTY *et al.*, 2011). These fruits contain high levels of bioactive compounds and polyphenols

antioxidants, carotenoids, flavanoids, phenolic acids, hydroxycinnamates, ellagic acid, quercetin, ellagitanins, and proanthocyanins (AMMAR *et al.*, 2018). Bell *et al.* (2015) found such components are capable of decreasing cell damage caused by oxidative stress and have high levels of anti-inflammatory capacities (BELL *et al.*, 2015; HOWATSON *et al.*, 2010; KELLEY *et al.*, 2006; SEERAM *et al.*, 2001).

### Cherries

Tart and sweet cherries provide to dietary fiber intake and carry high amounts of antioxidants (WANG; CAO; PRIOR, 1997; BELL *et al.*, 2015). A study by Howatson *et al.* (2010) was performed to investigate the effect of tart cherry juice blend ingested before and after running a Marathon on muscle damage, inflammation, and oxidative stress. In the study, total antioxidant capacity increased and lipid peroxidation decreased in the group that consumed the cherry juice in comparison to the placebo group (HOWATSON *et al.*, 2010).

Moreover, it was shown that Montmorency cherry concentrate consumption twice per day for 8 consecutive days can be an efficacious functional food for accelerating recovery and reducing exercise-induced inflammation such as IL-6 and high-sensitivity C-reactive protein following strenuous cycling exercise (BELL *et al.*, 2015). The same study did not find an effect on levels of CK in blood (BELL *et al.*, 2015). In agreement, a study performed in 36 resistance trained men found no effect of tart cherry juice intake in blood levels of CK after resistance (LAMB *et al.*, 2019).

Analyzing different markers of muscle catabolism and soreness (blood creatinine and total protein), Levers *et al.* (2015) suggest that short-term consumption (10 days pre and 48 h after exercise) of Montmorency powdered tart cherries in a capsule is an effective supplement to recovery after a single bout of resistance exercise in resistance trained individuals (LEVERS *et al.*, 2015). Therefore, cherry intake seemed to account for the improvement of the recovery after high intensity exercise; however; its effect on muscle damage marker remain contradictory.

### Blueberries

Blueberries have benefits in attenuating ROS and inflammatory cytokines, which was shown to inhibit neural degeneration (MCANULTY *et al.*, 2011; YU-DIM *et al.*, 2002). This makes blueberry an attractive fruit to mitigate damages induced after heavy exercise. McAnulty *et al.* (2011) tested on twenty-five trai-

ned subjects prior to and after 2.5 h of running. This study found reduction of plasma 8-isoprostanes (a classical ROS marker) and elevated plasma IL-10 post-exercise. Natural killer cell counts are usually reduced after long durations of exercise, but in McAnulty *et al.* (2011) study, the blueberry group had high pre-exercise natural killer cell levels, which assisted in maintaining levels after exercise close to the control group prior to physical activity (MCANULTY *et al.*, 2011). Similar effect of blueberry supplementation on immunological system was found after 3 days of intensified running training (AHMED *et al.*, 2014) when blueberry-green tea-polyphenol soy protein complex for 17 days, with a 3-day running period inserted at day 14 (AHMED *et al.*, 2014).

In addition, the intake of blueberry was studied after eccentric exercise and was found to have a faster rate of decrease in oxidative stress when this fruit was consumed 5 and 10 hours prior to 300 strenuous eccentric contractions of the quadriceps and then immediately, 12 and 36 hours (MCLEAY *et al.*, 2012). Increase in antioxidant capacity as well as decrease in IL-6 and CK was found when blueberry have been consumed (MCLEAY *et al.*, 2012). Moreover, despite of no effect in performance, 4 days of blueberry supplementation decreased blood lactate after 8 km running (BRANDENBURG *et al.*, 2019). In contrast, supplementation polyphenol soy protein complex containing blueberry over a 17 days period did not alter blood biomarkers for inflammation and oxidative stress after from 3 days of heavy running exertion (NIEMAN *et al.*, 2013). As a result, the ingestion of blueberries seemed to increase recovery rate and muscle repair, and stimulate the reduction of oxidative stress, inflammation, and prevent diseases after exercise.

### Pomegranate

Utilization of pomegranate as a supplement has been shown to prevent oxidative stress by increasing antioxidant status and decreasing oxidative stress with the inclusion of lipid peroxidation and low-density lipoprotein oxidation (AMMAR *et al.*, 2018). Pomegranate also improved exercise performance of aerobic (TREXLER; SMITH-RYAN; MELVIN, 2014) and strength exercise (ROELOFS *et al.*, 2017). Pomegranate juice ingestion seemed to reduce oxidative stress response to intense physical activity through the enhancement of antioxidant responses and accelerate recovery; pomegranate supplementation has implications for performance recovery post-exercise bouts (AMMAR *et al.*, 2018).

Healthy subjects performed once exhaustive exercise running on treadmill after one cup of pomegranate juice for two weeks. Antioxidant enzymes activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase was increased in the group who consumed pomegranate juice when compared to the control placebo group (MAZANI; FARD; BAGHI, 2014). Moreover, Ammar *et al.* (2016) tested the consumption of 1.5L of pomegranate juice or placebo on the 48 hours following the performance of two Olympic-Weightlifting-sessions. Pomegranate intake improved the recovery kinetic CK and LDH showing its effect on muscle damage (AMMAR *et al.*, 2016).

On the other hand, a study observed no change in inflammatory markers such as IL-6, and CK or myoglobin for 9-days of pomegranate extract consumption 2, 24, 48, 72, and 96 h after two sets of 20 maximal eccentric elbow flexion exercises with one arm when compared to placebo (TROMBOLD; BARNES; CRITCHLEY, 2010). Indeed, pomegranate intake was not effective to attenuate exercise-induced muscle damage from eccentric exercise of the elbow flexors of their non-dominant arm (LAMB *et al.*, 2019). Therefore, the effect of pomegranate consumption on exercise recovery still contradict.

### Grapes and apple

Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) are polyphenols that are polymers of flavanols (MANACH *et al.*, 2004), and the main nutrient sources are grapes, cocoa, and apples (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). It is supported that constant consumption of grape juice decreased oxidative stress damage caused by carbon tetrachloride in the brain, liver, and plasma (DANI *et al.*, 2008a, 2008b). In Dalla Corte *et al.* (2013) study, organic purple grape juice intake was verified to be sufficient in protecting vital organs from oxidative stress induced by prolonged exercise in laboratory animals (DALLA CORTE *et al.*, 2013). Beside healthy humans ingested 300 mg/day of polyphenol-rich grape seed extract or placebo from the time of eccentric exercise to 72 h after exercise (KIM; SO, 2019). CK level was significantly decreased 96 h after exercise in the polyphenol-rich grape seed extract group compared with the placebo group (KIM; SO, 2019). Together these result suggested that grapes might inhibit muscle ROS increase in skeletal muscle damage.

Apples are important in protecting body cells from damage that can be caused from oxidative stress. Another attribute of apples is their abundance of antioxidants used in the inhibition of poor cell proliferation, decrease in lipid oxidation, and lowering

cholesterol (LAPUENTE *et al.*, 2019). Therefore, apples and grapes are useful supplements in the promotion of a decrease in oxidative stress and inflammation. Few research have been performed analyzing the effect of apple and grape intake and together suggest that both promote effect of recovery blood pressure or time to exhaustion (DELEY *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2017), outcomes linked to health rather than performance. During the two testing sessions, healthy subjects completed an endurance test at a high percentage of their maximal aerobic power and time to exhaustion was measured. The preceding evening and 1 h before testing, subjects consumed either 500 mg of polyphenols (grapes and apples) or placebo and the intake of polyphenols improve performance and maximal perceived exertion (DELEY *et al.*, 2017). Therefore, the effect of grapes and apple combined on recovery by an analysis using ROS and muscle damage waits for further verification.

### Tomato

Tomatoes are comprised of numerous phytochemicals and bioactive components, which encompass a wide variety of vitamins, minerals, and antioxidants (LAPUENTE *et al.*, 2019). Consumption of tomatoes have been found to reduce levels of inflammatory response, oxidative stress markers, and lipid peroxidation (LAPUENTE *et al.*, 2019). The effect of tomato on the recovery process after high intensity exercise has still not been well explored. In one of the few studies in this topic, supplementation of tomatoes with lycopene, phytoene, and phytofluene over a 4-week period attenuated muscle damage biomarker myoglobin, but not CK post-exercise from 2 hours running bout, inflammation or oxidative stress (NIEMAN *et al.*, 2018b). Therefore, the effect of tomatoes after exercise waits for further clarifications.

### Bananas

Bananas are high in many of the aforementioned components making them an eminent post-exercise supplement. Nieman *et al.* (2018a) found that banana consumption was related to increased post-exercise plasma glucose and fructose, and a reduction in leukocyte counts. The study displayed acute consumption of bananas during prolonged, high intensity exercise reduced inflammation by increasing blood glucose and tissue glucose uptake; the higher plasma sugar levels are efficient in maintaining mitochondrial oxidative metabolism (NIEMAN *et al.*, 2018a). The same laboratory found that banana consumption provided benefits to the immunological system and antio-

xidant defense after athletes cycled 75 Km (NIEMAN *et al.*, 2018a). In contrast, banana intake did not affect blood lactate production after high intensity interval exercise (ASTORINO *et al.*, 2019). Due to the sugar and phytochemicals in bananas, the ingestion during exercise can be used to improve metabolic recovery and lower post-exercise inflammation at the cellular level.

## CONCLUSION

In summary, fruits contain nutrients with carbohydrates, proteins, and antioxidants to endure the most abundant recovery after exhaustive exercise (Figure 1). Most of studies have shown that cherries and blueberry can control oxidative stress and inflammation; however, its effect on damage in the skeletal muscle membrane remain contradicted. Regarding pomegranate, studies agreed on its effect towards the increase in oxidative stress after exercise. The effect of grapes, apple, banana, tomato as an asset to abbreviate recovery after high intensity exercise awaits future clarifications. Further studies should be carried out associating the fruit effect with parameter related to glucose metabolism. Another limitation on this field is the heterogeneity of the fruit intake, studies have been using fruit extract, fruit juice, or encapsulate fruit components. Indeed, researchers should test the single effect of various fruits using similar exercise protocols and population. Based on the studies reviewed each fruit appeared to have specific targets to attenuate body regeneration, avoid over training, and improve overall performance (Table 1). Together the majority of data demonstrated beneficial effect of fruit on the recovery process after high intensity exercise.

## REFERENCES

- ACCATTATO, F. *et al.* Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. *PLoS One*, 12(6), p. e0178900, 5 June 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178900.
- AHMED, M. *et al.* The protective effects of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced susceptibility to virus infection. *Phytother Res*. 28(12), p. 1.829-1.836, Dec. 2014. DOI: 10.1002/ptr.5208.
- AMIRI, M.; GHIASVAND, R.; KAVIANI, M. Chocolate milk for recovery from exercise: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Eur J Clin Nutr*, 73, p. 835-849, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0187-x>.
- AMMAR, A. *et al.* Effects of pomegranate supplementation on exercise performance and post-exercise recovery in healthy adults: A systematic review. *British Journal of Nutrition*, 120(11), p. 1.201-1.216, 2018. DOI: 10.1017/S0007114518002696.

- AMMAR, A. *et al.* Pomegranate supplementation accelerates recovery of muscle damage and soreness and inflammatory markers after a weightlifting training session. *Plos One*, 11, p. e0160305, 2016.
- ASTORINO, T. A. *et al.* No effect of meal intake on physiological or perceptual responses to self-selected high intensity interval exercise (HIIE). *Biol Sport.*, S36(3), p. 225-231, Sep. 2019. DOI: 10.5114/biolSport.2019.85557.
- BECK, K. L. *et al.* Role of nutrition in performance enhancement and postexercise recovery. *Open Access Journal of Sports Medicine*, 6, p. 259-267, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147/OAJSM.S33605>.
- BELL, P. G. *et al.* Recovery facilitation with Montmorency cherries following high-intensity, metabolically challenging exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 40(4), P. 414-423, 2015. DOI: 10.1139/apnm-2014-0244.
- BOGDANICH, H.; KIGER, J.; SANTOS, J. The physiology effects of a finishing sauna on aerobic exercise in college-aged individual. *Revista Contexto & Saúde*, 19(37), P. 137-141, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.37.137-141>.
- BOND, H.; MORTON, L.; BRAAKHUIS, A. J. Dietary Nitrate Supplementation Improves Rowing Performance in Well-Trained Rowers. *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*, 22(4), p. 251-256, 2012. Disponível em: <https://ezproxy.fairmontstate.edu/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspxdirect=true&db=hch&AN=78336866&site=ehost-live&scope=site>.
- BRANDENBURG, J. P.; GILES, L. V. Four Days of Blueberry Powder Supplementation Lowers the Blood Lactate Response to Running But Has no Effect on Time-Trial Performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 17, p. 1-7, Oct. 2019. DOI: 10.1123/ijsnem.2019-00.
- CERMAK, N. M.; GIBALA, M. J.; VAN LOON, L. J. C. Nitrate Supplementation's Improvement of 10-km Time-Trial Performance in Trained Cyclists. *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*, 22(1), p. 64-71, 2012. Disponível em: <https://ezproxy.fairmontstate.edu/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=hch&AN=70857481&site=ehost-live&scope=site>.
- DALLA CORTE, C. L. *et al.* Antioxidant effect of organic purple grape juice on exhaustive exercise. *Applied Physiology, Nutrition, And Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, 38(5), p. 558-565, 2013. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1139/apnm-2012-0230>.
- DANFORTH, W. H. Glycogen synthetase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of glycogen synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 240, p. 588-593, 1965.
- DANI, C. *et al.* Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *J. Med. Food.*, 11(1), p. 127-132, 2008a. DOI: 10.1089/jmf.2007.558. PMID: 18361748.
- DANI, C. *et al.* Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. *J. Med. Food.*, 11(1), p. 55-61, 2008b. DOI: 10.1089/jmf.2007.505. PMID:18361738.
- DAVISON, G. *et al.* The effect of acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *European Journal of Nutrition*, 51(1), p. 69-79, 2012. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1007/s00394-011-0193-4>.
- DELEY, G. *et al.* An Acute Dose of Specific Grape and Apple Polyphenols Improves Endurance Performance: A Randomized, Crossover, Double-Blind versus Placebo Controlled Study. *Nutrients*, 9(8), p. pii: E917, 22 Aug. 2017. DOI: 10.3390/nu9080917.
- DOS SANTOS, J. M. *et al.* The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. *Metabolism*, 64(12), p. 1.619-1.628, 2015. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.09.013.
- FRANKEL, E. N. *et al.* (1998). Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 46(3), p. 834-838, 1998. DOI: 10.1021/jf9707952.
- FULEKI, T.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J. Agric. Food. Chem.*, 51(3), p. 640-646, 2003. DOI: 10.1021/jf020689m. PMID:12537435.
- GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.*, 44(2), p. 126-131, 2008. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001.
- HORN, A. *et al.* Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Sci Signal*, 10(495), p. eaaj1978, 5 Sep. 2017. DOI: 10.1126/scisignal.aaj1978.
- HOWATSON, G. *et al.* Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 20(6), p. 843-852, 2010. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1111/j.1600-0838.2009.01005.x>.
- KARP, J. R. *et al.* Chocolate milk as a post-exercise recovery aid. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 16(1), p. 78-91, 2006 Feb. DOI: 10.1123/ijsnem.16.1.78. PMID: 16676705.
- KELLEY, D. S. *et al.* Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J Nutr.*, 136, p. 981-986, 2006.
- KIM, J.; SO, W. Y. Effects of acute grape seed extract supplementation on muscle damage after eccentric exercise: A randomized, controlled clinical trial. *J Exerc Sci Fit.*, 17(2), p. 77-79, 2019. DOI: 10.1016/j.jesf.2019.01.001.
- LAMB, K. L. *et al.* No Effect of Tart Cherry Juice or Pomegranate Juice on Recovery from Exercise-Induced Muscle Damage in Non-Resistance Trained Men. *Nutrients*, 11(7), p. 1.593, 14 July 2019. DOI: 10.3390/nu11071593.
- LAPUENTE, M. *et al.* Relation of Fruits and Vegetables with Major Cardiometabolic Risk Factors, Markers of Oxidation, and Inflammation. *Nutrients*, 11(10), p. 2.381, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11102381>.

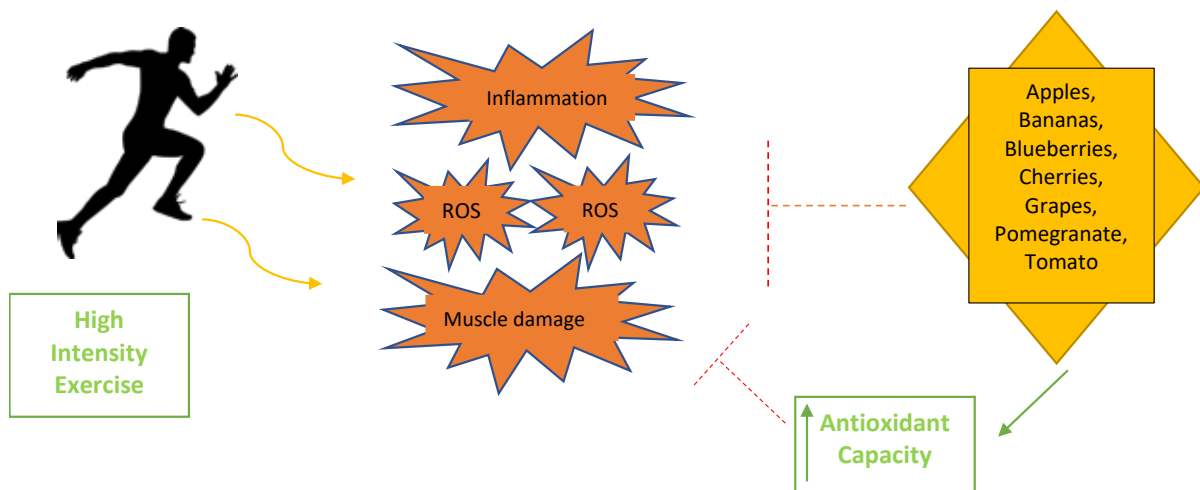
- LEVERS, K. *et al.* (2015). Effects of powdered Montmorency tart cherry supplementation on an acute bout of intense lower body strength exercise in resistance trained males. *J Int Soc Sports Nutr.*, 12, p. 41, 16 Nov. 2015. DOI: 10.1186/s12970-015-0102-y.
- MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, p. 727-747, 2004.
- MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, p. S66, 2003. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1038/sj.ejcn.1601819>.
- MAZANI, M.; FARD, A. S.; BAGHI, A. N. Effect of pomegranate juice supplementation on matrix metalloproteinases 2 and 9 following exhaustive exercise in young healthy males. *J Pak Med Assoc.*, 64, p. 785-790, 2014.
- MCANULTY, L. S. *et al.* Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. *Applied Physiology, Nutrition, And Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, 36(6), p. 976-984, 2011. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1139/h11-120>.
- MCLEAY, Y. *et al.* Effect of New Zealand blueberry consumption on recovery from eccentric exercise-induced muscle damage. *Journal Of The International Society Of Sports Nutrition*, 9(1), p. 19, 2012. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1186/1550-2783-9-19>.
- MORO T. *et al.* Low skeletal muscle capillarization limits muscle adaptation to resistance exercise training in older adults. *Exp Gerontol.*, 127, p. 110-123, 2019. DOI: 10.1016/j.exger.110723.
- NIEMAN, D. C. *et al.* Metabolic recovery from heavy exertion following banana compared to sugar beverage or water only ingestion: A randomized, crossover trial. *Plos One*, 13(3), 2018a. DOI: 10.1371/journal.pone.0194843.
- NIEMAN D. C. *et al.* Effect of 4-Week Ingestion of Tomato-Based Carotenoids on Exercise-Induced Inflammation, Muscle Damage, and Oxidative Stress in Endurance Runners. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 28(3), p. 266-273, 1º May 2018b, DOI: 10.1123/ijsnem.2017-0272.
- NIEMAN, D. C. *et al.* Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach. *PLoS One*, 8(8), p. e72215, 2/13, 15 Aug. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072215.
- NIEMAN, D. C. *et al.* Metabolomics-Based Analysis of Banana and Pear Ingestion on Exercise Performance and Recovery. *J Proteome Res.*, 14(12), p. 5.367-5.377, 4 Dec. 2015. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00909.
- NETO, M. M. *et al.* Whole Red Grape Juice Reduces Blood Pressure at Rest and Increases Post-exercise Hypotension. *J Am Coll Nutr.*, 36(7), p. 533-540, Sep./Oct. 2017. DOI: 10.1080/07315724.2017.1331385.
- RATTRAY, B. *et al.* Is it time to turn our attention toward central mechanisms for post-exertional recovery strategies and performance? *Frontiers in physiology*, 6, p. 79, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00079>.
- ROELOFS, E. J. *et al.* Effects of pomegranate extract on blood flow and vessel diameter after high-intensity exercise in young, healthy adults. *European Journal of Sport Science*, v. 17, n. 3, p. 317-325, apr. 2017. Doi: 10.1080/17461391.2016.1230892.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT A. Proanthocyanidins and tan-nin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, p. 1.094-1.117, 2000.
- SANTOS, J. *et al.* Skeletal Muscle Pathways of Contraction-Enhanced Glucose Uptake. *International Journal of Sports Medicine*, 29(10), p. 785-794, 2008. DOI: 10.1055/s-2008-1038404.
- SEERAM, N. P. *et al.* Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomed*, 8, p. 362-369, 2001.
- SEERAM, N. P. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J. Agric. Food Chem.*, 56(3), p. 630-635, 2008. DOI: 10.1021/jf072504n.PMID:18211019.
- TREXLER, E. T.; SMITH-RYAN, A. E.; MELVIN, M. N. Effect of pomegranate extract on blood flow and running time to exhaustion. *Appl Physiol Nutr Metab*, 39, p. 1.038-1.042, 2014.
- TROMBOLD, J. R.; BARNES, J. N.; CRITCHLEY, L. Ellagitannin consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 42, p. 493-498, 2010.
- UPSHAW, A. U. *et al.* Cycling Time Trial Performance 4 Hours After Glycogen-Lowering Exercise Is Similarly Enhanced by Recovery Nondairy Chocolate Beverages Versus Chocolate Milk. *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*, 26(1), p. 65-70, 2016. Disponível em: <https://doi-org.ezproxy.fairmontstate.edu/10.1123/ijsnem.2015-0056>.
- VOJVODIĆ, S.; POPOVIĆ, S. Natural killer cells: Biology, functions and clinical relevance. *Med. Pregl.*, 63(1-2), p. 91-97, 2010. DOI: 10.2298/MPNS1002091V. PMID:20873317.
- WADE, M. *et al.* The effect of BPA exposure on insulin resistance and type 2 diabetes – The impact of muscle contraction [published online ahead of print, 2020 Mar 11]. *Med Hypotheses*, 140, p. 109.675, 2020. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.109675.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem.*, 45, p. 304-309, 1997.
- YAVARI, A. *et al.* Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian Journal of Sports Medicine*, 6(1 ), p.24898, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.5812/asj-sm.24898>.
- YOUNDIM, K. A. *et al.* Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J Nutr. Biochem.*, 13(5), p. 282-288, 2002. DOI: 10.1016/S0955-2863(01) 00221-2. PMID:12015158.

Table 1 – Effect of fruits and its target on the recovery process after high intensity exercise

Fruits	Effect	Reference
<b>Apples</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Oxidative Stress</li> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> <li>↑ Total Antioxidant Capacity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deley <i>et al.</i> (2017)</li> <li>Neto <i>et al.</i> (2017)</li> </ul>
<b>Bananas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> </ul>	Nieman <i>et al.</i> (2018a)
<b>Blueberries</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Oxidative Stress</li> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> <li>↑ Total Antioxidant Capacity</li> <li>↑ Recovery Rate</li> <li>Muscle Membrane Damage (contradict)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>McLeay <i>et al.</i> (2012)</li> <li>McAnulty <i>et al.</i> (2011)</li> <li>Youdim <i>et al.</i> (2002)</li> </ul>
<b>Cherries</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Lipid Peroxidation</li> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> <li>↑ Total Antioxidant Capacity</li> <li>Muscle Membrane Damage (contradict)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bell <i>et al.</i> (2015)</li> <li>Lamb <i>et al.</i> (2019)</li> <li>Howatson <i>et al.</i> (2010)</li> <li>Wang; Cao; Prior (1997)</li> </ul>
<b>Grapes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Oxidative Stress</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dalla Corte <i>et al.</i> (2013)</li> <li>Kim &amp; So (2019)</li> </ul>
<b>Pomegranate</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Oxidative Stress</li> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> <li>↑ Total Antioxidant Capacity</li> <li>Muscle Membrane Damage (contradict)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ammar <i>et al.</i> (2018)</li> <li>Trexler; Smith-Ryan; Melvin (2014)</li> <li>Roelofs <i>et al.</i> (2017)</li> </ul>
<b>Tomatoes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Lipid Peroxidation</li> <li>↓ Exercise-Induced Inflammation</li> <li>↑ Total Antioxidant Capacity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lapuente <i>et al.</i> (2019)</li> <li>Nieman <i>et al.</i> (2018b)</li> </ul>

Font: The authors.

Figure 1 – Schematic representation of the effect of fruits on ROS (reactive oxygen species), inflammation, muscle membrane damage and antioxidant capacity after high intensity exercise. These fruits-effects improve the recovery after exercise



Font: The authors.



## Efeito *In Vitro* do Extrato de *Camellia Sinensis* Sobre o DNA de Leucócitos Humanos

Daniele Scherer Drews<sup>1</sup>, Ivana Beatrice Manica da Cruz<sup>2</sup>,  
Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner<sup>3</sup>

### RESUMO

Bebidas à base de *Camellia sinensis* tem sido utilizadas por muitos séculos na medicina tradicional, sendo a infusão preparada com as suas folhas. Um dos produtos à base de *C. sinensis* amplamente consumido é o chá verde, e seus benefícios vêm sendo associados a sua composição química. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade genotóxica do extrato de chá verde por meio da avaliação de danos no DNA pelo Teste Cometa. Desta forma, foi conduzido um ensaio *in vitro* a partir de leucócitos isolados de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Os leucócitos isolados foram tratados com diferentes concentrações de extrato de *C. sinensis*, posteriormente sendo avaliado o dano no DNA pelo Teste Cometa. Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que nas concentrações 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL, o extrato de *C. sinensis* comportou-se igual ao controle, não apresentando diferença significativa no índice de danos do DNA, o que indica que nas concentrações utilizadas o extrato não apresentou efeito genotóxico. O uso do chá verde na dieta pode ter muitos benefícios para o organismo, principalmente pelos seus compostos bioativos e, por este motivo, fazem-se necessários estudos para avaliar sua toxicidade para melhor avaliar a segurança em seu uso.

**Palavras-chave:** Teste cometa. Chá verde. Genotoxicidade. Dano no DNA.

### IN VITRO EFFECT OF CAMELLIA SINENSIS EXTRACT IN HUMAN DNA LEUKOCYTES

### ABSTRACT

Beverages based on *Camellia sinensis* have been used for many centuries in traditional medicine, with the infusion being prepared with its leaves. One of the widely consumed products of *C. sinensis* is green tea, its benefits being associated with its chemical composition. For this reason, the objective of this work was to evaluate the possible genotoxic activity of the green tea extract through the evaluation of DNA damage by the Comet Assay. In this way, an *in vitro* assay was performed from leukocytes isolated from peripheral blood of healthy subjects. The isolated leukocytes were treated with different concentrations of *C. sinensis* extract, after which the DNA damage was evaluated by the Comet Assay. The results obtained show that DNA damage index to different concentrations to *C. sinensis* extract was similar to the control, with no significant difference, which show that at the concentrations used the extract had no present genotoxic effect. The use of green tea in the diet can have many benefits for the organism, mainly for its bioactive compounds, therefore, studies are necessary to evaluate its toxicity, to better evaluate the safety in its use.

**Keywords:** Comet assay. Green tea. Genotoxicity. DNA damage.

RECEBIDO EM: 11/8/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 7/11/2019

ACEITO EM: 10/7/2020

<sup>1</sup> Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí. Ijuí/RS, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil.

<sup>3</sup> Autora correspondente. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí. Rua do Comércio, 3000 – Bairro universitário. Ijuí/RS, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/3492211662498366>. <https://orcid.org/0000-0001-8765-1452>. [greice.fdsantos@unijui.edu.br](mailto:greice.fdsantos@unijui.edu.br)

## INTRODUÇÃO

Plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas pela população, justamente pelo fato de seus consumidores acreditarem que seu uso, por serem naturais, é inerentemente seguro. Este aumento do uso estaria embasado no apego de que não haveria contraindicações, por se tratar de produtos naturais (AKRAM *et al.*, 2014). Desta forma, a análise química detalhada de plantas medicinais é necessária para que sejam destinadas ao uso terapêutico de forma segura, pois existem vários fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabolitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e suas interações com o organismo.

Os compostos bioativos, ingeridos tanto pelo uso de plantas medicinais quanto pelos compostos presentes na dieta, desempenham um papel crucial em processos fisiológicos e no *status* de saúde dos indivíduos. Tal ingestão pode ter um impacto tanto positivo quanto negativo sobre a interação destas moléculas com o metabolismo. Neste contexto, muitas plantas têm sido estudadas para avaliar seus efeitos sobre o organismo humano. Dentro disso, podemos destacar as espécies de família Theaceae, em especial a *Camellia sinensis*, popularmente conhecida como chá verde (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010; SIMÕES *et al.*, 2004; MANFREDINI; MARTINS; BENFATO, 2004).

*Camellia sinensis* é um arbusto de pequeno porte, de origem da Ásia continental e da Indonésia, pertencente à família Theaceae (Figura 1). É um arbusto perenifólio grande ou arvoreta de 3-4 m de altura, de copa piramidal e densa. Apresenta folhas simples, elípticas, coriáceas, quase glabras, de 4-7 cm de comprimento; as flores são de cor branca, solitárias ou em grupo de duas ou três nas axilas foliares. Os frutos são cápsulas deiscentes e oblongas com 1-3 sementes. É cultivada principalmente na China, Índia, Sri Lanka, Japão, Quênia e Indonésia (SIMÕES *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 1 – Arbusto de *Camellia sinensis*



Fonte: <http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis&lang=en>. Acesso em: 15 jan. 2019.

As folhas e botões de *C. sinensis* têm sido utilizados popularmente, principalmente na forma de chá. Os principais tipos de chás obtidos a partir desta planta são o chá verde, o *chá oolong*, o chá preto e o chá branco. As folhas jovens e brotos foliares são apresentados comercialmente como chá verde, este é produzido por dessecação das folhas sem fermentação, o *chá oolong* sofre fermentação parcial apenas e o chá preto é produzido por dessecação após fermentação (LORENZI; MATOS, 2008).

As propriedades farmacológicas da *C. sinensis* estão relacionadas à presença de compostos bioativos. As folhas não fermentadas contêm proteínas (15% a 20%), glicídeos (5%), ácido ascórbico, vitaminas do complexo B e bases púricas, especialmente a cafeína (2% a 4%), polifenóis (30%): monosídeos de flavonóis e flavonas, catecóis e epicatecóis livres e esterificados pelo ácido gálico e produtos de condensação, taninos (10 a 24%) (PRADO *et al.*, 2005; SILVA; SILVA; MICHELIN, 2013; PINTO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2009).

Pesquisas revelam seu efeito benéfico em algumas patologias e, por tratar-se de uma bebida amplamente disponível e de baixo custo, seu uso torna-se viável como um importante coadjuvante em diversas patologias (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2007; SUZUKI-SUGIHARA *et al.*, 2016; PRASAD; KATIYAR, 2015). A dose diária recomendada de chá verde ainda é estudada, pois não há consenso da quantidade e frequência do uso do chá. Na literatura, entretanto, há indícios de que para alcançar benefícios à saúde a ingestão diária seja de 5 a 7 xícaras de chá/dia (WEISBURGER, 1999; SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

Dentre os compostos bioativos presentes no chá verde, as catequinas são as que estão em maior quantidade e possuem várias atividades biológicas, como antioxidante, antiangiogênica, antiproliferação do câncer e tem sido relevantes para a prevenção do câncer. (CAVALCANTI *et al.*, 2007; COOPER; MORRÉ; MORRÉ, 2005; THIELECKE; BOSCHMANN, 2009).

Apesar do potencial uso farmacológico da *C. sinensis*, estudos sobre as suas propriedades funcionais e toxicológicas ainda estão sendo realizados. Por este motivo, o objetivo deste estudo é avaliar os possíveis danos no DNA de leucócitos de indivíduos saudáveis expostos ao extrato de *C. sinensis*, contribuindo, assim, para um uso mais seguro da *C. sinensis*.

## METODOLOGIA

### Delineamento

O estudo foi realizado em uma única etapa, quando o sangue foi coletado de diferentes indivíduos por punção venosa e, logo após a coleta, os leucócitos foram separados. A separação de leucócitos foi realizada por centrifugação, e os leucócitos obtidos foram divididos em microtubos com igual suspensão celular ( $10^6$  cels/mL) e mantidos em *Hank's* até o tratamento. A suspensão celular foi tratada com extrato de *C. sinensis* em concentrações finais de  $3\mu\text{g/mL}$ ,  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $30\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{g/mL}$  e  $300\mu\text{g/mL}$  por 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida foram avaliados os danos no DNA pelo teste cometa.

### Preparo do extrato de *Camellia sinensis*

O extrato utilizado neste estudo foi previamente preparado deixando as folhas de *C. sinensis* em contato com água destilada (1g de folhas/100mL de água) a  $80^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após, o extrato obtido foi rotaveaporado e liofilizado e armazenado a  $\pm 4^\circ\text{C}$  até o momento de uso. Para utilização nos testes *in vitro* o extrato foi diluído em água.

### Coleta, preparo da amostra e tratamento

O sangue foi coletado de três indivíduos saudáveis por punção venosa, utilizando heparina sódica como anticoagulante. Os leucócitos foram obtidos por centrifugação e, posteriormente, lavados com solução lisante de hemácias. Para os testes *in vitro*, o *pellet* obtido foi ressuspenso em *Hank's* e a densidade celular determinada com o auxílio de câmara de *Neubauer* com corante *Trypan blue* 0,4%.

A suspensão celular obtida foi dividida igualmente para os tratamentos, de modo que todos apresentaram  $10^6$  células/mL e mantida em *Hank's*. O extrato foi diluído em água na concentração de  $1,5\text{mg/mL}$  e adicionado aos tratamentos de forma a obter concentrações finais de  $3\mu\text{g/mL}$ ,  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $30\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{g/mL}$  e  $300\mu\text{g/mL}$  em um volume de  $250\mu\text{L}$ ; para o controle foi adicionado solução de *Hank's* apenas. Após preparo, os tratamentos foram mantidos a  $37^\circ\text{C}$  por 1h e, em seguida, realizado o teste cometa. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### Avaliação do dano no DNA pelo Ensaio do Cometa

Para a avaliação de danos no DNA foi utilizado o teste Cometa, que segue o protocolo de detecção de danos em células eucarióticas em condições alcalinas,

elaborado por Singh *et al.* (1988). Após a realização dos tratamentos, a suspensão celular foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão, e em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose de alto ponto de fusão. As lâminas foram mantidas em solução de lise por pelo menos 1 hora, após foram submetidas ao tratamento alcalino (20 minutos) e, em seguida, submetidas à eletroforese (25V, 300 mA por 20 minutos). Logo após foi realizada a neutralização, fixação e coloração das lâminas com solução à base de nitrato de prata.

As lâminas foram analisadas com o auxílio do microscópio óptico (50 células/lâmina), em que cada célula foi analisada individualmente e o dano classificado visualmente de zero a quatro, e a extensão da migração do DNA foi relacionada com o dano ocorrido (TICE *et al.*, 2000); posteriormente, foi calculado o índice de danos multiplicando o número de células pela classe do dano, obtendo-se, assim, um índice de danos de zero-200.

### Análise estatística

Os dados foram plotados em planilha eletrônica Excel e, posteriormente, transferidos e analisados pelo programa estatístico SPSS versão 12.0. As variáveis quantitativas foram analisadas pelos testes *Student t* para a comparação dos tratamentos com extrato nas diferentes concentrações, com o controle e a análise de variância *One-way* para comparação entre os grupos. Foram consideradas significativas as comparações com  $P < 0,05$ .

### Aspectos éticos

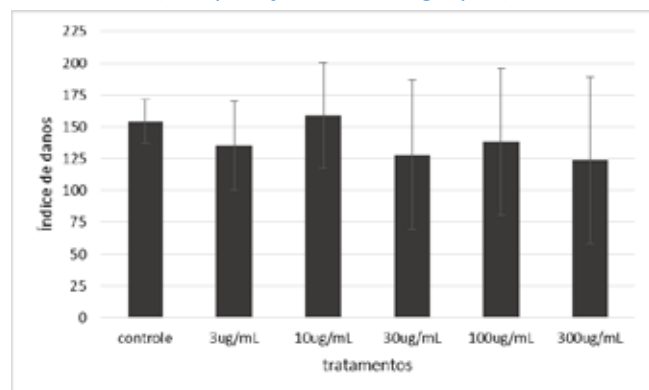
O estudo está registrado sob o número 56972216.5.0000.5350, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Unijuí) sob parecer número 1.692.526.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *C. sinensis* é uma planta conhecida em todo o mundo e também muito utilizada na medicina tradicional, sendo a forma mais ingerida a do chá verde. Com a descoberta de diversos compostos bioativos presentes na planta, o uso se tornou ainda maior. Neste estudo foi avaliado o efeito do extrato de *C. sinensis* no dano ao DNA de leucócitos utilizando o teste cometa. Foi observado que nas concentrações de  $3\mu\text{g/mL}$ ,  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $30\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{g/mL}$  e  $300\mu\text{g/mL}$  o extrato de *C. sinensis* comportou-se igual ao controle (Figura 2), não apresentando diferença significativa no

índice de danos do DNA, o que pode indicar que nas concentrações utilizadas o extrato não apresenta efeito genotóxico.

Figura 2 – Avaliação do efeito genotóxico *in vitro* do extrato de *Camellia sinensis* (em leucócitos humanos (n=3), teste *student t* (comparação com o controle) e análise de variância One Way (comparação entre os grupos)



Fonte: Dados dos autores.

Na literatura já é bem descrito que o chá verde é rico em flavonoides, que apresenta em sua composição diversos compostos como cafeína, catequina, epicatequina e epigalocatequina galato, e também é descrito que este apresenta atividade antioxidante (NISHIYAMA *et al.*, 2010). Diante disso, neste estudo optou-se por utilizar o extrato aquoso obtido por infusão, mimetizando as condições de uso comum, e, por este motivo, também optou-se por utilizar o extrato bruto e não os componentes isolados. Ainda com base na literatura, foi optado por utilizar o extrato em diferentes concentrações, observando, assim, se em altas concentrações este poderia apresentar efeito genotóxico (CABRERA, 2006).

O Ensaio do Cometa consiste em um método sensível para detectar danos no DNA, os quais acontecem por meio da quebra da cadeia de DNA. Este ensaio tem sido utilizado amplamente em diversos modelos experimentais, incluídos testes *in vitro*, ou em estudos de monitoramento em humanos para avaliar danos decorrentes de exposição à pró-oxidantes, geralmente associados ao estresse oxidativo (COLLINS, 2014; VENTURA *et al.*, 2013).

A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, sendo os fatores pró-oxidantes relacionados principalmente às exposições ambientais e hábitos de vida. Já o sistema de defesa antioxidante tem por objetivo manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo ou reduzindo danos causados pela ação deletéria de espécies reativas geradas pelo metabolismo

(BARBOSA *et al.*, 2010). Diante disso, a dieta, é sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo, dada a importância de antioxidantes presentes em sua composição.

A ingestão regular de chá verde associa um menor dano ao DNA e uma maior resistência do mesmo a efeitos antioxidantes, sendo relatados estes efeitos em estudos *in vitro*. No estudo de Ho *et al.* (2014), linfócitos periféricos de voluntários saudáveis foram incubados em soluções de chá recém-preparadas por 30 minutos a 37°C. Os efeitos genoprotetores do chá verde foram avaliados por meio do ensaio do cometa e observou-se que baixas doses de chá verde poderiam estar relacionadas à proteção antioxidante direta, decorrente dos polifenóis presentes em sua composição. Estudos *in vitro* com leucócitos humanos ainda não foram realizados para observar o efeito genotóxico do extrato de *C. sinensis*, sendo este o único estudo com um modelo parecido ao utilizado, o qual mostra que o chá verde tem proteção antioxidante na célula e o mesmo se dá pelos seus compostos bioativos.

No estudo realizado por Magcwebeba *et al.* (2016) foram avaliadas as propriedades quimiopreventivas do chá verde, utilizando-se um modelo *in vivo* na pele do rato. O objetivo foi determinar o efeito antiproliferativo e a atividade pró-apoptótica em diferentes células da pele, empregando o chá verde como referência. A atividade metabólica na célula foi interrompida pela despolarização da membrana mitocondrial, e observou-se que a atividade antiproliferativa do extrato de chá verde foi mediada, principalmente, pelos flavonoides. Nas concentrações mais baixas a proliferação celular foi inibida, à medida que, a uma concentração mais elevada, foi observado aumento na apoptose, dirigindo-se, principalmente, à remoção de células pré-cancerosas.

Durgo *et al.* (2011) avaliou os potenciais efeitos citotóxicos e pró-oxidativos do extrato de chá verde em seus dois principais constituintes flavonoides: as epigalocatequina galato (EGCG) e galato de epicatequina (ECG) na linha celular de carcinoma de laringe humana (HEp2) e sua linhagem celular resistente CK2 (citoqueratina). O objetivo foi verificar se o extrato e seus dois flavonoides poderiam aumentar a sensibilidade da linhagem celular CK2 resistente à cisplatina em comparação com a linhagem celular parental. Extrato de chá verde e catequinas no extrato de chá verde causam efeitos antioxidantes e pró-oxidantes, dependendo do tipo de célula, tempo de exposição e concentração. De forma geral, foi observado que os compostos biologicamente ativos, presentes no extrato de chá verde, podem ter um efeito significativo so-

bre células resistentes, sugerindo, então, que o consumo de chá verde pode ajudar na prevenção de câncer em razão de seu efeito inibitório sobre o crescimento das células da laringe.

Diversos estudos abordam os efeitos benéficos do chá verde, no entanto são escassos os que avaliam seus efeitos tóxicos, decorrentes do uso de altas doses do chá. Desta forma, estudos como este, que avaliam a genotoxicidade, são importantes para a segurança e o uso do chá verde em diversas terapias. Os resultados apresentados neste estudo indicam que o extrato, nas condições e concentrações estudadas, não apresentou efeito genotóxico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer o efeito dos componentes químicos presentes nas plantas torna-se cada vez mais importante, e o uso das mesmas na dieta tem crescido. O uso de chás e extratos de plantas tem sido foco de estudos e, a partir dos efeitos que estes produzem, pode-se ter benefícios, com uma dose a ser tomada diariamente em concentrações certas. Diversos estudos *in vitro* vêm sendo feitos para provar este efeito não somente no organismo humano, mas, também, no DNA, avaliando sua toxicidade para melhor estabelecer a segurança para seu uso. Neste sentido, o presente trabalho demonstrou que o extrato de *C. sinensis* não apresentou efeito genotóxico *in vitro* em leucócitos humanos observado pelo Teste Cometa.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Biogenômica da UFSM e ao Laboratório de Ensaios Biológicos da Unijuí.

## REFERÊNCIAS

AKRAM, M.; HAMID, A.; KHALIU, A.; GHAFAR, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A. ALFA, M., NAVEED. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory. *Activity of Plants International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(3), p. 313-319, 2014.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4), p. 629-643, 2010.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea – A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, p. 79-99, 2006.

CAVALCANTI, Á. S. S.; ROSA, J. A. B.; LIMA, M. S. C. S.; SILVA, A. G. O uso do chá verde, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) em produtos tópicos – uma revisão. *Natureza on-line*, 5(2), p. 76-84, 2007.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1.840, p. 794-800, 2014.

COOPER, R.; MORRÉ, D. J.; MORRÉ, D. M. Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 11(3), p. 521-528, 2005.

DURGO, K.; KOSTIĆ, S.; GRADIŠKI, K.; KOMES, D.; OSMAK, M.; FRANEKIĆ, J. Genotoxic effects of green tea extract on human laryngeal carcinoma cells *in vitro*. *Arh Hig Rada Toksikol*, 62, p. 139-146, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Quim. Nova*, 30(2), p. 374-381, 2007.

HO, C. K.; CHOI, S. W.; SIU, P. M.; BENZIE, I. F. Effects of single dose and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(6), Version of Record on-line, 2014.

KITAGAWA, N.; MORIKAWA, T.; MOTAI, C.; NINOMIYA, K.; OKUGAWA, S.; NISHIDA, A.; YOSHIKAWA, M.; MURAOKA, O. The Antiproliferative Effect of Chakasaponins I and II, Floratheasaponin A, and Epigallocatechin 3-O-Gallate Isolated from *Camellia sinensis* on Human Digestive Tract Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, p. 1.979, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MAGCWEBEBA, T. U.; SWART, P.; SWANEVELDER, S.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W. C. A. *In Vitro* Chemopreventive Properties of Green Tea, Rooibos and Honeybush Extracts in Skin Cells. *Molecules*, 21, p. 1.622, 2016.

MANFREDINI, V.; MARTINS, V.D.; BENFATO, M. da S. Chá verde: benefícios para a saúde humana. *Infarma*, 16, p. 9-10, 2004.

NISHIYAMA, M. C.; COSTA, M. A. F.; da COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 30(1), p. 191-196, 2010.

PRADO, C. C.; ALENCAR, R. G.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (chá verde). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2, p. 164-167, 2005.

PRASAD, R.; KATIYAR, S. K. Polyphenols from green tea inhibit the growth of melanoma cells through inhibition of class I histone deacetylases and induction of DNA damage. *Genes & Cancer*, 6, p. 1-2, 2015.

PEREIRA, A. V.; ALMEIDA, T. C.; BELTRAME, F. L.; COSTA, M. E.; GARRIDO, L. H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Theaceae*, Maringá, 31(2), p. 119-124, 2009.

PINTO, N. B. P.; ALEXANDRE, B. da S.; NEVES, K. R. T.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 161092, 12 p. Vol. 2015.

SAIGG, N. L.; SILVA, M. C. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, 7(1), p. 69-89, 2009.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*, Porto Alegre, 20(4), p. 292-300, 2010.

SILVA, B. C.; SILVA, F.; MICHELIN, D. C. Avaliação da qualidade de amostras de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (*Theaceae*) comercializadas no município de Araras – SP. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, São Paulo, 34(2), p. 245-250, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1), p. 184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0. PMID: 3345800.

SUZUKI-SUGIHARA, N.; KISHIMOTO, Y.; SAITA, E.; TAGUCHI, C.; KOBAYASHI, M.; ICHITANI, M.; UKAWA, Y.; SAGESAKA, Y.M.; SUZUKI, E.; KONDO, K. Green tea catechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low-density lipoprotein particles in humans. *Nutrition Research*, 36(16), p. 23, 2016.

THIELECKE, F.; BOSCHMANN, M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. *Phytochemistry*, 70, p. 11-24, 2009.

TTICE, R. R. *et al.* Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), p. 206-221, 2000. DOI: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j. PMID: 10737956.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; BUTTAFAVA, A.; CARBONERA, D.; BALESTRAZZI, A. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *L. Chemosphere*, 92, p. 1-9, 2013.

WEISBURGER J. H. Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 220, p. 271-275, 1999.

## Effects of Type 2 Diabetes Mellitus Induction and of Moderate Physical Exercise on the Hepatic Metabolism and Oxidative Stress in Wistar Rats

Denise Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Júlia Matzenbacher dos Santos<sup>2</sup>, Kayorrany Gomes Galvão do Prado<sup>1</sup>  
Andreia Vitor Couto Amaral<sup>1</sup>, Sandra Aparecida Benite-Ribeiro<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Aims:** The aim of the study was to verify if the induction of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) by the association of streptozotocin and high fat diet causes hepatic alterations and if physical exercise can influence these alterations. **Methods:** 46 males Wistar rats were divided into two groups: A high fat group (HF) that received a diet containing 60% of fat for 8 weeks and on the 14<sup>th</sup> received a single dose of streptozotocin (25mg/kg); a control group (C) that received a standard diet and a single dose of citrate buffer. Animals were then divided into two subgroups: one sedentary (S) and the other submitted to physical exercise (PE), totaling four groups: C-S; C-PE; HF-S; HF-PE. Body weight and capillary glucose were measured weekly. After euthanasia hepatic concentrations of triacylglycerol (TAG), very low-density lipoprotein (VLDL); alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), arginase; plasma concentration of glucose, urea, and 8-isoprostane (an oxidative stress marker) were measured. **Results:** Capillary glucose was higher in HF-S and HF-PE compared to C-S and C-PE groups. There were no differences in ALT, AST, arginase, oxidative stress concentration among the groups. Urea concentration was lower in HF-S and HF-PE than in C-PE. Liver TAG and VLDL were higher in the HF-PE group when compared to the C-S. **Conclusions:** The used protocol induced T2DM but not liver diseases or increase in blood oxidative stress. Besides, PE acted in synergy with high fat diet and STZ inducing accumulation of TAG and VLDL in hepatic tissue, an effect that could either represents lipotoxicity or a protective mechanism to conserve energy.

**Descriptors:** Amino acid metabolism. High fat diet. Insulin resistance. Triacylglycerol.

### EFEITOS DA INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 E DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO NO METABOLISMO HEPÁTICO E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR

### RESUMO

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi verificar se a indução de Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM) com baixa dose de estreptozotocina e dieta hiperlipídica causa alterações hepáticas e estresse oxidativo e o efeito do exercício físico nessas alterações. **Métodos:** 46 ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos. Um recebeu uma dieta contendo 60% de gordura por 8 semanas e no 14<sup>o</sup> dia receberam uma dose única de estreptozotocina (25mg/kg). O grupo (C) recebeu uma dieta padrão e uma dose única de tampão citrato. Os animais foram divididos em dois subgrupos: um sedentário (S) e outro exercitado (PE), totalizando quatro grupos: C-S; C-PE; HF-S; HF-PE. A massa corporal e a glicemia capilar foram mensuradas semanalmente. Após a eutanásia, sangue e fígado foram coletados. Concentrações plasmáticas e hepáticas de triacilglicerol, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); alanina-transaminase (ALT), aspartato-transaminase (AST) e arginase; ureia, lactato e 8-isoprostano (marcador de estresse oxidativo) foram dosadas. **Resultados:** A glicemia capilar foi maior nos grupos HF-S e HF-PE do que em C-S e C-PE. Não houve diferenças em ALT, AST, arginase e no estresse oxidativo entre os grupos. Ureia foi menor em HF-S e HF-PE do que em C-PE. TAG e VLDL hepáticos foram maiores no grupo HF-PE do que no C-S. **Conclusões:** O protocolo usado induziu T2DM, mas não doenças hepáticas ou estresse oxidativo. Além disso, o PE agiu em sinergia com a dieta HF induzindo acumulação hepática de TAG e VLDL, um efeito que pode representar lipotoxicidade ou um efeito protetivo para conservação de energia.

**Palavras-chave:** Dieta rica em gordura. Metabolismo de aminoácidos. Resistência à insulina. Triacilglicerol.

RECEBIDO EM: 12/12/2019

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 6/2/2020

ACEITO EM: 10/7/2020

<sup>1</sup> Universidade Federal de Jataí – Instituto de Biociências. Jataí/GO, Brasil.

<sup>2</sup> Detroit R&D, Inc, 2727, 2nd street, Detroit, MI, 48208 USA. Fairmont State University – Department of Education, Health and Human Performance, Fairmont, WV, USA. 1201 Locust Avenue, Fairmont, WV 26554.

<sup>3</sup> Autora correspondente. Universidade Federal de Jataí – Instituto de Biociências. Jataí/GO, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/7352053592004344>. <https://orcid.org/0000-0002-3741-3787>. [sandrabenite@gmail.com](mailto:sandrabenite@gmail.com)

## INTRODUCTION

Diabetes is a growing epidemic expected to reach half of billion worldwide subjects (WHO, 2018). Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) accounts for 90-95% of the de diabetes cases, is a multifactorial disease linked with combined obesity, hyperlipidemia, physical inactivity that leads to the development of insulin resistance (SANTOS *et al.*, 2014). Long periods of hyperglycemia, a common condition of diabetic patients, induces a great number of diabetes complications such as nephropathy, retinopathy, liver diseases and neuropathy (LIU *et al.*, 2017). In 2015, an estimated 1.6 million deaths were directly caused by diabetes and its complications (WHO, 2018).

Liver complications induced by diabetes is a leading cause of death among diabetes population. In fact, the entire spectrum of liver disease is seen in patients with T2DM (LIU *et al.*, 2017). This includes abnormal liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and acute liver failure (LIU *et al.*, 2017). The initial and most important indicators in assessing liver injury are levels of plasma and liver alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) (DE CHIARA, *et al.*, 2018; SHAHWAN *et al.*, 2019; YOUNOSSI *et al.*, 2019). Also, insulin resistance contributes to a metabolic deregulation, altering carbohydrate metabolism in liver causing an imbalance between protein synthesis and catabolism, the latter being favored in T2DM due to precursors supply to the gluconeogenic pathway (SADIE; SREEKUMARAN, 2010). Thus, in the development of T2DM, hepatic metabolism of carbohydrate and lipid become dysfunctional, which might favor the catabolism of protein.

The role of oxidative stress has been an important element for the understanding of the complex mechanism by which diabetes and its complications are developed (SANTOS *et al.*, 2011). Using a methodology to induce T2DM in rodents (a single low injection of streptozotocin combined with high fat diet), our previous study demonstrated that 8-isoprostane (a marker for oxidative stress) is increase in skeletal muscle accounting to mitochondrial dysfunction and insulin resistance (SANTOS *et al.*, 2018). The increase of oxidative stress was suggested to also be involved on the underlying mechanism of diabetes that contributes to liver damage (MOHAMED *et al.*, 2016). However, most of the studies carried out with the pur-

pose of verifying the effect of diabetes in liver diseases used a protocol to induce Type 1 diabetes mellitus not T2DM.

A great body of the literature well demonstrated that aerobic physical exercises ameliorate the conditions of T2DM patients by improving glucose uptake in skeletal muscle and adiposity decreasing hyperglycemia and hyperlipidemia (BENITE-RIBEIRO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2014) However, the effect of regular exercise on liver diseases induced by T2DM is not well identified. Thus, the first aim of this study was to verify the effect of a T2DM- induced protocol on liver diseases development and its link with oxidative stress. The second aim was to verify the effect of exercise on the potential impact of T2DM on liver diseases.

## METHODS

### Ethical aspects

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University of Goiás according to guidelines and regulations from the National Council for Animal Experimentation Control in Brazil (CONCEA) and registered under number 34, the year 2014. The experimental procedures followed the recommendations of Grundi (2015).

### Animals and diet

Animals of the species *Rattus norvegicus* were kept in pairs in polypropylene cages (500 x 600 x 220 cm). Cages were sheltered in climate chambers (Insight LTDA, Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil); inverted light/dark cycle and temperature at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Food and water were offered ad libitum.

Male Wistar rats ( $n = 46$ ) with eight weeks old and an average weight of 236g were separated into four groups, depending on the diet type and physical training. The control group (C,  $n = 23$ ) received standard diet for rats (3868 cal/kg, 24.82% kcal protein, 63.08% kcal carbohydrate and 12.10% kcal fat - ®PragSoluções, Jaú, State of São Paulo, Brazil) and the T2DM group received high fat diet (5205 cal/Kg, 19.98% kcal protein, 20.37% kcal carbohydrate and 59.65% fat) (HF,  $n = 23$ ) during all experimental procedures. On day 14, after 12 hours of fasting, rats of HF group received a single intraperitoneal injection with low dosage of streptozotocin (STZ 25mg / kg body weight) (STZ> 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in citrate buffer, pH 4.5 Control group (C), af-



ter 12 hours of fasting, received an injection of citrate buffer pH 4.5 (Fig 1) This methodology of T2DM induction was validated by Mansor *et al.* (2013) and successfully tested by our group Santos *et al.* (2018).

### Experimental groups and exercise training

Animals were then assigned into two subgroups: one sedentary (S) and the other submitted to physical exercise (PE), totalizing four groups: C-S; C-PE; HF-S; HF-PE. Animals in exercised groups were submitted to a swimming protocol for six weeks, five sessions per week, with an increase in swimming time each week until reaching 55 minutes of swimming (Fig 1). Swimming exercise protocol was adapted from Zacarias *et al.* (2017). The animals were not familiar with swimming, because of this the protocol started with 30 min of swimming and reached 55 min. Body weight was measured with a Shimadzu balance and capillary glucose was obtained with One Touch® Ultra (São Paulo, State of São Paulo, Brazil), both measured weekly.

### Tissues collection

At the end of the eighth week and after 48 hours of the last PE session, animals were anesthetized with inhaled isoflurane and euthanized. Blood was collected and centrifuged at 1814g during 10 minutes at 25°C. Livers were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Subsequently, livers were homogenized at 4°C, [0.02M] / 0.01M phosphate in 1/1 (v/v) glycerol, pH 7.4 in TRIS buffer, and centrifuged at 20.000g for 10 minutes at 4°C.

### Biochemical analyzes

The activity of hepatic enzymes such as alanine transaminase - ALT (E.C 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase - AST (E.C 2.6.1.1) was determined by Labtest® colorimetric kits (Lagoa Santa, State of Minas Gerais, Brazil). The activity of hepatic arginase (E.C. 3.5.3.1) was determined according to Mellerup (1967). Plasma and hepatic concentrations of triacylglycerol (TAG), were determined by Labtest® colorimetric kits (Lagoa Santa, State of Minas Gerais, Brazil). Very low-density lipoprotein (VLDL) concentration was determined by the formula: TAG / 5. Urea and lactate plasma metabolites were determined by Labtest® colorimetric Kits. Oxidative stress was assessed by the concentration of 8-isoprostane in plasma as previous done by us Santos *et al.* (2018) using ELISA kit (Detroit, R & D, Inc).

### Statistical analyzes

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The outliers were calculated by Grubb's test. The variables presented normal distribution (Shapiro-Wilk test) and were tested by One Way Anova, followed by Tukey. The level of significance stated was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

During data exploration, 4 outliers were found, one in each experimental group, which were excluded. Thus, the number of animals in each group was: C-S,  $n = 10$ ; C-PE, 11; HF-S,  $n = 10$ ; HF-PE,  $n=11$ . As shown in our previous study (Santos *et al.*, 2018), the used protocol for T2DM induction in rats was efficient in causing increase in capillary glucose level in animals belonging to the HF-S and HF-PE groups ( $P=0.002$ ) as shown in Table 1. There was not a significant increase in body weight, lactate, plasma TAG and VLDL (Table 1 and Fig 2A and B, respectively) and 8-isoprostane (Fig 3) of HF-S and HF-PE group animals when compared to the C-S and C-PE control groups. Plasma urea concentration decreased ( $P= 0.002$ ) in HF-S and HF-PE when compared to C-PE (Table 1). Besides, hepatic TAG and VLDL were higher in HF-PE compared to C-S ( $P=0.016$ ) (Fig 2 C and D, respectively). No statistical difference was observed in ALT, AST and arginase liver enzyme activity (Table 1 and Fig 2 E and F, respectively).

## DISCUSSION

In this study two hypotheses were tested. The first hypothesis was that a T2DM - induced protocol using a single dose of STZ together with 8-weeks of high fat food intake could promote liver diseases via increase in oxidative stress. The second hypothesis was that physical exercise could revert the potential impact of T2DM on liver diseases. To test the first hypothesis, we used a validated T2DM induction protocol (SANTOS *et al.*, 2018) to verify its effect on plasma oxidative stress and hepatic lipid and protein metabolism. Despite of the increase in capillary blood glucose in the diabetes-induced animals (HF), the protocol failed to induce liver diseases or increase blood oxidative stress. However, the T2DM induced protocol seem to affect protein metabolism by altering urea concentration. Also contradicting our hypothesis, the metabolic changes induced by exercise added to the effect of STZ and high fat diet and increased TAG and VLDL in hepatic cells.

Liver metabolism can be impaired by insulin resistance that could either precedes T2DM establishment or to be induced in consequence of this disease (SHAHWAN *et al.*, 2019). In a cross-sectional study involving 453 T2DM patients, it was observed that 80.8 % presented abnormal hepatic profile parameter (altered ALT and AST), and changes in lipid profiles were associated with abnormal hepatic function (SHAHWAN *et al.*, 2019). Moreover, results of a meta-analyses of 80 studies from 20 different countries including 49,419 individuals with T2DM suggested that the overall prevalence of NAFLD is 55.5% and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is 37.3% among T2DM population (YOUNOSSI *et al.*, 2019).

The concentration of plasma ALT and AST enzymes are bioindicators of liver damage (SHAHWAN *et al.*, 2019). In fact, studies have reported an increase in hepatic ALT and AST activity when T2DM rats developed NAFLD (SHAHWAN *et al.*, 2019; YOUNOSSI *et al.*, 2019). In an experimental study that analyzed the effect of 12 weeks high fat diet (65% of fat) intake in rodents, ALT and lipotoxicity was increased (DE CHIARA *et al.* 2018). In contrast, our T2DM protocol failed to induce changes in hepatic ALT, AST, TAG or VLDL. The reason for the discrepancy could be due the duration of the protocol and the use of STZ to induce T2DM.

Urea is the principal nitrogenous waste product of protein metabolism and is generated from protein breakdown (WATFORD 2003; DE CHIARA *et al.* 2018). In this study, we observed a decrease in plasma urea levels in the two groups fed with the high-fat diet (HF-S and HF-PE) compared to C-PE. One potential explanation for this phenomenon could be that the high-fat diet promoted an increase in fat storage and therefore a saving effect of muscle proteins breakdown. Thus, the results could indicate that the high-fat diet altered the hepatic metabolism (urea cycle) and probably induced by increase in lipid metabolism.

Over several decades epidemiologic studies as well as experimental studies using *in-vivo* and *in-vitro* approaches indicated almost unanimously that regular aerobic exercise is a therapeutically approach to control and inhibit T2DM development (BENITE-RIBEIRO *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2011). Therefore, the second aim of the study was to investigate the effect of the aerobic exercise on levels of oxidative stress and marker of liver diseases in T2DM. Excessive fat intake could lead to insulin resistance in skeletal muscle and that could be mediated by oxidative as shown by us and others (SANTOS *et al.*, 2018; TANGVARASITTICHAJ, 2015). Regular exercise increases the antioxidant capacity and decreases

oxidative stress in plasma and other tissues (SIMIONI *et al.*, 2018). Here we observed that the same methodology that induced T2DM and increased oxidative stress in skeletal muscle (SANTOS *et al.*, 2018) failed to affect levels of oxidative stress in plasma even when exercise was performed. In addition, our exercise protocol did not alter oxidative stress in plasma either in the control animals or the group induced for T2DM development.

In present study moderate aerobic exercise did not ameliorate the accumulation of VLDL and TAG, which is associated with liver diseases. In fact, exercise induced a synergistic effect with high fat diet and STZ increasing TAG and VLDL in liver. The mechanism behind this phenomenon might be explained by the increase in gluconeogenesis stimulation, due to metabolic adaptations caused by excess of lipid and by changes in skeletal muscle energy requirement induced by moderate PE. Gluconeogenesis could have been stimulated by the increase in glycerol concentration on high fat diet, increase in adrenaline induced by exercise and decreased in insulin concentration caused by STZ (BECK-NIELSEN; HOTHER-NIELSEN; STAEHR, 2002; BARTHEL; SCHMOLL, 2003). Altogether, those mechanism seem to exacerbate insulin resistance in hepatic tissues favoring the increase in lipotoxicity observed by the increase in hepatic TAG and VLDL. On the other hand, the increase of TAG and VLDL observed in the HF-PE group could represent a protective mechanism triggered by regular aerobic exercise to conserve fat as energy source since glucose uptake is impaired. However, the exact mechanism behind this outcome waits for further investigation.

## CONCLUSION

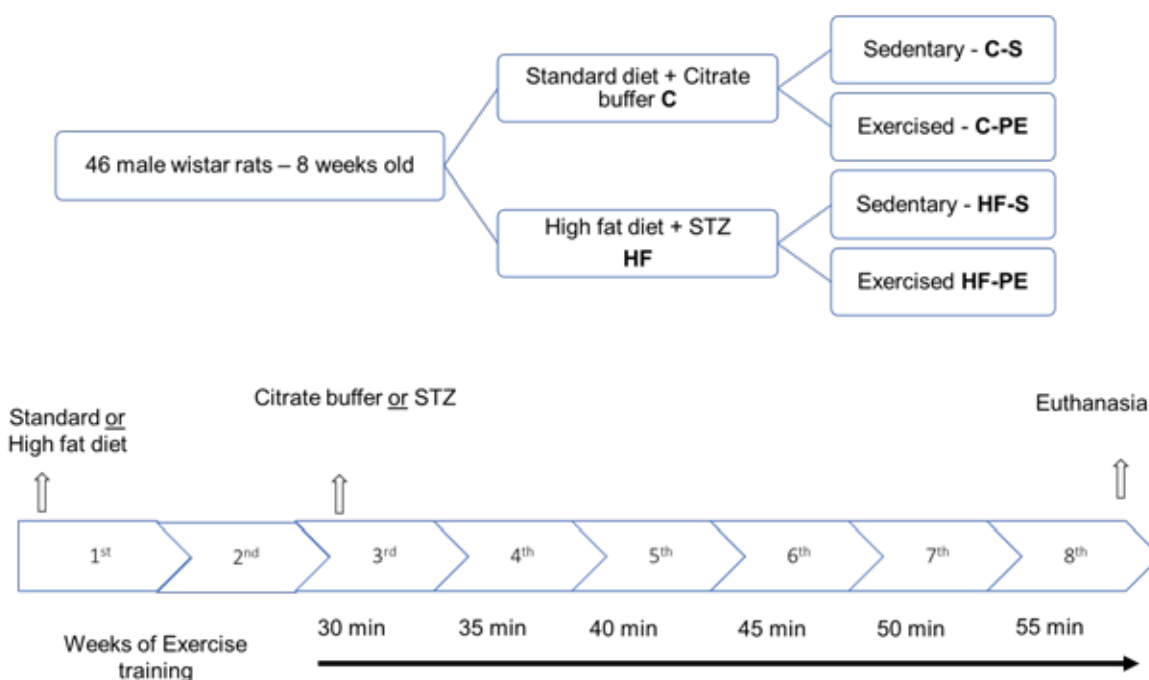
In summary, the protocol that induced T2DM, high fat diet and a single injection of STZ, did not induce liver diseases or increase in blood oxidative stress. Besides, PE acted in synergy with high fat diet and STZ inducing accumulation of TAG and VLDL in hepatic tissue, an effect that could either represents lipotoxicity or a protective mechanism to conserve sources of energy. A distinct T2DM- induced protocol, with a longer duration and/or pharmacological approaches might be more suitable to study liver diseases induced by T2DM.

Table 1 – Effect of T2DM induction protocol and physical exercise on morphological and plasma metabolic changes. Data are expressed as mean ± standard deviation. C-S = control-sedentary group (n=10); C-PE = control-physical exercise group (n=11); HF-S = high fat diet-sedentary group (n=10); HF-PE high fat diet-physical exercise group (n=11)

Variables	C-S	C-PE	HF-S	HF-PE	P
Body weight (g)	359.6±61.9	354.9±46.3	405.6±76.1	383.8±48.7	>0.05
Capillary glucose (mmol/L)	6.7±0.5	7.0±0.6	11.4±4.8*	13.1±7.6*	0.002
Lactate (mg/dL)	15.9±6.0	14.0±3.7	18.0±4.8	14.9±4.1	>0.05
Urea (mg/dL)	39.4±10.2	44.9±8.5 <sup>#</sup>	32.9±3.7	34.5±3.9	0.002
Arginase(µg/mg.prot)	0.43±0.21	0.38±0.08	0.36±0.16	0.45±0.19	>0.05

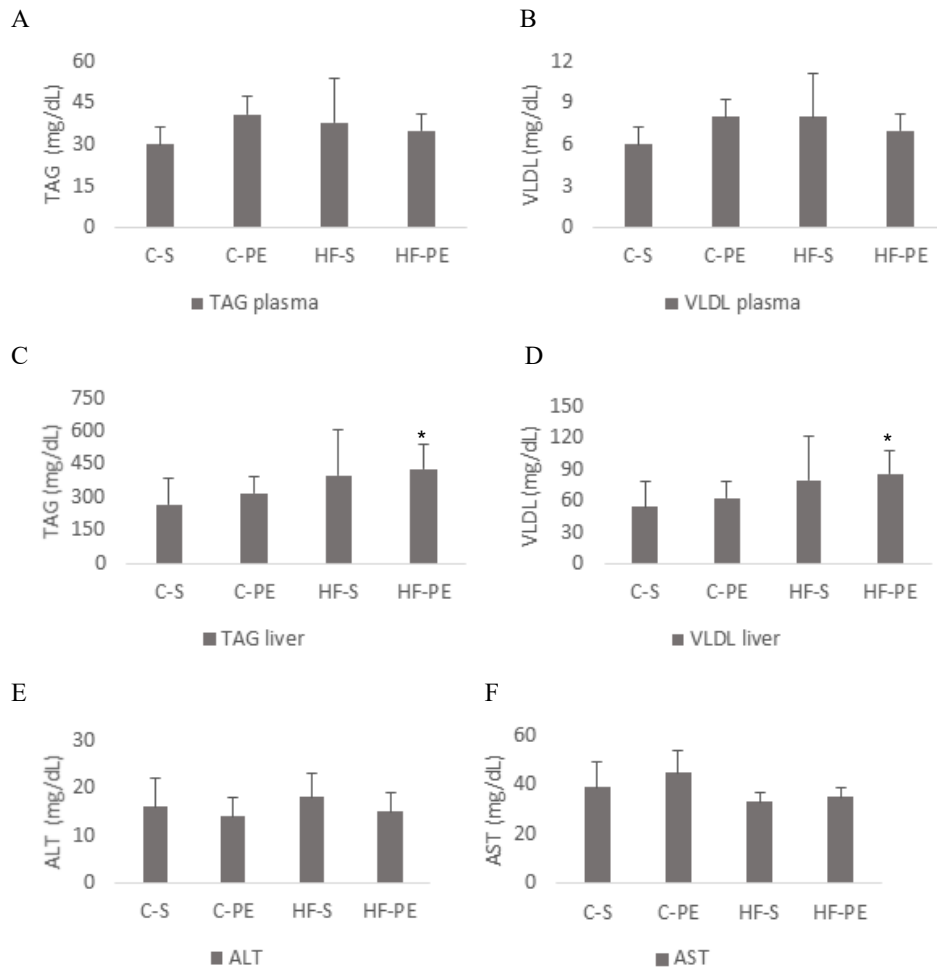
Font: The authors.

Figure 1 – Design and timeline of experimental procedures, STZ= streptozotocin, C= Control, S= sedentary, PE= Physical exercise training, HF= High fat diet



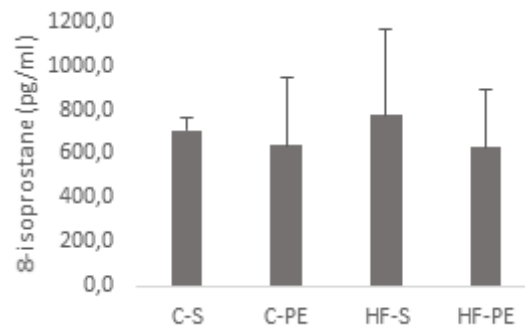
Font: The authors.

Figure 2 – Effect of T2DM induction protocol and physical exercise on: A- plasma TAG (triacylglycerol) and B- VLDL (very low-density lipoprotein); C- liver TAG and D- VLDL; E- ALT (alanine transaminase) and F- AST (aspartate aminotransferase). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. C-S = control-sedentary group (n=10); C-PE = control-physical exercise group (n=11); HF-S = high fat diet-sedentary group (n=10); HF-PE high fat diet-physical exercise group (n=11). \*p= 0.0016 HF-PE vs C-S



Font: The authors.

Figure 3 – Effect of T2DM induction protocol and physical exercise on plasma 8-isoprostane level. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. C-S = control-sedentary group (n=10); C-PE = control-physical exercise group (n=11); HF-S = high fat diet-sedentary group (n=10); HF-PE high fat diet-physical exercise group (n=11)



Font: The authors.

## REFERENCES

- BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 285, n. 4, p. 685-692, Oct. 2003.
- BECK-NIELSEN, H.; HOTHER-NIELSEN, O.; STAEHR, P. Is hepatic glucose production increased in type 2 diabetes mellitus? *Current Diabetes Reports*, v. 2, n. 3, p. 231-236, May 2002.
- BENITE-RIBEIRO, S. A. *et al.* Influence of regular physical exercise on increased caloric intake triggered by stressors. *Annual Review of Biomedical Sciences*, v. 2, p. 30-45, Nov. 2010.
- BENITE-RIBEIRO, S. A.; SANTOS, J. M.; DUARTE, J. A. R. Moderate physical exercise attenuates the alterations of feeding behaviour induced by social stress in female rats. *Cell Biochemistry & Function*, v. 32, n. 2, p. 142-149, June 2013.
- DE CHIARA, F. *et al.* Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 69, p. 905-915, 2018.
- DOS SANTOS, J. M. *et al.* A. The effect of age on glucose uptake and GLUT1 and GLUT4 expression in rat skeletal muscle. *Cell Biochemistry & Function*, v. 30, n. 3, p. 191-197, Nov. 2011.
- DOS SANTOS, J. M. *et al.* The effect of exercise on skeletal muscle glucose uptake in type 2 diabetes: An epigenetic perspective. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 64, n. 12, p. 1.619-1.628, Sept. 2015.
- GRUNDI, D. Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Grundy, D. Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*, v. 100, p. 755-758, June 2015.
- LIU, H. *et al.* Body mass index and mortality in patients with type 2 diabetes mellitus: A prospective cohort study of 11.449 participants. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 31, n. 2, p. 328-333, Feb. 2017.
- MANSOR, L. S. *et al.* Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology*, v. 12, n. 1, p. 136-146, Sept. 2013.
- MELLERUP, B. Colorimetric method for rapid determination of serum arginase. *Clinical Chemistry*, v. 13, n. 10, p. 900-908, Oct. 1967.
- MOHAMED, J. *et al.* Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, v. 16, n. 2, p. 132-141, Mayo 2016.
- SADIE, L. H.; SREEKUMARAN, N. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 3-17, Feb. 2010.
- SANTOS, J. M. *et al.* The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 449, n. 1-2, p. 251-255, Apr. 2018.
- SANTOS, J. M. *et al.* The interrelation between aPKC and glucose uptake in the skeletal muscle during contraction and insulin stimulation. *Cell Biochemistry & Function*, v. 32, n. 8, p. 621-624, Dec. 2014.
- SANTOS, J. M. *et al.* Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 352-361, Mar. 2011.
- SHAHWAN, M. J. *et al.* Association between abnormal serum hepatic enzymes, lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Obesity Medicine*, v. 16, Dec. 2019.
- SIMIONI, C. *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, 9(24), p. 17.181-17.198, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24729>
- TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 3, p. 456-480, Apr. 2015.
- WATFORD, M. The urea cycle: Teaching intermediary metabolism in a physiological setting. *Biochem Mol Biol Educ*; 31, 5, p. 289-97, 2003.
- WHO. World Health Organization. *Diabetes*. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Acesso em: 12 June 2018.
- ZACARIAS, A. C. *et al.* Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, v. 22, n. 6, p. 515-523, Apr. 2017.
- YOUNOSSI, Z. M. *et al.* The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, v. 71, p. 793-801, 2019.

## L-Glutamine Supplementation Associated With Moderate Aerobic Training Improves Biometric, Glycemic Profile and the Antioxidant Defense

Analú Bender dos Santos,<sup>1</sup> Lílian Corrêa Costa-Beber,<sup>2</sup>  
Eloisa Gabriela de Pelegrin Basso,<sup>3</sup> Pauline Brendler Goettems Fiorin,<sup>3</sup>  
Renan Daniel Bueno Basso,<sup>1</sup> Maicon Machado Sulzbacher,<sup>1</sup>  
Mirna Stela Ludwig,<sup>1</sup> Thiago Gomes Heck<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Introduction:** L-glutamine is a non-essential amino acid, whose pool appears to be depleted during catabolic conditions, such as intense or high duration exercise, and to avoid the exercise-related benefits. Therefore, its supplementation could provide an additional source of L-glutamine and prevent these effects. However, the oral intake of its free form has been discouraged, despite of some evidences reporting positive effects. **Objective:** to verify whether the L-glutamine supplementation (in its free form) could provide an additional improvement in biometric, glycemic and redox parameters, in animals undergoing moderate aerobic training (MAT). **Methods:** 28 Swiss male mice were divided into four groups: Cont (n=7), Ex (n=7), Glut (n=8), and Ex+Glut (n=6). Glut and Ex+Glut received gastric gavage of L-glutamine (1g/kg), while Cont and Ex groups received 100 µL of PBS one hour before exercising, five days/week, six weeks. Ex and Ex+Glut underwent moderate swimming, while Cont and Glut remained sedentary, for the same period. Mice started swimming with 2% of body weight attached to the tail during 20 min, and ended the experiment with 4% during 60 min. **Results:** L-glutamine supplementation increased the gastrocnemius mass and improved the glucose tolerance in animals submitted to MAT. It improved the antioxidant status in gastrocnemius, liver and pancreas, and declined it in adipose tissue in animals undergoing MAT. The drop of adipose antioxidant defense was associated with adiposity, while pancreas antioxidant activity was inversely associated with the glucose intolerance. **Conclusion:** L-glutamine (free form) improves biometric and glucose parameters, and enhances antioxidant activities.

**Keywords:** Glucose intolerance. Oxidative stress. HSP70. Skeletal muscle. Adiposity.

### SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA ASSOCIADA AO TREINAMENTO AERÓBICO MODERADO MELHORA PERFIL BIOMÉTRICO E GLICÊMICO E A DEFESA ANTIOXIDANTE

### RESUMO

**Introdução:** L-glutamina é um aminoácido não essencial, cujo 'pool' intracelular parece ser depletado durante condições catabólicas, como exercício intenso ou de longa duração, e assim inibir os benefícios relacionados ao exercício. Portanto, a sua suplementação pode fornecer uma fonte adicional de L-glutamina e prevenir esses efeitos. No entanto, a ingestão oral da sua forma livre tem sido desencorajada, apesar de algumas evidências reportando efeitos positivos. **Objetivo:** verificar se a suplementação de L-glutamina (na sua forma livre) pode proporcionar uma melhora adicional em parâmetros biométricos, glicêmicos e redox, em animais submetidos ao treinamento aeróbico moderado (MAT). **Métodos:** 28 camundongos Swiss machos foram divididos em quatro grupos: Cont (n=7), Ex (n=7), Glut (n=8), e Ex+Glut (n=6). Glut e Ex+Glut receberam gavagem gástrica de L-glutamina (1g/kg), enquanto os grupos Cont e Ex receberam 100 µL de PBS uma hora antes do exercício, cinco dias/semana, seis semanas. Ex e Ex+Glut foram submetidos a natação moderada, enquanto Cont e Glut permaneceram sedentários, durante o mesmo período. Os camundongos iniciaram a natação com 2% do peso corporal acoplado a cauda durante 20 min, e terminaram o experimento com 4% durante 60 min. **Resultados:** A suplementação de L-glutamina aumentou a massa do gastrocnêmio e melhorou a tolerância à glicose nos animais submetidos ao MAT. Ela melhorou o estado antioxidante no gastrocnêmio, fígado e pâncreas, e reduziu no tecido adiposo branco em animais passando por MAT. A redução da defesa antioxidante do tecido adiposo esteve associada a adiposidade, enquanto a atividade antioxidante pancreática foi inversamente associada a intolerância a glicose. **Conclusão:** L-glutamina (forma livre) melhora parâmetros biométricos e glicêmicos, e aumenta as atividades antioxidantes.

**Palavras-chave:** Intolerância a glicose. Estresse oxidativo. HSP70. Músculo esquelético. Adiposidade.

RECEBIDO EM: 25/8/2020

MODIFICAÇÕES SOLICITADAS EM: 9/9/2020

ACEITO EM: 20/9/2020

<sup>1</sup> Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (Unijuí). Rua do Comércio, 3000 – Bairro Universitário. Ijuí/RS, Brazil. CEP 98700-000.

<sup>2</sup> Autora correspondente. Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (Unijuí). Rua do Comércio, 3000 – Bairro Universitário. Ijuí/RS, Brazil. CEP 98700-000. <http://lattes.cnpq.br/2752820101075796>. <https://orcid.org/0000-0001-7796-1641>. [lilianutty@hotmail.com](mailto:lilianutty@hotmail.com)

<sup>3</sup> Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (Unijuí). Rua do Comércio, 3000 – Bairro Universitário. Ijuí/RS, Brazil. CEP 98700-000; Atmospheric Pollution Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA). Rua Sarmiento Leite, 245. Porto Alegre/RS, Brazil.

## INTRODUCTION

The dietary supplementation L-glutamine has been discussed worldwide regardless its efficacy in preventing muscle fatigue (COQUEIRO; ROGERO; TIRAPEGUI, 2019), in catabolic conditions such as hind limb immobilization (PETRY *et al.*, 2019), sepsis (SULZBACHER *et al.*, 2018) and aerobic physical training (PETRY *et al.*, 2014). L-glutamine is one of the most abundant amino acids in the circulation, and can act in the glycemic control by increasing the insulin production and secretion (CARLESSI *et al.*, 2019; COQUEIRO; ROGERO; TIRAPEGUI, 2019). Besides, the most important role of glutamine is the indirect antioxidant activity through enhancing glutathione availability and the 70 kDa-heat shock protein (HSP70) expression (PETRY *et al.*, 2019). The HSP70 is a high evolutionarily conserved chaperone, expressed under stressful conditions, with a fundamental antioxidant, anti-inflammatory role (MIRAGEM; HOMEM DE BITTENCOURT, 2017), and sensible to exercise (HECK *et al.*, 2017), diabetes (BITTENCOURT *et al.*, 2020) and glutamine levels (PETRY *et al.*, 2014, 2015, 2019).

The main endogenous source of L-glutamine is the skeletal muscle under activity, besides also being produced by adipose tissue and liver (COQUEIRO; ROGERO; TIRAPEGUI, 2019). By challenging our body through an increase of oxidative metabolism and the production of reactive oxygen species (ROS), the exercise can deplete the L-glutamine pool (CRUZAT *et al.*, 2018) and overload the antioxidant defense depending on its intensity and duration. This depletion is followed by an increased release of oxidative stress biomarkers, which can affect other metabolic tissues, and compromise the exercise-related benefits. Moderate physical aerobic training is a non-pharmacological strategy to treat or prevent metabolic conditions, which can, at long-term lead to type II diabetes mellitus (DM2) (PEDERSEN, 2017; WEDELL-NEERGAARD *et al.*, 2018a).

The moderate training-related benefits are related to the amelioration of body composition, with a significant reduction of the adiposity and a stabilization or increase of lean mass, both related to the improvement of glycemic homeostasis (WEDELL-NEERGAARD *et al.*, 2018a). By enhancing the muscle content, exercise helps in contra balancing the inflammatory and oxidative phenotype displayed by adipocytes, in a 'yin-yang' relationship (PEDERSEN, 2013, 2017). Therefore, and can be considered a "real poly-pill" (FIUZA-LUCES *et al.*, 2013), since also enhances the antioxidant defense, which depends on the L-glutamine availability.

L-glutamine deprivation induces metabolic adaptations, such as reduction of glucose uptake, insulin production and release, as well as a drop in the mitochondrial respiration, both associated with a  $\beta$ -cells dysfunction (CARLESSI *et al.*, 2019). Therefore, the L-glutamine supplementation could provide an exogenous source of this amino acid, and improve the glycemic, glutathione and inflammatory profile. However, although some studies report benefits (MEDRAS *et al.*, 2018; ABBOUD *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020), recently the oral intake of L-glutamine in its free form has been discouraged, due to its utilization for the enterocytes supply (CRUZAT *et al.*, 2018). Nevertheless, if it works in stimulating other antioxidant enzymes than the glutamine-glutathione-HSP70 axis (PETRY *et al.*, 2014, 2015, 2019), and if it has a synergistic effect with moderate aerobic training these parameters remains unclear.

Here, we propose to associate the L-glutamine supplementation in the moderate aerobic training, to verify if the supplementation could provide an additional improvement in biometric, glycemic parameters, by protecting metabolic tissues from oxidative damage and enhancing the muscle HSP70 expression in animals undergoing moderate aerobic training.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

We utilized 28 Swiss male mice, with 90 days old ( $35 \pm 3$  grams), obtained from the Animal Facility of the Regional University of Northwestern of Rio Grande do Sul State (Unijuí). During the experimental period, the animals were maintained in semi-metabolic boxes (5-6 animals/box), with controlled ambient temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and a light-dark cycle of 12 hours. All animals received water and standard diet (Nuvilab CR-1) *ad libitum*.

This study followed all ethical rules established by Arouca's Act (Federal Law 11794/2008) and the Guide for Care and Use of Experimental Animals, published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996) and was approved by the Animal Ethics Committee of Unijuí (Ceua-Unijuí, protocol nº 017/2013).

### Experimental design

Animals were divided into four experimental groups: Control group (Cont,  $n = 7$ ), Exercise (Ex,  $n = 7$ ), Glutamine (Glut,  $n = 8$ ), and Exercise + Glutamine (Ex + Glut,  $n = 6$ ). Glut and Ex + Glut received gas-

tric gavage of L-glutamine (1g/kg), while Cont and Ex groups received the same volume of PBS, adjusted by the body weight, one hour before exercising. Ex and Ex + Glut were submitted to moderate swimming, while Cont and Glut remained physical inactive (sedentary), in the shallow water, five days/week, for six weeks (Figure 1A).

### Swimming protocol

Prior to experiment, all animals were allowed to accustom to the water environment to avoid any stress response related to the new situation and environment. Thus, for three consecutive days, all animals received gastric gavage of 100  $\mu$ L PBS pH 7.4 one hour before were submitted to the water environment. The animals were kept for 10 min in individual swimming pool chambers (10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  30 cm) filled with water at  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  (20 cm depth), for three consecutive days, without any overload, to avoid stress behavior during exercise training sessions. Afterwards, animals remained three days without manipulation and were further assigned into each experimental groups (Sedentary: Cont and Glut or Trained: Ex and Ex+Glut i.g.).

During the swimming protocol, as in the acclimatization, all animals were maintained in individual swimming pool chambers (10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  30 cm) filled with water at  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ . The sedentary (Cont and Glut) groups remained at rest in shallow water (2 cm depth), while the trained (Ex and Ex+Glut) groups swam in 20 cm depth, as previously described (MAI *et al.*, 2017; KOSTRYCKI *et al.*, 2019) (Figure 1B). The individual pool chambers with 20 cm of water prevents jumping and diving behavior and allows energy expenditure higher than three metabolic equivalents (METs) (KREGEL *et al.*, 2006; KOSTRYCKI *et al.*, 2019).

In the first week, Ex and Ex + Glut swam with 2% of body weight (b. w.) of workload attached to the tail during 20 min. In the second week, the workload increased to 4% b. w., but the duration remained unchanged. From the third to the sixth week, the animals continued swimming with 4% b. w. workload, but the time increased 10 min per week, ending the experiment with 60 min of swimming with 4% b. w. workload (Figure 1C). Mice were weekly weighted and the workload adjusted according to it, respecting the training protocol.

All experiments were carried out between 7:00 and midday, and the room temperature was kept at  $24^\circ\text{C}$ . They were monitored by an experienced researcher to prevent drowning, in agreement with The American Physiological Society's Resource Book for

the Design of Animal Exercise Protocols (KREGEL *et al.*, 2006). Fatigue was considered when animal stayed eight seconds with the snout underwater, as previously described (MAI *et al.*, 2017; KOSTRYCKI *et al.*, 2019). A previous study of our lab already demonstrated that mice trained with 4% of workload reached a lactate concentration of  $4.54 \pm 0.21$  mmol/L in the 5<sup>th</sup> week (SCHOLER *et al.*, 2016; MAI *et al.*, 2017). It is hypothesized that 4.0–4.6% workloads in swimming would reach a moderate intensity range of 60–75% of  $\text{VO}_2\text{max}$  (KREGEL *et al.*, 2006; MAI *et al.*, 2017).

### Diet and L-Glutamine supplementation

All experimental animals received a standard diet (Nuvilab CR-1, commercially obtained from Nuvital Nutrientes SA), which contains crude protein, mineral material, fibrous matter and minerals. The standard diet presents a total metabolizable energy of 16.6 MJ/kg, being 11.4 % as fats, 62.8 % as carbohydrates, and 25.8 % as proteins (GOETTEMES-FIORIN *et al.*, 2016). A more detailed description of the diet is present in the Supplementary Table S1.

L-Glutamine (m. w. 146 g/mol, Ajinomoto, Brazil) was administered in the dose of 1 g/kg b. w. For this, we prepared a solution in the concentration of 1 g/10 mL in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. Each animal received the volume corresponding to its body weight, by gastric gavage administration, one hour before exercising. We weekly monitored the animal's body weight and adjusted the L-glutamine volume. Therefore, every week, animals received a different volume of the L-glutamine solution, respecting the original dose.

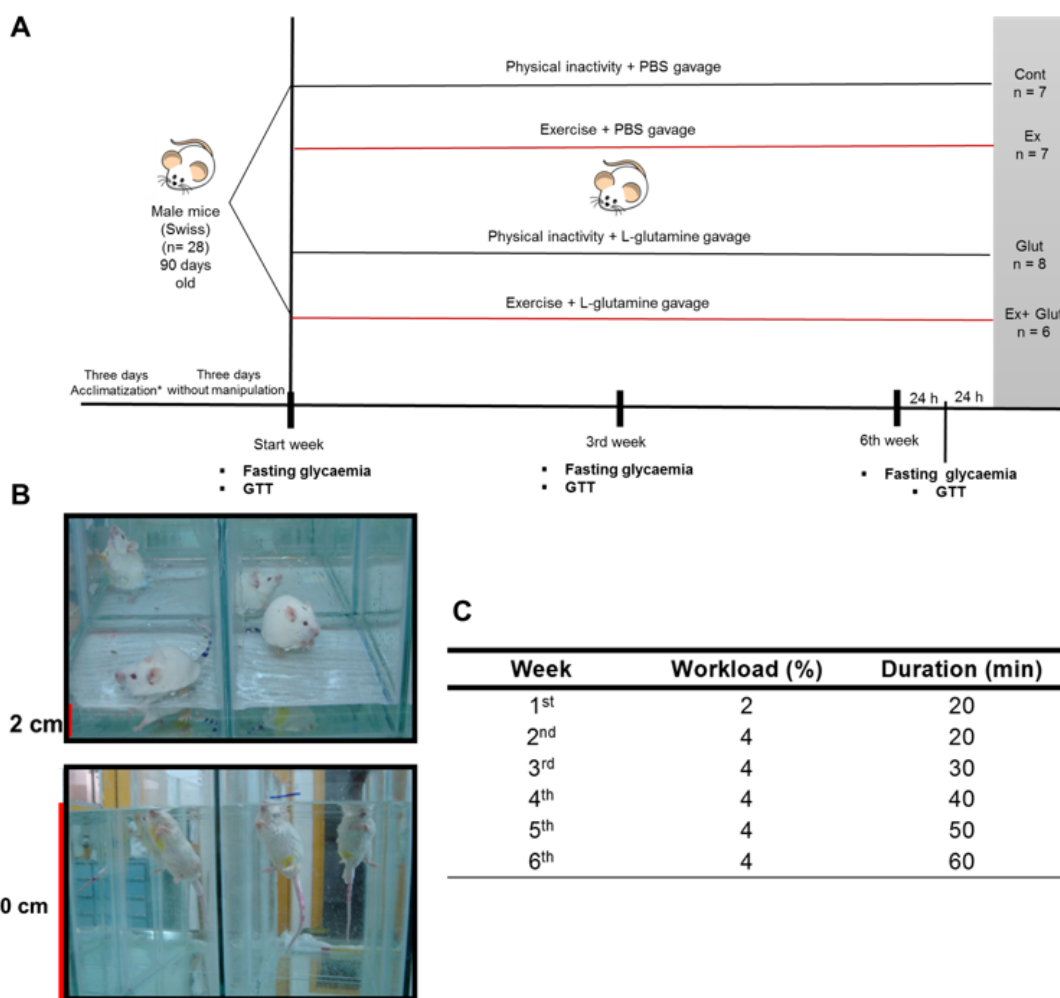
The time of one hour before exercising was considered due to the fact that approximately 30 minutes are required until the increase of glutamine blood concentration after oral intake, which returns to baseline about two hours later (CASTELL; POORTMANS; NEWSHOLME, 1996). Besides, the dose of 1 g/kg b. w. combined to L-alanine in its free form or in the dipeptide form (L-alanyl-L-glutamine) was recently reported to prevent oxidative damage and muscle loss in models of hindlimb immobilization-induced disuse muscle atrophy (PETRY *et al.*, 2019) and in aerobic exercise (PETRY *et al.*, 2014), and the immune dysfunction in sepsis in its free and isolated form (SULZBACHER *et al.*, 2018).

### Biometric Profile

Body weight was monitored weekly with a semi-analytical scale. We also verified the naso-anal length (cm) to perform Lee Index at the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> weeks.



Figure 1 – Experimental design



A) Animals underwent three days of acclimatization to the water environment. They received 100  $\mu$ L of PBS by gastric gavage and one hour later were kept for 10 min in individual swimming pool chambers filled with water, for three consecutive days, without any overload, to avoid stress behavior during exercise training sessions. Animals remained three days without any manipulation and were further assigned into four experimental groups: Glut and Ex + Glut received glutamine (1g/kg), diluted in PBS pH 7.4 by gastric gavage, while Cont and Ex groups received 100  $\mu$ L of PBS one hour before exercising. Ex and Ex + Glut were submitted to moderate swimming, while Cont and Glut remained physical inactive (sedentary), in the shallow water, five days/week, for six weeks. Body weight was verified weekly, fasting glycaemia and glucose tolerance at the baseline, third and sixth weeks. At the end of the sixth week, after the last glucose tolerance test (GTT) and 48 hours without intervention, animals were euthanized with guillotine. B) During experimental design, the sedentary animals (Cont and Glut groups) were kept in shallow water (2 cm depth;  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ ) during each training session, while the active animals (Ex and Ex + Glut) were kept in a water (20 cm depth;  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ , 20 min). C) Schematic protocol of moderate swimming. The animals started the protocol with 2% b. w. workload attached to the tail during 20 min. In the second week, the workload increased for 4% b. w., but the duration remained stable. From the third to the sixth weeks, the time enhanced 10 min per week with the 4% b. w. workload, ending the experiment swimming with 4% b.w. attached to the tail during 60 min.

Font: The authors.

Lee Index was calculated by dividing the cube root of the animal's body weight (g) by naso-anal distance (cm) (LEE, 1929). At the end of the experiment, we evaluated adiposity [% of epididymal white adipose tissue (Ewat)/body weight] and % of liver, pancreas, gastrocnemius and soleus muscle relative to body weight.

### Glycaemia and Glucose Tolerance Test (GTT)

Blood glucose levels were monitored at the baseline, at 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> weeks, in the morning after the last exercise session. Blood glucose was measured by

Glucometer Optium Xceed (Abbott Diabetes Care, Alameda, USA) (5  $\mu$ L of blood) after 12 hours of fasting. The glycaemia results were expressed in mg/dL.

Food was withdrawn in the night before experiments (12 hours before). Glycaemia was measured as described above immediately before and at 30 and 120 min after glucose (1 g/kg in saline solution, *i.p.*) administration. The glycemic response during GTT was evaluated by the area under the curve (AUC) and incremental area under the curve (IAUC) method. AUC and IAUC results were expressed in min.mg/dL.

## Tissue preparation

At the end of the six weeks of treatment, 48 hours after the last session to avoid its acute effects, animals were euthanized by guillotine for rodents. Metabolic tissues were collected and weighted (grams): liver, gastrocnemius and soleus muscle, pancreas and epididymal white adipose tissue (EWAT). We choose gastrocnemius and soleus muscle due to the different metabolism; gastrocnemius mainly composed by fast twitch fiber and glycolytic, and soleus a predominantly slow twitch, oxidative-fiber-type muscle (PETRY *et al.*, 2019). The EWAT, as a visceral depot, presents a higher metabolic rate and is closely associated with insulin resistance and cardiometabolic risks (OIKONOMO; ANTONIADES, 2018; COSTA BEBER *et al.*, 2020). Mainly the EWAT redox status can provide important information about the systemic redox profile and glucose intolerance (COSTA BEBER *et al.*, 2020).

Tissues were frozen by liquid nitrogen and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the biochemical analysis. Then, still frozen tissues were homogenized in potassium phosphate buffer (KPI, pH 7.4), containing proteases inhibitor PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, Sigma® P7626, FW = 174.19 g/mol; 1.74 mg/mL = 100 mM) to oxidative stress parameters. Gastrocnemius muscle was also homogenized in sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.1% (w/v)) buffer to determine HSP70 expression by Western blotting. We used buffer in a proportion of 9 mL/g of tissue, except for adipose tissue, that we used 5 mL/g. Blotting and oxidative stress preparations were further centrifuged into CentriBio centrifuge for 10 minutes at 4000 rpm. The supernatants were collected.

## Evaluation of Oxidative Stress

### Determination of Lipid Peroxidation

The lipid peroxidation was analyzed using the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978). Homogenates were precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) in the proportion of 3:1 (540  $\mu\text{L}$  TCA and 180  $\mu\text{L}$  homogenate) centrifuged and incubated with thiobarbituric acid (TBA) in the proportion of 1:1 (300  $\mu\text{L}$  TBA and 300  $\mu\text{L}$  supernatant) for 15 minutes at  $100^{\circ}\text{C}$ . After, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 535 nm. The malondialdehyde (MDA) standard was prepared from 1.1.3.3-Tetramethoxypropane (points from 0.0005 – 0.016 mg/mL). Results were expressed in mmol MDA/mL, normalized for by protein concentration, measured by the Bradford method, at 595 nm,

using albumin curve as standard (BRADFORD, 1976). Further, they were normalized by the control and represented as Arbitrary Units.

### Determination of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity

The total SOD activity was performed by inhibition of the auto-oxidation of pyrogallol (Marklund e Marklund, 1974). Briefly, in a cuvette, 970  $\mu\text{L}$  of 50 mM Tris/ 1mM EDTA buffer (pH 8.2), 4  $\mu\text{L}$  of CAT (CAT; 30  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{L}$  of homogenate were added, the equipment was cleared and 16  $\mu\text{L}$  of pyrogallol (24 mM in HCl 10 mM) were added. The SOD activity was determined at  $36^{\circ}\text{C}$  in a spectrophotometer (420 nm), every 20 seconds, during 120 seconds. The results were expressed in USOD/mg prot.

The CAT activity was performed by the decomposition of hydrogen peroxide (Aebi, 1984). In a quartz cuvette, 955  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and 10  $\mu\text{L}$  of homogenate were added, the equipment was cleared and 35  $\mu\text{L}$  of hydrogen peroxide (0.01 M) were mixed. The CAT activity was determined at  $36^{\circ}\text{C}$  in a spectrophotometer (240 nm), every 15 seconds, during 120 seconds. The results were expressed in pmol/mg prot.

SOD and CAT activities were normalized by protein concentration. Further, they were normalized by the control and represented as Arbitrary Units.

### HSP70 muscle expression (iHSP70)

The iHSP70 expression was evaluated in gastrocnemius tissue by western blotting analyses. Equivalent amounts of protein from each sample ( $\sim 40 \mu\text{g}$ ) were prepared in sample buffer [Tris 50 mM, SDS 10%, glycerol 10%, 2-mercaptoethanol 10% and 2 mg/ml bromphenol blue]. The samples were boiled for 10 min and electrophoresed in a 10% polyacrylamide gel (5h in 15 mA/gel). After, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE HealthCare) by electrotransfer (1h in 100 V) and subsequently, transferred bands were visualized with 0.3% (w/v) Red Ponceau S (Sigma-Aldrich).

Membranes were washed with washing buffer [TEN-Tween 20 solution (0.1% w/v): TEN is 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4]; and then blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk in washing buffer. Membranes were incubated for 12 hours with monoclonal anti-HSP70 antibody (Sigma-Aldrich H5147, 1:1000). After three consecutive washings with washing buffer, peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich A9044, Lot # 018M4899V, 1:15000)

was utilized as secondary antibody. Membrane were incubated for one hour, and after this, were washed three times on washing buffer. As a gel loading control, we used Coomassie Blue (0.1% Coomassie blue, 40% methanol, 10% acetic acid) to detect the 43 kDa  $\beta$ -actin region. Blot visualization was performed using ECL-Prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare®). Quantification of bands was performed using Image J® software. The data were presented in arbitrary units of iHSP70, relative do control.

### Statistical analyses

First, we verified the Gaussian distribution of the data, by performing the D'Agostino-Pearson and Shapiro-Wilk normality tests. Further, assuming the normality, we used two-way ANOVA followed by Tukey to test the effect of time and of the interventions on body weight and GTT. Area under the curve (AUC) and incremental area under the curve (IAUC) were calculated to GTT curve. One-way Anova, followed by Tukey for comparison between groups. We also performed

Pearson's correlation between some variables. All data were expressed in mean  $\pm$  SD. We considered a significance level of 95% and a P 0.05.

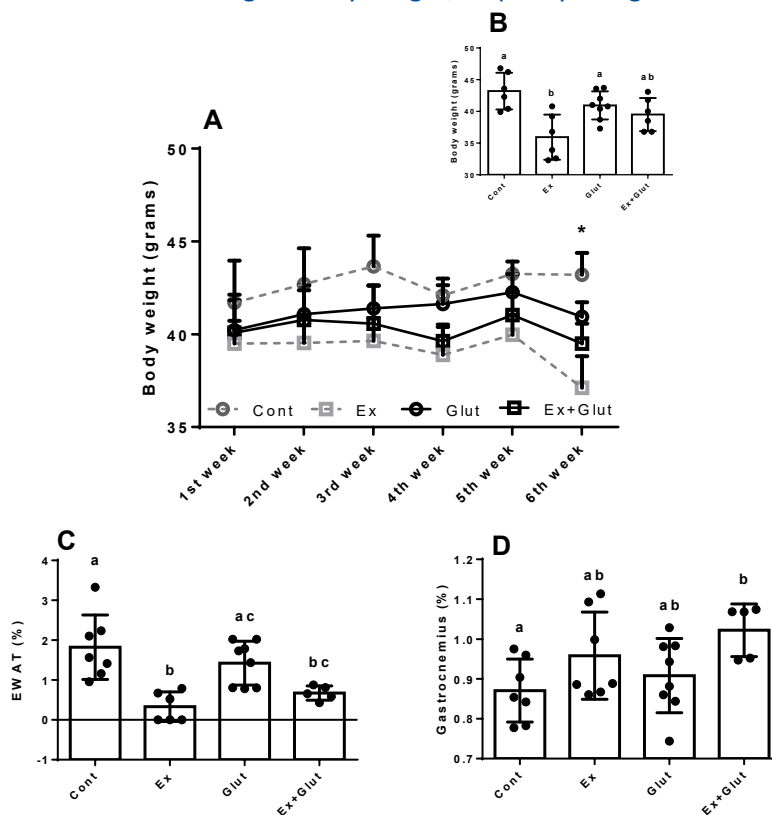
## RESULTS

L-glutamine does not affect the moderate training-induced reduction of adiposity and enhances the gastrocnemius mass in trained animals

Six weeks of moderate aerobic training did not affect the weight during the experiment ( $P = 0.248$ ) (Figure 2A), except in the 6<sup>th</sup> week, when the Ex presented lower body weight than Cont and Glut groups ( $P = 0.001$ ,  $F_{3,22} = 7.143$ ) (Figure 2B). Neither moderate training nor the L-glutamine changed the weight gain during the experiment ( $P = 0.215$ ,  $F_{3,24} = 1.601$ ) (Figure S1A), Lee Index in the 3<sup>rd</sup> ( $P = 0.689$ ,  $F_{3,26} = 0.493$ ) (Figure S1B), and 6<sup>th</sup> weeks ( $P = 0.718$ ,  $F_{3,24} = 0.451$ ) (Figure S1C).

Ex and Ex+Glut presented lower EWAT mass compared to Cont group, while Glut presented higher adiposity than Cont group ( $P = 0.0003$ ,  $F_{3,22} = 9.518$ )

Figure 2 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training on body weight, adiposity and gastrocnemius mass



A) Body weight during the 12 weeks. Two-way ANOVA with repeated measures, followed by the Tukey test. Time  $P = 0.024$ , Interventions  $P = 0.248$ , Interaction between factors  $P = 0.591$ , \* Ex vs Cont. B) Final body weight. One-way ANOVA, followed by Tukey test ( $P = 0.001$ ,  $F_{3,22} = 7.143$ ). C) Epididymis white adipose tissue (EWAT). One-way ANOVA, followed by Tukey test ( $P = 0.0003$ ,  $F_{3,22} = 9.518$ ). D) Gastrocnemius mass. One-way ANOVA, followed by Tukey test ( $P = 0.045$ ,  $F_{3,23} = 3.117$ ). Data presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 6-8$  p/ group). a-c Means within a row with different superscripts are different at  $P < 0.05$ . Different letters represent different means while equal letters represent equal means.

Font: The authors.

Table 1 – Metabolic tissue's weight of animals submitted to moderate aerobic training and L-glutamine supplementation

Tissue mass (%)	Cont	Ex	Glut	Ex + Glut	P value
Soleus muscle	0.044 ± 0.006	0.052 ± 0.010	0.045 ± 0.004	0.042 ± 0.004	0.100 ( $F_{3,24} = 2.326$ )
Pancreas	0.521 ± 0.042	0.565 ± 0.040	0.555 ± 0.050	0.555 ± 0.052	0.379 ( $F_{3,23} = 1.075$ )
Liver	4.118 ± 0.341	3.960 ± 0.537	3.825 ± 0.213	4.020 ± 0.530	0.591 ( $F_{3,24} = 0.648$ )

Data expressed as mean ± SD. One-way ANOVA, followed by Tukey (n = 6-8 p/ group).

Font: The authors.

Table 2 – Fasting glycaemia of animals submitted to animals submitted to moderate aerobic training and L-glutamine supplementation

Glycaemia	Cont	Ex	Glut	Ex + Glut	P value
Baseline	135.00±17.76	121.70±12.68	115.10±47.38	114.80±29.64	0.590 ( $F_{3,24} = 0.650$ )
3 <sup>rd</sup> week	117.30±28.92	96.71±27.22	124.40±28.79	110.30±40.70	0.393 ( $F_{3,24} = 1.040$ )
6 <sup>th</sup> week	123.00±21.27	111.40±27.46	114.10±14.75	108.50±23.67	0.655 ( $F_{3,24} = 0.545$ )

Data expressed as mean ± SD. One-way ANOVA, followed by Tukey (n = 5-6 p/group).

Font: The authors.

(Figure 2C). Ex+Glut presented a slight higher gastrocnemius mass than Cont group ( $P = 0.045$ ,  $F_{3,23} = 3.117$ ) (Figure 2D). Therefore, the moderate aerobic training reduces the adiposity independent of supplementation; however, L-glutamine helps in maintaining the lean mass, which explains the lack of effect in the total body weight. Neither the moderate training nor the L-glutamine supplementation affected the mass of the other metabolic tissues, such as soleus muscle, pancreas and liver (Table 1). The biometrical effects were independent of changes in the food ( $P = 0.744$ ,  $F_{3,44} = 0.413$ ) (Figure S1D) and water intake ( $P = 0.3614$ ,  $F_{3,43} = 1.095$ ) (Figure S1E).

### Both moderate aerobic training and L-glutamine supplementation enhances the glucose tolerance

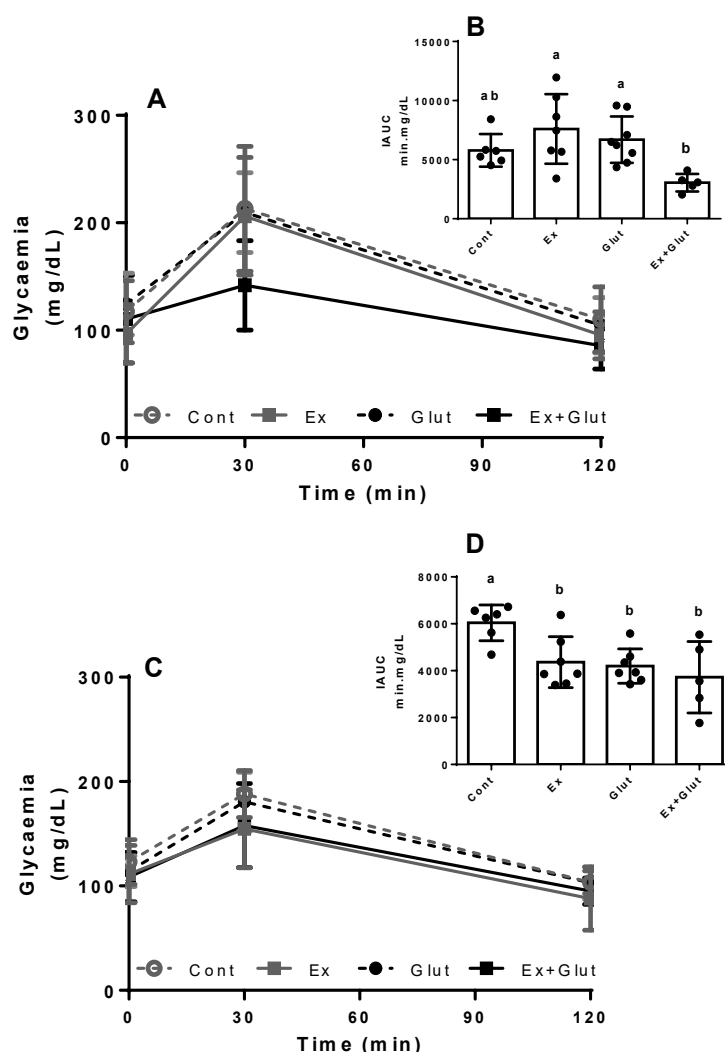
Neither moderate training nor the L-glutamine supplementation changed the fasting glycaemia during the experiment (Table 2). However, to verify if the L-glutamine could improve the glucose tolerance in trained animals, we performed GTT at the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> weeks of experiment. At the 3<sup>rd</sup> week, the GTT was not affected by the interventions ( $P = 0.199$ ,  $F_{3,24} = 1.674$ ) (Figure 3A), neither was the GTT-AUC ( $P = 0.100$ ,  $F_{3,24} = 2.321$ ) (Figure S2A). However, Ex+Glut presented a lower IAUC than Ex and Glut groups ( $P = 0.006$ ,  $F_{3,22} = 5.290$ ) (Figure 3B). At the 6<sup>th</sup> week, the GTT was also not affected by the interventions ( $P = 0.205$ ,  $F_{3,24} = 1.643$ ) (Figure 2D), neither the GTT-AUC ( $P = 0.168$ ,  $F_{3,24} = 1.833$ ) (Figure S2B).

However, the IAUC was lower in all groups compared to Cont group ( $P = 0.005$ ,  $F_{3,21} = 5.534$ ) (Figure 3D). Taking together, these results shows that the association between L-glutamine supplementation and moderate aerobic exercise improves the glucose tolerance, without affecting the glucose overload-induced glycemic peak. Besides, the association anticipates the IAUC improvement compared to the effects each intervention isolated.

### L-glutamine supplementation induces the antioxidant defense in metabolic tissues of animals submitted to moderate aerobic training

Ex+Glut group presented higher lipoperoxidation in the gastrocnemius muscle than Cont and Ex groups ( $P = 0.022$ ,  $F_{3,23} = 3.854$ ) (Figure 4A). The association of L-glutamine supplementation and moderate aerobic training slightly increased the SOD activity in Ex+Glut animals compared to Cont ( $P = 0.044$ ,  $F_{3,24} = 3.125$ ) (Figure 4B). L-glutamine also increased the CAT activity in Ex+Glut compared to Ex group ( $P = 0.027$ ,  $F_{3,22} = 3.678$ ) (Figure 4C). Neither moderate aerobic training nor the L-glutamine supplementation affected the lipoperoxidation in the pancreas tissue ( $P = 0.062$ ,  $F_{3,22} = 2.826$ ) (Figure 4D). L-glutamine supplementation also increased the SOD activity in trained animals, as verified by the higher SOD activity presented by the Ex+Glut compared to Ex group ( $P = 0.031$ ,  $F_{3,21} = 3.581$ ) (Figure 4E). L-glutamine, moderate ae-

Figure 3 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training in the GTT response and AUC



A) GTT response at 3<sup>rd</sup> week, Two-way ANOVA, followed by Tukey ( $P = 0.199$ ,  $F_{3,24} = 1.674$ ). B) IAUC at 3<sup>rd</sup> week, One-way ANOVA, followed by Tukey ( $P = 0.006$ ,  $F_{3,22} = 5.290$ ). C) GTT response at 6<sup>th</sup> week, Two-way ANOVA, followed by Tukey ( $P = 0.205$ ,  $F_{3,24} = 1.643$ ). D) IAUC at 6<sup>th</sup> week, One-way ANOVA, followed by Tukey ( $P = 0.005$ ,  $F_{3,21} = 5.534$ ). Data expressed in mean  $\pm$  SD ( $n = 6-8$  p/group). a-c Means within a row with different superscripts are different at  $P < 0.05$ . Different letters represent different means while equal letters represent equal means.

Font: The authors.

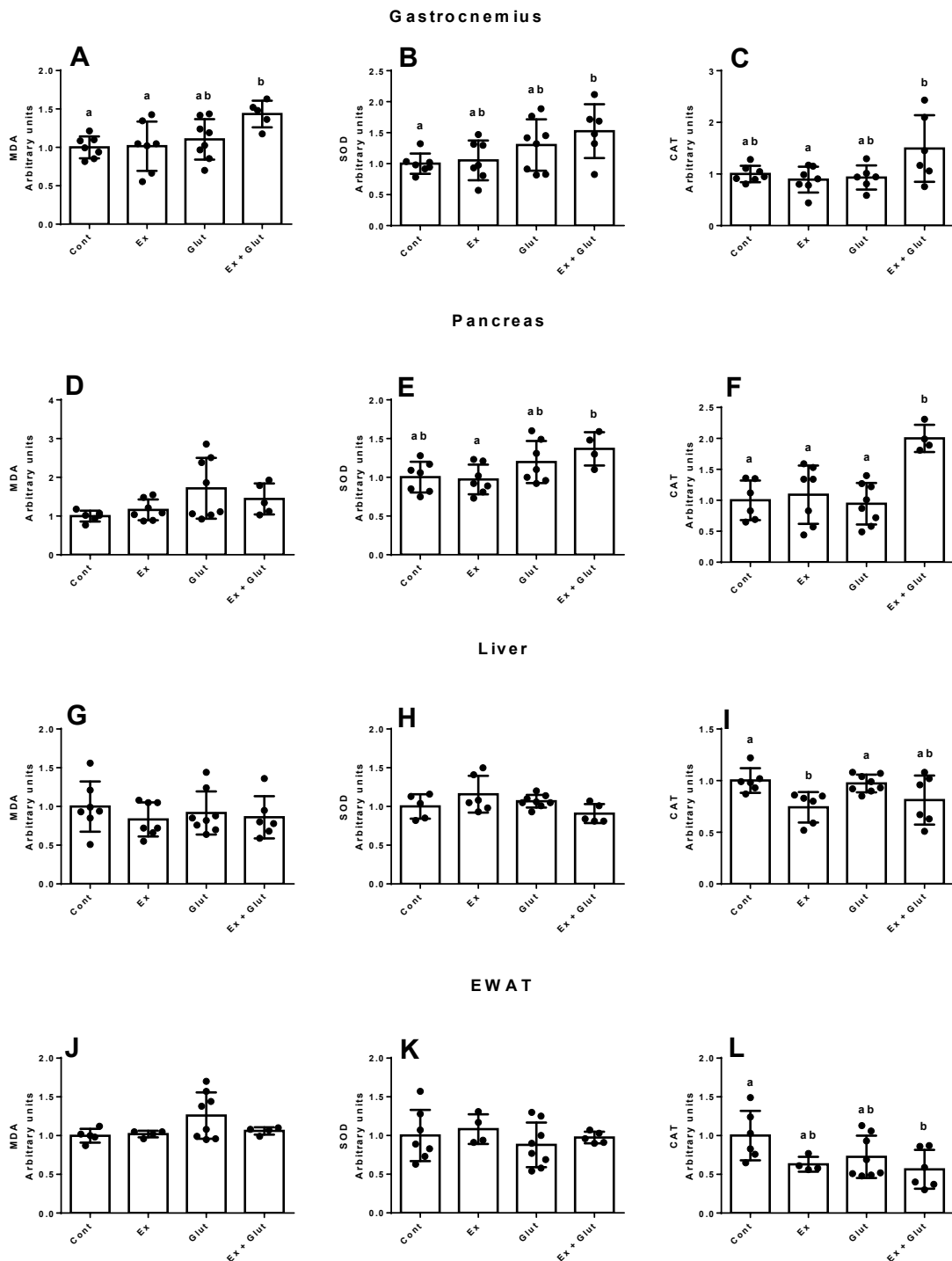
robic training and both associated increased the CAT activity compared to Cont group ( $P = 0.0007$ ,  $F_{3,21} = 8.514$ ) (Figure 4F).

Neither the lipoperoxidation ( $P = 0.697$ ,  $F_{3,24} = 0.483$ ) (Figure 4G) and SOD activity ( $P = 0.086$ ,  $F_{3,20} = 2.526$ ) (Figure 4H) were affected by the interventions in the liver tissue. However, Ex group presented lower hepatic CAT activity than Cont, while Glut group presented higher CAT activity than Ex group ( $P = 0.016$ ,  $F_{3,22} = 4.266$ ) (Figure 4I). Together, these results suggest that the moderate aerobic training reduced the CAT activity in the liver, while the L-glutamine supplementation attenuated this decrease in the Ex+Glut group. In the epididymis white adipose tissue (EWAT), nei-

ther the lipoperoxidation ( $P = 0.106$ ,  $F_{3,17} = 2.376$ ) (Figure 4L), nor the SOD activity ( $P = 0.622$ ,  $F_{3,20} = 0.600$ ) (Figure 4K) were affected by the interventions. However, the association of L-glutamine supplementation and moderate aerobic training had a slight significant effect in reducing the CAT activity in this tissue compared to Cont group ( $P = 0.049$ ,  $F_{3,20} = 3.101$ ) (Figure 4L). Therefore, these results suggest that L-glutamine supplementation enhances the antioxidant defense in metabolic tissues, except the adipose tissue.

Furthermore, we also found interesting correlations between some variables. Adiposity was weakly and positively associated with the GTT-AUC at the 6<sup>th</sup> week ( $r = 0.433$ ,  $P = 0.021$ ) (Figure 5A). Ex+Glut group

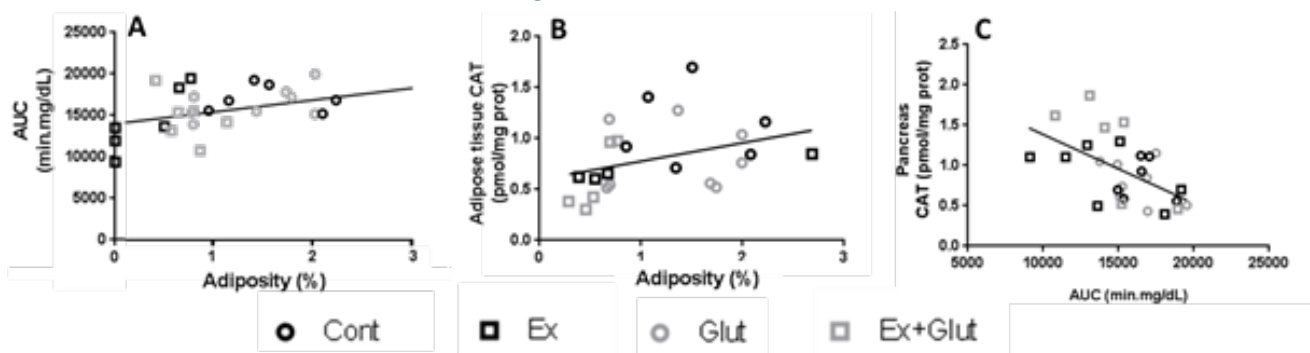
Figure 4 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training on the oxidative parameters in metabolic tissues, gastrocnemius (A-C), pancreas (D-F), liver (G-I) and EWAT (J-L)



**A)** Lipoperoxidation ( $P = 0.022$ ,  $F_{3,23} = 3.854$ ). **B)** SOD activity ( $P = 0.044$ ,  $F_{3,24} = 3.125$ ). **C)** CAT activity ( $P = 0.027$ ,  $F_{3,22} = 3.678$ ). **D)** Lipoperoxidation ( $P = 0.062$ ,  $F_{3,22} = 2.826$ ). **E)** SOD activity ( $P = 0.031$ ,  $F_{3,21} = 3.581$ ). **F)** CAT activity ( $P = 0.0007$ ,  $F_{3,21} = 8.514$ ). **G)** Lipoperoxidation ( $P = 0.697$ ,  $F_{3,24} = 0.483$ ). **H)** SOD activity ( $P = 0.086$ ,  $F_{3,20} = 2.526$ ). **I)** CAT activity ( $P = 0.016$ ,  $F_{3,22} = 4.266$ ). **J)** Lipoperoxidation ( $P = 0.106$ ,  $F_{3,17} = 2.376$ ). **K)** SOD activity ( $P = 0.622$ ,  $F_{3,20} = 0.600$ ). **L)** CAT activity ( $P = 0.049$ ,  $F_{3,20} = 3.101$ ). Data expressed in mean  $\pm$  SD, relative to Cont group. One-way ANOVA, followed by Tukey ( $n = 5-8$  p/group). a-c Means within a row with different superscripts are different at  $P < 0.05$ . Different letters represent different means while equal letters represent equal means.

Font: The authors.

Figure 5 – Correlations



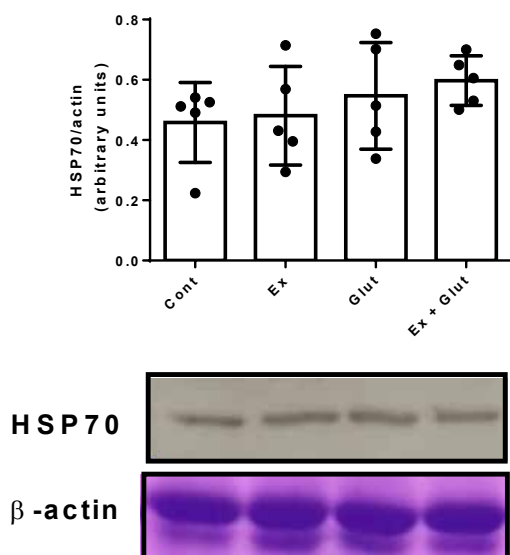
A) Adiposity and GTT-AUC at the 6<sup>th</sup> week ( $r = 0.433$ ,  $P = 0.021$ , all animals together). B) Adiposity and adipose tissue's CAT activity ( $r = 0.350$ ,  $P = 0.092$ , all animals together;  $r = 0.881$ ,  $P = 0.048$  for Ex+Glut). C) GTT-AUC at the 6<sup>th</sup> week and pancreas' CAT activity ( $r = -0.544$ ,  $P = 0.003$ ). Pearson's correlation.

Font: The authors.

also presented a positive association between adiposity and adipose tissue CAT activity ( $r = 0.881$ ,  $P = 0.048$ ) (Figure 5B). Besides, pancreas antioxidant status (CAT activity) was inversely related with the GTT-AUC at the 6<sup>th</sup> week ( $r = -0.544$ ,  $P = 0.003$ ) (Figure 5C).

Neither the physical moderate training nor the L-glutamine supplementation affected the HSP70 expression in the gastrocnemius muscle ( $P = 0.999$ ,  $F_{3,16} = 5.278e-013$ ) (Figure 6).

Figure 6 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training on gastrocnemius HSP70 expression



Data expressed in mean  $\pm$  SD, relative to Cont group. One-way ANOVA, followed by Tukey ( $P = 0.999$ ,  $F_{3,16} = 5.278e-013$ ) ( $n = 5-8$  p/group).

Font: The authors.

## DISCUSSION

In our study, the L-glutamine supplementation helped in maintaining the gastrocnemius mass, and improved the glucose tolerance of animals submitted

to moderate aerobic training. These effects might be due to the indirect effect of L-glutamine supplementation in the enhancement of the antioxidant activity in metabolic tissues, in a HSP70-independent way.

L-glutamine is one of the most abundant amino acids in the circulation, with a fundamental role in the amino acids and glycemic metabolism. Therefore, the exogenous source of L-glutamine by oral supplementation associated with L-alanine in its free forms, or in alanyl-glutamine dipeptide form can help in the muscle upkeep during catabolic conditions (PETRY *et al.*, 2014, 2019). In our study, we showed that the L-glutamine (without additional alanine) supplementation combined to moderate aerobic training increased the gastrocnemius mass, which explains why this experimental group did not present a decrease in the body weight, induced by the exercise in non-supplemented animals. These biometric effects were independent of food and water intake. Besides, this training protocol reduced the adiposity, independent on L-glutamine supplementation, which contradicts the recent reported possibility of glutamine being lipogenic (COQUEIRO *et al.*, 2019).

Independent of body mass index, low-fitness is associated with central obesity, low-grade inflammation, metabolic diseases and cardiovascular outcomes (WEDELL-NEERGAARD *et al.*, 2018a). Therefore, moderate training can act as a non-pharmacological strategy to prevent and treat metabolic conditions in physically inactive subjects (PEDERSEN, 2017). L-glutamine is a non-essential amino acid, which helps in stimulating insulin secretion and glucose uptake (MEDRAS *et al.*, 2018). Therefore, by helping in glucose uptake and muscle performance (COQUEIRO; ROGERO; TI-RAPEGUI, 2019), by reducing about 25% of the ammonium content (PETRY *et al.*, 2015), we investigated whether the L-glutamine supplementation could also

exert a synergistic effect in the exercise-induced glucose sensibility. We found that three- and six- weeks of L-glutamine supplementation associated with the moderate aerobic training helped in improve the glucose intolerance, which was related with the decrease of adiposity. This effected preceded the effect of the interventions isolated, which was only perceptible after the 6-weeks following. The protective effect of L-glutamine in the glucose tolerance may be due to the enhancement of the insulin production and secretion (MEDRAS *et al.*, 2018), which helps in augmenting the glucose uptake (CARLESSI *et al.*, 2019). Therefore, these positive effects of L-glutamine may be considered with caution before extrapolating it for obese subjects, since it could be related with a hyperinsulinemia (MEDRAS *et al.*, 2018). Since metabolic disorders or its improvement generally follow oxidative and inflammatory signaling, with HSP70 playing a fundamental role, we investigated whether the L-glutamine could prevent oxidative damage.

In our study, L-glutamine associated to moderate aerobic training increased the lipoperoxidation in the gastrocnemius muscle tissue compared to that observed in the non-supplemented trained animals. Nevertheless, it also increased the muscle SOD and CAT antioxidant activities, the last one compared to non-supplemented trained animals. CAT acts on the SOD-generated  $H_2O_2$ , while HSP70 inhibits one of the  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  producers, the NADPH oxidase (NOX) (CHEN *et al.*, 2012). Therefore, the increase of SOD and CAT activity may provide enough antioxidant defense to upkeep its mass during moderate training, explaining why the HSP70 remained unchanged. Moreover, L-glutamine upregulated the SOD and CAT antioxidant activities in pancreas tissue of animals undergoing physical training, which is in agreement with its protective role in diabetic rats' pancreatic islets (MEDRAS *et al.*, 2018; CARLESSI *et al.*, 2019). An increased antioxidant activity in the pancreas may neutralize the ROS production, and suppress the ROS-derived neutralization of insulin (MUNHOZ *et al.*, 2016). Thus, the increased pancreas antioxidant activity may explain the L-glutamine-related enhancement in the glucose tolerance, and this is also supported by the inverse correlation between pancreas CAT activity and the GTT-AUC at the final week.

We also found that, in the adipose tissue (EWAT), the association of L-glutamine and moderate aerobic training reduced the CAT activity. Adipose tissue's antioxidant defense is indirectly related to systemic antioxidant status, marks a metabolic impairment (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014; COSTA

BEBER *et al.*, 2020) and is positively related with the adiposity. Thus, the reduction of its antioxidant defense, together with a reduction of central obesity triggered by the association of exercise and glutamine may represent a better prognostic. The reduced antioxidant defense present by the adipose tissue, contrarily to the increased defense presented by the other metabolic tissues may be associated with the adipose insulin resistance triggered by L-glutamine supplementation, while muscle and liver present an L-glutamine-induced amelioration in these aspects (ABBOUD *et al.*, 2019). In this sense, L-glutamine could contribute to reducing the adiposity, by injuring the adipocytes, through insulin resistance and oxidative stress.

As the central metabolic tissue, liver exerts an essential role supporting glycemic, lipid and protein metabolism, especially under intense exercise. However, if the effects of the L-glutamine supplementation are similar in liver and muscle remained unclear until this moment. A previous study showed that L-glutamine associated to L-alanine in its free form or in the dipeptide form could enhance liver glutamine and GSH content, without affecting the HSP70 expression (PETRY *et al.*, 2015). In our study, we tested if the L-glutamine in its free form could improve the hepatic oxidative status in trained animals. We found that moderate training reduced the CAT activity, while L-glutamine supplementation increased it. Thus, this result show an important target of investigation concerning to the hepatic effects of moderate exercise. Nevertheless, this effect was neutralized when the L-glutamine was combined to training.

L-glutamine has an essential role in maintaining the antioxidant system. However, high-duration or intense exercises deplete the L-glutamine pools and lead to an oxidative condition, here perceptible in the CAT down regulation in the hepatic tissue. Thus, the supplementation could provide an exogenous source of L-glutamine. L-glutamine (1g/kg) combined to L-alanine supplementation increased plasma L-glutamine by approximately 60% (PETRY *et al.*, 2014, 2015), muscle GSH content by 100% (PETRY *et al.*, 2014), and liver GSH content by 90% compared to non-supplemented trained animals (PETRY *et al.*, 2015). However, the oral administration of L-glutamine in its free form has been criticized concerning to its efficacy (CRUZAT *et al.*, 2018), since only half of L-glutamine load supplied by the gastrointestinal route escapes the splanchnic bed (MATTHEWS, 1990; DECHELOTTE *et al.*, 1991). Despite the loss of L-glutamine to en-



terocytes provision, our results shows that the oral administration is still an efficient way when combined to physical training.

Here, we used a six-weeks moderate aerobic training protocol, which was already validated in previous studies (HECK *et al.*, 2017; MAI *et al.*, 2017; KOSTRYCKI *et al.*, 2019). Since rodents feed with standard diets and remained sedentary tends to develop weight gain and obesity because of the free access to food (MARTIN *et al.*, 2010; SEO *et al.*, 2014), and present an innate swimming ability, the swimming represents a replicable protocol, very similar to the human condition. Besides, eight-weeks training leads to physiological adaptations, such as an improved physical performance, reduction of adiposity and cardiac hypertrophy, whilst enhances the skeletal muscle mass (ARAUJO *et al.*, 2015). In addition, it also improves glycemic and lipid parameters in high fat diet-fed animals (JANG *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2015). Some of these effects are also evident in standard diet-fed animals, following a twelve-weeks swimming protocol (MAI *et al.*, 2017). Taking together, these data enhances the replicability of swimming protocol and highlights the possibility of extending it for longer periods, with a guarantee of physical adaptation.

However, our study has some limitations. Swimming requires a high tissue demand and response, which can be different between animals and humans, because of the size and movement patterns (SEO *et al.*, 2014). Besides, in this study, we only used male mice, and female could respond differently to the training protocol and L-glutamine supplementation, since estrogen per se has a powerful antioxidant activity. Finally, our data concerning to glucose tolerance may be carefully considered before extrapolating these results to an insulin resistant model, since we used standard diet-fed animals.

Taking together, our results show that L-glutamine oral supplementation, even when not associated with L-alanine, improves the biometrical, glycemic and antioxidant status in male mice undergoing moderate aerobic training. These findings are in agreement with a recent report of the benefits of combined exercise training and L-glutamine supplementation in oral redox and inflammatory parameters (ALMEIDA *et al.*, 2020). It is known that L-glutamine supplementation can improve the muscle and liver health by enhancing the glutamine-glutathione-HSF1-HSP70 regulation and protection (PETRY *et al.*, 2014, 2015, 2019). Furthermore, our study show that L-glutamine exerted the improvement in biometric and glycemic metabolism in animals undergoing aerobic training, by an

indirect antioxidant activity, enhancing muscle, pancreas and liver antioxidant defenses, but not in EWAT, even without changes to the HSP70 content yet.

## CONCLUSION

In conclusion, the L-glutamine supplementation in its free form, helps in increasing the gastrocnemius mass and improving the glucose tolerance in animals submitted to moderate aerobic training. These benefits are related to the improvement of the antioxidant status verified in the metabolic tissues, gastrocnemius muscle, liver and pancreas in animals undergoing moderate aerobic training. Moreover, our study shows that the L-glutamine-related antioxidant effect extrapolates the already known glutamine-glutathione-HSP70 axis, and enhances other antioxidant enzymes, such as SOD and CAT activities.

## REFERENCES

- ABBOUD, K. Y. *et al.* Oral Glutamine Supplementation Reduces Obesity, Pro-Inflammatory Markers, and Improves Insulin Sensitivity in DIO Wistar Rats and Reduces Waist Circumference in Overweight and Obese Humans. *Nutrients*, v. 11, n. 3, Mar. 1<sup>o</sup> 2019. ISSN 2072-6643 (Electronic) (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832230>.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>.
- ALMEIDA, E. B. *et al.* L-Glutamine Supplementation Improves the Benefits of Combined-Exercise Training on Oral Redox Balance and Inflammatory Status in Elderly Individuals. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2020, p. 2.852.181, 2020. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32411324>.
- ARAUJO, L. C. *et al.* Chronic aerobic swimming exercise promotes functional and morphological changes in rat ileum. *Biosci Rep*, v. 35, n. 5, Sept. 30 2015. ISSN 1573-4935 (Electronic) 0144-8463 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424698>.
- BITTENCOURT, A. *et al.* Heat shock response to exercise in pancreatic islets of obese mice. *Biochimie*, v. 168, p. 28-40, Jan. 2020. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31678111>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May. 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v. 52, p. 302-310, 1978. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>.
- CARLESSI, R. *et al.* Glutamine deprivation induces metabolic adaptations associated with beta cell dysfunction and exacerbate lipotoxicity. *Mol Cell Endocrinol*, v. 491, p. 110-133, July 1 2019. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31018148>.
- CASTELL, L. M.; POORTMANS, J. R.; NEWSHOLME, E. A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 73, n. 5, p. 488-90, 1996. ISSN 0301-5548 (Print) 0301-5548 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8803512>.
- CHEN, F. *et al.* Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 32, n. 12, p. 2989-99, Dec. 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023377>.
- COQUEIRO, A. Y. *et al.* Effects of Glutamine and Alanine Supplementation on Adiposity, Plasma Lipid Profile, and Adipokines of Rats Submitted to Resistance Training. *J Diet Suppl*, v. 16, n. 6, p. 676-688, 2019. ISSN 1939-022X (Electronic) 1939-0211 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29985713>.
- COQUEIRO, A. Y.; ROGERO, M. M.; TIRAPGUI, J. Glutamine as an Anti-Fatigue Amino Acid in Sports Nutrition. *Nutrients*, v. 11, n. 4, Apr 17 2019. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30999561>.
- COSTA BEBER, L. C. *et al.* The association of subchronic exposure to low concentration of PM2.5 and high-fat diet potentiates glucose intolerance development, by impairing adipose tissue antioxidant defense and eHSP72 levels. *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 27, n. 25, p. 32.006-32.016, Sept. 2020. ISSN 1614-7499 (Electronic) 0944-1344 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32506396>.
- CRUZAT, V. *et al.* Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, v. 10, n. 11, Oct. 23 2018. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30360490>.
- DECHELOTTE, P. *et al.* Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am J Physiol*, v. 260, n. 5 Pt 1, p. G677-82, May. 1991. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1903599>.
- FIUZA-LUCES, C. *et al.* Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*, v. 28, n. 5, p. 330-58, Sept. 2013. ISSN 1548-9221 (Electronic) 1548-9221 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997192>.
- GOETTEMES-FIORIN, P. B. *et al.* Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *J Physiol Biochem*, v. 72, n. 4, p. 643-656, Dec. 2016. ISSN 1877-8755 (Electronic) 1138-7548 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27356529>.
- HECK, T. G. *et al.* Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress Chaperones*, v. 22, n. 2, p. 271-291, Mar. 2017. ISSN 1466-1268 (Electronic) 1355-8145 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251488>.
- JANG, A. *et al.* The effect of dietary alpha-lipoic acid, betaine, l-carnitine, and swimming on the obesity of mice induced by a high-fat diet. *Food Funct*, v. 5, n. 8, p. 1966-74, Aug. 2014. ISSN 2042-650X (Electronic) 2042-6496 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973338>.
- KOSTRYCKI, I. M. *et al.* Effects of High-Fat Diet on eHSP72 and Extra-to-Intracellular HSP70 Levels in Mice Submitted to Exercise under Exposure to Fine Particulate Matter. *J Diabetes Res*, v. 2019, p. 4.858.740, 2019. ISSN 2314-6753 (Electronic). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30723746>.
- KREGEL, K. C. A. *et al.* Resource book for the design of animal exercise protocols. American Physiological Society, 2006.
- LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Journal of Physiology*, v. 89, p. 24-33, 1929.
- MAI, A. S. *et al.* Exercise Training under Exposure to Low Levels of Fine Particulate Matter: Effects on Heart Oxidative Stress and Extra-to-Intracellular HSP70 Ratio. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2017, p. 9.067.875, 2017. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29387296>.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sept. 16 1974. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654>.
- MARTIN, B. *et al.* "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 14, p. 6.127-6.133, Apr. 6 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194732>.
- MATTHEWS, D. E. Utilisation of enterally delivered glutamine and glutamate: stable isotope tracer study in healthy humans. *Clin Nutr*, v. 9, n. 1, p. 50-51, Feb. 1990. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837330>.
- MEDRAS, Z. J. H. *et al.* Glutamine up-regulates pancreatic sodium-dependent neutral aminoacid transporter-2 and mitigates islets apoptosis in diabetic rats. *Pharmacol Rep*, v. 70, n. 2, p. 233-242, Apr. 2018. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29475006>.

MIRAGEM, A. A.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., JR. Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flashes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response. *Hum Reprod Update*, v. 23, n. 5, p. 600-628, Sept. 1 2017. ISSN 1460-2369 (Electronic) 1355-4786 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28903474>.

MUNHOZ, A. C. *et al.* Control of Insulin Secretion by Production of Reactive Oxygen Species: Study Performed in Pancreatic Islets from Fed and 48-Hour Fasted Wistar Rats. *PLoS One*, v. 11, n. 6, p. e0158166, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362938>.

NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT, P. I., JR. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 17, n. 4, p. 295-305, Jul. 2014. ISSN 1473-6519 (Electronic) 1363-1950 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878874>.

OIKONOMOU, E. K.; ANTONIADES, C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*, Oct. 4 2018. ISSN 1759-5010 (Electronic) 1759-5002 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30287946>.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol*, v. 3, n. 3, p. 1337-62, Jul. 2013. ISSN 2040-4603 (Electronic) 2040-4603 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897689>.

PEDERSEN, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*, v. 47, n. 8, p. 600-611, Aug. 2017. ISSN 1365-2362 (Electronic) 0014-2972 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722106>.

PETRY, E. R. *et al.* L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, v. 25, n. 2, p. 188-97, Apr. 2015. ISSN 1543-2742 (Electronic) 1526-484X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202991>.

PETRY, E. R. *et al.* Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sci*, v. 94, n. 2, p. 130-6, Jan. 17 2014. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269578>.

PETRY, E. R. *et al.* Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: Role of 70kDa heat shock protein. *Free Radic Biol Med*, v. 145, p. 87-102, Dec. 2019. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31505269>.

SCHOLER, C. M. *et al.* Modulation of rat monocyte/macrophage innate functions by increasing intensities of swimming exercise is associated with heat shock protein status.

*Mol Cell Biochem*, v. 421, n. 1-2, p. 111-25, Oct. 2016. ISSN 1573-4919 (Electronic) 0300-8177 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522667>.

SEO, D. Y. *et al.* Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflugers Arch*, v. 466, n. 9, p. 1.673-1.687, Sept. 2014. ISSN 1432-2013 (Electronic) 0031-6768 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647666>.

SULZBACHER, M. M. S. *et al.* Efeitos do tratamento com glutamina via enteral em modelo animal de sepse. *Revista Saúde (Santa Maria)*, v. 42, n. 2, p. 1-10, 2018.

WEDELL-NEERGAARD, A. S. *et al.* Low fitness is associated with abdominal adiposity and low-grade inflammation independent of BMI. *PLoS One*, v. 13, n. 1, p. e0190645, 2018a. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29342196>.

WEDELL-NEERGAARD, A. S. *et al.* Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: Roles of inflammation and abdominal obesity. *PLoS One*, v. 13, n. 3, p. e0194991, 2018b. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29590212>.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

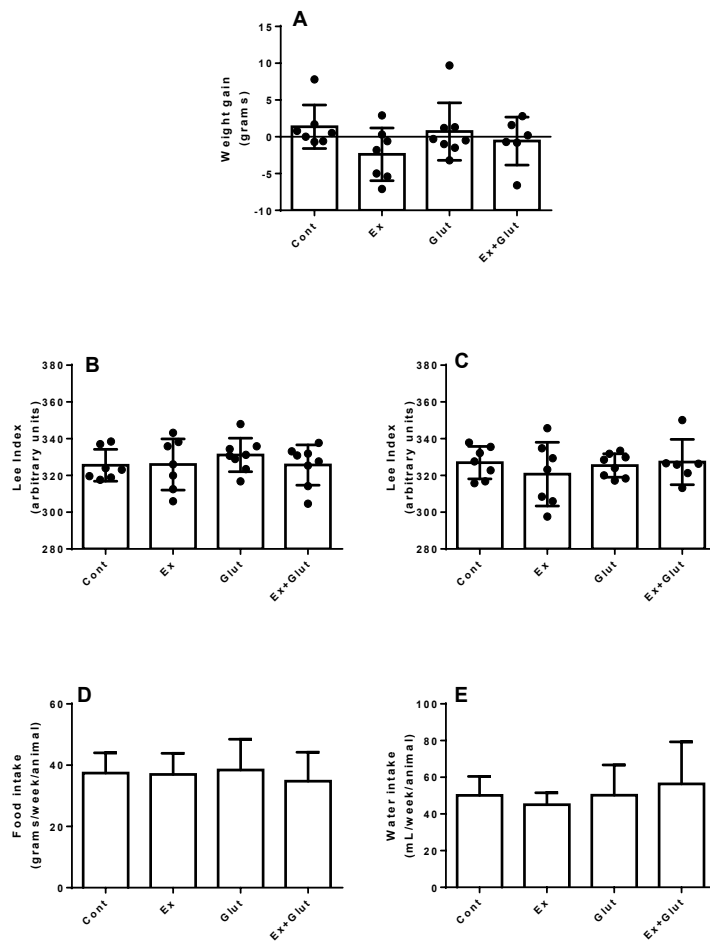
Table S1 – A detailed description of the standard diet (Nuvilab CR-1, commercially obtained from Nuvital Nutrientes SA)

Component	Content
Crude protein	220 g/kg
Ethereal extract	40 g/kg
Mineral material	90 g/kg
Crude fiber	70 g/kg
<b>Vitamins</b>	
Vit A	13000 U/kg
Vit D3	2000 U/kg
Vit E	34 U/kg
Vit K3	3 mg/kg
Vit B1	5 mg/kg
Vit B2	6 mg/kg
Vit B6	7 mg/kg
Vit B12	22mcg/kg
Niacin	60 mg/kg
Calcium pantothenate	20 mg/kg
Folic acid	1 mg/kg
Biotin	0.05 mg/kg
Choline	1900 mg/kg
Sodium minerals	2700 mg/kg
Manganese	60 mg/kg
Zinc	60 mg/kg
Copper	10 mg/kg
Iodine	2 mg/kg
Selenium	0.05 mg/kg
Cobalt	5 mg/kg
Fluorine	80 mg/kg
Iron	50 mg/kg
<b>Amino acids</b>	
Lysine	12 g/kg
Methionine	4000 mg/kg
<b>Additions</b>	
BHT	100 mg/kg

U – International Unit

Font: The authors.

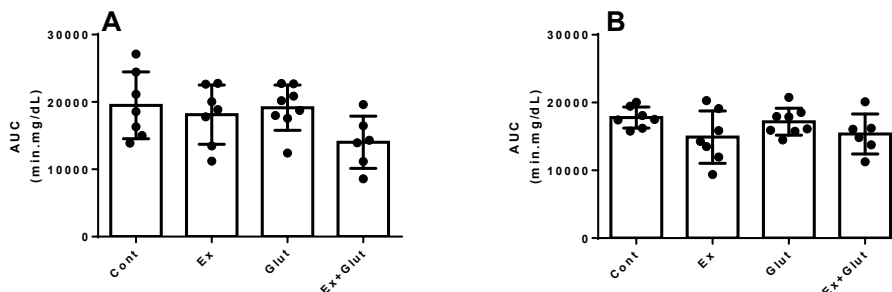
Figure S1 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training on weight gain, Lee Index, food and water intake



A) Weight gain ( $P = 0.215$ ,  $F_{3,24} = 1.601$ ). B) Lee Index at the 3rd week ( $P = 0.689$ ,  $F_{3,26} = 0.493$ ). C) Lee Index at the 6th week ( $P = 0.718$ ,  $F_{3,24} = 0.451$ ). D) Food intake ( $P = 0.744$ ,  $F_{3,44} = 0.413$ ). E) Water intake ( $P = 0.3614$ ,  $F_{3,43} = 1.095$ ). Data presented as mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA, followed by Tukey ( $n = 6-8$  p/ group).

Font: The authors.

Figure S2 – Effect of association of L-glutamine supplementation in animals submitted to moderate aerobic training on GTT-AUC



A) AUC-GTT 3<sup>rd</sup> week ( $P = 0.100$ ,  $F_{3,24} = 2.321$ ). B) AUC-GTT 6<sup>th</sup> week ( $P = 0.168$ ,  $F_{3,24} = 1.833$ ). Data presented as mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA, followed by Tukey ( $n = 6-8$  p/ group).

Font: The authors.