HIDROLISADO DE CLARA DE OVO COMO POSSÍVEL PROTETOR DOS EFEITOS TÓXICOS CARDIOVASCULARES DO CÁDMIO

Tatiane Inácio Cavallini [1]

José Eudes Gomes Pinheiro Júnior [2]

Paola Zambelli Moraes [3]

Jose Eduardo Stasiaki dos Santos [4]

Marta Miguel [5]

Giulia Alessandra Wiggers Pecanha [6]

Resumo:

O cádmio (Cd) é um metal pesado altamente tóxico presente no ambiente, entretanto, e sua larga utilização aumenta seus níveis atmosféricos, o tornando um contaminante comum de água e alimentos. Em contra partida o hidrolisado da clara do ovo (HCO), apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, contribui dessa forma para redução da hipertensão em ratos SHR a curto e a longo prazo, melhora de complicações associadas a síndrome metabólica reverte totalmente os danos cardiovasculares causados pela exposição ao HgCl2.Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e posteriormente tratados por 14 dias: a) Controle (Ct), b) Cloreto de Cádmio (CdCl2), c) Hidrolisado de clara de ovo (HCO) e d) CdCl2 + HCO. Ao final do tratamento os ratos tiveram a pressão mensurada por técnica não invasiva de pletismografia caudal, anestesiados e eutanasiados. A artéria aorta dissecada e cortada para análise da reatividade vascular. Foi realizado curva de relaxamento a Ach, após nova estabilização curva de contração com concentração-resposta a fenilefrina (Phe). Ainda, anéis foram testados quanto a resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio por meio de curva de concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio. Análises bioquímicas de níveis de peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante, foram realizadas em artéria aorta. Após 14 dias de exposição ao Cd os ratos apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, que foi prevenida pelo co-tratamento com HCO. Os valores elevados de pressão arterial no grupo que recebeu Cd em contra partida o co-tratamento com hidrolisado mostrou-se eficiente para prevenir este efeito, intoxicados por Hg e com síndrome metabólica. No entanto, houve um aumento da reatividade vascular nos ratos tratados com Cd por 14 dias, e o HCO não foi capaz de prevenir este efeito. Corroborando os dados funcionais, as análises bioquímicas mostram um aumento das espécies reativas de oxigênio nos ratos expostos ao Cd, que foi totalmente revertida com o co-tratamento com hidrolisado da clara de ovo. Quanto a peroxidação lipídica, observamos um aumento significativo no grupo exposto ao Cd e esse aumento foi parcialmente prevenido com o co-tratamento com hidrolisado. A capacidade antioxidante foi significativamente aumentada após exposição ao Cd, esse aumento manteve-se mesmo com o co-tratamento com o hidrolisado.

Palavras-chave: Cádmio, Hidrolisado, Reatividade, Pressão arterial

Modalidade de Participação: Pesquisador

HIDROLISADO DE CLARA DE OVO COMO POSSÍVEL PROTETOR DOS EFEITOS TÓXICOS CARDIOVASCULARES DO CÁDMIO

[1] Outro. tatiane.cavallini@gmail.com. Autor principal

[2] Doutorando. jose.eudes86@gmail.com. Co-autor

[3] Mestranda . pzambellimoraes@gmail.com. Co-autor

[4] Iniciação cientifica. . edu.stasiaki@gmail.com. Co-autor

[5] Pesquisadora. marta.miguel@csic.es. Co-autor

[6] Docente. giuliapecanha@unipampa.edu.br. Orientador

HIDROLISADO DE CLARA DE OVO COMO POSSÍVEL PROTETOR DOS EFEITOS TÓXICOS CARDIOVASCULARES DO CÁDMIO.

1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal pesado altamente tóxico presente no ambiente, entretanto, e sua larga utilização aumenta seus níveis atmosféricos, o tornando um contaminante comum de água e alimentos[1,2]. A exposição a este metal está relacionada a atividade industrial, lixo urbano, fontes de alimento, consumo de água contaminada e inalação da fumaça de cigarro[3,4,5,6,7]. Por ser um metal com rápida absorção ele acumula-se no corpo humano ao longo do tempo, tendo meia-vida alta e baixa taxa de excreção, desencadeando assim, danos a vários órgãos e sistemas, sendo associado ao desenvolvimento de várias doenças, tais como hipertensão arterial[8], aterosclerose[9], doença arterial periférica[10], câncer[11], acidente vascular cerebral[12] e insuficiência cardíaca[13].

Em contrapartida, nas últimas décadas, alternativas nutricionais como os "alimentos funcionais" estão sendo estudados para prevenção de doenças e efeitos deletérios da exposição a metais, por serem considerados mais seguros do que os agentes farmacológicos tradicionais[14].

O ovo, em especial a clara, é uma fonte rica em proteínas de importante capacidade funcional que pode ser utilizado como alimento funcional no combate ao estresse oxidativo induzido por metais pesados. O hidrolisado da clara do ovo (HCO), desenvolvido por Miguel, M. *et al.* (2004) apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, contribui dessa forma para redução da hipertensão em ratos SHR a curto e a longo prazo[16,17], melhora de complicações associadas a síndrome metabólica[18] e reverte totalmente os danos cardiovasculares causados pela exposição ao $HgCl_2$[19]. Miguel et al. (2007) propõe como possíveis mecanismos do peptídeos do hidrolisado de clara de ovo na proteção vascular o aumento da síntese de óxido nítrico e diminuição da enzima conversora de angiotensina (ECA) devendo ser incentivado como ingrediente funcional na alimentação tanto para prevenção como para tratamento da hipertensão arterial.

Dada a toxicidade do cádmio e as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do hidrolisado da clara do ovo, o objetivo deste estudo foi investigar se os peptídeos bioativos do hidrolisado da clara do ovo previnem os danos no sistema cardiovascular de ratos expostos ao cádmio.

2 METODOLOGIA

Para investigação foram utilizados ratos machos *Wistar* com 12 semanas de vida, adquiridos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos em ambiente com temperatura e umidade constantes e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e à água em gabinete próprio. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil (Processo Número: 017/2018).

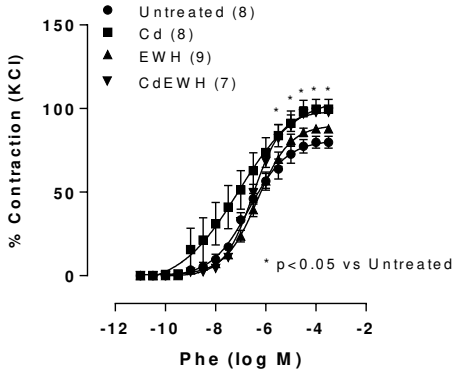
Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e posteriormente tratados por 14 dias: a) Controle (Ct) – H_2O destilada i.p. e H_2O via gavagem, b) Cloreto de Cádmio ($CdCl_2$) – 1mg/kg/dia i.p. (Balaraman, R. *et al*. 1989) c) Hidrolisado de clara de ovo (HCO) via gavagem, 1g/kg/dia (Miguel *et al*., 2006), d) $CdCl_2$ + HCO. Ao final do tratamento os ratos tiveram a pressão mensurada por técnica não invasiva de pletismografia caudal. Após anestesia com ketamina: 1,3µg/Kg e xilasina: 0,65µg/Kg os ratos foram eutanasiados e a

artéria aorta dissecada e cortada em anéis e montada e sistema de banho de órgãos para análise da reatividade vascular. Após montadas e mantidas em solução de Krebs aerada por mistura carbogênica e estabilização de 45 min foi avaliada a integridade funcional pela contração com cloreto de potássio 75mM. A integridade endotelial em curva de relaxamento a Ach e relaxamento maior que 80% foi considerado endotélio íntegro. Foram realizadas após nova estabilização curva de contração com concentração-resposta a fenilefrina (Phe). Ainda, anéis foram testados quanto a resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio por meio de curva de concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio.

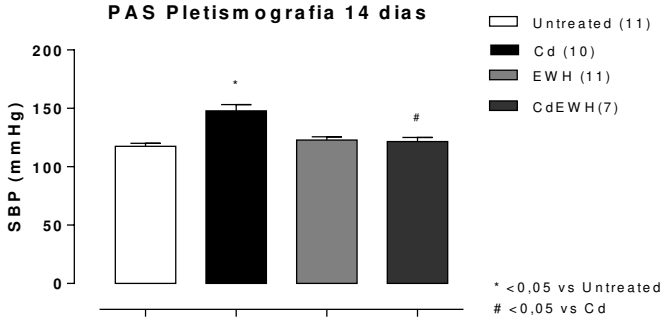
Análises bioquímicas de níveis de peroxidação lipídica conforme descrito por Okawa *et al.,* (1979), espécies reativas de oxigênio conforme descrito por Loetchutinat et al. (2005) e capacidade antioxidante, conforme descrito por Benzie and Strain, (1996) foram realizadas em artéria aorta.

Os resultados foram expressos em média ± EPM e analisados utilizando teste *t students* para dados pareados e não pareados, e análise de variância (ANOVA) de I ou II vias para medidas repetidas, acompanhado de *post-hoc* de *Bonferroni*. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de p<0,05.

3 RESULTADOS



Após 14 dias de exposição ao Cd os ratos apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, que foi prevenida pelo co-tratamento com HCO (Fig. 1). Os valores elevados de pressão arterial no grupo que recebeu Cd corroboram com dados prévios descritos por Balaraman, R. *et al*. (1989)



neste mesmo modelo experimental. Em contra partida o co-tratamento com hidrolisado mostrou-se eficiente para prevenir este efeito, corroborando a literatura que demonstra efeitos similares em ratos SHR[16,17], intoxicados por Hg[19] e com síndrome metabólica[18].

Fig.1 - Valores da pressão arterial sistólica final expressos como média ± EPM. ANOVA: *p < 0,05 vs Untreated; # p < 0.05 vs Cd.

A exposição ao Cadmio não afetou o relaxamento dependente e independente do endotélio (dados não mostrados). No entanto, houve um aumento da reatividade vascular nos ratos tratados com Cd por 14 dias, e o HCO não foi capaz de prevenir este efeito (Fig. 2).

Fig 2 - Resposta contrátil induzida por fenilefrina (Phe) em artérias aortas. Os resultados estão expressos com média ± EPM da porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. ANOVA: * p<0,05 vs Untreated

Corroborando os dados funcionais, as análises bioquímicas mostram um aumento das espécies reativas de oxigênio nos ratos expostos ao Cd, que foi totalmente revertida com o co-tratamento com hidrolisado da clara de ovo (Fig 3A). Quanto a peroxidação lipídica, observamos um aumento significativo no grupo exposto ao Cd e esse aumento foi parcialmente prevenido com o co-tratamento com hidrolisado (Fig 3B). A capacidade antioxidante foi significativamente aumentada após exposição ao Cd, esse aumento manteve-se mesmo com o co-tratamento com o hidrolisado (Fig 3C)

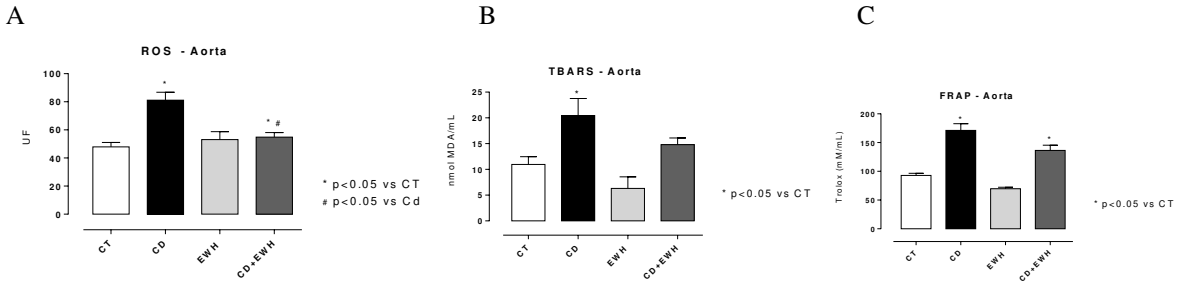


Fig 3 - A: Medida de espécies reativas (ROS) por absorbância em artérias aorta. UF: unidade de fluorescência. B: Medida da Peroxidação Lipídica (TBARS) em artérias aorta. C: capacidade antioxidante total (FRAP) em artérias aorta. Dados expressos em média±EPM e comparação feita pela ANOVA I via, * p<0.05 vs Ct; # p<0.05 vs Cd.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição ao Cd induz efeitos tóxicos no sistema cardiovascular de ratos, aumentando a pressão arterial e a reatividade vascular assim como aumentando os níveis de espécies reativas e peroxidação lipídica. O hidrolisado da clara do ovo previne parcialmente esses efeitos mostrando-se como uma possível alternativa no tratamento dessas disfunções.

REFERÊNCIAS

1 - ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry., 2008. Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

2- World Health Organization (WHO), 2010. Preventing Disease Throught Healthy Environments. Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern. Geneva: World Health Organization

3- Rebelo M, Caldas ED., 2016. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. Environmental Research,151,671–688.

4- Ueno D, Yamajia N, Konob I , Huanga CF, Andob T, Yanoc M , Ma JF., 2010 Gene limiting cadmium accumulation in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 21;107(38).

5- Afridi HI, Kazi TG, Kazi NG, Jamali MK, Arain MB, Sirajuddin, Baig JA, Kandhro GA, Wadhwa SK, Shah AQ., 2010. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. J Hum Hypertens 24:34–43.

6- Satarug, S.; Nishijo, M.; Lasker, J. M.; Edwards, R. J.; Moore, M. R., 2006. Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? Tohoku J Exp Med.;208(3):179-202.

7- Abu-Hayyeh S, Sian M, Jones KG, Manuel A, Powell JT., 2001. Cadmium accumulation in aortas of smokers. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:863–867.

8- Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Crainiceanu CM, Guallar E., 2008. Cadmium exposure and hypertension in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Environ Health Perspect 116:51–56.

9- Knoflach M, Messner B, Shen YH, Frotschnig S, Liu G, Pfaller K, Wang X, Matosevic B, Willeit J, Kiechl S, Laufer G, Bernhard D., 2011. Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. Circ J 75:2491–2495.

10- Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E., 2014. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. Circulation 109:3196– 3201.

11- Liu J, Qu W, Kadiiska MB., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 238: 209–214.

12- Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Menke A, Crainiceanu CM, Pastor-Barriuso R, Guallar E., 2012. Cadmium exposure and allcause and cardiovascular mortality in the U.S. general population. Environ Health Perspect 120:1017–1022.

13- Tellez-Plaza M, Guallar E, Howard BV, Umans JG, Francesconi KA, Goessler W, Silbergeld EK, Devereux RB, Navas-Acien A., 2013. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. Epidemiology 24:421–429.

14- Manso, M.A., Miguel, M., Even, J., Hernandez, R., Aleixandre, A., Lopez-Fandino, R., 2008. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative

status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. Food Chem. 109, 361–367.

15- Miguel, M., Recio, I., Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Lopez-Fandino, R., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. J. Food Prot. 67, 1914–1920.

16- Miguel, M., Lopez-Fandino, R., Ramos, M., Aleixandre, A., 2005. Short-term effect of eggwhite hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. Br. J. Nutr. 94, 731–737.

17- Miguel, M., Lopez-Fandino, R., Ramos, M., Aleixandre, A., 2006. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Life Sci. 78, 2960–2966.

18- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., González, C., Uranga, J.A., López-Miranda, V., Verab, G. and Miguel, M., 2018 Pepsin egg white hydrolysate ameliorates metabolic syndrome in high-fat/high-dextrose fed rats. Food Funct.,9, 78–86. The Royal Society of Chemistry

19- Rizzetti DA, Martín Á, Corrales P, Fernández F, Simões MR, FM Peçanha, DV Vassallo, Miguel M, Wiggers GA., 2017 Toxicol Lett. 281: 158-174.