HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CLORETO CÁDMIO

Jose Eduardo Stasiaki dos Santos [1]

Jose Eudes Gomes Pinheiro Junior [2]

Paola Zambelli Moreis [3]

Tatiane Inacio Cavallini [4]

Marta Miguel [5]

Giulia Alessandra Wiggers [6]

Resumo:

Objetivo: Investigar os efeitos de do hidrolisado de clara de ovo em ratos expostos ao cloreto de cádmio por 14 dias no sistema cardiovascular. Métodos: Ratos Wistar machos de três meses de idade (± 300 g) foram divididos em quatro grupos e tratados por 14 dias: a) Untreated (Controle - água destilada i.p.), b) Cd (Cloreto de Cádmio-CdCl2 - 1mg/kg i.p.) c) EWH (Hidrolisado de clara de ovo, 1g/kg/dia por gavagem), d) CdEWH (CdCl2 plus EWH). A pressão arterial (PAS) foi medida por pletismografia caudal e a reatividade vascular foi estudada em artérias mesentéricas de resistência (MRA) em sistema de banho de órgãos. Foram realizadas curvas dose-resposta para acetilcolina (ACh) e noradrenalina (NE). As análises bioquímicas de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total foram mensuradas em plasma e vaso. Os resultados estão expressos como média e EPM, comparados por ANOVA seguido do teste de Bonferroni com nível de significância de p

Palavras-chave: cádmio, reatividade, cardiovascular, hidrolisado

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CLORETO CÁDMIO

[1] Aluno de graduação. edu.stasiaki@gmail.com. Autor principal

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

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

[4] Pesquisadora Voluntaria . tatini.cavallini@gmail.com. Co-autor

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

[6] Docente. giuliawp@gmail.com. Orientador

HIDROLISADO DA CLARA DE OVO PREVINE DANOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CLORETO CÁDMIO[(1)]

Palavras-Chave: cádmio, reatividade, cardiovascular, hidrolisado.

RESUMO: Objetivo: Investigar os efeitos de do hidrolisado de clara de ovo em ratos expostos ao cloreto de cádmio por 14 dias no sistema cardiovascular. Métodos: Ratos Wistar machos de três meses de idade (± 300 g) foram divididos em quatro grupos e tratados por 14 dias: a) Untreated (Controle – água destilada i.p.), b) Cd (Cloreto de Cádmio-$CdCl_2$ – 1mg/kg i.p.) c) EWH (Hidrolisado de clara de ovo, 1g/kg/dia por gavagem), d) CdEWH ($CdCl_2$ *plus* EWH). A pressão arterial (PAS) foi medida por pletismografia caudal e a reatividade vascular foi estudada em artérias mesentéricas de resistência (MRA) em sistema de banho de órgãos. Foram realizadas curvas dose-resposta para acetilcolina (ACh) e noradrenalina (NE). As análises bioquímicas de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total foram mensuradas em plasma e vaso. Os resultados estão expressos como média e EPM, comparados por ANOVA seguido do teste de Bonferroni com nível de significância de $p<0,05$. Aprovação do Comitê de Ética 017/2018 - Unipampa. Resultados: A exposição ao Cd aumentou a PAS e o co-tratamento com EWH foi capaz de reverter/prevenir este efeito (Ct: 117.56± 2,54; Cd: 147.86±5.36*; EWH: 122.84±2.86; CdEWH: 121.6±3.5 mmHg - *p<0,05 vs Ct). Houve prejuízo do relaxamento a ACh nos anéis de ratos expostos ao Cd assim como aumento da resposta contrátil induzida pela NE, enquanto que o co-tratamento com EWH foi capaz de prevenir o aumento da resposta contrátil e do dano endotelia (Rmax%: Untreated: 97.37±2.32; Cd: 117.86±4.91*; EWH: 101.97±2.38; CdEWH: 98.21±4.52 - *p<0,05 vs Ct). Adicionalmente, o Cd promoveu aumento da produção de EROs e do status antioxidante e o EWH incrementou o estesse oxidativo e as defesas antioxidantes em artérias mesentéricas. Conclusões: O EWH tem efeito protetor sobre os danos tóxicos induzidos pelo $CdCl_2$ no sistema cardiovascular.

1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal pesado e tóxico, não essencial e amplamente utilizado na indústria. Os seres humanos são expostos ao metal pelo tabaco, alimentos, água e poeira contaminada (HOLÁSKOVA et al., 2012). A sua exposição de forma crônica resulta em danos a vários órgãos e sistemas, sendo associado ao desenvolvimento de doenças, tais como hipertensão arterial (EUM et al., 2008; TELLEZ-PLAZA et al., 2008), aterosclerose (KNOFLACH M. et.al.,2011) e doença arterial periférica (NAVAS-ACIEN et al., 2004). Diferentes compostos naturais possuem propriedades de recuperar os efeitos tóxicos de metais, como vitamina E, selênio e polifenóis e peptídeos derivados da clara do ovo (RIZZETTI et al., 2017; ABARIKWU et al., 2016). Nesse sentido, a hidrólise enzimática de clara de ovo resultou na produção de peptídeos com importantes funções biológicas testadas in vitro e in vivo, como ação anti-inflamatória e antioxidante (MIGUEL et al., 2004) demonstrando efeitos benéficos em disfunções cardiovasculares e metabólicas (MIGUEL et al., 2006; RIMÓN-GARCÉS et al., 2016).
O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos protetores do hidrolisado da clara de ovo contra os danos cardiovasculares provocados pela exposição sub-crônica ao $CdCl_2$.

2 METODOLOGIA

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 e Uso de Animais da Unipampa (nº 017/2018). Para o modelo animal de exposição sub-crônica ao Cd, os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos tratados por 14 dias: a) Untreated (Controle – injeção de água destilada intraperitoneal- i.p.), b) Cd (Cloreto de Cádmio-$CdCl_2$ – 1mg/kg i.p., segundo Balaraman et al., 1989) c) EWH (Hidrolisado de clara de ovo, 1g/kg/dia por gavagem, segundo Miguel *et al*., 2014), d) CdEWH – ambos os tratamentos ($CdCl_2$ *plus* EWH).

A análise das pressões arterial foi realizada semanalmente pela técnica não-invasiva de pletismografia de caudal, onde os registros de pressão sistólica (PAS) (Instruments Pty Ltd, Bella Vista, NSW, Australia).

Ao final do tratamento os ratos foram anestesiados (ketamina: 87 mg/kg e xilasina: 13 mg/kg i.p.) seguido de uma incisão cirúrgica abdominal para a extração do mesentério para experimentos de reatividade vascular de artérias mesentéricas (MRA) e posteriormente eutanasiados. Para a análise dos efeitos vasculares, as artérias mesentéricas foram dissecadas, divididas em segmentos de 2mm e montadas em um miógrafo de tensão e mantidas em solução Krebs-Henseleit aquecida e aerada por mistura carbogênica (MULVANY & HALPERN, 1977). Após determinação da tensão basal e período de estabilização de 30 minutos, a avaliação da integridade funcional foi realizada pela contração ao cloreto de potássio (KCl 120mM). Em seguida, para confirmar a integridade endotelial, as artérias previamente contraídas com NE receberam uma única dose de ACh. Foram então realizadas curvas concentração-resposta à NE na presença do endotélio.

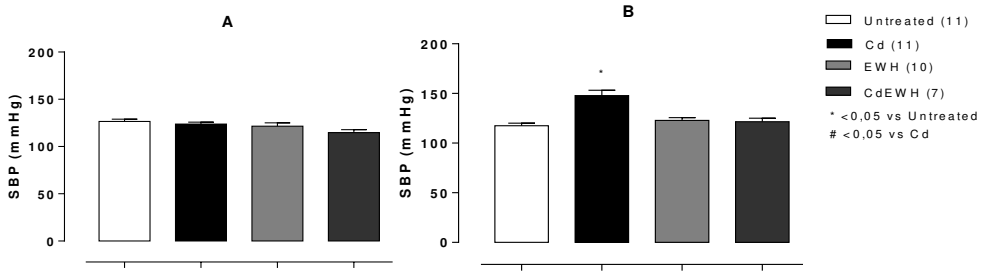
As análises bioquímicas foram realizadas nas artérias previamente homogenizadas em Tris-Hcl 50 mM (pH 7,4), centrifugadas e utilizado o sobrenadante. A avaliação da peroxidação lipídica foi analisada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com formação do complexo TBA-MDA (ácido tiobarbitúrico-malondialdeido) pela degradação de ácidos graxos, conforme descrito previamente por Okawa *et al.,* (1979) e expresso em n/mol de MDA/mg de proteína tecidual. Os níveis de espécies reativas (ROS) foi determinado por espectrofluorometria, conforme descrito por Loetchutinat et al. (2005); e a capacidade antioxidante total foi medida pelo ensaio *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP) *Assay* (BENZIE et al., 1996) com resultados foram expressos com referência aos equivalentes de Trolox.

Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro-padrão da média). Para análise das curvas dose-resposta a fenilefrina foi realizada ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de $p<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

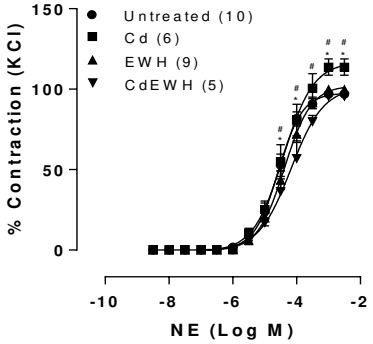
A exposição sub-crônica ao Cd aumentou a PAS e o co-tratamento com EWH foi capaz de reverter/prevenir este efeito (Untreated: 117.56±2,54; Cd: 147.86±5.36*; EWH: 122.84±2.86; CdEWH: 121.6±3.5 mmHg). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Balaraman et al. (1989) para o grupo Cd tratado com 1mg/kg de $CdCl_2$. Adicionalmente, o EWH apresentou efeito protetor contra o dano tóxico induzido pelo metal semelhante ao encontrado por Rizzetti et al. (2017) no seu estudo com exposição ao mercúrio, um metal também bivalente.

Figura 1: Valores da pressão arterial sistólica – PAS inicial (A) e final – pós 14 dias (B) realizadas via plestimografia caudal entre os grupos. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA 2v: * $p<0,05$ vs Untreated; #$p<0.05$ vs Cd.



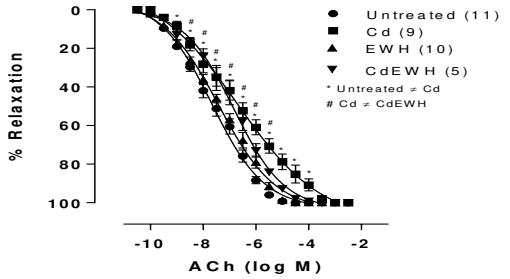
A exposição dos segmentos de MRA ao KCl promoveu resposta contrátil semelhante nos grupos experimentais (Untreated: 5.64 ± 0,306 mN/mm; Cd: 5.37 ± 0,269 mN/mm; EWH: 5.026 ± 0.313 mN/mm; CdEWH: 5.563 ± 0.495 mN/mm). A NE promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de MRA dos grupos estudados (Figura 2), os ratos tratados com Cd tiveram maior resposta contrátil e resposta máxima (Rmáx), enquanto que o co-tratamento com EWH conseguiu prevenir o aumento da resposta contrátil e da resposta máxima nos segmentos de MRA (Rmáx % KCl Untreated: 97.37±2.32; Cd: 117.86±4.91*; EWH: 101.97±2.38; CdEWH: 98.21±4.52, p<0.05) sem alterar a sensibilidade (pD2) entre os grupos experimentais (pD2 Untreated: -4.95±0.36; Cd: -4.36±0.15; EWH: -4.37±0.09; CdEWH: -4.22±0.24). De forma semelhante, Rizzetti et al. (2017) observou aumento da resposta contrátil em ratos tratados com mercúrio e o EWH também foi capaz de prevenir os danos cardiovasculares.

Figura 2: Resposta contrátil induzida por noradrenalina (NE) em MRA entre os grupos. Os resultados estão expressos com média ± EPM da porcentagem da contração induzida por 120mM de KCl. ANOVA: * <0,05 vs Untreated (Ct); # <0.05 vs Cd



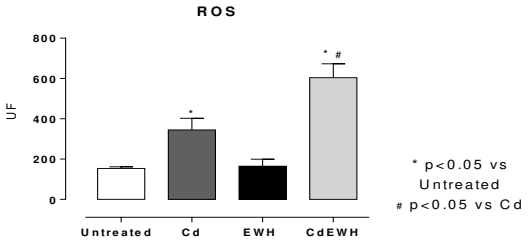
O relaxamento dependente do endotélio apresentou prejuízo nos segmentos arteriais de animais tratados com Cd sugerindo que o metal promoveu disfunção endotelial e o co-tratamento com o EWH foi capaz de atenuar tais danos (Figura 3).

Figura 3: Curva concentração-resposta à ACh em MRA dos grupos. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA: * <0,05 vs Untreated; # <0.05 vs Cd.



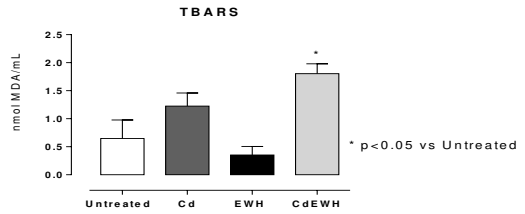
A exposição ao metal demonstrou ser capaz de aumentar as espécies reativas (ROS) e o co-tratamento com EWH incrementou ainda mais este fator em MRA (Figura 4). Segundo Hart et al. (2001), o Cd pode aumentar o número de espécies reativas e inclusive induzir carcinogênese por supressão de apoptose.

Figura 4: Medida de espécies reativas (ROS) por absorbância em MRA entre os grupos de ratos. Dados expressos em média±EPM e comparação feita pela ANOVA seguida de pos-hoc de Bonferroni, * <0,05 vs Untreated; # <0.05 vs Cd. UF: unidade de fluorescência.



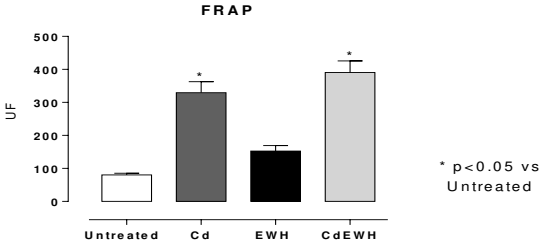
Em relação ao nível de peroxidação lipídica (Figura 5), somente os ratos expostos ao Cd e co-tratados com EWH aumentaram os níveis de MDA. De acordo com Kara et al. (2005), o Cd é capaz de aumentar o nível de peroxidação lipídica de forma precoce tanto em ratos machos como em fêmeas após 24h de exposição de 0.5, 1, 2 e 4 mg/kg.

Figura 5: Medida da Peroxidação Lipídica (TBARS) em AMR entre os grupos de ratos. Dados expressos em média±EPM. ANOVA seguida de pos-hoc de Bonferroni, * < 0,05 vs Untreated; # < 0,05 vs Cd.



A FRAP foi incrementada tanto nos ratos expostos ao Cd quanto naqueles co-tratados com EWH, indicando que para a injúria causada pelo Cd, o EWH não foi capaz de reverter o aumento da capacidade antioxidante induzida pelo metal (Figura 6). Hart at al. (2001), afirma que a exposição ao Cd pode aumentar as defesas antioxidantes por aumento da expressão de glutationa e redução da apoptose, mas isso pode representar um risco por aumento do risco de desenvolvimento de células cancerígenas resistentes.

Figura 6: Capacidade antioxidante total (FRAP) em MRA entre os grupos de ratos. Dados expressos em média±EPM. ANOVA seguida de pos-hoc de Bonferroni, * < 0,05 vs Untreated.



CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o EWH parece ser capaz de atenuar parcialmente os danos tóxicos vasculares induzidos pelo $CdCl_2$. Assim, o hidrolisado tem potencial efeito terapêutico sendo considerado um alimento funcional.

REFEREÊNCIAS

ABARIKWU, S.O., BENJAMIN, S., EBAH, S.G., OBILOR, G. and AGBAM, G. Oral administration of Moringa oleifera oil but not coconut oil prevents mercury-induced testicular toxicity in rats. Andrologia, 2016.

BENZIE IFF, STRAIN JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. Anal biochem 239:70-76.

EUM KD, LEE MS, PAEK D. Cadmium in blood and hypertension. Sci Total Environ 407:147–153, 2008.

HART, B.A.; POTTS, R.J.; WATKIN, R.D. Cadmium adaptation in the lung—A double-edged sword? Toxicology 2001, 160, 65–70.

HOLÁSKOVÁ, I., ELLIOTT, M., HANSON, M. L., SCHAFER, R., AND BARNETT, J. B. (2012). Prenatal cadmium exposure produces persistente changes to thymus and spleen cell phenotypic repertoire as well as the acquired immune response. Toxicol. Appl. Pharmacol. 265, 181–189.

KARA, H., KARATAS, F., KANATAN, H. Effect of Single Dose Cadmium Chloride Administration on Oxidative Stress in Male and Female Rats. Turk J Vet Anim Sci 29 (2005) 37-42.

KNOFLACH M, MESSNER B, SHEN YH, FROTSCHNIG S, LIU G, PFALLER K, WANG X, MATOSEVIC B, WILLEIT J, KIECHL S, LAUFER G, BERNHARD D. Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. Circ J 75:2491–2495, 2011.

LOETCHUTINAT C, KOTHAN S, DECHSUPA S, MEESUNGNOEN J, JAY-GERIN J, MANKHETKORN S. 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drugsensitive and drug-resistant cancer cells using the 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate assay. Rad Phys Chem 72:323-331.

MIGUEL, M., RECIO, I., GOMEZ-RUIZ, J.A., RAMOS, M. and LOPEZ-FANDINO, R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. J. Food Prot. 67, 1914-1920, 2004.

MIGUEL, M. Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. PLoS. One. 11(3), e0151193, 2016.

MULVANY, M.J. & HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circulation Research. 1977; 41:19-26.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351–358.

RIZZETTI DA, CS MARTINEZ, ESCOBAR AG, DA SILVA TM, URANGA-OCIO JA, FM PEÇANHA, DV VASSALLO, CASTRO MM, WIGGERS GA. Food Chem Toxicol . 2017 fev; 100: 253-264

TELLEZ-PLAZA M, NAVAS-ACIEN A, CRAINICEANU CM, GUALLAR E. Cadmium exposure and hypertension in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Environ Health Perspect 116:51–56, 2008.