AVALIÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO (VACCINUM SPP.) SOBRE O A EM CAENORHABDITS ELEGANS

Bibiana Pistoia Ferreira Rabuske [1]

Flávia Suelen de Oliveira Pereira [2]

Cristiane Casagrande Denardin [3]

Daiana Ávila [4]

Resumo:

O blueberry ou mirtilo, conhecido pelo nome científico Vaccinum spp, devido as suas propriedades antioxidantes e anti-envelhecimento, principalmente pela presença de antocianinas, tornou-se um alvo promissor de estudos como potencial candidato ao tratamento de doenças, como a Doença de Alzheimer (DA). Um dos principais mecanismos fisiopatológicos descritos, é a presença das placas senis, devido a formação de agregados do peptídeo beta-amilóide, o que resulta em um quadro de neurodegeneração. Como modelo alternativo, in vivo, para o estudo da DA, tem-se o nematóide C.elegans. Este verme apresenta a cepa transgênica GMC101. Que expressao o peptídeo quando exposta ao aumento da temperatura fazendo com que o verme paralise. Em nosso estudo avaliamos a capacidade o extrato de mirtilo em conter a taxa de vermes paralisados, assim como em estender a longevidade. Para isso utilizamos as concentrações de 5, 50, 100, 250 e 500ug/mL. Além de avaliarmos a sua toxicidade, através da taxa de sobrevivência. O extrato de Mirtilo não demonstrou toxicidade em C.elegans, através da análise da taxa de sobrevivência. O que na cepa GMC101 contribuiu para a redução da taxa de paralisia e consequentemente dos efeitos causados pelo A, proporcionando um aumento perceptível do tempo de vida dos vermes. Porém ainda são necessários mais estudos para avaliar os reais efeitos antioxidantes do mirtilo e as vias pelos quais o mesmo desempenha seu efeito protetor contra a neurodegeneração e toxicidade.

Palavras-chave: mirtilo, C.elegans, Alzheimer

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO (VACCINUM SPP.) SOBRE O A EM CAENORHABDITS ELEGANS

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

[2] Mestranda em Bioquímica. flaviaoliper@gmail.com. Co-autor

[3] Docente. cristianedenardin@unipampa.edu.br. Orientador

[4] Professora Adjunta da Universidade Federal do Pampa. dsavila1@gmail.com. Co-orientador

AVALIÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE MIRTILO (*Vaccinum spp.*) SOBRE O Aβ EM *Caenorhabditis elegans*

1 INTRODUÇÃO

O blueberry ou mirtilo, conhecido pelo nome científico *Vaccinum* spp, é um fruto originário dos Estados Unidos e extremamente difundido e consumido na América do Norte e Europa. Suas propriedades medicinais incluem atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatórias. O que torna seu uso potencial para o tratamento de doenças como o diabetes, câncer, hepáticas e renais (ANTUNES; HOFFMANN, 2002).

Sendo que principal interesse do potencial terapêutico do mirtilo se deve as suas propriedades antioxidantes, proporcionadas pela presença dos compostos naturais encontrados no fruto, conhecidas como antocianinas (SILVEIRA et al., 2007).

Na luta contra o estresse oxidativo, os antioxidantes contribuem para manter a homeostase no organismo. Sendo que alterações nesse mecanismo que resultam no aumento das espécies reativas estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças, principalmente as relacionadas ao processo de envelhecimento. Portanto o consumo de frutas e legumes na dieta contribuem em vários processos biológicos entre eles os efeitos protetores contra o envelhecimento, como os antioxidantes. (QIU et al; 2016; VELJKOVIC et al., 2017).

No que abrange as principais doenças que acometem a população de idosos, tem-se a doença de Alzheimer (DA). A DA acarreta em um estado de demência e perda da capacidade cognitiva, devido a neurodegeneração ocasionada por mecanismos que envolvem, entre outros, o acúmulo do peptídeo beta-amilóide (Aβ). Este se agrega formando placas amiloides fibrilares, levando a ativação de células que atuam à nível cerebral liberando fatores pró-inflamatórios ocasionando um quadro neuroinflamatório e consequentemente neurotóxico e neurodegenerativo (MURPHY; LEVINE, 2010).

Muitas pesquisas foram, e estão sendo desenvolvidas com o intuito de desenvolver um fármaco ou medida terapêutica eficaz para a contenção da DA. Porém sabe-se que até então nenhum tratamento que se possa propiciar a cura da doença foi desenvolvido (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013). Na busca por esse feito tem-se utilizados modelos experimentais que permitem a avaliação de compostos e substâncias contra a DA, entre esses modelos para estudo da doença *in vivo* tem-se o *Caenorhabdits elegans* (*C. elegans*) (GAWAIN et al., 2013).

O modelo *C.elegans* é um nematódeo de fácil cultivo, possui ciclo de vida curta, gerando vários descendentes o que permite acompanhar os efeitos, por exemplo, desencadeados pela expressão de genes homólogos aos encontrados em humanos relacionados ao desenvolvimento de doenças, ao longo de toda vida do verme em cepas transgênicas. Entre elas a GMC101 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP], que quando exposta a temperatura de 25ºC, diferente da utilizada para manutenção (20ºC), expressa o Aβ em toda as células musculares do corpo do verme, ocasionando a paralisia. Há a existência de cepas transgênicas para estudo de inúmeras doenças, e ainda existe uma linhagem que não apresenta nenhuma alteração genética, sendo do tipo selvagem a N2.

Diante da disponibilidade de consumo de alimentos naturais e com potencial antioxidante e antienvelhecimento, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato de mirtilo (*Vaccinum spp*.) na contenção dos danos causados pelo Aβ em GMC101.

2 METODOLOGIA

I) Obtenção e preparação da amostra: Os frutos de mirtillo foram cedidos e identificados pela Embrapa de Pelotas/RS. E a partir do fruto inteiro, foi obtido o extrato etanólico. Para a extração foi utilizado etanol 95ºGL, que passou por processos de centrifugações, utilizando rotavapor para evaporar o etanol e o extrato ressuspenso em água para a preparação da solução mãe.

II) Cepas: as cepas utilizadas foram a N2 (cepa selvagem) e a GMC101 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP], mantidas em meio NGM a temperatura de 20 ºC, com bactéria E.coli OP50 como alimento.

III) Sincronização: para a obtenção dos vermes no estágio larval L1 os mesmos foram submetidos ao processo de sincronização, que consiste em romper a cutículas dos vermes adultos hermafroditas grávidos, utilizando uma solução de lise (hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio), para a liberação dos ovos. Após 12-16 horas os ovos eclodiram com a liberação das larvas no estágio L1.

IV) Tratamento: os vermes foram submetidos a exposição aguda (30 minutos) do extrato nas concentrações de 5, 50, 100, 250 e 500µg/mL. Para o grupo controle foi utilizado NaCl (0.6%)

V) Sobrevivência: a avaliação deste parâmetro se deu através contagem de animais vivos nas placas após 48hs de tratamento, tanto da N2 quanto da GMC101.

VI) Paralisia: o ensaio foi realizado com os vermes da cepa GMC101 após 72horas de exposição a temperatura de 25ºC. Onde a alteração de temperatura da cepa transgênica o que acarreta na agregação de placas Aβ e os vermes paralisam. A taxa de vermes paralisados foi mensurada através da observação dos vermes que não moviam-se do local de origem após sofrerem um estímulo causado pelo toque.

VII) Longevidade: nesse ensaio os vermes são acompanhados durante todo o seu tempo de vida. Após as 48hs de tratamento, foi realizada a transferência de 20 vermes para placas contendo 20µL de bactéria *E.coli* no centro. Diariamente os vermes eram transferidos para novas placas até não restar mais vermes vivos. A longevidade foi realizada com as duas cepas (N2 e GMC101). Após a realização do ensaio de paralisia, onde a cepa N2 foi utilizada como controle da cepa transgênica, os vermes foram novamente transferidos para a temperatura normal de manutenção (20ºC). Foi realizado também uma avaliação dos efeitos do extrato sobre a longevidade somente com a cepa selvagem a 20 cepa ºC

VIII) Análise estatística: todos os dados foram plotados e analisados utilizando o programa GraphPad Prism7. Foram considerados dados estatisticamente significativos os que apresentaram valor de $p<0.05$. Para a análise estatística de sobrevivência foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. A avaliação estatística da taxa de paralisia foi realizada em meio a análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey. Para a longevidade foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via, por medidas

repetidas seguido do teste de Bonferroni, para verificar a diferença estatística em cada grupo experimental. Posteriormente os mesmos dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey para verificar a diferença estatística de cada dia, entre os grupos, ao longo do período do experimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O extrato de mirtilo no modelo experimental *in vivo C.elegans* na cepa selvagem (N2), nas concentrações de 50 e 100µg/mL do tratamento com o extrato, proporcionou um aumento visível na taxa de sobrevivência (**Figura 1A**). Esse efeito também foi observado na cepa transgênica (GMC101), nas concentrações de 5 e 50µg/mL **(Figura 2A)**. Isso demonstra que nas concentrações testadas, o extrato de mirtilo não apresentou toxicidade capaz de reduzir a taxa de sobrevivência nos vermes tratados.

A **figura 2B** demonstra a porcentagem de vermes não paralisados da cepa GMC101, após a expressão do Aβ. Assim como da cepa selvagem, a qual foi utilizada como um controle negativo, da expressão do peptídeo, para a GMC101. Encontramos um aumento na taxa de vermes não paralisados, em todas as concentrações do extrato testado, em comparação a GMC101.

Também avaliamos na cepa GMC101, através da longevidade, se esse potencial resultado protetor poderia agir a longo prazo, de modo que minimizasse os efeitos causados pelo acúmulo do Aβ na DA, o que contribui para o envelhecimento e redução a expectativa de vida dos indivíduos acometidos pela doença. Em nosso estudo não encontramos resultados estatísticos significativamente, nas concentrações testadas. O que observamos é que as concentrações de 50 e 500µg/mL foram capazes de estender o tempo de vida dos vermes, em comparação ao controle (**Figura 2C**).

Um resultado interessante é que as menores concentrações utilizadas no tratamento, para a cepa GMC101 não demonstraram potencial em estender a longevidade, com exceção a de 50µg/mL. Porém ao realizamos o mesmo teste com a cepa selvagem (N2), as concentrações de 5 e 50µg/mL, foram as que demonstraram os resultados mais promissores (**Figura 1B**). Acredita-se que pelo fato da cepa transgênica apresentar um fator que favorece a progressão mais rápida do processo de envelhecimento, a expressão do Aβ, concentrações menores do extrato não teriam efeito promissor em conter os danos causados pelo Aβ.

Já é descrito na literatura o potencial efeito antienvelhecimento que as substâncias presentes no fruto, tais como uma variedade de vitaminas, minerais, açucares, pectinas, taninos e ácidos cítrico, málico e tartárico, inclusive antocianinas, desempenham. (SILVEIRA et al., 2007).

No estudo de YAMAKAWA et al. (2016), as antocianinas, também propiciaram a redução da toxicidade exercida pelo Aβ, prevenindo assim e o dano cognitivo causado pela neurodegeneração.

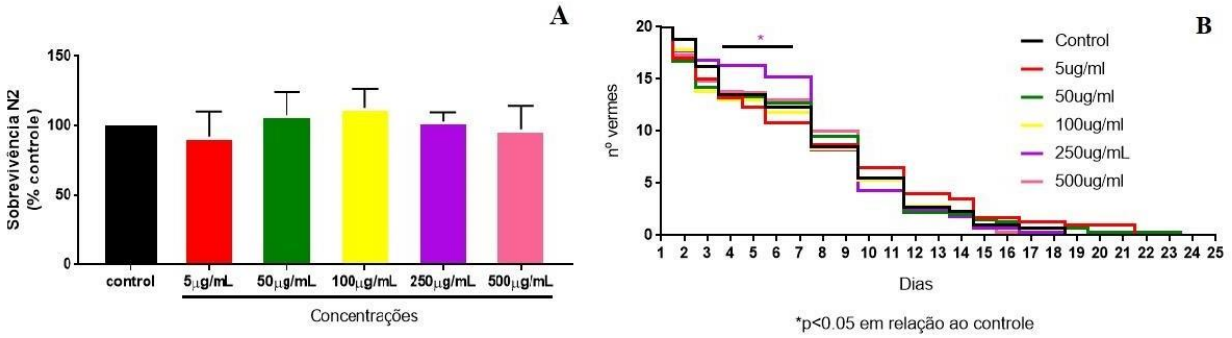


Figura 1. Sobrevivência (A) e longevidade (B) de vida do *C.elegans* na cepa selvagem (N2), após o tratamento com diferentes concentrações do extrato de mirtilo.

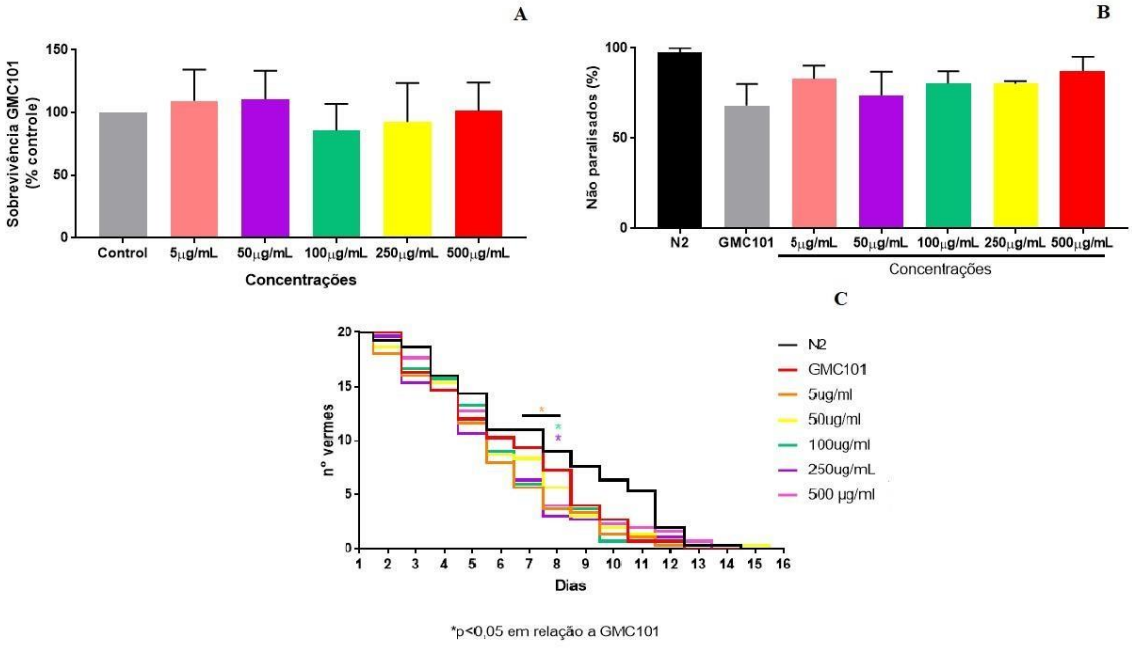


Figura 2. Taxa de sobrevivência (A), taxa de vermes não paralizados (B) e longevidade (C) de vermes da cepa transgênica GMC101, tratados com o extrato de mirtilo.

CONCLUSÃO

O extrato de Mirtilo não demonstrou toxicidade em *C.elegans*, através da análise da taxa de sobrevivência. O que na cepa GMC101 contribuiu para a redução da taxa de paralisia e consequentemente dos efeitos causados pelo Aβ, proporcionando um aumento perceptível do tempo de vida dos vermes. Porém ainda são necessários mais

estudos para avaliar os reais efeitos antioxidantes do mirtilo e as vias pelos quais o mesmo desempenha seu efeito protetor contra a neurodegeneração e toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L.E.; HOFFMANN, A. Como cultivar mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.112, 2002.

GAWAIN, M et al. Utility of na improved modelo of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicty in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alheimer´s disease. **Molecular Neurodegeneration**, n.1, v.10, p.115-119, 2013.

MURPHY, M.Paul.; LEVINE, Harry. Alzheimer's Disease and the β-Amyloid Peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.19, n.1, 2010.

QIU, Z. K.; WANG, X. X.; GAO, J. C.; GUO, Y. M.; HUANG, Z. J.; DU, Y. C. The tomato hoffman's anthocyaninless gene encodes a bHLH transcription factor involved in anthocyanin biosynthesis that is developmentally regulated and induced by low temperatures. **PLoS One** 2016, 11, e0151067.

SILVEIRA, N. G. A.; VARGAS, Paola Nunes; ROSA, C. S. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 18, n. 4, p. 365-370, 2008.

TIRABOSCHI P, HANSEN LA, ALFORD M, MASLIAH E, THAL LJ, COREY-BLOOM J. The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease. Neurology 2000;55:1278–1283.

VELJKOVIC, M.; PAVLOVIC, D. R.; STOJILJKOVIC, N.; ILIC, S.; JOVANOVIC, I.; ULRIH, N. P.; RAKIC, V,; VELICKOVIC, L.; SOKOLOVIC, D. Bilberry: Chemical profiling, in vitro and in vivo antioxidant activity and nephroprotective effect against gentamicin toxicity in rats. **Phytotherapy Research**. Res. 2017, 31, 115–123.

YIANNOPOULOU, Konstantina; PAPAGEORGIOU, Sokratis. Current and future treatments for Alzheimer's disease. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v.6, n.1, 2013.

YAMAKAWA et al. Anthocyanin suppresses the toxicity of Aβ deposits through diversion of molecular forms in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. **Nutritional Neuroscience**, v.19, n.1, 2016.