

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO DE AMORA (*Rubus sp.*) EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE MANIA

LUIZA SPOHR¹; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²; VITOR CLASEN CHAVES³; KARINA PEREIRA LUDUVICO⁴; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – luizaspohr@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – mspereirasoares@gmail.com

³Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil – chavesvc@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – fmstefanello@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – rspanevello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma doença psiquiátrica grave e crônica, associada com altas taxas de morbidade e mortalidade. Essa patologia é caracterizada por alterações recorrentes de humor e seus sintomas oscilam entre dois estados opostos: depressão e mania (SIGITOVA et al. 2016). A fisiopatologia do THB permanece pouco esclarecida, entretanto, dados da literatura têm demonstrado que o estresse oxidativo parece estar envolvido com as alterações neuropsiquiátricas dessa doença. O estresse oxidativo, que é caracterizado pelo aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição das defesas antioxidantes, vem sendo considerado um dos principais mecanismos associados a processos neurodegenerativos (ANDREAZZA et al. 2008).

Na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos para o THB, diversos compostos derivados de plantas têm sido estudados. As terapias à base de plantas podem ser alternativas eficazes no tratamento do THB por apresentarem compostos com potentes atividades antioxidantes. Dados da literatura tem demonstrado que a amora (*Rubus sp.*), a qual é conhecida por ser rica em antocianinas, possui diversas propriedades benéficas para a saúde (MOYER et al. 2002). Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato de amora nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) em hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzido por cetamina.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos *Wistar* (250-300g, 60 dias), fornecidos pelo Biotério Central da UFPel. Os animais foram mantidos em condições experimentais controladas e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA 4609).

2.2 Protocolo de mania e de prevenção com extrato de amora

Foram utilizados 50 animais, os quais foram divididos em cinco grupos experimentais: I (salina + salina); II (salina + extrato de amora); III (salina + cetamina); IV (cetamina + lítio) e V (cetamina + extrato de amora). Nos primeiros sete dias os animais dos grupos II e V receberam por gavagem o extrato de amora na dose de 200 mg/kg, enquanto que os animais do grupo IV receberam

lítio (45 mg/kg duas vezes ao dia) e os animais dos grupos I e III receberam solução salina. Entre o 8º e 14º dia, os animais dos grupos III, IV e V receberam também cetamina (25mg/kg) e os animais dos grupos I e II receberam salina por via intraperitoneal. No 15º dia os animais receberam uma única dose de cetamina e após 30 minutos a atividade locomotora foi avaliada utilizando o teste de campo aberto (GHEDIM et al. 2012; GAZAL et al. 2014). Após esse teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia, o hipocampo foi retirado, homogeneizado em tampão fosfato contendo KCl pH 7,4 (1:10) e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado para análises bioquímicas.

2.3 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Esse ensaio foi realizado segundo ALI et al. (1992). A oxidação de diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH-DA) para 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi usada para a detecção de ERO. A quantificação de ERO foi expressa em $\mu\text{mol DCF}$ por mg de proteína.

2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada pelo método descrito por MISRA; FRIDOVICH (1972). Este método baseia-se na inibição da auto-oxidação de adrenalina dependente de superóxido em um espectrofotômetro a 480 nm. A atividade da SOD foi expressa como unidades por mg de proteína.

2.5 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com AEBI (1984), baseada na decomposição de H_2O_2 a 240 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por mg de proteína.

2.6 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi mensurada usando um kit comercial (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, Reino Unido). A atividade foi monitorada a 340 nm e foi expressa como unidades por mg de proteína.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram que a administração de cetamina induziu um comportamento do tipo maníaco observado através do aumento da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto ($P < 0,001$) (Figura 1). O tratamento com lítio ($P < 0,001$) e com o extrato de amora ($P < 0,01$) foram capazes de prevenir a hiperlocomoção induzida pela cetamina (Figura 1).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, foi observado um aumento nos níveis de ERO ($P < 0.001$) e uma diminuição na atividade das enzimas SOD ($P < 0.01$) e CAT ($P < 0.05$) em hipocampo de ratos tratados com cetamina. No entanto, o extrato de amora foi capaz de prevenir essas alterações induzidas pela cetamina de forma similar ao lítio ($P < 0.05$), o fármaco padrão usado para o tratamento de THB. Quanto a atividade da enzima GPx, não foram observadas alterações significativas (Figura 2).

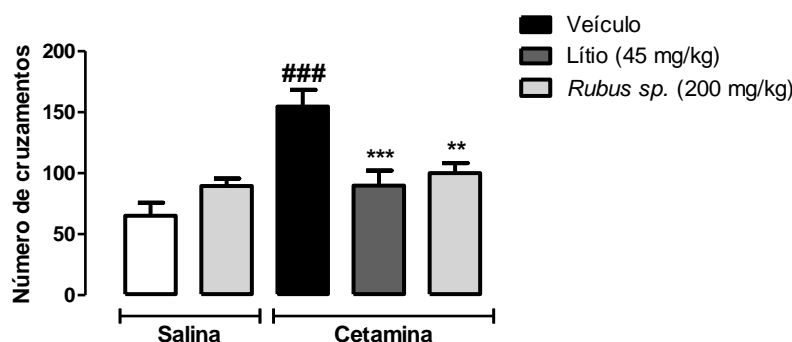


Figura 1. Efeitos da administração de extrato de amora *Rubus sp.* (200 mg/kg) e lítio (45 mg/kg, duas vezes ao dia) na atividade locomotora de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido com cetamina. (###) $P < 0.001$ quando comparado com o grupo veículo/salina. (**) $P < 0.01$ e (***) $P < 0.001$ quando comparado com o grupo veículo/cetamina.

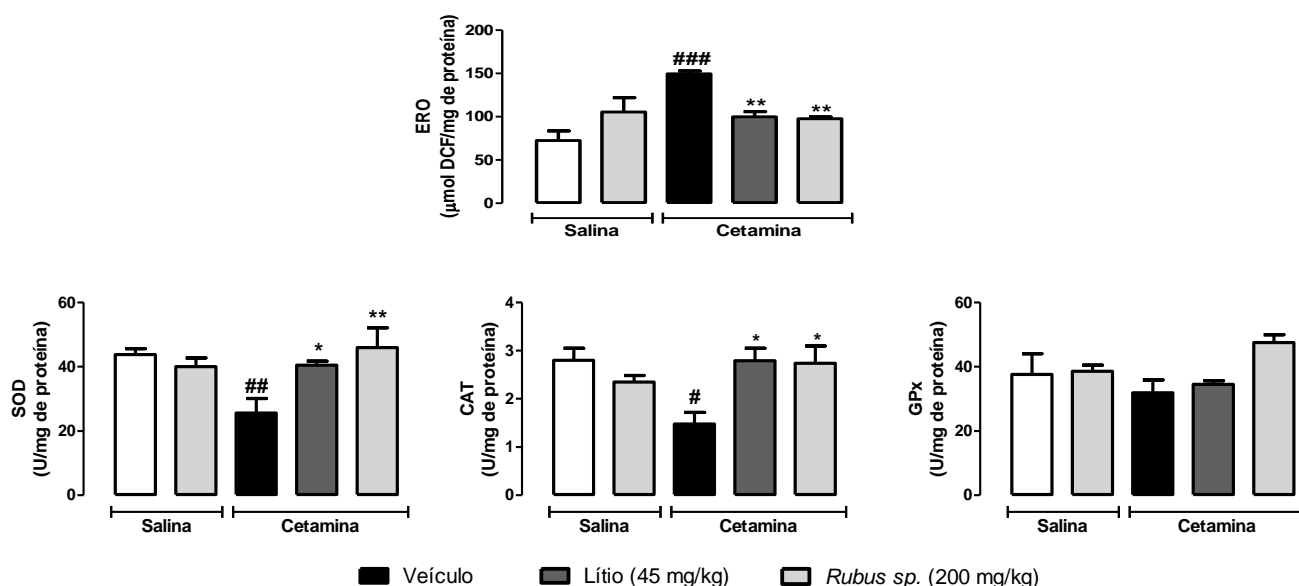


Figura 2. Efeitos da administração de extrato de amora *Rubus sp.* (200 mg/kg) e lítio (45 mg/kg, duas vezes ao dia) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) em hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido com cetamina. (#) $P < 0.05$, (##) $P < 0.01$ e (###) $P < 0.001$ quando comparado com o grupo veículo/salina. (*) Denota $P < 0.05$ e (**) $P < 0.01$ comparado com o grupo veículo/cetamina.

Estudos têm sugerido que o sistema glutamatérgico está envolvido na etiologia do THB, uma vez que ocorre uma diminuição na expressão do receptor NMDA na região do hipocampo. A cetamina é um fármaco antagonista não-competitivo de receptores NMDA, conhecida por seus efeitos anestésicos, e quando administrada em doses específicas (25 mg/kg) pode levar a uma hiperlocomoção, caracterizando um comportamento tipo maníaco. Além disso, nossos resultados demonstram que a cetamina aumentou os níveis de ERO no hipocampo. A enzima antioxidante SOD atua convertendo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a CAT e a GPx atuam detoxificando o H_2O_2 (ANDREAZZA et al. 2008). Um desequilíbrio entre ERO e a atividade dessas enzimas pode contribuir para o dano oxidativo cerebral durante os episódios maníacos.

O extrato de amora foi capaz de prevenir o estresse oxidativo causado pela cetamina. Esse efeito pode ser atribuído aos compostos naturais encontrados na

fruta, principalmente os polifenóis, os quais possuem potentes atividades biológicas, dentre elas, a ação antioxidante.

4. CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido nas alterações neuroquímicas relacionadas com a progressão THB. O tratamento com extrato de amora preveniu a hiperlocomoção, bem como o estresse oxidativo induzido pela cetamina, sendo que os resultados foram muito similares aos observados com tratamento com lítio, o fármaco padrão usado para o tratamento do THB. Estes resultados sugerem um potencial terapêutico do extrato de amora na prevenção da recorrência de novos episódios maníacos, porém mais estudos são necessários para comprovar este efeito benéfico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.
- ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; BOND, D.J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v.111, n.2-3, p.135-144, 2008.
- DEBOM, G.; GAZAL, M.; SOARES, M.S.P.; COUTO, C.A.T.; MATTOS, B.; LENCINA, C.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G.C.; TAVARES, R.; BRAGANHOL, E.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.M. Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. **Brain Research Bulletin**, v.127, p.260-269, 2016.
- GAZAL, M.; VALENTE, M.R.; ACOSTA, B.A.; KAUFMANN, F.N.; BRAGANHOL, E.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; GHISLENI, G.; KASTER, M.P. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.5, p.132-139, 2014.
- GHEDIM, F.V.; FRAGA, D. de B.; DEROZA, P.F.; OLIVEIRA, M.B.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; BUDNI, J.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; ZUGNO, A.L. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v.46, p.1569-1575, 2012.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, p.3170–3175, 1972.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.519-525, 2002.
- SIGITOVA, E.; FIŠAR, Z.; HROUDOVÁ, J.; CIKÁNKOVÁ, T.; RABOCH, J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. **Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v.71, n.2, p.77-103, 2016.