AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM EXTRATO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE HEPÁTICO EM UM MODELO MURINO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Palavras-Chave: COMPOSTOS BIOATIVOS; ENZIMAS ANTIOXIDANTES; OBESIDADE.

Autores(as):

CAMILA DE SOUZA COUTINHO, FEA – UNICAMP

LUCAS LEÃO CALDEIRA (mestrando), FEA – UNICAMP

Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (DHEADM), anteriormente conhecida como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), é uma condição heterogênea caracterizada pela esteatose hepática, inflamação, fibrose consequente e cirrose. O fígado é um órgão particularmente exposto às espécies reativas de oxigênio (ROS), que surgem não apenas durante funções metabólicas, mas também durante a biotransformação de xenobióticos. O desequilíbrio do balanço redox causa estresse oxidativo, que afeta a função hepática, modula vias inflamatórias e contribui para o desenvolvimento de doenças (ALLAMEH et al., 2023). Neste contexto, a obesidade emerge como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da DHEADM, estabelecendo uma relação bidirecional mediada pelo estresse oxidativo. A obesidade tem se tornado uma preocupação global de saúde, com sua prevalência aumentando constantemente nas últimas décadas. Evidências extensas mostram que o excesso de gordura corporal está associado ao aumento de marcadores de estresse oxidativo. O estresse oxidativo desempenha um papel crucial no início e progressão da obesidade e doenças relacionadas (WANG et al., 2024). Atividades das enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx), foram encontradas menores em eritrócitos de indivíduos obesos comparados aos não obesos (MANNA; JAIN, 2015).

As enzimas antioxidantes constituem a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo. O selênio desempenha papel na atividade da glutationa peroxidase, uma enzima que reduz peróxidos, destacando sua significância na mitigação do dano oxidativo. O zinco, por outro lado, aumenta a atividade de proteínas e enzimas antioxidantes, incluindo glutationa e catalase (WANG et al., 2024). As SODs convertem o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, enquanto as catalases convertem o peróxido de hidrogênio em água, transformando duas espécies tóxicas em um produto inofensivo (ALLAMEH et al., 2023). Nas doenças hepáticas gordurosas, a capacidade oxidativa mitocondrial varia amplamente ao longo do espectro da obesidade e DHGNA, principalmente devido à massa corporal, mas também idade, sensibilidade à insulina e diabetes tipo 2 concomitante. A capacidade oxidativa pode aumentar transitoriamente com maior duração da obesidade,

estimulando a oxidação de ácidos graxos e limitando a deposição de triglicerídeos. Isso favorece a geração de estresse oxidativo, que gradualmente esgota a capacidade antioxidativa e contribui para as anormalidades mitocondriais progressivas observadas na esteatohepatite não alcoólica e fibrose (FROMENTY; RODEN, 2023).

Neste contexto, os compostos bioativos surgem como estratégia promissora para modular o sistema antioxidante hepático. As dietas ricas em antioxidantes servem como fatores protetivos na prevenção da obesidade. Os antioxidantes dietéticos, através de seus compostos bioativos, geram uma ação sinérgica que mitiga o estresse oxidativo e oferece vantagens antioxidantes, consequentemente diminuindo o risco de obesidade e suas sequelas (WANG et al., 2024). Portanto, a compreensão dos mecanismos pelos quais os compostos bioativos modulam as enzimas antioxidantes hepáticas, especificamente SOD, catalase, GSH e GR, representa uma área de investigação fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes no tratamento da obesidade e suas comorbidades hepáticas.

METODOLOGIA:

O extrato vegetal utilizado neste estudo foi adquirido de uma fonte sigilosa, mantendo-se em confidencialidade para possível patente futura. Trata-se de um extrato rico em carotenóides, considerado como uma forma concentrada e estável do composto ativo em sua forma pura. Foram adquiridos 60 camundongos machos da linhagem Swiss, com quatro semanas de idade (peso ≈ 35g), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os testes in vivo foram realizados conforme autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) sob o protocolo nº 6221-1/2023. A experimentação ocorreu no Laboratório de Experimentação Pré-Clínica In Vivo, do Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Após quatro semanas de aclimatação com dieta padrão de crescimento (ração Nuvilab CR-1), os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (15 animais por grupo): Grupo controle (N) com dieta de manutenção (AIN-93M); Grupo controle + extrato vegetal (NE) com dieta de manutenção (AIN-93M) suplementada com o extrato vegetal; Grupo dieta hiperlipídica (H) com dieta hiperlipídica (AIN-93M modificada para conter 35% de lipídeos); e Grupo hiperlipídica + extrato vegetal (HE) com dieta hiperlipídica suplementada com o extrato vegetal. A dose administrada do extrato foi de 1,2 g por kg de dieta, incorporada diretamente à ração durante sua formulação. Durante o experimento, a ingestão alimentar e o ganho de peso dos animais foram rigorosamente monitorados e registrados semanalmente. A troca por dietas novas era realizada a cada dois dias para evitar oxidação. A composição centesimal das dietas utilizadas no experimento foi determinada por metodologias padronizadas, realizadas em triplicata para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados. Os teores de proteínas foram obtidos pelo método de Kjeldahl; umidade por secagem em estufa; cinzas por incineração em mufla; lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer; e os carboidratos e fibras calculados pela diferença entre os demais constituintes. Ao final do experimento, com o auxílio de profissionais, os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina e xilazina, seguido de coleta de sangue por punção cardíaca. O soro foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos e, posteriormente, armazenado a -80°C para preservação até as análises bioquímicas.

Foram utilizados quatro métodos bioquímicos para avaliação do sistema antioxidante celular, todos adaptados para microplaca de 96 poços. A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio monitorada espectrofotometricamente a 240 nm por 1 minuto (AEBI, 1984). A quantificação da glutationa reduzida (GSH) utilizou o reagente DTNB para formar complexos colorimétricos lidos a 412 nm após 5 minutos de incubação (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada através da inibição da autoxidação do pirogalol monitorada a 420 nm por 1 minuto (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A glutationa redutase (GR) foi determinada pelo consumo de NADPH na redução da glutationa oxidada, acompanhado pela redução da absorbância a 340 nm durante 3 minutos (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). Todos os ensaios utilizaram alíquotas de 20 µL de amostra em volume total de 200 µL por

poço, com resultados normalizados por proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Esta metodologia permite análise padronizada e eficiente de múltiplas amostras para avaliação do status antioxidante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A evolução do peso corporal e consumo alimentar dos animais do início ao fim do período de experimentação de 14 semanas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Ganho de peso e consumo alimentar dos animais durante as 14 semanas de experimento (n =15)

Grupos	N	NE	H	HE
Peso inicial (g)*	37,61 ± 3,42	35,55 ± 2,80	35,78 ± 2,94	35,43 ± 3,03
Peso final (g) *	42,99 ± 4,33[a]	44,65 ± 6,31[a]	55,01 ± 4,31[b]	54,78 ± 7,24[b]
Ganho de peso (g) *	5,86 ± 5,53[a]	7,11 ± 2,49[a]	18,51 ± 6,35[b]	18,16 ± 6,35[b]
Ingestão Alimentar (g)**	386,97 ± 26,19[a]	397,465 ± 22,52[a]	369,81 ± 32,70[b]	357,38 ± 31,79[b]
Ingestão Calórica (Kcal)**	1454,33 ± 98,44[a]	1474,51 ± 83,56[a]	1924,53 ± 170,17[b]	1847,33 ± 164,36[b]

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas; * representa (P<0,001); ** representa (P<0,0001).

Entre os grupos, o grupo H apresentou um ganho de peso esperado e significativo para o objetivo do experimento, comparando com o grupo N (P<0,0001), confirmando o efeito da dieta hiperlipídica para promoção do ganho de peso. O grupo HE teve um ganho de peso menor do que o grupo H, mas sem diferença estatística significativa. Além disso, em relação à ingestão alimentar, é possível observar que o grupo NE foi o que teve uma maior ingestão comparando com grupo HE (P<0,001). Essa diferença entre esses grupos pode estar relacionada à densidade calórica da dieta do grupo HE, levando esse grupo a ter uma ingestão menor de alimento ofertado. Ademais, pelos resultados, a adição do extrato parece não ter afetado significativamente a ingestão alimentar e a ingestão calórica do grupo HE com relação ao grupo H.

Com isso, após a eutanásia, foram realizados ensaios bioquímicos no tecido hepático com o objetivo de avaliar a resposta do sistema antioxidante endógeno frente aos diferentes tratamentos dietéticos. Os resultados dos testes foram alocados abaixo nas figuras 1 e 2.

Os resultados obtidos em superóxido dismutase (SOD) manteve níveis estáveis, sem variações significativas entre grupos; já a catalase apresentou aumento progressivo. A estabilidade de SOD contrasta com a bibliografia encontrada que mostram que a depleção em modelos de disfunção metabólica (DHEADM), porém se encontra em acordo com evidências recentes que indicam que há uma resposta adaptativa do sistema antioxidante a fim de preservar a linha de defesa (KORUK et al., 2004; GAMET-PAYRASTRE, 2021; DELLI BOVI et al., 2021)

O aumento de 4 U/mg no grupo controle para 9 U/mg no grupo tratado destaca a importância da catalase na decomposição do peróxido de hidrogênio gerado pelo metabolismo exacerbado de ácidos graxos, visto que estudos anteriores demonstram que a deficiência de tal enzima agrava o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídios, indicando, assim, sua relevância para conter o avanço da DHEADM (SHIN et al., 2019). Além disso, a elevação da atividade da catalase no grupo tratado com extrato vegetal sugere a ativação de vias específicas para a hepatoproteção , especialmente reguladas pelo fator de transcrição Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2); esse fator modula a expressão de genes antioxidantes e atua na preservação da progressão da esteatose hepática para estágios mais avançados, pois inibe o acúmulo lipídico e o estresse oxidativo hepático interferindo com vias lipogênicas e induzindo a expressão de genes antioxidativos, sendo que sua deleção acelera a progressão da esteatose para NASH (SUZUKI et al., 2023).

Os compostos bioativos do extrato aparentam atuar sobre a catalase, seletivamente, sem impactar a SOD, essa seletividade indica que o extrato possui componentes bioativos com tropismo específico para vias regulatórias da catalase, podendo ser através de modulação transcricional via Nrf2/ARE (Antioxidant Response Elements) ou estabilização pós-traducional da enzima, visto que extratos vegetais ricos em compostos fenólicos e

flavonoides demonstram capacidade de proteção hepática através da ativação seletiva de sistemas antioxidantes endógenos (CHEN et al., 2016).

Em suma, quanto a catalase e a superóxide dismutase, o extrato vegetal testado possui propriedades hepatoprotetoras robustas, tendo capacidade de potencializar o sistema de catalase como mecanismo de defesa frente ao estresse oxidativo crônico gerado pela DHEAD. Tal capacidade de potencializar o sistema catalase-peróxido de hidrogênio, indica que as células hepáticas preservaram a capacidade responsiva frente a intervenções antioxidantes naturais, o que é consistente com evidências de que a redução do estresse oxidativo pode melhorar tanto a progressão da DHEADM, quanto também a obesidade e a resistência insulinica. (SHIN et al., 2019).

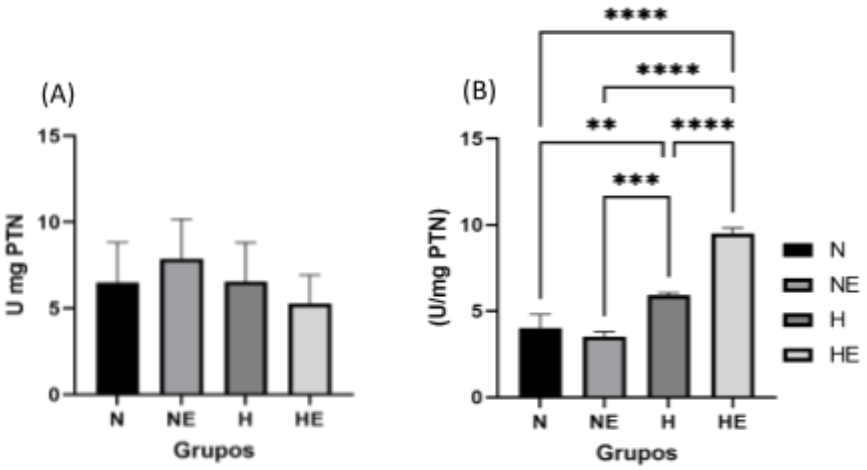

Figura 1. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A) e catalase (B) no tecido hepático de camundongos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: N (normolipídico), NE (normolipídico + extrato), H (hiperlipídico) e HE (hiperlipídico + extrato). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína total. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (n = 8 animais por grupo). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Embora esperássemos uma redução nos níveis de GSH nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (H e HE), os resultados demonstraram um aumento significativo. Este achado pode ser interpretado como uma resposta adaptativa celular ao estresse oxidativo induzido pelos lipídios, mediada por vias de sinalização antioxidantes como NRF2. A elevação de GSH pode refletir uma tentativa do organismo de restaurar a homeostase redox frente à sobrecarga lipídica, especialmente em tecidos como o fígado, altamente sensíveis a este tipo de estímulo.

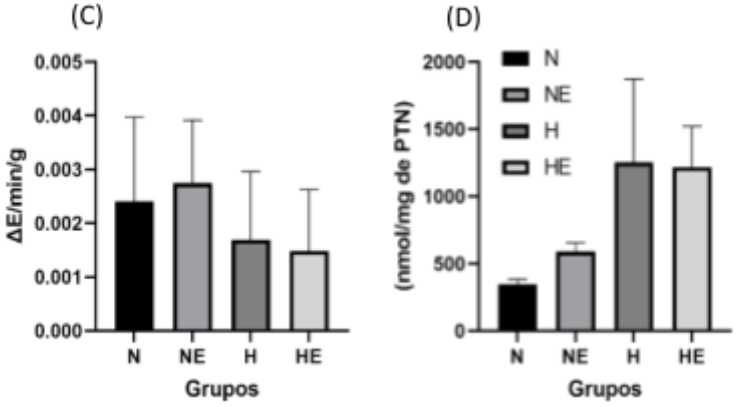

Figura 2. Níveis de glutationa redutase (C) e atividade da glutationa reduzida (GSH) (D) no tecido hepático de camundongos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: N (normolipídico), NE (normolipídico + extrato), H (hiperlipídico) e HE (hiperlipídico + extrato). A atividade da glutationa redutase foi expressa em ΔE/min/g de proteína, enquanto os níveis de GSH foram expressos em µmol/mg de proteína. Os

dados são apresentados como média ± erro padrão da média (n = 8 por grupo). As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA one-way seguida de pós-teste de Tukey, sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

A análise do sistema de glutationa demonstrou uma resposta diferencial frente à dieta hiperlipídica, com aumento dos níveis de glutationa reduzida (GSH) e redução da glutationa redutase (GR). Os níveis de GSH aumentaram significativamente nos grupos tratados com dieta hiperlipídica, em especial no grupo HE (hiperlipídico com extrato vegetal), o que sugere uma ativação compensatória da síntese da glutationa. Todavia,a atividade da GR, responsável por regenerar GSH a partir da glutationa oxidada, diminui em ambos os grupos H e HE, indicando um desequilíbrio funcional entre a síntese e regeneração da glutationa em condições de estresse oxidativos (ZELKO et al., 2002).

Nos animais tratados com extrato vegetal e dieta normolipídica (NE), observou-se um aumento em ambos os níveis de GSH e GR, o que indica que o extrato tem propriedades moduladoras em condições basais; indica, também que,os compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato podem ativar o fator de transcrição NRF2, promovendo assim, tanto a síntese quanto a regeneração da glutationa. Essa resposta destaca o potencial preventivo do estresse oxidativo, quando administrado antes do estabelecimento do dano hepático.

Já para os grupos submetidos à dieta hiperlipídica, o extrato manteve os níveis de GSH, porém não restaurou os níveis de GR. Isso indica que, o extrato embora seja eficaz em estimular a síntese de GSH mesmo sob estresse oxidativo, não influencia diretamente a regeneração da glutationa, possivelmente por limitações no fornecimento de NADPH ou disfunções mitocondriais associadas a disfunção metabólica (DHEADM). Portanto o sistema ainda é dependente da síntese contínua de GSH (DELLI BOVI et al., 2021)

Por fim, de maneira geral, temos que o sistema glutationa na DHEADM apresenta uma adaptação incompleta: há a preservação da síntese, porém há um comprometimento na regeneração de GSH. O extrato vegetal tem ação seletiva e eficaz na modulação para a síntese, mantendo níveis elevados de GSH, porém falhando na regeneração da GR em condições de estresse oxidativo crônico, o que sugere que terapias eficazes para a DHEADM teriam que combinar a síntese de glutationa com estratégias que restaurem a regeneração.

REFERÊNCIAS

ALLAMEH, A.; NIAYESH-MEHR, R.; ALIARAB, A.; SEBASTIANI, G.; PANTOPOULOS, K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1653, 2023. DOI: 10.3390/antiox12091653.

FROMENTY, B.; RODEN, M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 78, n. 2, p. 415-429, 2023. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.09.020.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423-444, 2015. DOI: 10.1089/met.2015.0095.

WANG, Z.; WANG, Q.; TANG, F.; YU, P.; XIE, J.; HUANG, L.; WU, Y.; CHEN, Z.; XIE, M. Composite dietary antioxidant index and obesity among U.S. adults in NHANES 2007–2018. **Scientific Reports**, v. 14, p. 28102, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-78852-y.

YOUNOSSI, Z. M.; HENRY, L. Understanding the Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Time for Action. **Diabetes Spectrum**, v. 37, n. 1, p. 9-19, 2024. DOI: 10.2337/dsi23-0010.

DELLI BOVI, A. P. et al. Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. Frontiers in Medicine, v. 8, p. 595371, 2021.
CHEN, G. et al. Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 9, p. 1379, 2016.
GAMET-PAYRASTRE, L. Oxidative Stress in DHEADM. Encyclopedia MDPI, 2021. Disponível em: https://encyclopedia.pub/entry/6320. Acesso em: 14 jul. 2025.
KORUK, M. et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Annals of Clinical and Laboratory Science, v. 34, n. 1, p. 57-62, 2004.
SHIN, S. K. et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. Pflügers Archiv, v. 471, n. 6, p. 829-843, 2019.
SHIN, S. K. et al. Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. Pflügers Archiv, v. 470, n. 12, p. 1721-1737, 2018.
SUZUKI, T. et al. Molecular mechanisms of cellular response to oxidative stress induced by exposure to environmental electrophilic chemicals. Free Radical Biology and Medicine, v. 201, p. 100-110, 2023.
ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biology and Medicine, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.