

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATO DE MIRTILO (*V. virgatum*) EM
MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICA**

Pathise Souto Oliveira

Pelotas, 2015

Pathise Souto Oliveira

Dissertação

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATO DE MIRTILO (*V. virgatum*) EM
MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências (Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello

Co-orientador: Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina

Pelotas, 2015

Pathise Souto Oliveira

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48e Oliveira, Pathise Souto

Efeitos farmacológicos de extrato de mirtilo (*V. virgatum*) em modelo animal de síndrome metabólica / Pathise Souto Oliveira ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Claiton Leoneti Lencina, coorientador. — Pelotas, 2015.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Síndrome metabólica. 2. Mirtilo. 3. Parâmetros metabólicos. 4. Parâmetros comportamentais. 5. Parâmetros neuroquímicos. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Lencina, Claiton Leoneti, coorient. III. Título.

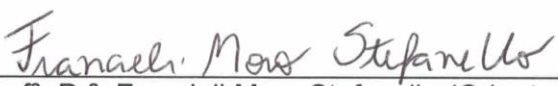
CDD : 634.3

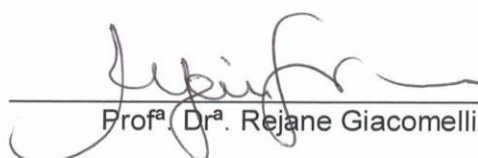
Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE EXTRATO DE MIRTILO (*V. virgatum*) EM
MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICA

Como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências
(Bioquímica e Bioprospecção), Universidade Federal de Pelotas.

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (Orientadora) (UFPel)


Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares (UFPel)


Prof^a. Dr^a. Rachel Krolow Santos Silva Bast (UCPel)

Pelotas, março de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Nara e Sergio e ao meu marido Cezar pelo amor incondicional, apoio, incentivo e por todos os esforços e oportunidades que me proporcionaram de estudar.

Agradecimentos

Aos meus pais por todos os esforços, apoio, preocupação, paciência, carinho, amor e atenção. Obrigada por me incentivarem a estudar e por me motivarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu marido pelo amor, paciência confiança, incentivo e apoio em cada decisão tomada. Obrigada por saber lidar com meus momentos de estresse e com minhas crises de ansiedade e principalmente por ter sempre uma palavra de conforto e otimismo.

A minha orientadora Prof^ª. Francieli Moro Stefanello pelo acolhimento, amizade, oportunidade e confiança. Obrigada pela disposição e principalmente por acreditar nesse trabalho e fazer parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Claiton Leoneti Lencina pelos conhecimentos repassados, paciência e dedicação. Obrigada pelo incentivo e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Prof^ª. Alethéa Gatto Barschak pela oportunidade de iniciar os projetos no Laboratório de Biomarcadores. Obrigada pela confiança e por ter aberto as portas para novos conhecimentos.

A Prof^ª. Marta Gazal e toda equipe do Laboratório de Neurociência Clínica da Universidade Católica de Pelotas. Obrigada pela ajuda constante, disponibilidade, paciência e amizade.

Aos funcionários do biotério da Universidade Federal de Pelotas, obrigada pelos conhecimentos práticos repassados, incentivo, convivência, disponibilidade e amizade.

A Prof^ª. Roselia Maria Spanevello pelos ensinamentos, confiança, amizade e por fazer parte do meu crescimento profissional.

A mais nova mestrandia Natália Porto e a todos os alunos de mestrado e iniciação científica dos Laboratórios de Biomarcadores e NEUROCAN, em

especial a Pâmela Gonçalves e a Laiz Xavier Rodrigues que me ajudaram na execução desse trabalho. Obrigada pela energia, disposição, comprometimento e amizade durante todo esse período.

As amigas que o mestrado meu deu Carla Sigales e Flávia Aleixo Vasconcellos. Obrigada pelos conselhos e pelos momentos de desabafo e muitas risadas. Obrigada também as minhas amigas de infância Roberta Maraninchi, Paula Agendes e Karen Carvalho pelas palavras de carinho, incentivo e principalmente por entenderem minhas ausências.

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos para a execução deste trabalho.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem „Por quê?“ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo „Por que não?“”

George Bernard Shaw

PARTE I

Resumo

OLIVEIRA, Pathise Souto. **Efeitos farmacológicos de extrato de mirtilo (*V. virgatum*) em modelo animal de síndrome metabólica.** 2015. 79f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada por uma combinação de fatores de risco cardiovascular que incluem hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão. Estudos sugerem que a elevada ingestão energética pode ocasionar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que tem sido diretamente relacionado com as complicações da SM e com o desenvolvimento de doenças neurológicas e distúrbios neuropsiquiátricos. Estudos epidemiológicos revelam que compostos bioativos presentes no mirtilo (*Vaccinium virgatum*) apresentam importantes efeitos benéficos para alterações presentes na SM. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do consumo de extrato de fruto de *Vaccinium virgatum* sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e de estresse oxidativo em hipocampo e córtex cerebral de animais submetidos ao modelo experimental de SM induzido por uma dieta hiperpalatável (DHP). Os camundongos C57/BL6 foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo (1) recebeu ração padrão e solução salina por gavagem, grupo (2) ração padrão e extrato hidroalcoólico de mirtilo (200 mg/kg) por gavagem, grupo (3) DHP e solução salina por gavagem, e o grupo (4) DHP e extrato de mirtilo (200 mg/kg) por gavagem. Os animais foram tratados durante 150 dias. Nossos resultados mostraram que os animais submetidos à DHP apresentaram resistência à insulina, aumento significativo do peso corporal, gordura visceral, glicose, triglicerídeos e colesterol total quando comparados ao grupo controle. No entanto, o extrato de mirtilo reduziu esses parâmetros metabólicos nos animais submetidos à DHP. Da mesma forma, o extrato de mirtilo foi capaz de diminuir os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex cerebral e hipocampo dos animais submetidos à DHP. Em contraste, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo tiólico total, e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em nenhum dos grupos testados. Além disto, os animais alimentados com a DHP exibiram um aumento significativo no tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Por outro lado, a administração crônica do extrato preveniu esta alteração comportamental. Em contrapartida, não foram observadas modificações significativas no comportamento ambulatorio, bem como no perfil ansiolítico destes animais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o extrato de mirtilo, administrado cronicamente, apresenta ação hipoglicemiante, anti-dislipidêmica, tipo-antidepressiva e antiperoxidativa em modelo animal de SM.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Mirtilo. Compostos fenólicos. Parâmetros metabólicos. Parâmetros comportamentais. Parâmetros neuroquímicos.

Abstract

OLIVEIRA, Pathise Souto. **Efeitos farmacológicos de extrato de mirtilo (*V. virgatum*) em modelo animal de síndrome metabólica.** 2015. 79f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by a combination of cardiovascular risk factors including hyperglycemia, insulin resistance, visceral obesity, dyslipidemia and hypertension. Studies suggest that the increased energy intake can enhance the production of reactive oxygen species (ROS), which has been directly related to the complications of MetS and to the development of neurological and neuropsychiatric disorders. Bioactive compounds of blueberry (*Vaccinium virgatum*) have demonstrated beneficial effects to alterations observed in the MetS. Therefore, in the present study we investigated the effect of blueberry fruit extract on metabolic, behavioral and oxidative stress in the hippocampus and cerebral cortex of mice submitted to an experimental model of MetS induced by a highly palatable diet (DHP). Mice C57/BL6 were divided into 4 experimental groups: (1) received standard chow and saline orally, (2) standard chow and blueberry hydroalcoholic extract (200 mg/kg, p.o), (3) DHP and saline orally, (4) DHP and blueberry hydroalcoholic extract (200 mg/kg, p.o). The animals were treated for 150 days. Our results showed that the animals treated with DHP presented insulin resistance, increased body weight, visceral fat, glucose, triglycerides, and total cholesterol when compared to control group. However, the blueberry extract prevented the increase in these metabolic parameters. Similarly, the blueberry extract was able to reduce the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the cerebral cortex and hippocampus of animals submitted to DHP. In contrast, no differences were observed in the total thiol content, activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). In addition, the DHP fed animals showed a significant increase in immobility time in the forced swimming test and blueberry prevented this alteration. However, no changes were observed in the ambulatory behavior, as well as anxiolytic profile of these animals. Altogether, our findings suggest that blueberry extract, administered chronically, exhibit hypoglycemic, antidyslipidemic, antidepressant-like and antiperoxidative effects in an animal model of MetS.

Keywords: Metabolic Syndrome. Blueberry. Phenolic compounds. Metabolic parameters. Neurochemical parameters. Behavioral parameters.

Lista de Figuras

Figura 1	Fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio 25
Figura 2	Produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio pelas enzimas antioxidantes.26
Figura 3	Complexo ativo da enzima NADPH-oxidase 27
Figura 4	Modelo ilustrando o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no tecido adiposo, correlacionando com marcadores inflamatórios e desenvolvimento de síndrome metabólica 29
Figura 5	Fruto de mirtilo (<i>Vaccinium virgatum</i>)30

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AGL	Ácidos Graxos Livres
ATP-III	<i>Adults Treatment Painel</i>
CAT	Catalase
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DHP	Dieta Hiperpalatável
DM2	Diabetes Melittus tipo 2
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GLUT-4	Proteína Transportadora de Glicose
GSH	Glutationa reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCIO	Ácido Hipocloroso
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-6-	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
NCET	<i>National Cholesterol Education Program</i>

NF-K β	Fator Nuclear Kappa B
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio
PCR	Proteína C Reativa
RI	Resistência à Insulina
sICAM	Molécula de Adesão Intracelular Solúvel
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TNF	Teste do Nado Forçado
UCPs	Proteínas Desacopladoras
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular

Sumário

PARTE I.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Abreviaturas.....	12
 PARTE II	 15
1 Introdução.....	16
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Revisão da Literatura.....	19
3.1 Síndrome Metabólica.....	19
3.3 Síndrome Metabólica e Estresse Oxidativo.....	24
3.4 Síndrome Metabólica e Frutos Vermelhos.....	29
 PARTE III.....	 33
Manuscrito.....	34
 PARTE IV.....	 63
Conclusão.....	64
Referências.....	65

PARTE II

1 Introdução

No Brasil tem sido observado um aumento progressivo da prevalência da síndrome metabólica (SM) devido às alterações demográfico-populacionais, tais como envelhecimento da população, aumento da expectativa de vida e, principalmente, ao aumento da obesidade, o qual está relacionado às mudanças comportamentais e culturais, como o aumento do sedentarismo e a alimentação inadequada (XAVIER & MONTE, 2005).

A SM é caracterizada por uma combinação de fatores de risco cardiovascular que incluem hiperglicemia, resistência à insulina (RI), obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão (ALBERTI et al., 2009; BRUCE & HANSON, 2010; DIANA et al., 2013; MAYUKO et al., 2013). Outros fatores que também têm sido relacionados à SM desempenham um papel importante na agressão ao miocárdio por meio da produção de substâncias com ações cardiovasculares e sistêmicas, como a leptina, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) (BULLO et al., 2007; SHAH et al., 2008; HAJER et al., 2009; RUDOLF et al., 2014).

Dados da literatura sugerem que o aumento energético pode induzir o estresse oxidativo e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERRO) (PIHL et al., 2006; DINIZ et al., 2008; WELLEN & THOMPSON, 2010). Ainda, o aumento destas espécies tem sido diretamente relacionado com o desenvolvimento da obesidade, aterosclerose, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), RI, doenças neurológicas e distúrbios neuropsiquiátricos (FRANÇA et al., 2013; MURDOLO et al., 2013; ZHANG & YOA, 2013). Além disto, níveis elevados de cortisol e citocinas pró-inflamatórias são observados em pacientes com SM que apresentam sintomas clínicos depressivos (PENNINX et al., 2003; HOWREN et al., 2009; GRAGNOLI, 2014). RUDOLF e colaboradores (2014) sugerem que níveis elevados de citocinas responsáveis pelo desenvolvimento da SM tais como a IL-6, estão entre os mais consistentes achados em indivíduos com depressão. Ainda, este estudo mostrou que concentrações elevadas de

insulina e PCR em indivíduos depressivos, o que suporta a hipótese da interação entre depressão e SM (RUDOLF et al., 2014).

Estudos epidemiológicos revelam que compostos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário vegetal, tais como as antocianinas, flavonóides e outros compostos fenólicos apresentam várias atividades, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva, anti-hipertensiva, anti-hiperlipidêmica e hipoglicemiante (MARY et al., 2009; BRONEEL et al., 2010; PAREDES - LOPEZ et al., 2010; OSAMA et al., 2011; KUMAR et al., 2012). Neste contexto, extratos de raízes, caules, folhas e frutos de mirtilo (*Vaccinium*) contêm várias substâncias ativas que podem reduzir as complicações da SM (TSUDA et al., 2003; MARTINEAU et al., 2006; LEE et al., 2014). Ainda, estes extratos podem apresentar proteção contra os danos oxidativos em diferentes condições patológicas, uma vez que, os compostos fenólicos presentes têm sido demonstrados como inibidores potentes da peroxidação lipídica quando comparados a outros antioxidantes (KONG et al., 2003; BAGCHI et al., 2004; MOSKAUG et al., 2005).

Estudos em modelos animais e em culturas de células com o objetivo de modular a resposta inflamatória utilizando antocianinas observaram inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TESUDA et al., 2002; HERATH et al., 2003; LEE et al., 2014). O aumento na produção destas citocinas e de ERO tem sido observado em diversas patologias, dentre elas a SM e a depressão (ZEUGMANN et al., 2010; PYYKKONEN et al., 2012 RYBKA et al., 2013). Em animais e humanos, características sintomáticas da SM estão relacionadas com o consumo de uma dieta rica em carboidratos, podendo induzir a inflamação, o estresse oxidativo e distúrbios cognitivos.

2 Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar os efeitos do consumo de extrato hidroalcoólico de frutos de *Vaccinium virgatum* sobre o perfil glicídico e lipídico, parâmetros de estresse oxidativo e comportamentais em camundongos submetidos ao modelo de SM induzido por uma dieta hiperpalatável.

Objetivos Específicos

- Avaliar *in vivo* a atividade anti-dislipidêmica e hipoglicemiante do extrato de frutos de *Vaccinium virgatum* no modelo animal de SM;
- Avaliar o efeito do extrato de *Vaccinium virgatum* sobre parâmetros comportamentais (campo aberto, teste do nado forçado e labirinto em cruz elevado) no modelo animal de SM;
- Avaliar *in vivo* a ação antioxidante do extrato dos frutos de *Vaccinium virgatum* em hipocampo e córtex cerebral de animais submetidos ao modelo de SM através da determinação dos seguintes parâmetros: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo tiólico total, atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

3 Revisão da Literatura

Síndrome Metabólica

A SM é caracterizada por uma combinação de fatores de risco cardiovascular que incluem hiperglicemia, RI, obesidade visceral, hipertensão e dislipidemia, como aumento dos triglicerídeos (TG) e diminuição das concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os sintomas da SM pioram com o aumento do consumo de alimentos de alta densidade energética e a inatividade física (FRANSSEN et al., 2008; ALBERTI et al., 2009; BRUCE & HANSON, 2010; DIANA et al., 2013; MAYUKO et al., 2013).

O estudo da SM tem sido dificultado pela ausência de consenso na sua definição e nos pontos de corte dos seus componentes. Existem pelo menos dois critérios que têm sido adotados na prática clínica: um proposto pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP), que apresentou a terceira revisão das diretrizes para diagnóstico e controle das dislipidemias, o *Adults Treatment Painel*, ATP III, conhecido como NCEP-ATP III (2001), e o outro ditado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ALBERTI & ZIMMET, 1998).

São classificados como portadores da SM pela definição do NCEP-ATP III (2001), aqueles que apresentam três ou mais dos seguintes critérios: circunferência abdominal elevada (>102 cm em homens e >88 cm em mulheres), aumento dos TG (>150 mg/dL), diminuição do HDL (<40 mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres), hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial >130/85 mm/Hg ou uso de medicação anti-hipertensiva) e glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL.

Segundo a definição da OMS (1998), os parâmetros diagnósticos observados são: intolerância à glicose ou RI e dois ou mais dos seguintes critérios: hipertensão arterial sistêmica, (pressão arterial >140/90 mm/Hg ou uso de medicação anti-hipertensiva), aumento dos TG (>150 mg/dL), diminuição do HDL (<35 mg/dL em homens e <39 mg/dL em mulheres), relação cintura/quadril elevada (>90cm para homens e 85 cm para mulheres) e/ou índice de massa corporal (IMC) >30 Kg/m² e microalbuminúria (taxa de

exceção de albumina $>20 \mu\text{g}$ por minuto). Dentre os critérios definidos, os adotados pelo NCEP-ATP III (2001) são os mais recomendados pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica por sua simplicidade e praticidade.

Apesar da fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) circulante não constar nos critérios de diagnóstico da SM, níveis plasmáticos elevados de LDL são considerados um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença aterosclerótica cardiovascular (XAVIER et al., 2004). Uma das hipóteses sobre a aterogênese refere-se à disfunção endotelial induzida pela ação dos fatores de risco, em especial, pela exposição do endotélio vascular à LDL oxidada, aumentando assim o estresse oxidativo, injúria vascular e acúmulo de células espumosas (XAVIER et al., 2004; MENUET et al., 2005). A oxidação é um dos processos de modificação das LDL mais estudados. Atualmente se aceita que uma pequena proporção destas partículas seja modificada ainda na circulação e que a oxidação continue após a entrada na camada íntima das artérias, em ambiente pró-oxidante, caracterizando condições pró-aterogênicas (KOVANEN & PENTIKAINEN, 2003).

A principal causa do desenvolvimento da SM tem sido um desafio para os pesquisadores. No entanto, a RI e a obesidade visceral são considerados os principais componentes (DE CARVALHO VIDIGA et al., 2013). Sabe-se que a secreção de insulina é controlada pelo nível plasmático de glicose que estimula as células β -pancreáticas a produzirem e secretarem maior quantidade deste hormônio. Quando a liberação de uma quantidade normal de insulina não é capaz de manter os níveis normais de glicose plasmática, ocorre um aumento da secreção da insulina até a glicemia retornar aos valores normais (KOVAC et al., 2007). A ativação do receptor de insulina resulta na translocação da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4) do citosol para a membrana celular, o que permite a entrada de glicose na célula. A RI pode decorrer de diversos fatores: defeitos na secreção e/ou ação da insulina por menor número de receptores ou menor afinidade destes, redução na quantidade de GLUT4 ou na translocação de GLUT4 para a membrana, sendo este último considerado como o fator mais importante (SANTOS et al., 2006).

A obesidade visceral contribui para estados pró-inflamatórios e pró-oxidantes, assim como para alterações no metabolismo da glicose e dos lipídios (FERNÁNDEZ et al., 2010; SAVINI et al., 2013). Isto ocorre devido ao acúmulo de tecido adiposo na região do abdômen. A disfunção deste tecido aumenta a capacidade de sintetizar moléculas com ações pró-inflamatórias denominadas adipocitocinas, que apresentam um papel importante nas complicações associadas à SM e obesidade (BULLO et al., 2007; HAJER et al., 2008; SHAH et al., 2008). Os níveis de TNF- α no plasma se elevam persistentemente em indivíduos obesos ou com DM2 e em pacientes com problemas cardiovasculares. Seu papel principal é mediado pela modulação da atividade do GLUT4 (BULLO et al., 2007; HAJER et al., 2008). Assim como o TNF- α , níveis elevados de IL-6 têm sido associados com aumento do risco de desenvolver DM2, infarto agudo do miocárdio e desenvolvimento de doenças neurológicas (BULLO et al., 2007; RUDOLF et al., 2014). Um dos efeitos mais importantes da IL-6 é o controle da produção da PCR, que por sua vez induz a síntese de outras citocinas, como a molécula de adesão celular vascular (VCAM) ou a molécula de adesão intracelular solúvel (sICAM) e propicia uma ligação entre a inflamação e a aterosclerose (BULLO et al., 2007).

Vários hormônios possuem papel fundamental na manutenção do peso corporal. A leptina é um hormônio peptídico formado por 167 aminoácidos, transcritos a partir do gene *ob*, que foi originalmente clonado em camundongos. (ROMERO & ZANESCO, 2006). Este hormônio está envolvido na homeostase energética, atuando na estimulação da captação de glicose, na lipólise nos adipócitos, na redução da ingestão energética e na expressão de proteínas desacopladoras (UCPs) em diversos tecidos (ROMERO & ZANESCO, 2006; SCHERER et al., 2013).

Os indivíduos obesos apresentam elevados níveis plasmáticos de leptina, cerca de cinco vezes maiores do que aqueles encontrados em indivíduos eutróficos. Estima-se que a presença de altos níveis de leptina seja um indicativo de resistência a este hormônio, ou pela alteração da sua síntese e/ou secreção, por alterações no transporte cerebral ou por deficiência nos receptores (ROMERO & ZANESCO, 2006; SCHERER et al., 2013). A hiperleptinemia, encontrada em indivíduos obesos, é atribuída a alterações no

receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hematoencefálica, fenômeno denominado resistência à leptina semelhante ao que ocorre na DM2 (PARACCHINI & PEDOTTI, 2005; ROMERO & ZANESCO, 2006).

Em contraste à maioria das adipocitocinas, a expressão de adiponectina diminui com o aumento do tecido adiposo (LENZ & DIAMOND Jr., 2008). Os efeitos metabólicos desta citocina devem-se à melhora na sensibilidade à insulina, redução na secreção de glicose no fígado e aumento na captação de glicose no tecido adiposo (ANTUNA-PUENTE et al., 2007; LENZ & DIAMOND Jr., 2008; BONET et al., 2009). Os efeitos anti-inflamatório e antiaterogênico devem-se à inibição do crescimento de precursores de macrófagos e sua diferenciação em células espumosas, inibição da adesão de monócitos na parede vascular por reduzir a expressão de moléculas de adesão e inibição na remodelagem e proliferação de células musculares da parede vascular (BRAY et al., 2009). Dentro deste contexto, tem sido relatado que a diminuição de tecido adiposo na região do abdômen pode afetar diretamente o balanço energético e a função da insulina por aumentar os níveis de adiponectina e diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, PCR, dentre outras (BUSETO et al., 2008).

O tratamento da SM com objetivo de melhorar a RI preconiza a perda de peso e a adoção da prática regular de exercício físico, pois promovem melhora da sensibilidade à insulina reduzindo os riscos de complicações cardiovasculares (TUOMILETHO, 2005; LUDWIG et al., 2012). O tratamento farmacológico para redução do peso inclui os inibidores de apetite, como derivados da fentermina e sibutramina, e inibidores da absorção de nutrientes (WILSON & GRUNDY, 2003). No entanto, esses medicamentos não tem sido muito úteis no tratamento da obesidade devido à baixa eficácia e inúmeros efeitos adversos provocados, prejudicando a adesão ao tratamento (ECKEL et al., 2005).

O NCEP – ATP III recomenda como alvo principal da terapêutica hipolipidêmica a redução dos níveis elevados de LDL, através dos medicamentos da família das estatinas (TUOMILEHTO, 2005). Além disto, os

fibratos e o ácido nicotínico (niacina) são utilizados para a redução dos TG e para o aumento do HDL (SBC, 2005).

O tratamento medicamentoso da hipertensão arterial na SM visa reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular. Os benefícios podem ser alcançados pelo uso de diuréticos, inibidores adrenérgicos, inibidores da enzima conversora da angiotensina, antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II, antagonistas de canais de cálcio e vasodilatadores diretos (SBC, 2005).

Com o avanço dos estudos e conhecimentos dos mecanismos envolvidos no controle da fome e saciedade, além do desenvolvimento de novas tecnologias, outros medicamentos estão sendo estudados e desenvolvidos para o tratamento da SM. A terapia inclui medicamentos que atuam sobre neurotransmissores, hormônios associados à obesidade (leptina e grelina), aumentam o gasto energético até suplementos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (BAYS, 2004). Dentro deste contexto, é de extrema importância a busca por alvos terapêuticos que contemplem a gama de condições presentes nesta síndrome. Neste sentido, os frutos vermelhos, como o mirtilo, são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, devido à imensa diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas ou biológicas (SIMÕES et al., 2007; BASU & LYONS 2012).

Síndrome Metabólica e Estresse Oxidativo

As ERO são formadas continuamente no metabolismo celular. Estas espécies incluem não apenas radicais livres, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e oxigênio singlete, mas também alguns derivados não radicalares de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RAJENDRAN et. al., 2014). Várias organelas podem gerar ERO, estas incluem as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e os peroxissomos. Em adição, várias enzimas, incluindo oxidases e oxigenases, geram ERO, como parte de seus ciclos de reação enzimática (Figura 1) (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014). A produção destas espécies tem sido observada em diversas condições fisiológicas, como por exemplo, na fagocitose, fosforilação de proteínas, apoptose, diferenciação celular, na coordenação da resposta inflamatória, na sinalização celular e na regulação do tônus vascular e controle da ventilação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RAJENDRAN et. al., 2014). Entretanto, quando formadas em excesso, podem oxidar diversas biomoléculas, como os lipídios, as proteínas e o DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VENTURINI et al., 2011; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014; RAJENDRAN et. al., 2014). A oxidação destas biomoléculas parece contribuir para o desenvolvimento de várias patologias, incluindo doenças neurológicas, aterosclerose, diabetes e câncer (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014; RAJENDRAN et. al., 2014).

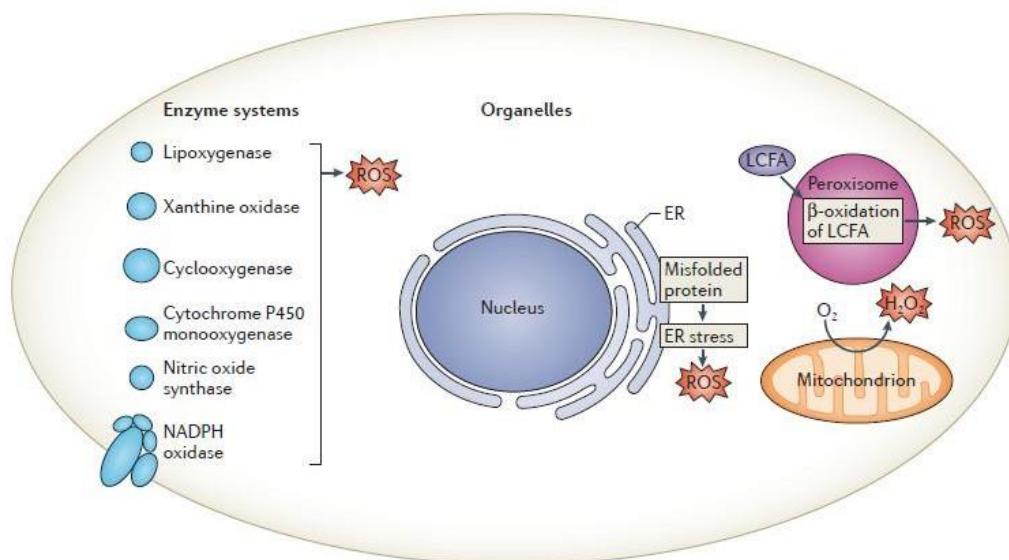


Figura 1- Fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

A fim de evitar os efeitos deletérios das ERO, o organismo dispõe de mecanismos eficientes para a detoxificação destes agentes oxidantes, conhecidos como defesas antioxidantes. Estas defesas podem proteger contra as espécies reativas por uma variedade de mecanismos diferentes, incluindo, remoção catalítica realizada pelas enzimas antioxidantes, redução da formação destas espécies por meio de proteínas como albumina e transferrina, proteção de biomoléculas contra o dano oxidativo (como exemplo as chaperonas), oxidação pelas ERO a fim de preservar importantes biomoléculas como, por exemplo, bilirrubina, ascorbato, α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), flavonóides, ácido úrico dentre outras (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; HUANG et al., 2012; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014; RAJENDRAN et al., 2014).

Em condições fisiológicas há um balanço entre a produção de ERO e os sistemas de defesa antioxidante, porém, em certas condições patológicas pode haver aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes, resultando no que chamamos de estresse oxidativo (Figura 2). Este termo se refere ao desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as

ERO formadas, podendo resultar em dano aos componentes celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RAJENDRAN, et. al., 2014).

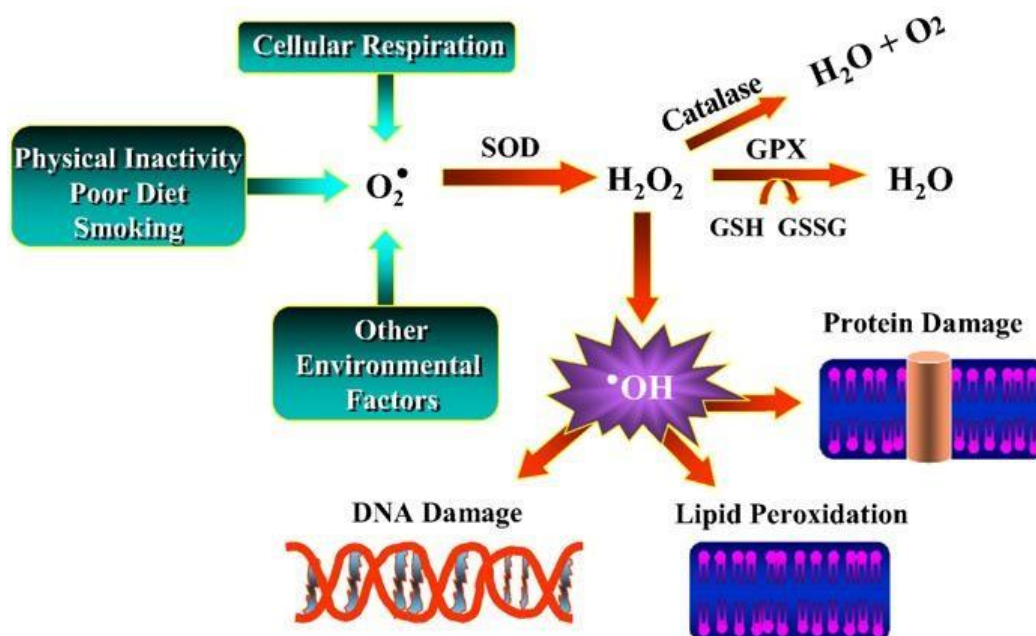


Figura 2- Produção e eliminação das ERO pelas enzimas antioxidantes (ROBERTS & SINDHU, 2009).

Na SM ocorre um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios (FRANÇA et al., 2013). Este desequilíbrio leva ao aumento na produção de ERO e diminuição das defesas antioxidantes o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas.

Estudos apontam que o aumento energético pode induzir o estresse oxidativo e aumentar a produção de ERO (PIHL et al., 2006; DINIZ et al., 2008; WELLEN & THOMPSON, 2010). Além disto, o dano oxidativo pode desempenhar um papel importante nas manifestações relacionadas à SM, incluindo a obesidade visceral, aterosclerose, hipertensão, DM2 e RI (ROBERTS & SINDHU, 2009; FRANÇA et al., 2013; MURDOLO et al., 2013).

Sabe-se que a hiperglicemia, presente em indivíduos com SM, leva ao aumento na produção de espécies reativas na mitocôndria, por aumentar o gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. Quando este gradiente excede o limiar, a transferência de elétrons no complexo III da cadeia transportadora de elétrons é bloqueada, levando a um escape de elétrons da

ubiquinona, com formação de $O_2^{\bullet-}$ (CHOI et al., 2008). Ainda, o aumento nos níveis de AGL nos tecidos e na circulação também leva a um aumento na produção de ERO causando um desequilíbrio entre a produção e eliminação destas espécies pelos sistemas de defesa celular (AVIGNON et al., 2012). Estes AGL são conhecidos como ativadores da produção de $O_2^{\bullet-}$ dependente de NADPH oxidase (Figura 3) em várias células, inclusive as fagocíticas (SCHÖNFELD & WOJTCZACK, 2008; MURDOLO et al., 2013).

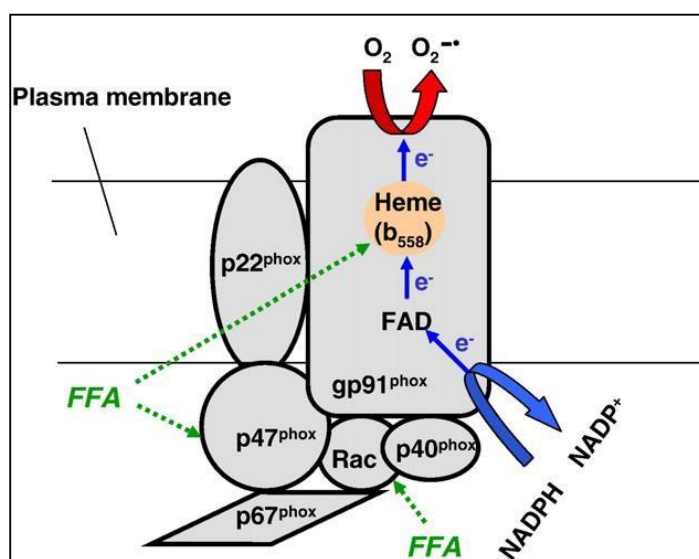


Figura 3- Complexo ativo da enzima NADPH-oxidase. Complexo formado pela montagem de subunidades associadas à membrana (p22^{phox} e gp91^{phox}) e subunidades citosólicas (p47^{phox}, Rac, p40^{phox}, p67^{phox}). (SCHÖNFELD & WOJTCZACK, 2008).

Alguns estudos demonstraram que o aumento de ERO está associado ao aumento na expressão de NADPH oxidase, e expressão reduzida de enzimas antioxidantes, e que o estresse oxidativo aumentado neste tecido está fortemente correlacionado com aumento de marcadores inflamatórios, desregulação de adipocitocinas, hiposecreção de adiponectina e RI (Figura 4) (TRIPATHY et al., 2003; FURUKAWA et al., 2004; REGE et al., 2013; LIU & LLOYD, 2013). Além disto, sabe-se que o estresse oxidativo medeia processos neuropatológicos de uma série de doenças neurodegenerativas e distúrbios neuropsiquiátricos, e dados recentes têm sugerido o seu envolvimento na fisiopatologia da depressão (KUMAR et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; RYBKA et al., 2013; ZHANG & YOA, 2013). Ainda, alguns estudos demonstram

uma possível associação entre o estresse oxidativo, depressão, SM e citocinas pró-inflamatórias e sugerem que componentes presentes na SM são a principal causa de mortalidade em indivíduos com distúrbios neuropsiquiátricos (KAHL et al., 2005; CAPURON et al., 2008; ZEUGMANN et al., 2010; PAN et al., 2012; PYYKKONEM et al., 2012).

Alguns pesquisadores sugerem que níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento da SM tais como a IL-6, estão entre os mais consistentes achados em indivíduos com depressão. Ainda, concentrações elevadas de insulina e PCR foram encontradas em indivíduos depressivos, o que suporta a hipótese da interação entre depressão e SM (RUDOLF et al., 2014). Elevados níveis de IL-6 presentes na depressão também estão relacionadas com o ganho de peso e o acúmulo de tecido adiposo visceral (MAES et al., 2012).

A depressão também tem sido associada com altos níveis de cortisol. Sabe-se que o estresse causa a hiperativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), pelo desencadeamento da secreção hipotalâmica do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), fazendo com que a secreção de cortisol aumente. Altos níveis de cortisol podem alterar o humor, bem como causar hiperglicemia, RI, e outros fatores presentes na SM (WEIGENBERG et al., 2008; GRAGNOLI, 2014). A hiperativação do eixo HPA pode ocorrer devido a variações nos genes de receptores do CRH, melanocortina, glicocorticóides, entre outros, que podem ser parcialmente responsáveis pela associação de depressão, DM2 e SM (WEIGENBERG et al., 2008; GRAGNOLI, 2014).

Diante disto, o aumento dos níveis de cortisol e a inflamação podem contribuir para o aumento da prevalência de depressão em indivíduos com SM e, assim como o estresse oxidativo, pode também estar envolvido na fisiopatologia deste transtorno de humor (PAN et al., 2012; PYYKKONEM et al., 2012; GRAGNOLI, 2014).

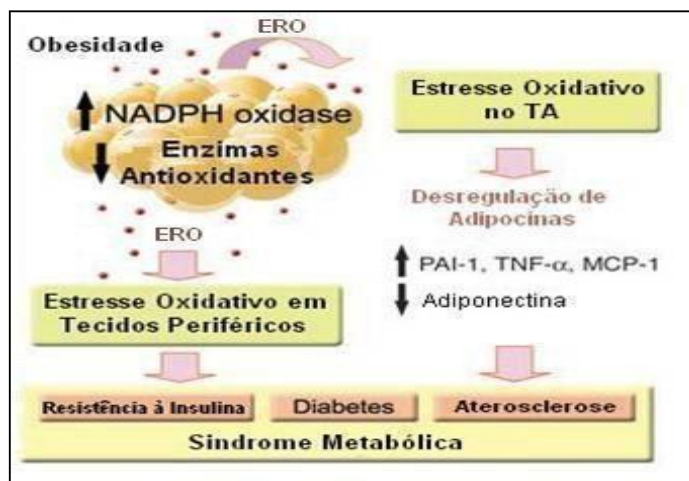


Figura 4- Esquema ilustrando como o aumento da produção espécies reativas de oxigênio (ERO) no tecido adiposo está correlacionado com aumento de marcadores inflamatórios e desenvolvimento da síndrome metabólica (Adaptado de FURUKAWA et al., 2004).

3.3. Síndrome Metabólica e Frutos Vermelhos

Os frutos vermelhos como o mirtilo (*Vaccinium sp.*), amora silvestre (*Rubus sp.*), groselha preta (*Ribes nigrum*) e vermelha (*Ribes uva-crispa*), uva (*Vitis vinifera*), framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) e preta (*Rubus occidentalis*) são uma importante fonte de micronutrientes e compostos fitoquímicos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo as doenças cardiovasculares (SEERAM, 2008; SZAJDEK & BOROWSKA 2008; BASU & LYONS 2012). Dentre os compostos presentes nestes frutos, destacam-se os polifenóis, tais como flavonóides, taninos condensados, taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos seus altos níveis e sua ampla diversidade (FERREIRA et al., 2010; HIRSCH, 2011).

Estes frutos são importantes componentes da nossa dieta diária e por apresentarem vários compostos bioativos são utilizados em terapias tradicionais para o tratamento de várias patologias, incluindo diabetes, obesidade e SM (DEVALARAJA et al., 2011). O efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, as propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante (CHERNIACK, 2011).

O mirtilo é um fruto silvestre do gênero *Vaccinium* que pertence à família das Ericáceas (Figura 5), sendo um fruto de clima temperado que apresenta grande importância comercial, especialmente nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (FACHINELLO, 2008). No Brasil, seu consumo está vinculado aos conceitos de saúde e sofisticação. Sua disponibilidade, versatilidade e variedade de formas de apresentação, permitem que seja incorporado em uma ampla variedade de formulações durante quase todo o ano (PAYNE, 2005). O Rio Grande do Sul é o estado com maior destaque na produção de mirtilo, ocupando uma área de 65 ha e produção aproximada de 150 toneladas (FACHINELLO, 2008). As primeiras plantas foram trazidas em 1980, pela EMBRAPA - Clima Temperado (Pelotas – RS) oriundas da Universidade da Flórida (Estados Unidos). O plantio comercial iniciou em 1990, na cidade de Vacaria (RS) (HOFFMAN & ANTUNES, 2004).



Figura 5- Fruto de mirtilo (*Vaccinium virgatum*) (PERTUZATTI, 2009).

Os frutos de mirtilo têm despertado a atenção dos pesquisadores devido aos seus efeitos positivos na promoção da saúde e na prevenção de algumas patologias. O efeito benéfico tem sido atribuído a uma ampla variedade de compostos bioativos, principalmente de antocianinas (LIU et al., 2002; GIOVANELLI & BURATTI de 2009; YOU et al., 2011). Dentre as antocianinas presentes no mirtilo destacam-se a petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-galactosídeo e a malvidina-3-glicosídeo (BELITZ & GROSCH, 1997).

Estudos epidemiológicos revelam que compostos produzidos pelo metabolismo secundário vegetal, tais como antocianinas, flavonóides e outros compostos fenólicos apresentaram resultados benéficos em alterações presentes na SM devido as ações antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva, anti-hipertensiva, anti- hiperlipidêmica e hipoglicemiante (MARY et al., 2009; BRONEEL et al., 2010; PAREDES - LOPEZ et al., 2010; OSAMA et al., 2011; KUMAR et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que extratos de frutos de mirtilo contêm várias substâncias ativas que podem reduzir as complicações presentes na SM (TSUDA et al., 2003; MARTINEAU et al., 2006; LEE et al., 2014). DEFURIA e colaboradores (2009) relataram efeitos favoráveis do mirtilo sobre a DM2 em modelos animais. Estes pesquisadores verificaram que em ratos alimentados com elevada quantidade de gordura e suplementados com mirtilo ocorreu uma diminuição da RI e de citocinas pró-inflamatórias, comparativamente com os ratos alimentados apenas com uma dieta rica em gordura. Além disto, as antocianinas presentes no mirtilo melhoraram o perfil lipídico e reduziram a concentração de colesterol tota (CT) aumentando a excreção fecal de ácidos e esteróis neutros em animais alimentados com uma dieta rica em colesterol (LIANG et al., 2013). Ainda, extratos de frutos de mirtilo demonstraram proteção contra o estresse oxidativo observado em diferentes condições patológicas, uma vez que os compostos fenólicos presentes inibiram a peroxidação lipídica, quando comparados a outros antioxidantes. (KONG et al., 2003; BAGCHI et al., 2004; MOSKAUG et al., 2005).

Estudos em modelos animais e em culturas de células com o objetivo de modular a resposta inflamatória utilizando antocianinas observaram inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-8 (IL-8), PAI-1, IL-1, IL-6, TNF- α e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (TESUDA et al., 2002; HERATH et al., 2003; LEE et al., 2014). O aumento na produção destas citocinas e o estresse oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia de uma variedade de doenças, dentre elas a SM e a depressão (ZEUGMANN et al., 2010; PYYKKONEN et al., 2012; RYBKA et al., 2013). KUMAR e colaboradores (2012) demonstraram propriedades antidepressivas de extrato de mirtilo em animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo

estresse crônico, o que pode ser atribuído à inibição de óxido nítrico no cérebro. Esta molécula atua como segundo mensageiro e tem sido implicada na neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizado, agressividade e depressão (KUMAR et al., 2012). Em outro estudo, PAPANDREOU e colaboradores (2009) avaliaram a administração de extratos de mirtilo em camundongos submetidos a testes de desempenho cognitivo. Os pesquisadores demonstraram que a suplementação com estes extratos está intimamente relacionada com a inibição da atividade da acetilcolinesterase, aumento da proteção contra os danos oxidativos, aumento dos níveis de GSH e ascorbato no córtex cerebral e uma melhora significativa na aprendizagem e memória quando comparados ao grupo controle.

Vários estudos científicos têm demonstrado os efeitos benéficos do mirtilo em várias patologias, tais como doenças neurológicas e neuropsiquiátricas, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, dentre outras. Neste sentido, estes estudos podem definir a importância do consumo destes frutos ou de seus derivados na modulação de biomarcadores específicos de estresse oxidativo subjacentes à SM (BASU & LYONS, 2012).

PARTE III

Capítulo 1

Manuscrito

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito.

Blueberry as important auxiliary on biochemical and behavioral alterations raised in an animal model of metabolic syndrome

Pathise Souto Oliveira¹, Marta Gazal², Natália Porto Flores¹, Aline Rigon Zimmer³, Flávio Henrique Reginatto⁴, Vitor Chaves⁴, Manuella Pinto Kaster⁵, Rejane Giacomelli Tavares¹, Roselia Maria Spanevello⁶, Claiton Leoneti Lencina¹, Francieli Moro Stefanello^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento – Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁵Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Córrego Grande, 88040900, Florianópolis, SC, Brazil.

⁶Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil

Phone: 55 53 32757355

Fax: 55 53 32757354

Email: fmstefanello@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of blueberry fruit extract on metabolic, behavioral and oxidative parameters in the hippocampus and cerebral cortex of mice submitted to an experimental model of MetS induced by a highly palatable diet (DHP). Mice C57/BL6 were divided into 4 experimental groups: (1) received standard chow and saline orally, (2) received standard chow and blueberry hydroalcoholic extract (200 mg/kg, p.o), (3) received DHP and saline orally, (4) received DHP and blueberry hydroalcoholic extract (200 mg/kg, p.o). The animals were treated for 150 days. Our results showed that the animals treated with DHP presented insulin resistance, increased body weight, visceral fat, glucose, triglycerides, and total cholesterol when compared to control group. However, the blueberry extract prevented the increase in these metabolic parameters. Similarly, the blueberry extract was able to reduce the levels of thiobarbituric acid reactive substances in the cerebral cortex and hippocampus of animals submitted to DHP. In contrast, no differences were observed in the total thiol content, activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. In addition, the DHP fed animals showed a significant increase in immobility time in the forced swimming test and blueberry prevented this alteration. However, no changes were observed in the ambulatory behavior, as well as anxiolytic profile of these animals. Overall, our findings suggest that chronic consumption of blueberry extract exhibit hypoglycemic, lipolipidemic, antidepressant-like and antiperoxidative effects in an animal model of MetS.

Keywords: Metabolic Syndrome. Blueberry. Phenolic Compounds. Metabolic parameters. Neurochemical parameters.

1. Introduction

Obesity is a chronic pathological condition characterized by accumulation adipose tissue associated with an increased risk of multiple morbidities and mortality [1-3]. Further, the obesity is causally linked to metabolic syndrome (MetS), a cluster of factors including insulin resistance, increased abdominal fat, dyslipidemia and hypertension [4]. MetS is also characterized by low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in association with elevated triglyceride levels that commonly precedes the development of type 2 diabetes and heart disease [4,5]. Furthermore, the increase in plasma free fatty acids (FFA) concentrations in normal subjects to levels comparable to those observed in obese individuals also induces oxidative stress, inflammation and subnormal vascular reactivity [6].

Abnormally high levels of free radicals and the loss of antioxidant defense mechanisms lead to damage to the cellular organelles and enzymes, increased lipid peroxidation, DNA damage, and protein derivatives, the development of insulin resistance, depression and neurobehavioral and cognitive deficit [2,7-10]. Epidemiological studies reveal that bioactive compounds produced by the secondary metabolism of plant foods as anthocyanins, flavonoids and other phenolic compounds show multiple biological functions including antioxidant, anti-inflammatory, anti-hypertensive, anti-hyperlipidemic and hypoglycemic [11-14]. Blueberries (*Vaccinium sp*) are known to contain high levels of anthocyanins, flavonoids and phenolic compounds [15-17]. Extracts of roots, stems, leaves and fruits of blueberry contain several active ingredients that may reduce complications of diabetes and obesity [18-20]. In addition, these extracts have demonstrated protection against damage from oxidative stress in different pathologic conditions, such as cardiovascular disorders, advancing age-induced oxidative stress inflammatory responses, degenerative diseases, and to trigger genetic signaling in promoting human health and disease prevention [21-24].

Some authors demonstrated that animals supplemented with blueberry fruit have decreased weight gain and food intake, improvement in cognitive and motor performance and protection of short-term memory decline [25-27].

Moreover, blueberry supplementation prevented the development of impairments in neurochemistry, synaptic transmission and behavior in rodent models of brain aging [28,29].

In animals and humans, symptomatic features of MetS are linked to consumption of high-carbohydrate diets, inducing inflammation, oxidative stress and cognitive disorders. In this respect, we assessed the effects of blueberry extracts on lipid and glycemic profile, oxidative stress and behavioral parameters in mice fed with a highly palatable diet.

2. Materials and Methods

Chemicals and Procedures

All reagents were purchased from Sigma Chemical Company® (St. Louis, MO, USA). All solvents were purchased from Vetec® AG (Rio de Janeiro, Brazil). All reagents were of analytical grade.

Extraction

Vaccinium virgatum fruits was harvested in orchard at Federal University of Pelotas (31°48'12.48"S and 52°30'34.08"W). The extracts were prepared according Bordignon et al. [30], with modifications. Unprocessed freeze rabbiteye blueberry fruits (30 g) were sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL 70:30 v/v ethanol-water. The pH solution was adjusted to 1.0. After, the crude extracts were filtered; the ethanol evaporated under reduced pressure and the remaining aqueous solution was lyophilized yielding the tested samples. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

Total flavonoid content

The total flavonoid content in samples was determined according to Miliauskas et al. [31] with minor modifications. The calibration curve was prepared by mixing aliquots of 1 mL of an ethanolic solution of rutin in concentrations of 100, 150, 200, 300, 450 and 500 µg/mL with 1 mL of an ethanolic solution of 20 g/L aluminum chloride and diluted with 25 mL of ethanol. The absorptions were measured at 415 nm after 40 min. These readings were used to draw the calibration curve. The absorption of each

blueberry sample was measured under the same conditions. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of rutin per 100 g of fresh fruit and 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate.

Total phenolic content

The total phenolic content was determined according to Singleton et al. [32] with slight modifications. The calibration curve was first prepared by mixing 125 mL aliquots of an ethanolic solution of gallic acid in concentrations of 100, 150, 200, 300, 450 and 500 $\mu\text{g/mL}$, 500 μL of distilled water and 125 μL of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min 1.25 mL of a 7% solution of sodium carbonate was added and 1 mL of distilled water making a final volume of 3 mL. The readings were performed after 90 min. on a wavelength of 760 nm. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of gallic acid per 100 g of fresh fruit and 1 g of dried extract. All analyses were carried out in triplicate.

Total anthocyanin content

Anthocyanins were quantified by the pH differential method [33,34]. Calculation of the anthocyanin concentration was based on cyanidin 3-glucoside in molar extinction coefficient of 26.900 and molecular weight of 449.2 g/mol. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside per 100 g of fresh fruit and 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate.

Animals and drug treatments

Male C57/BL6 mice 21 days (25-30g) maintained at 21-25°C with free access to water and food, under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) were used throughout this study.

Mice were divided into four groups: (1) normal diet group (ND) + vehicle, which received standard laboratory rat chow (50% carbohydrate, from starch, 22% protein and 4% fat) and saline orally; (2) ND + blueberry, which received standard laboratory rat chow (50% carbohydrate, from starch, 22% protein and 4% fat) and 200 mg/kg/day of blueberry orally; (3) highly palatable diet group

(HPD) + vehicle, which received a enriched sucrose diet (65% carbohydrates being 34% from condensed milk, 8% from sucrose and 23% from starch, 25% protein and 10% of fat) and saline orally (4) HPD + blueberry, which received a enriched sucrose diet (65% carbohydrates being 34% from condensed milk, 8% from sucrose and 23% from starch, 25% protein and 10% of fat) and 200 mg/kg/day of blueberry orally. All animals had free access to food and water. The HPD protocol was performed according to the method described by Souza et al. [35]. The dose of blueberry extract used in this study was chosen according to Leibowitz et al. [36].

The experiments were performed after approval by the Ethics Committee of the Institution (CEEA n° 10265) and all efforts were made to minimize animal suffering.

Body weight gain and food intake

Changes in body weight and food intake patterns of mice were measured throughout the experimental period. The weight of each mouse was recorded on day 0 and at weekly intervals throughout the course of the study. The quantity of food consumed by each group was recorded weekly, and the food consumption per mouse was calculated for all groups.

Sample collection and biochemical assay

After 150 days of food and extract administration and 24 hours after the last behavioral test, the animals of all groups were sacrificed by decapitation after 6 h of fasting. At sacrifice, visceral fat was weighed and the blood collected. Serum was obtained by centrifugation at 4000 rpm (4°C) for 15 min. Cerebral cortex and hippocampus were collected and stored at -80°C for subsequent biochemical analyzes.

Glucose tolerance test

Mice were injected intraperitoneally with 50% glucose solution load of 2 mg/g of body weight. The glucose levels for all the groups were estimated by the glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA) at 30, 60, and 120 min after the injection by a small tail puncture.

Biochemical parameters

Measurements of serum glucose, total cholesterol and triglyceride levels were determined using commercially available diagnostic kits supplied by Labtest® (Labtest, MG, Brazil).

Behavioral analysis

All behavioral experiments were conducted between 9 a.m. and 6 p.m. under low-intensity light. All apparatuses were cleaned with a 10% ethanol solution and then dried with a paper towel after each trial.

Forced Swim Test (FST)

The depressive-like behavior was evaluated by the total duration of immobility in the forced swimming test, as previously described Kaster et al. [37]. Briefly, in the FST, mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter, 10 cm; height, 25 cm), with water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and the total duration of immobility during a 6 min period was scored: mice were judged to be immobile when they ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water.

Open-field Test

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test as previously described by Kaster et al. [38]. The apparatus consisted of a box measuring 40 x 60 x 50 cm with the floor of the arena divided into 12 equal squares and placed in a sound-free room. Animals were placed in the rear left square and left to freely explore it for 8 min during which time the number of squares crossed with all paws (crossing) was counted. The apparatus was cleaned up with a 70% alcohol solution and dried after each individual mouse session.

Elevated plus-maze

The evaluation of anxiety-related behaviors was carried out using the elevated-plus maze [39]. The maze consists of a cross, made of two opposite

closed arms and two opposite open arms (each with 31 cm long, 5 cm wide and 15 cm tall), set up 40 cm above the floor. Mice were placed at the center of the cross and left to explore the apparatus during a total of 5 min. One entry was considered when the mice placed the four paws inside an arm. We recorded the time spent in the open and closed arms, as a measure of anxiety.

Oxidative stress parameters

2.6.1 Tissue preparation

Cerebral cortex and hippocampus was homogenized in sodium phosphate buffer pH 7.4 containing KCl (1:10, w/v). The homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C. Immediately the supernatant was separated and used for biochemical determinations.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Ohkawa et al. [40]. Briefly, tissue supernatant was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm and reported as nmol TBARS/mg protein.

Total thiol content assay

Total thiol content was determined using the DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) method as described by Aksenov and Markesbery [41] with some modifications. Briefly, 50 µL of de sample was mixed with 980 µL of PBS, pH 7.5, containing 1mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 µL of 10 mM DTNB stock solution in PBS. The amount of TNB formed was determined at 412 nm. The results were reported as nmol of TNB/ mg protein.

Catalase (CAT) assay

CAT activity was assayed according to Aebi [42] based on the decomposition of H₂O₂ monitored at 240 nm at ambient temperature. One CAT unit is defined as one µmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is reported as units/mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich [43]. This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

Protein determination

Protein was determined by the method of Lowry [44] using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Glucose tolerance was analyzed by Repeated Measures analyses of variance (ANOVA) and Bonferroni's *post-hoc* test. Parametric variables were tested by Two-Way ANOVA and Bonferroni's *post-hoc* test. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be significant. Analyses were performed using the software GraphPad PRISM 5®.

3. Results

3.1. Total phytochemical determination

Total content of anthocyanins in rabbiteye blueberry was 13.03 ± 0.44 mg/g of dried extract and 76.86 ± 2.56 mg/100 g of fresh fruit. Regarding total content of flavonoids, we obtained 156.52 ± 4.86 mg/g of dried extract and 923.47 ± 28.67 mg/100 g of fresh fruit. In addition, the total content of phenolic acid was 302.70 ± 8.13 mg/g of dried extract and 1785.93 ± 47.97 mg/100 g of fresh fruit.

Metabolic parameters

Table 1 shows that there were no significant differences in the initial weight of the animals of all groups (blueberry treatment: $[F(1,35) = 3.52, P=0.07]$, diet: $[F(1,35) = 1.32, P=0.26]$, interaction: $[F(1,35) = 4.20, P<0.05]$).

However, treatment with blueberry (200 mg/kg, p.o.) reduced the weight gain of the animals fed with the ND, as well as HPD (blueberry treatment: $[F(1,33) = 49.14, P<0.001]$, diet: $[F(1,33) = 31.90, P<0.001]$, interaction: $[F(1,33) = 4.86, P<0.05]$) and reduced visceral fat (blueberry treatment: $[F(1,28) = 34.28, P<0.001]$, diet: $[F(1,28) = 316.01, P<0.001]$, interaction: $[F(1,28) = 9.56, P<0.05]$).

Additionally, blueberry treatment prevented the increase in serum glucose levels (blueberry treatment: $[F(1,36) = 53.61, P<0.001]$, HPD: $[F(1,36) = 52.02, P<0.001]$, interaction: $[F(1,36) = 36.57, P<0.001]$), triglycerides (blueberry treatment: $[F(1,11) = 7.10, P<0.05]$, HPD $[F(1,11) = 6.89, P<0.05]$, interaction: $[F(1,11) = 38.87, P<0.001]$) and total cholesterol (blueberry treatment) $[F(1,14) = 1.09, P=0.31]$, HPD $[F(1,14) = 56.46, P<0.001]$, interaction: $[F(1,14) = 8.69, P<0.05]$) caused by HPD.

To address insulin resistance, we performed the glucose tolerance test. As can be seen in Fig. 1, the impairment in glucose tolerance induced by HPD was prevented by blueberry treatment ($P<0.05$).

The depressant-like effect of highly palatable diet in the FST is prevented by chronic consumption of blueberry extract

As shown in Fig. 2A, mice submitted to a HPD exhibited a significant increase in immobility time in the FST as compared to control animals, an indicative of a depressive-like state. Chronic treatment with blueberry extract prevented the increase in immobility time (blueberry treatment: $[F(1,31) = 5.19, P<0.05]$, HPD: $[F(1,31) = 7.04, P<0.05]$, interaction: $[F(1,31) = 5.05, P<0.05]$).

In order to rule out nonspecific motor effects that could influence activity in the FST, mice were also submitted to the open-field test (Fig. 2B). No significant alteration in the ambulatory behavior was observed in the open-field test, suggesting that the effect of blueberry consumption in the FST are not related to changes in the locomotor activity (blueberry treatment: $[F(1,35) = 2.99, P=0.09]$, HPD: $[F(1,35)=0.22, P=0.64]$, interaction: $[F(1,35)=1.05, P=0.31]$).

Anxiogenic profile of mice submitted to highly palatable diet and chronic blueberry consumption in the elevated plus-maze

No differences were found in the anxiogenic profile (time spent in the open arm of the elevated plus maze; see Fig. 3A (blueberry treatment: $[F(1,34) = 0.65, P=0.43]$, HPD: $[F(1,34) = 0.03, P=0.87]$, interaction: $[F(1,34) = 0.06, P=0.81]$), or number of open arm entries; (Fig. 3B) of mice submitted to the HPD e/or blueberry consumption (blueberry treatment: $[F(1,34) = 0.80, P=0.38]$, HPD: $[F(1,34)=0.17, P=0.68]$, interaction: $[F(1,34)= 0.48, P=0.49]$). The absence of ambulatory behavior alterations was further confirmed in the plus-maze apparatus since no change was found in the total number of entries between groups (Fig. 3C) (blueberry treatment: $[F(1,34) = 0.30, P=0.58]$, HPD: $[F(1,34)=1.07, P=0.30]$, interaction: $[F(1,34)= 0.34, P=0.56]$).

Measurement of oxidative stress parameters in the cerebral cortex and hippocampus

Fig. 4A shows that blueberry treatment was able to prevent the increase in TBARS levels induced by HPD in the cortex (blueberry treatment: $[F(1,35)=19.63, P<0.001]$, HPD: $[F(1,35)=1.39, P=0.24]$, interaction: $[F(1,35)=12.15, P<0.01]$). The sulfhydryl content (Fig. 4B) and the activity of the antioxidant enzymes CAT (Fig. 4C) and SOD (Fig. 4D) were not different in the HPD or in the group treated with blueberry extract.

Also, we evaluated the effects of blueberry on oxidative stress parameters in the hippocampus. Likewise, blueberry treatment (200 mg/kg, p.o.) was able to prevent the increase in TBARS levels induced by HPD (Fig. 5A) (HPD: $[F(1,15)=1.80, P<0.05]$, blueberry treatment: $[F(1,15)=5.40, P<0.05]$, interaction: $[F(1,15) = 8.60, P<0.01]$), without interfering in the sulfhydryl content (Fig. 5B) (blueberry treatment: $[F(1,15)=0.34, P=0.57]$, HPD: $[F(1,15)=4.43, P<0.05]$, interaction: $[F(1,15)=1.76, P=0.20]$), CAT activity (Fig. 5C) (blueberry treatment: $[F(1,14) = 2.22, P=0.16]$, HPD: $[F(1,14) = 0.22, P=0.64]$, interaction: $[F(1,14) = 8.60, P=0.08]$) or SOD activity (Fig 5D) (blueberry treatment: $[F(1,11) = 7.20, P =0.21]$, HPD: $[F(1,11) = 0.73, P=0.41]$, interaction: $[F(1,11) = 2.98, P=0.11]$).

4. Discussion

The present study investigated the ability of blueberry extract to improve some biochemical and behavioral parameters related to the pathogenesis of the MetS, in particular, blood lipid and glycemie profile, oxidative stress and depressive-like behavior.

The HPD-induced changes in biochemical parameters (insulin resistance, glucose, cholesterol and triglycerides) and the lipid peroxidation (TBARS) were significantly prevented by the treatment with blueberry extract. However, no significant effect was observed on the total thiol content, SOD or CAT activity after treatment with blueberry extract.

It must be noted that recent studies have not confirmed this biochemical effects in humans. BASU et al. [45] demonstrated that the consume of freeze-dried blueberry beverage daily for 8 weeks in a randomized controlled trial decreased the systolic and diastolic blood pressures, without affecting serum levels of glucose and lipid profiles. On other hand, another interventional study with hyperlipidemic adults receiving of anthocyanins (fruit extract) or placebo capsules twice a day for 4 weeks demonstrated that the fruit extract significantly reduced total cholesterol [46]. Anthocyanins such as cyanidin-3-glucoside have been shown *in vitro* to regulate the expression and activity of key enzymes involved in lipid metabolism including LPL, fatty acid synthase and ABCA1. These findings might explain the observed effects of blueberry consumption on lipid profile [47]. Phenolic acids and flavonoids are also important phytochemical classes in MetS combating. The antiobesity, hipolipidemic properties of phenolic acids, as gallic acid, and their ability to reduce oxidative stress in animal models have been shown [48,49]. Moreover, coumaric acid can reduce weight as well as serum cholesterol, triacylglycerol, insulin and leptin [49,50]. In turn, flavonoids, as quercetin, have also potential antiobesity effects through inhibition of preadipocytes differentiation and induction of apoptosis of mature adipocytes [49, 51]. There are also reports rutin can reduce the blood levels of insulin and leptin, as well as, inhibit glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an enzyme linked to glycerol and triacylglycerol conversion in adipose tissue and liver [50].

Many dietary polyphenols are antioxidants that can protect against oxidative damage by directly neutralizing reactive oxidants [48]. Reactive oxygen species (ROS) are unavoidable products during normal intracellular metabolism. They play essential roles in cell differentiation, proliferation, and host defense response. However, ROS can cause oxidation of DNA, proteins and lipids [52]. As a result, the action of reactive species can lead to the destruction of cell membrane permeability and cellular dysfunction, related neurodegenerative diseases and MetS [53-55].

In this study we evaluated the activity of the enzymes SOD and CAT in cerebral cortex and hippocampus of animals subjected to HPD and treated with blueberry extract, since that the enzymatic antioxidant defenses help to control reactive species levels protecting the cells against oxidative damage [52]. However, no significant differences in the activity of these enzymes were observed in any of the groups tested. Similarly, no significant differences were found in total thiol content in the studied tissues, which is a biomarker to oxidative damage to proteins. In contrast, a study performed by SINHA and collaborators [56] with obese rats presenting all components of the MetS verified a significant decrease in SOD and CAT activity in the cerebral cortex, indicating that the components present in the MetS may be involved in the decrease in antioxidant defenses. Furthermore, studies suggest that increase in energy intake can induce oxidative stress and higher ROS production in adipocytes [57-60]. Accordingly, our study indicated that TBARS levels, a lipid peroxidation biomarker, had a significant increase in cerebral cortex and hippocampus of animals subjected to HPD. These results suggest that higher energetic intake can be involved in this oxidative damage.

Alternatively, chronic ingestion of blueberry in animals subjected to HPD prevented the increase in TBARS levels on studied tissues. Indeed, blueberry fruit extract is protective against oxidative stress damages in different pathological conditions indicating it could be a potent inhibitor of lipid peroxidation when compared to other classic antioxidants [21-24]. These positive effects have been attributed to anthocyanins, flavonoids and other phenolic presence [15-17]. We further reinforce that the present study evaluated

the effects of the whole berry and at this point we are not able to determine the specific contribution of the isolated polyphenols.

Our study shows that MetS induces lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus of mice. Indeed, some data show that oxidative stress in several brain regions may play a role in the pathogenesis of depression [61-63]. In addition, it has been demonstrated an association between depression and MetS [64,65]. To confirm this hypothesis, we investigated whether depressive behavior is elicited by HPD consumption and the influence of blueberry treatment. Our findings demonstrate that mice exposed to a MetS model presented a depressive-like behavior in FST and administration of blueberry extract prevented this effect. Furthermore, no significant changes in the ambulatory behavior were observed in animals submitted to the open field test, which suggests that the effect of blueberry intake on the FST is specific and not related to alterations in locomotor activity. The *Vaccinium* genus demonstrated antidepressant properties in stressed mice, possibly by modulation of nitric oxide signaling pathway [24].

Herein we also demonstrate that despite the absence of effects in the anxiolytic profile, animals subjected to HPD had a significant increase in immobility time on FST. In addition to oxidative damage, the depressive-like behavior observed in our data may be explained due to the fact that individuals with MetS show elevated levels of proinflammatory cytokines [66]. Additionally, high concentrations of insulin and C-reactive protein in depressed individuals seem to be important indicators that reinforce the hypothesis of an interaction between depression and MetS [67].

In summary, our results suggest that in this animal model treatment with blueberry extract produces antidepressant-like and antiperoxidative effects, besides it alters body composition in association with improvement in glucose and lipid profiles. Therefore, these data may contribute to the development of new pharmacological intervention in patients with MetS.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from “Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul” (FAPERGS), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

References

- [1] C.L. Ogden, M.D. Carroll, L.R. Curtin, M.A. Mcdowell, C.J. Tabak, K.M. Flegal, Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004, *JAMA*, 295 (2006) 1549-55.
- [2] B.E. Cumurcu, H. Ozyurt, I. Etikan, S. Demir, R. Karlidag, Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment, *Psychiatry Clin Neurosci*, 63 (2009) 639-645.
- [3] K.M. Flegal, M.D. Carroll, C.L. Ogden, R. Curtin, Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*, 303 (2010) 235-241.
- [4] I. Mayuko, K. Shigeko, T. Koichi, M. Sachiko, K. Mai, H. Eri, et. al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr Res*, 33 (2013) 397- 405.
- [5] E. R. Diana, K. Peter, E. Leonel, M. A. L. Rojo, R. Ilya, Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice, *Pharmacol Res*, 68 (2012) 59-67.
- [6] D. Tripathy, P. Mohanty, S. Dhindsa, T. Syed, H. Ghanim, A. Aljada, P. Dandona, Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects, *Diabetes*, 52 (2003) 2882-2887.
- [7] I.C. West, Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabet Med*, 17 (2000) 171-180.
- [8] R. Cruz-Aguado W. Almaguer-Melian, C.M. Díaz, L. Lorigados, J. Bergado, Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain, *Brain Res Bull*, 55 (2001) 327-333.
- [9] A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J Biochem Mol Toxicol*, 17 (2003) 24-38.

- [10] Y.C. Shi, T.M. Pan. Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review, *Appl Microbiol Biotechnol*, 94 (2012) 47-55.
- [11] H.G. Mary, M.R. David, K., Peter, P. Alexander, L. Sithes, G. Gad, N.H. Grace, D.M. Ribnicky, P. Kuhn, A. Poulev, S. Logendra, G.G. Yousef, I. Raskin, M.A. Lila. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton, *Phytomed*, 16 (2009) 406-415.
- [12] M. Broneel, M. Kozirog, P. Duchnowicz, Aroniamelanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker level in patients with metabolic syndrome, *Med Sci Monit*, 16 (2010) CR28-34.
- [13] O. Paredes-Lopez, M.L. Cervantes-Ceja, M. Vigna-Perez, T. Hernandez-Perez, Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life, *Plant Food Hum Nutr*, 65 (2010) 299-308.
- [14] M.A. Osama, A.E. Ahmed, M.A. Abdulrahman, M.A.M. Ameen, A.N. Ayman, B., Ashraf, O.M. Ashour, A.A. Elberry, A. Alahadal, A.M. Al Mohamedi, A.A. Nagy, A.B. Abdel-Naim, E.A. Abdel-Sattar, A.M. Mohamadi Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Med Sci Monit*, 17 (2011) 110-115.
- [15] X. Liu, Z. Chen, C.C. Chua, Melatonin as an effective protector against doxorubicin induced cardiotoxicity, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283 (2002) H254-H263.
- [16] G. Giovanelli, S. Buratti, Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties, *Food Chem*, 112 (2009) 903-908.
- [17] Q. You, B.W. Wang, F. Chen, Z.L. Huang, X. Wang, P.G. Luo, Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars, *Food Chem*, 125 (2011) 201-208.
- [18] T. Tsuda, F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, T. Osawa, Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice, *J Nutr*, 133 (2003) 2125- 2130.
- [19] L.C. Martineau, A. Couture, D. Spoor, A. Benhaddou-Andaloussi, C. Harris, B. Meddah, C. Leduc, A. Burt, T. Vuong, P. Maile, M. Prentki, S.A. Bennett, J.T.

- Arnason, P.S. Haddad, Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium*, *Phytomed*, 13 (2006) 612-623.
- [20] R. Sasaki, N. Nishimura, H. Hoshino, Y. Isa, M. Kadowaki, T. Ichi, A. Tanaka, S. Nishiumi, I. Fukuda, H. Ashida, F. Horio, T. Tsuda, Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to down regulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice, *Biochem. Pharmacol*, 74 (2007) 1619- 162.
- [21] J.M. Kong, L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia, R. Brouillard, Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochem*, 64 (2003) 923-933.
- [22] D. Bagchi, C.K. Sen, M. Bagchi, M. Atalay, Antiangiogenic, antioxidant, and anticarcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula, *J. Biochem*, 69 (2004) 95-102.
- [23] J.O. Moskaug, H. Carlsen, M.C. Myhrstad, R. Blomhoff, Polyphenols and glutathione synthesis regulation, *Am J Clin Nutr*, 81 (2005) 277S- 283S.
- [24] B. Kumar, V. Arora, A. Kuhad, K. Chopra, *Vaccinium myrtillus* Ameliorates Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression: Possible Involvement of Nitric Oxide Pathway, *Phytother Res*, 26 (2012) 488-497.
- [25] M.R. Ramires, I. Izquierdo, B.R.M. Carmo, J.A. Zunazzi, D. Barros, A.T. Henriques, Effect of lyophilized *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats, *Pharmacol Res*, 52 (2005) 457-462.
- [26] A.L. Molan, M.A. Lila, J. Mawson, Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to *in vitro* or *in vivo* antioxidant capacity, *Food Chem*, 107 (2008) 1039-1044.
- [27] E. Hauser, J.C. Tolentino, E. Pirogovsky, E. Weston, P.E. Gilbert. The effects of aging on memory for sequentially presented objects in rats, *Behav Neurosci*, 123 (2009) 1339-1345.
- [28] C. Andres-Lacueva, B. Shukitt-hale, R.L. Galli, O. Jauregui, R.M. Lamuela-Raventos, J.A. Joseph, Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory, *Nutr Neurosci*, 8 (2005) 111-120.
- [29] J.A. Joseph, B. Shukitt-Hale, F.C. Lau, Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence, *Ann N Y Acad Sci*, 1100 (2007) 470-485.

- [30] C.L. Bordignon Jr., V. Francescato, A.A. Nienow, E. Calvete, F.H. Reginatto, Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciênc Tecn Alim*, 29 (2009) 183-188.
- [31] G. Miliauskas, P.R. Venskutonis, Beek TA. Van, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85 (2004) 231-237.
- [32] V.L. Singleton, R. Orthofer, R. Lamuela-Ranventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods Enzymol*, (Parker L, ed.) Academic Press, Section III, 299 (1999) 152-159.
- [33] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: *Curr Prot Food Anal Chem*. (Wrolstad RE, ed.) John Wiley & Sons, New York, units (2001) F1.2.1-F1.2.13.
- [34] J. Lee, R.W. Durst, R.E. Wrolstad, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int*, 88 (2005) 1269-1278.
- [35] C.G. Souza, J.D. Moreira, I.R. Siqueira, A.G. Pereira, D.K. Rieger, D.O. Souza, T.M. Souza, L.V. Portela, M.L.S. Perry, Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior, *Life Sci*, 81 (2007) 198-203.
- [36] A. Leibowitz, Z. Faltin, A. Perl, Y. Eshdat, Y. Hagay, E. Peleg, E. Grossman, Red grape berry-cultured cells reduce blood pressure in rats with metabolic-like syndrome, *Eur J Nutr*, 53 (2013) 973-980.
- [37] M.P. Kaster, J. Budni, R.W. Binfare, A.R. Santos, A.L. Rodrigues, The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31 (2007) 690-696.
- [38] M.P. Kaster, A.O. Rosa, M.M. Rosso, E.C. Goulart, A.R. Santos, A.L. Rodrigues, Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors, *Neurosci Lett*, 355 (2004) 21-24.

- [39] G.R. Dawson, M.D. Tricklebank, Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents, *Trends Pharmacol Sci*, 16 (1995) 33-36.
- [40] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 95 (1979) 351-358.
- [41] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's diseases, *Neurosci Lett*, 302 (2001) 141-145.
- [42] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol*. 105 (1984) 121-126.
- [43] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J Biol Chem*, 247 (1972) 3170-3175.
- [44] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265-275.
- [45] A. Basu, M. Du, M.J. Leyva, K. Sanchez, N.M. Betts, M. Wu, C.E. Aston, T.J. Lyons, Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome, *J Nutr*, 140 (2010) 1582- 1587.
- [46] R. Soltani, M. Hakimi, S. Asgary, S.M. Ghanadian, M. Keshvari, N. Sarrafzadegan, Evaluation of the Effects of *Vaccinium arctostaphylos* L. Fruit Extract on Serum Lipids and hs-CRP Levels and Oxidative Stress in Adult Patients with Hyperlipidemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014 (2014) 217451.
- [47] S. Vendrame, A. Daugherty, A.S. Kristo, D.K. Zacas, Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats, *Br J Nutr*, 111 (2014) 194-200.
- [48] C.L. Hsu, G.C. Yen, Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms, *Molecular Nutr Food Res*, 52 (2008) 53-61.
- [49] P. Taesun, K. Yunyung, Antiobesity, *Drug Disc Develop* 1 (2011) 14-20, 2011.

- [50] C.L. Hus, C.H. Wu, S.L. Huang, G.C. Yen, Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J Agric Food Chem*, 5 (2009) 53-61.
- [51] S.C. Bischof, Quercetin, Potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11 (2008) 733-740.
- [52] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, New York: Oxford University Press, 2007.
- [53] P.V. Magalhaes, K. Jansen, R.T. Pinheiro, G.D. Colpo, L.L. Motta, F. Klamt, R.A. Silva, F. Kapczinski, Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study, *Int J Neuropsychopharmacol*, 15 (2012) 1043-1050.
- [54] X.Y. Zhang, J.K. Yao, Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 46 (2013) 197-199.
- [55] C. Peng, X. Wang, J. Chen, R. Jiao, L., Wang, Y.M. Li, Y. Zuo, Y. Liu, L. Lei, K.Y. Ma, Y. Huang, Z.Y. Chen, Biology of ageing and role of dietary antioxidants, *Biomed Res Int*, 2014 (2014) 831-841.
- [56] J. K. Sinha, S. Ghosh, U. Swain, N.V. Girdharan, M. Raghunath, Increased macromolecular damage due to oxidative Stress in the neocortex and hippocampus of wnin/ob, a novel rat model of premature aging, *Neurosci*, 269 (2014) 256-264.
- [57] E. Pihl, K. Zilmer, T. Kullisaar, C. Kairane, A. Magi, M. Zilmer, Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes, *Int J Obes (Lond)*, 30 (2006) 141-146.
- [58] Y.S. Diniz, R. M. Burneiko, F.R.F. Seiva, F.Q.A. Almeida, C.M. Galhardi, J.L.V.B. Novelli Filho, F. Mani, E.L.B. Novelli, Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects, *Int J Cardiol*, 124 (2008) 93-99.
- [59] K.E. Wellen, C.B. Thompson, Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess, *Mol Cell*, 40 (2010) 323-332.
- [60] A. Avignon, M. Hokayem, C. Bisbal, K. Lambert, Dietary antioxidants: do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? *Nutr*, 28 (2012) 715-721.

- [61] I. Eren, M. Naziroğlu, A. Demirdaş, Protective effects of lamotrigine aripiprazole and escitalopramon depression-induced oxidative stress in rat brain, *Neurochem Res*, 32 (2007) 1188-1195.
- [62] G. Lucca, C.M. Comim, S.S. Valvassori, G.Z. Reus, F. Vuolo, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E.C. Gavioli, J. Quevedo, Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int*, 54 (2009) 358-362.
- [63] M. Moretti, A. Colla, G. de Oliveira Balen, D.B. dos Santos, J. Budni, A.E. De Freitas, M. Farina, A.L. Severo Rodrigues, Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress, *J Psychiatry Res*, 46 (2012) 331-340.
- [64] S.J. Rhee, E.Y. Kim, S.H. Kim, H.J. Lee, B. Kim, K. Ha, D.H. Yoon, Y.M. Ahn, Subjective depressive symptoms and metabolic syndrome among the general population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 54 (2014) 223-230.
- [65] A. Pan, N. Keum, O. Okereke, Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies, *Diab Care*, 35 (2012) 1171-1180.
- [66] C.A.P. Bullo, C.P. Migo, J. Aranceta, S.J. Salas, Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet, *Public Health Nutr*. 10A (2007) 1164-1172.
- [67] S. Rudolf, W. Greggersen, K.G. Kahl, U.S. Huppe, Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression. *Psychiatry Res*, 217 (2014) 34-38.

Figure Captions

Fig. 1: Glucose tolerance test measured at the baseline (0), 30, 60 and 120 min after glucose injection (2 mg/g body weight). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis were performed with Repeated Measures ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test. * $P < 0.05$ when compared to control group (vehicle/ND)

Fig. 2: Effect of chronic blueberry consumption (200 mg/kg, p.o.) on the highly palatable diet (HPD) in immobility time in the FST (A) and ambulatory behavior in the open-field test (B). The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 9-10$ for group). * $P < 0.05$ when compared to control group (vehicle/ND). # $P < 0.05$ when compared to vehicle/HPD group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test.

Fig. 3: Anxiogenic profile of mice submitted to highly palatable diet (HPD) and chronic blueberry consumption (200 mg/kg, p.o.) in the elevated plus-maze. Time spent in open arms (A), number of opens arm entries (B) and total number of entries (C) in the elevated plus-maze. The results are expressed as percentage of control (mean $\pm$ S.E.M), $n = 9-10$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test.

Fig. 4: Effects of highly palatable diet (HPD) and blueberry (200 mg/kg, p.o.) on TBARS formation (A), total thiol content (B), catalase (CAT, C), and superoxide dismutase (SOD, D) activity in the cerebral cortex of mice. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-10$ for group). ** $P < 0.01$ as compared to the control group. # $P < 0.05$ as compared to vehicle/HPD group.

Fig. 5: Effects of highly palatable diet (HPD) and blueberry (200 mg/kg, p.o.) on TBARS formation (A), total thiol content (B), catalase (CAT, C) and superoxide dismutase (SOD, D) activity in the hippocampus of mice. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 5-10$ for group). ** $P < 0.01$ as compared to the control group. # $P < 0.05$ as compared to vehicle/HPD group.

Table 1. Metabolic parameters of the animals submitted to metabolic syndrome studied after oral administration of blueberry

	ND/Vehicle	ND/Blueberry	HPD/Vehicle	HPD/Blueberry
Initial body weight (g)	16.00 ± 1.33	20.80 ± 0.50	17.10 ± 1.43	16.89 ± 1.41
Final body weight (g)	29.80 ± 0.97	27.40 ± 0.50*	36.22 ± 0.62***	30.75 ± 0.45 [#]
Visceral fat mass (g)	0.54 ± 0.16	0.40 ± 0.01	1.92 ± 0.21***	0.83 ± 0.07 [#]
Glycemia (mg/dL)	82.82 ± 3.98	76.62 ± 3.55	147.3 ± 6.20***	82.29 ± 5.26 [#]
Total cholesterol (mg/dL)	68.01 ± 7.48	79.63 ± 4.91	132.0 ± 4.14*	107.6 ± 6.69 [#]
Triglycerides (mg/dL)	86.18 ± 1.74	97.08 ± 3.32	113.2 ± 3.46***	86.06 ± 3.32 [#]

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n =5-10). (***) Denotes P < 0.001 as compared to the ND/Vehicle control group. (*) Denotes P < 0.05 as compared to the ND/Vehicle control group. ([#]) Denotes P < 0.01 as compared to HPD/Vehicle group.

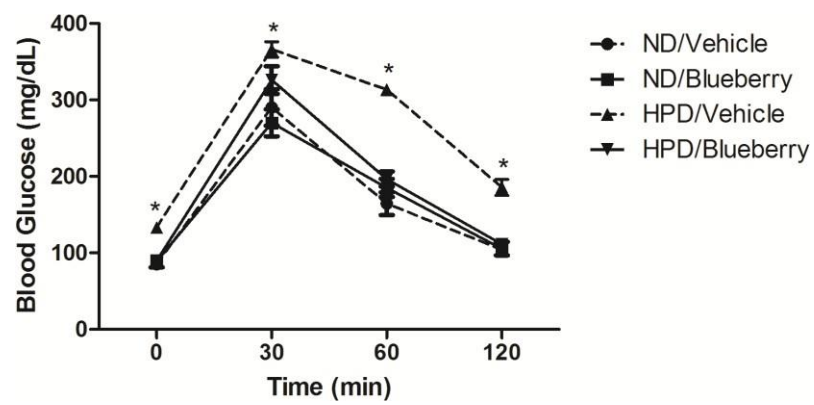
Fig. 1

Fig. 2

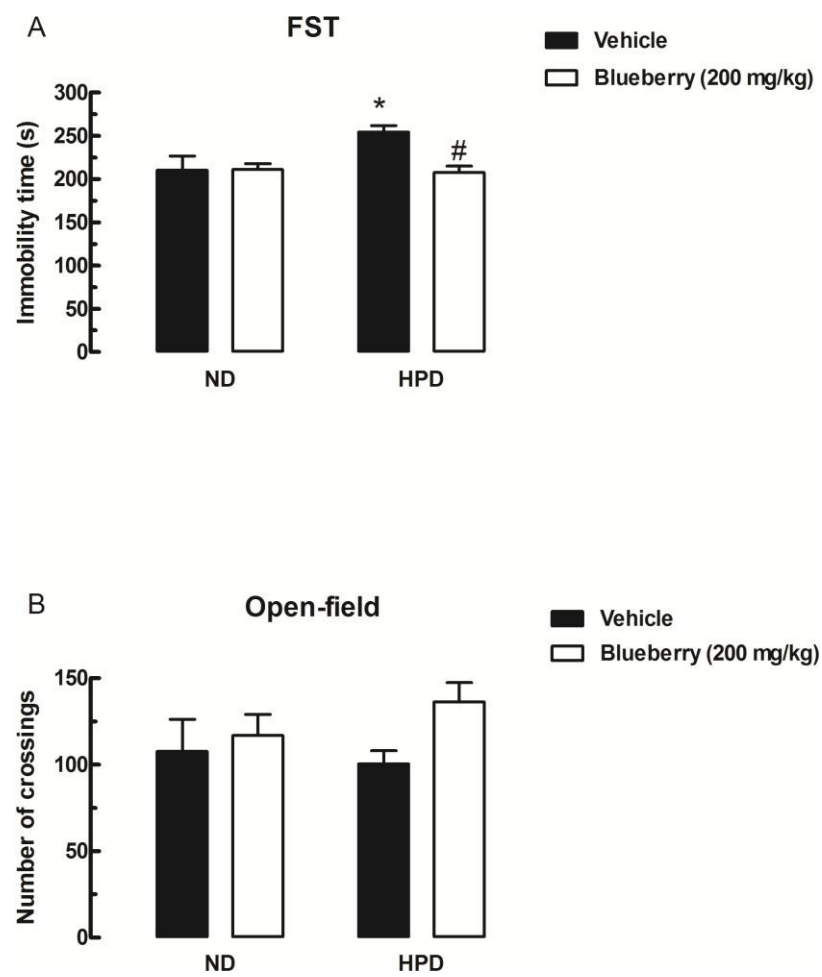


Fig. 3

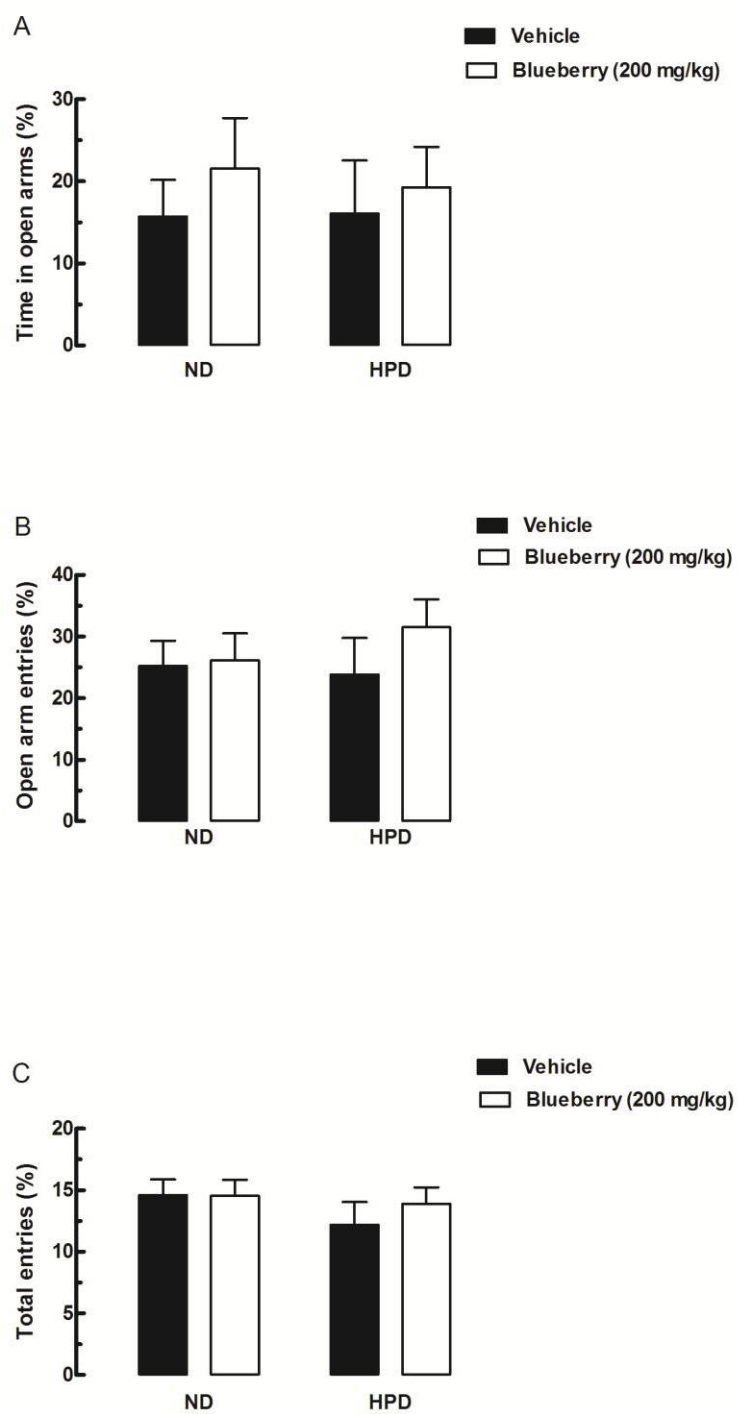


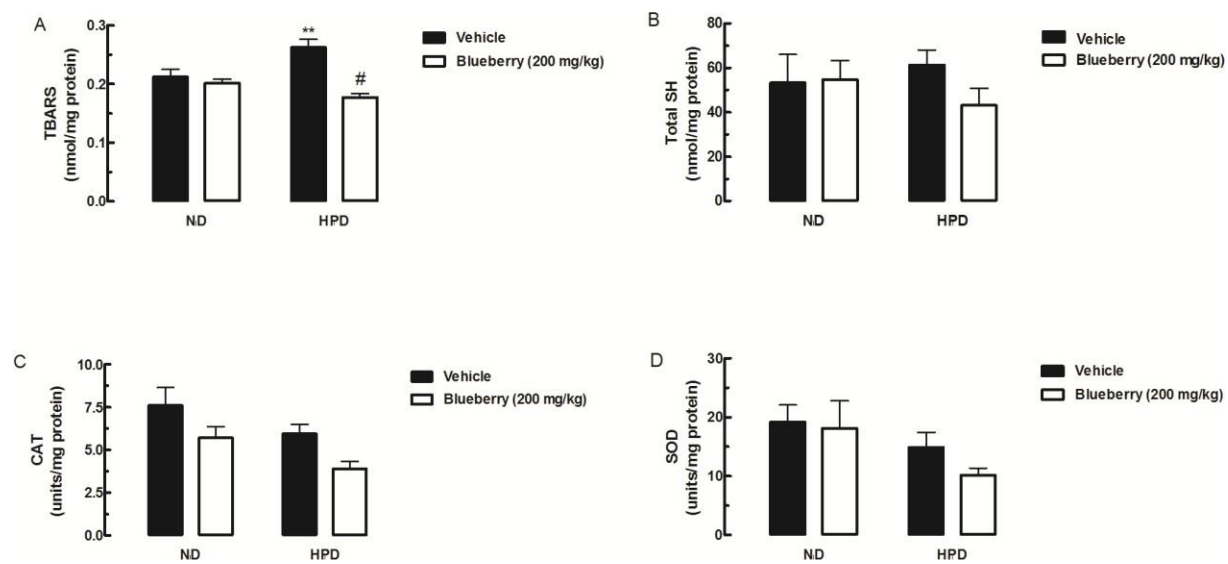
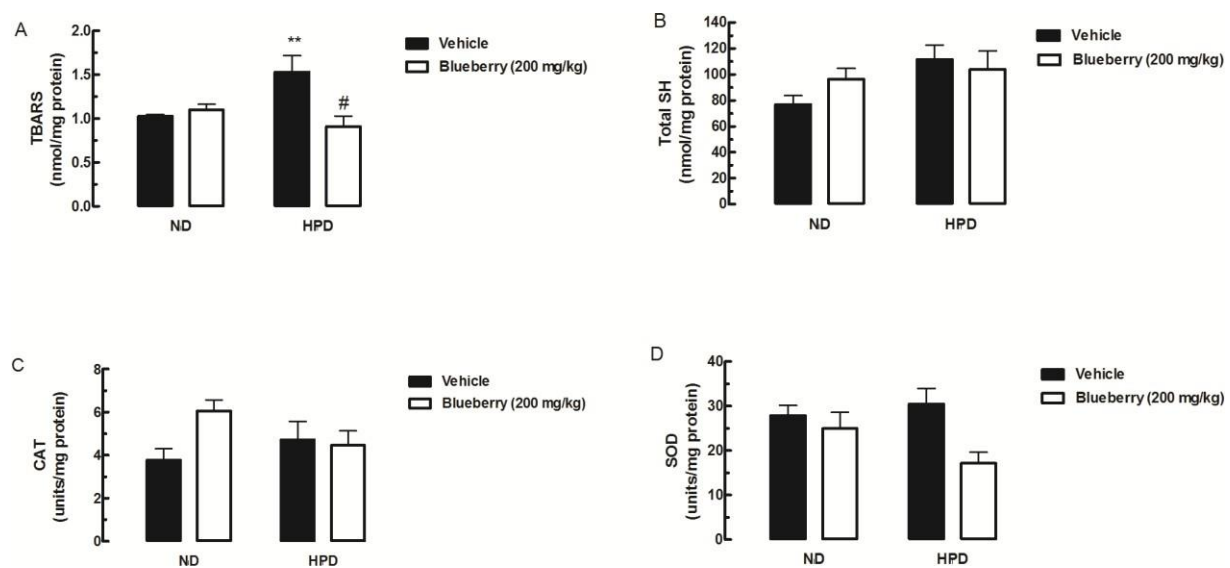
Fig. 4

Fig. 5

PARTE IV

Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos foi possível observar que:

- O consumo da dieta hiperpalatável induziu experimentalmente a SM, uma vez que ocasionou resistência à insulina, aumentou significativamente o peso corporal, gordura visceral, glicemia, triglicerídeos e colesterol total. Além disto, aumentou significativamente a peroxidação lipídica em hipocampo e córtex cerebral, bem como o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao modelo animal.
- A administração crônica de extrato de frutos de mirtilo foi capaz de reduzir significativamente as complicações metabólicas presentes nesta síndrome. Da mesma forma, foi possível observar que a administração de mirtilo protegeu contra o dano oxidativo aos lipídeos em estruturas cerebrais dos animais submetidos ao modelo de SM e apresentou um efeito tipo-antidepressivo.

Em conjunto, nossos achados demonstram que o tratamento com extrato de mirtilo apresenta importantes efeitos sobre a composição corporal bem como sobre parâmetros bioquímicos séricos no modelo de SM estudado. Além disto, este extrato demonstra ação tipo-antidepressiva e antiperoxidativa, podendo assim, ser considerado um agente terapêutico auxiliar para portadores de SM. Dentro deste contexto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos benéficos de extrato de mirtilo nesta desordem metabólica.

Referências

ALBERTI F.G.; ZIMMET P.Z. For the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, p. 539-553, 1998.

ALBERTI, F.G.; ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z.; CLEEMAN, J.I.; DONATO, K.A., et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009.

ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J.P. Adipokines: The missing link between insuline resistance and obesity. **Diabetes and Metabolism**, v. 34, p. 2-11, 2008.

AVIGNON, A.; HOKAYEM, M.; BISBAL, C.; LAMBERT, K. Dietary antioxidants: do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? **Nutrition**, v. 28, p. 715-721, 2012.

BAGCHI, D.; SEN, C. K.; BAGCHI, M.; ATALAY, M. Antiangiogenic, antioxidant, and anticarcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula, **Biokhimiya**, v. 69, p. 95-102, 2004.

BASU, A.; LYONS, T. J. Strawberries, Blueberries, and Cranberries in the Metabolic Syndrome: Clinical Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5687-5692, 2012.

BAYS, H.E. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. **Obesity Research**, v. 12, p. 1197-1211, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de Los Alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Review Neuroscience**, v. 7, n. 2, p.137-51, 2006.

BONET, M.L.; RIBOT, J.; PALOU. Citocinas y control metabólico. **Revista Española de Obesidad**, v.7, p. 22-47, 2009.

BUSETO, L.; BASSETTO, F.; ZOCCHI, M.; ZULIANI, F.; NOLLI, M.; PIGOZZO, S., COIN, A.; MAZZA, M.; SERGI, G.; MAZZOLENI, F.; ENZI, G. The effects of the surgical removal of subcutaneous adipose tissue on energy expenditure and adipocytokine concentrations in obese women. **Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 18, p. 112-120, 2008.

BRAY, G.A.; CLEARFIELD, M.B.; FINTEL, D.J.; NELINSON, D.S. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risks. **Clinical Cornerstone**, v.9, n.4, p. 30-42, 2009.

BRUCE, K.D.; HANSON, M.A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, v. 140, p. 648-652, 2010.

BRONEEL, M.; KOZIROG, M.; DUCHNOWICZ, P. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker level in patients with metabolic syndrome. **Medical Science Monitor**, v. 16, p. 28-34, 2010.

BORNSTEIN, S.R.; SCHUPPENIES, A.; WONG, M.L.; LICINIO, J. Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. **Molecular Psychiatry**, v. 11, p. 892-902, 2006.

BULLO, C.A.P.; MIGO, C.P.; ARANCETA, J.; SALAS, S. J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutrition**, v. 10(10A), p. 1164-1172, 2007.

CALLES-ESCANDON, J.; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Review**, v. 22, p. 36-52, 2001.

CAPURON, L.; SU, S.; MILLER, A.H.; BREMNER, J.D.; GOLDBERG, J.; VOGT, G.J.; MAISANO, C.; JONES, L., MURRAH, N.V.; VACCARINO, V. Depressive symptoms and metabolic syndrome: is inflammation the underlying link? **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 896-900, 2008.

CHAMBERS, B.; CAMIRE, M. Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? **Diabetes Care**, v. 26, p. 2695-2696, 2003.

CHERNIACK, E.P. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 27, p.617-623.

CHOI, S.; BENZIE, I.F.F.; MA, S.; STRAIN, J.J.; HANNIGAN, B.M. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1217- 1231, 2008.

COSTA, M.Z. **Avaliação do efeito da metionina e/ou metionina sulfóxido sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

DE CARVALHO VIDIGAL, F.; BRESSAM, J.; BABIO, N.; SALAS-SALVADÓ, J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1198-1208, 2013.

DE FURIA, J.; BENNETT, G.; STRISSEL, K. J.; PERFIELD II, J.W.; MILBURY, P.E.; GREENBERG, A.S.; . OBIN, M.S. Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1510-1516, 2009.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 44, p. 1856-1865, 2011.

DIANA E. R.; PETER, K.; LEONEL, E.; ROJO, M. A. L.; ILYA, R. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. **Pharmacological Research**, v. 68, p. 59- 67, 2013.

DINIZ, Y.S.; BURNEIKO, R. M.; SEIVA, F.R.F.; ALMEIDA, F.Q.A.; GALHARDI, C.M.; NOVELLI FILHO, J.L.V.B.; MANI, F.; NOVELLI, E.L.B. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International Journal of Cardiology**, v. 124, p. 93-99, 2008.

ECKEL, R., GRUNDY, S. ZIMMET. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v. 365, p. 1415 1428, 2005.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n.2, 2008.

FERREIRA DS, ROSSO VV, MERCADANTE AZ. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n.3, p. 664-674, 2010.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, A.; ESQUIVEL-CHIRINO, C., et

al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. **Journal of the American Medical Association**, v. 303, p. 235-241, 2010.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, O.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity and impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, p. 1752-1761, 2004.

FRANCA, B.K.; ALVES, M.R.M.; SOUTO, F.M.S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R.F.; GUIMARÃES, A.; JR, A.A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, p. 109-206, 2013.

FRANSSEN, R.; MONAJEMI, H.; STROES, E.S.; KASTELEIN, J.J.; Obesity and dyslipidemia. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 37, p. 623-633, 2008.

GIOVANELLI, G; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2009.

GRAGNOLI, C. Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. **The Application of Clinical Genetics**, v. 7, p. 43-53, 2014.

HAJER, G.R.; VAN HAEFTEN, T.W.; VISSEREN, F.L.J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, v. 29, p. 2959-2971, 2009.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HERATH, H.M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.E.; YAMAKI, K. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p. 365-370, 2003.

HIRSCH, G.E. **Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-preta (*Rubus sp.*)**. 2011. 100f. Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

HOFFMAN, A.; ANTUNES, L. E. C. Mirtilo: Grande Potencial. **Cultivar – hortaliças e frutas**. V. 5, p. 28-30, 2004.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. **Nature**, V. 15, p.41-421, 2014.

HOWREN, M.B.; LAMKIN, D.M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Journal of Psychosomatic Medicine**, V. 71, n2, p. 171-186, 2009.

HUANG, W.; ZHANG, H.; LIU, W.; LI, C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 13, p. 94-102, 2012.

KAHL, K.G.; BESTER, M.; GREGGERSEN, W.; RUDOLF, S.; DIBBELT, L.; STOECKELHUBER, B.M.; GEHL, H.B.; SIPOS, V.; HOHAGEN, F.; SCHWEIGER, U. Visceral fat deposition and insulin sensitivity depresses down men with and without comorbid borderline personality disorder. **Psychosomatic Medicine**, v. 67, p. 407-412, 2005.

KONG, J.M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins, **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

MAGNONI, D.; STEFANUTO, A. & KOVACS, C. Síndrome Metabólica In: *Nutrição Ambulatorial em Cardiologia*, 1ª Edição, cap. 11, p. 193-208, São Paulo, 2007.

KOVANEM, P.T.; PENTIKAINEN, M.O. Circulating lipoproteins as Proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 411-419, 2003.

KUMAR, B; ARORA, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Vaccinium myrtillus Ameliorates Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression: Possible Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 488-497, 2012.

LEE, S.G.; KIM, B.; YANG, Y.; PHAM, T. PARK, Y.; MANATOU, J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K.; LEE, J. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B independent of NRF2-mediated mechanism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 404-411, 2014.

LEMKE, M.R. Depressive symptoms in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 15, p. 21-25, 2008.

LIANG, Y.; CHEN, J.; ZUO, Y.; MA, K. Y.; JIANG, Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z. H. Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1 % lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet. **European Journal of Nutrition**, v. 52, p. 869-875, 2013.

LIBBY, P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. **American Journal of Medicine**, v. 121, p. S21-S31, 2008.

LIU, J.; LLOYD, S.G. High-fat, low-carbohydrate diet alters myocardial oxidative stress and impairs recovery of cardiac function after ischemia and reperfusion in obese rats. **Nutrition Research**, v. 33, p. 311-321, 2013.

LIU, X.; CHEN, Z.; CHUA, C.C. Melatonin as an effective protector against doxorubicin induced cardiotoxicity. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. H254-63, 2002.

LUDWIG, M.W.B.; BORTOLON, C.; BORTOLINI, M.; FEOLI, A.M.; MACAGNAN, F.E.; OLIVEIRA, M.S. Ansiedade, depressão e estresse em pacientes com síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Psicologia**, v. 64, p-31-46, 2012.

MACHADO-VIEIRA, R.; SOARES, J.C. Transtornos de humor refratários a tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n.2, p. 48-54, 2007.

MAES, M.; BERK, M.; GOEHLER, L.; SONG, C.; ANDERSON, G.; GALECKI, P.; LEONARD, B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC Medicine**, v. 10, p. 66-86, 2012.

MAGALHAES, P.V., JANSEN, K., PINHEIRO, R.T., COLPO, G.D., DA MOTTA, L.L., KLAMT, F., DA SILVA, R.A., KAPCZINSKI, F. Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, p.1043-1050, 2012.

MARTINEAU, L.C.; COUTURE, A.; SPOOR, D.; BENHADDOU-ANDALOUSSI, A.; HARRIS, C.; MEDDAH, B.; LEDUC, C.; BURT, A.; VUONG, T.; MAI LE P.; PRENTKI, M.; BENNETT, S.A.; ARNASON, J.T.; HADDAD, P.S. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium*. **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 13, p. 612-623, 2006.

MARY, H. G.; DAVID, M. R.; PETER, K.; ALEXANDER, P.; SITHES, L.; GAD, G., et al. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. **Phytomedicine**, v. 16, p. 406-415, 2009.

MAYUKO, I.; SHIGEKO, K.; KOICHI, T.; SACHIKO, M.; MAI, K.; ERI, H.; et. al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, p. 397-405, 2013.

MENUET, R.; LAVIE, C.; MILANI, R. Importance and management of dyslipidemia in the metabolic syndrome. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 330, p. 295-302, 2005.

MORTON, L.W.; ABU-AMSHA CACCETTA, R.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 152-159, 2000.

MOSKAUG, J. O.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M. C.; LOMHOFF, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 277S- 283S, 2005.

MURDOLO, G.; BARTOLINI, D.; TORTOIOLI, C.; PIRODDI, M.; IULIANO, L.; GALLI, F. Lipokines and oxysterols: Novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 811-820, 2013.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, p. 1068-1070, 2002.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p.13-25, 2002.

OSAMA, M. A.; AHMED A. E.; ABDULRAHMAN, M. A.; AMEEN, M. A. M.;
AYMAN, A. N.; ASHRAF, B; ABDEL-SATTAR E.A.; MOHAMADIN, A.M.

Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. **Medical Science Monitor**, v. 17, p.110-115, 2011.

PAN, A.; KEUM, N.; OKEREKE, O. Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Diabetes Care**, v. 35, n.5, p.1171-1180, 2012.

PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P. Genetics of leptin and obesity: a huge review. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, p. 101-114, 2005.

PAPANDREOU, M.A.; DIMAKOPOULOU, A.; LINARDAKI, Z.I.; CORDOPATIS, P.; KLIMIS-ZACAS, D.; MARGARITY, M.; LAMARI, F.N. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. **Behavioural Brain Research**, v.198, p. 352-358, 2009.

PAREDES-LOPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PEREZ, M.; HERNANDEZ-PEREZ, T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 65, p. 299-308, 2010.

PAYNE, T.J. Formulating with Blueberries for Health. **Cereal Foods World**, v. 50, n. 5, p. 262-264, 2005.

PENNINX, B.W.; KRITCHEVSKY, S.B.; YAFFE, K. Inflammatory markers and depressed mood in older persons: results from the Health, Aging and Body Composition study. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 566-572, 2003.

PERTUZATTI, P.B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

PIHL, E.; ZILMER, K.; KULLISAAR, T.; KAIRANE, C.; M'AGI, A.; ZILMER, M. Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. **International Journal of Obesity**, v. 30, p.141-146, 2006.

PYYKKONEN, A.J.; RAIKKONEN, K.; TUOMI, T.; ERIKSSON, J.G.; GROOP, L.; ISOMAA, B. Association between depressive symptoms and metabolic syndrome is not explained by anti- depressant medication: results from the PPP-Botnia Study. **Annals of Medicine**, v. 44, p. 279-288, 2012.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

REGE, S.D.; KUMAR, S. WILSON, D.N.; TAMURA, L.; GEETHA, T.; MATHEWS, S.; HUGGINS, K.W.; BRODERICK, T.L.; BABU, J.R. Resveratrol Protects the Brain of Obese Mice from Oxidative Damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 10, p.123-130, 2013.

RITCHIE, S.A.; EWART M.A.; PERRY, C.G.; CONNELL, J.M.C.; SALT, I.P. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. **Clinical Science**, v. 107, p.519-532, 2004.

ROBERTS, C.K; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, p. 705-712, 2009.

ROMERO, C.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 85-91, 2006

RUDOLF, S.; GREGGERSEN, W.; KAHL, K.G.; HUPPE, U.S. Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression. **Psychiatry Research**, v. 217, p.34-38, 2014.

RYBKA, J.; KEDZIORA-KORNATOWSKA, K.; BANAS-LEZANSKA, P.; MAJSTEREK, I.; CARVALHO, L.A.; CATTANEO, A.; ANACKER, C.; KEDZIORA, J. Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 63, p.187-194, 2013.

SANTOS, C.R.B. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica, **Revista de Nutrição de Campinas**, v.19, p.389-401, 2006.

SAVINI, I.; CATANI, M.V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 10497-10538, 2013.

SCHERER, T.; LEHNERT, H.; HALLSCHMID, M. Brain Insulin and Leptin Signaling in Metabolic Control. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 42, p. 109-125, 2013.

SEERAM, N. P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, pp. 627-629, 2008.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M.P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, p. 638-44, 2008.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZACK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 231-241, 2008.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora da UFSC, editora da Universidade/UFRGS, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2005/sindromemetabolica.asp>

Acessado em: 08/12/2014.

SZAJDEK, A. E BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 63, p. 147-156, 2008.

TUOMILETHO, J. Cardiovascular risk: Prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.68, p. 28-35, 2005.

TRIPATHY, D.; MOHANTY, P.; DHINDSA, S. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. **Diabetes**, v. 52, p.2882-2887, 2003.

TSUDA, T.; HORIO, F.E. OSAWA, T. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.48, p. 305-310, 2002.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v.133, p 2125- 2130, 2003.

VENTURINI, C.D.; MERLO, S.; SOUTO, A.A.; FERNANDES, M.C.; GOMEZ, R.; RHODEN, C.R. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.6, p.434-441, 2011.

XAVIER, H.T.; ABDALLA, D.S.P.; MARTINEZ, T.L.R.; RAMIRES, J.A.F.; GAGLIARDI, A.R.T. Efeitos da Lipoproteína LDL-oxidada Sobre a Proliferação e a Motilidade Espontânea in Vitro de Células Endoteliais de Artérias Coronárias Humanas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, p. 488-492, 2004.

XAVIER, H. T.; MONTE, O. Prevenção das complicações da aterosclerose na síndrome metabólica: da fisiopatologia à farmacoeconomia da terapia hipolipemiante com estatinas. **RBM – Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, n.5, p. 197-204, 2005.

ZHANG, X.Y.; YAO, J.K. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological**, v.46, p.197-199, 2013.

ZEUGMANN, S.; QUANTE, A.; HEUSER, I.; SCHWARZER, R.; ANGHELESCU, I. Inflammatory biomarkers in 70 depressed in patients with and without the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 71, p. 1007-1016, 2010.

YOU, Q.; WANG, B.W.; CHEN, F.; HUANG, Z.L.; WANG, X.; LUO, P.G. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, p. 201-208, 2011.

WEIGENBERG, M.J.; TOLEDO-CORRAL, C.M.; GORAN, M.I. Association between the metabolic syndrome and serum cortisol in overweight Latino youth.

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 93, p. 1372-1378, 2008.

WELLEN, K.E.; THOMPSON, C.B. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess, **Molecular Cell**, v.40, p. 323-332, 2010.

WILSON, P. AND GRUNDY, S. The metabolic syndrome: Practical guide to origins and treatment: Part 1. **Circulation**, v. 108, p. 1422-1425, 2003.