

## EFEITO DE EXTRATO DE MIRTILO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CÓRTEX CEREBRAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO

SARA KESKE<sup>1</sup>; LUIZA SPOHR<sup>2</sup>; KARINA LUDUVICO<sup>3</sup>; WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>4</sup>; VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – saarakeske@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – luizaspoehr@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – karina\_luduvico@outlook.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O mirtilo é uma fruta conhecida por ser cultivada na Europa e nos Estados Unidos, contudo, também tem atraído a atenção de produtores brasileiros nas últimas décadas. Um dos motivos para o interesse no fruto é seu potencial antioxidante (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014). Neste sentido, a fruta destaca-se por ser rica em antocianinas, compostos fenólicos relacionados à coloração avermelhada-azulada do fruto (ALAPPAT e ALAPPAT, 2020; KALT et al., 2020). Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial neuroprotetor deste fruto em modelos experimentais, incluindo modelos que avaliam comportamento tipo - depressivo (KALT et al., 2020; SPOHR et al., 2022).

O transtorno depressivo maior (TDM), comumente chamado de depressão, é uma doença crônica caracterizada por sintomas como tristeza profunda e anedonia. Apesar do avanço científico acerca da neurobiologia do TDM, muitos dos aspectos fisiopatológicos ainda não estão totalmente elucidados. Sabe-se que a etiologia do TDM é multifatorial, sendo que um dos mecanismos que tem sido associado ao desenvolvimento e a progressão do TDM é a neuroinflamação, a qual é mediada por citocinas como fator de necrose tumor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10) (CORDÁS et al., 2017; DEY e GIBLIN, 2018; WOELFER et al., 2019; KANG et al., 2020; JIA, GAO e HU, 2021). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com extrato de mirtilo na expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em córtex cerebral de camundongos submetidos ao modelo experimental de comportamento tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS).

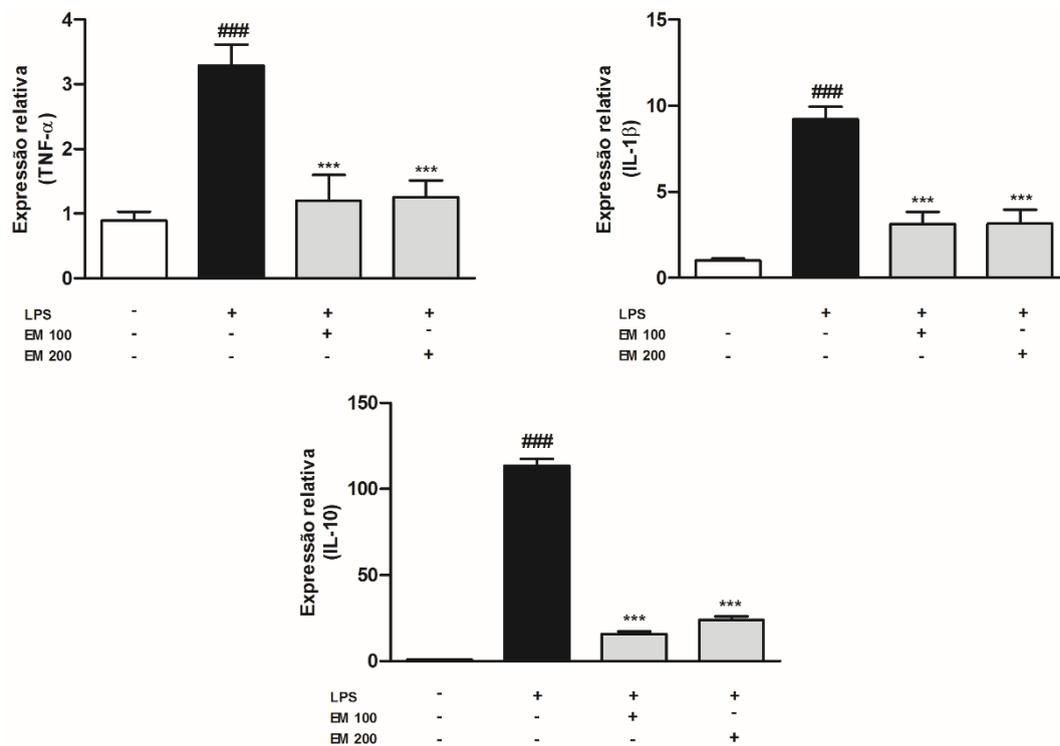
### 2. METODOLOGIA

Os frutos de mirtilo (*Vaccinium virgatum*) foram obtidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA), localizada no município de Pelotas/RS. Após a coleta, os frutos foram armazenados à temperatura de -20°C até o processo de extração. Os frutos congelados foram pesados e sonicados a 25°C durante 30 minutos em solução hidroetanólica. Após o processo de extração, as amostras foram filtradas, o etanol foi removido por rotaevaporação e, posteriormente, foram liofilizadas até a secura. Esse processo foi realizado protegido da luz.

Para realização do protocolo experimental foram utilizados camundongos *Swiss* machos os quais foram divididos em 4 grupos: I- controle, II - LPS (0,83 mg/kg), III - extrato de mirtilo (100 mg/kg) + LPS; e VI- extrato de mirtilo (200 mg/kg) + LPS. Os animais dos grupos III e IV foram tratados durante sete dias com extrato de mirtilo por via oral, enquanto que os animais dos grupos I e II receberam água. No sétimo dia, foi administrado nos animais LPS ou água por via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após a administração de LPS os animais foram submetidos a eutanásia e o córtex cerebral foi coletado para a análise da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 32979-2019).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que as expressões relativas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em córtex cerebral foram estatisticamente maiores no grupo LPS quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com extrato de mirtilo em ambas as doses (100 e 200 mg/kg) foi capaz de prevenir essas alterações induzidas pela administração de LPS em córtex cerebral de camundongos.



**Figura 1** - Efeito do extrato de mirtilo (EM) (100 ou 200 mg/kg) por via oral na expressão relativa do RNAm do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e da interleucina 10 (IL-10) em córtex cerebral de animais tratados com lipopolissacarídeo (LPS). ### $P$ <0,001 comparado com o grupo controle. \*\*\* $P$ <0,001 comparado com o grupo LPS (n = 5).

O córtex é uma estrutura envolvida no TDM, uma vez que esta região cerebral está associada ao controle de emoções, bem como a mecanismos de recompensa (ROLLS, 2019). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa

utilizando este mesmo protocolo experimental, já demonstraram que o extrato de mirtilo previne o comportamento tipo depressivo induzido pela administração de LPS (SPOHR et al., 2022). Evidências crescentes sugerem que o TDM está associado à neuroinflamação. Consistente com essas evidências, observou-se neste trabalho um aumento na expressão relativa de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no córtex cerebral de camundongos após exposição ao LPS. O LPS interage com os receptores do tipo Toll 4 (TLR-4) presentes em células do sistema imune e pode causar a translocação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (MENG, et al., 2011; CIESIELSKA, MATYJEK e KWIATKOWSKA, 2021). Esse é um passo essencial para que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sejam transcritas, sintetizadas e liberadas (CIESIELSKA, MATYJEK e KWIATKOWSKA, 2021).

Em um quadro inflamatório periférico, as células imunes, como os linfócitos T ativados, podem migrar para o sistema nervoso central (SNC) e liberar interleucina 4 (IL-4). Essa citocina é capaz de estimular a supressão do fenótipo inflamatório da micróglia, conhecida como macrófagos residentes do SNC, e mudança para um fenótipo menos inflamatório (M2), estimulando a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 (DERECKI et al., 2010; MILLER e RAISON, 2016; DEY, e GIBLIN, 2018). Portanto, o aumento de IL-10 no grupo LPS em comparação com o controle, pode indicar o aumento da resposta anti-inflamatória. A baixa expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 nos grupos administrados com extrato de mirtilo pode estar relacionada a uma prevenção proporcionada pelo tratamento diante do processo inflamatório causado pelo LPS. Corroborando com os resultados deste estudo, Lau, Bielinski e Joseph (2007) observaram uma expressão diminuída de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em células da micróglia tratadas com extrato de mirtilo, quando comparado com as células que receberam apenas LPS.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o extrato de mirtilo pode ser uma interessante ferramenta terapêutica para atenuar a neuroinflamação associada a doenças psiquiátricas como o TDM.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAPPAT, B.; ALAPPAT, J. Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. **Molecules**, v. 25, n.23, p.5500, 2020.
- CANTUARIAS-AVILÉS, T.; DA SILVA, S.R.; BORDIGNON, R.M.; MORAES, A.F.G; ALBERTI, M.F.Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2014, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-453/13>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.78, n.4, p.1233-1261, 2021.
- CORDÁS, et al. **História da melancolia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- DERECKI, N.C.; CARDANI, A.N.; YANG, C.H.; QUINNIES, K.M.; CRIHFIELD, A.; LYNCH, K.R.; KIPNIS, J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. **Journal of Experimental Medicine**, v.207, n.5, p.1067-80, 2010.

- DEY, A.; GIBLIN, P.A.H. Insights into Macrophage Heterogeneity and Cytokine-Induced Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. **Pharmaceuticals**, Basel, v.11, n.3, p.64, 2018.
- JIA, X.; GAO, Z.; HU, H. Microglia in depression: current perspectives. **Science China Life Sciences**, v.64, n.6, p.911-925, 2021.
- JIANG, X.; LIU, J.; LIN, Q.; MAO, K.; TIAN, F.; JING, C.; WANG, C.; DING, L.; PANG, C. Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway. **Brain Research Bulletin**, v.135, p.40-46, 2017.
- KALT, W.; CASSIDY, A.; HOWARD, L.R.; KRIKORIAN, R.; STULL, A.J.; TREMBLAY, F.; ZAMORA-ROS, R. Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. **Advances in Nutrition**, v.11, n.2, p.224-236, 2020.
- KANG, S.G.; CHO, S.E. Neuroimaging Biomarkers for Predicting Treatment Response and Recurrence of Major Depressive Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.6, p.2148, 2020.
- KROPF, KROPF, E.; SYAN, S.K.; MINUZZI, L.; FREY, B.N. From anatomy to function: the role of the somatosensory cortex in emotional regulation. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v.41, n.3, p.261-269, 2019.
- LAU, F.C.; BIELINSKI, D.F.; JOSEPH, J.A. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide -activated BV2 microglia. **Journal of Neuroscience Research**, v.85, p.1010-1017, 2007.
- MENG, J.; GONG, M.; BJÖRKBACKA, H.; GOLENBOCK, D.T. Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions. **Journal of Immunology**, 187, n.7, p.3683-3693, 2011.
- MILLER, A.H.; RAISON, C.L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v.16, n.1, p.22-34, 2016.
- ROLLS, E.T. The orbitofrontal cortex and emotion in health and disease, including depression. **Neuropsychologia**, v.128, p.14-43, 2019.
- SPOHR, L.; LUDUVICO, K.P.; SOARES, M.S.P.; BONA, N.P.; OLIVEIRA, P.S.; D.E. MELLO, J.E.; ALVEZ, F.L.; TEIXEIRA, F.C.; FÉLIX, A.O.C.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Blueberry extract as a potential pharmacological tool for preventing depressive-like behavior and neurochemical dysfunctions in mice exposed to lipopolysaccharide. **Nutritional Neuroscience**, v.25, n.4, p.857-870, 2022.
- WOELFER, M.; KASTIES, V.; KAHLFUSS, S.; WALTER, M. The Role of Depressive Subtypes within the Neuroinflammation Hypothesis of Major Depressive Disorder. **Neuroscience**, v.403, p.93-110, 2019.