

Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduz o Estresse Oxidativo e Melhora o Metabolismo Energético da Lesão de Isquemia-Reperfusão Miocárdica Em Ratos

Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduces Oxidative Stress and Improves Energetic Metabolism in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Patricia Alegre,¹ Livia Mathias,¹ Maria Angelica Lourenço,¹ Priscila Portugal dos Santos,¹ Andrea Gonçalves,¹ Ana Angélica Fernandes,¹ Paula Schmidt Azevedo Gaiolla,¹ Marcos Ferreira Minicucci,¹ Leonardo Zornoff,¹ Sergio Alberto Rupp Paiva,¹ Bertha Furlan Polegato¹

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP¹ São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Euterpe oleracea Mart. (açaí) é uma fruta com alta capacidade antioxidante e pode ser uma estratégia adjuvante para atenuar a lesão de isquemia-reperfusão.

Objetivo: Avaliar a influência do açaí no modelo global de isquemia-reperfusão em ratos.

Metodologia: Ratos Wistar foram divididos em 2 grupos: Controle (C: recebendo ração padrão; n = 9) e Açaí (A: recebendo ração padrão suplementada com 5% de açaí; n = 10). Após seis semanas, os animais foram submetidos ao protocolo global de isquemia-reperfusão e a estudo do coração isolado para avaliar a função ventricular esquerda. Nível de significância adotado: 5%.

Resultados: Não houve diferença entre os grupos quanto ao peso corporal inicial e final, e a ingestão diária de ração. O grupo A apresentou menor concentração miocárdica de hidroperóxido lipídico e maior atividade de catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase do que o grupo C. Também observamos aumento da atividade miocárdica da β -hidroxilacil coenzima-A desidrogenase, piruvato desidrogenase, citrato sintase, complexo I, complexo II e ATP sintase no grupo A, bem como menor atividade das enzimas lactato desidrogenase e fosfofructoquinase. A função sistólica foi semelhante entre os grupos, e o grupo A apresentou função diastólica pior que C. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à área de infarto do miocárdio, e expressão proteica de NF- κ B total e fosforilado, e das proteínas FOXO1, SIRT1 e Nrf-2.

Conclusão: Apesar de melhorar o metabolismo energético e atenuar o estresse oxidativo, a suplementação de açaí não diminuiu a área infartada nem melhorou a função ventricular esquerda no modelo global de isquemia-reperfusão. (Arq Bras Cardiol. 2020; 114(1):78-86)

Palavras-chave: Euterpe oleracea Mart.; Estresse Oxidativo; Metabolismo Energético; Isquemia Miocárdica; Injúria de por Reperfusão Miocárdica; Ratos.

Abstract

Background: Euterpe oleracea Mart. (açaí) is a fruit with high antioxidant capacity and could be an adjuvant strategy to attenuate ischemia-reperfusion injury.

Objective: To evaluate the influence of açaí in global ischemia-reperfusion model in rats.

Methods: Wistar rats were assigned to 2 groups: Control (C: receiving standard chow; n = 9) and Açaí (A: receiving standard chow supplemented with 5% açaí; n = 10). After six weeks, the animals were subjected to the global ischemia-reperfusion protocol and an isolated heart study to evaluate left ventricular function. Level of significance adopted: 5%.

Results: There was no difference between the groups in initial body weight, final body weight and daily feed intake. Group A presented lower lipid hydroperoxide myocardial concentration and higher catalase activity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase than group C. We also observed increased myocardial activity of β -hydroxyacyl coenzyme-A dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase, citrate synthase, complex I, complex II and ATP synthase in the A group as well as lower activity of the lactate dehydrogenase and phosphofructokinase enzymes. The systolic function was similar between the groups, and the A group presented poorer diastolic function than the C group. We did not observe any difference between the groups in relation to myocardial infarction area, total and phosphorylated NF- κ B, total and acetylated FOXO1, SIRT1 and Nrf-2 protein expression.

Conclusion: despite improving energy metabolism and attenuating oxidative stress, açaí supplementation did not decrease the infarcted area or improve left ventricular function in the global ischemia-reperfusion model. (Arq Bras Cardiol. 2020; 114(1):78-86)

Keywords: Euterpe Oleracea; Oxidative Stress; Energy Metabolism; Chemical Reactions; Myocardial Ischemia; Myocardial Reperfusion Injury; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Bertha Furlan Polegato •

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Medicina Campus de Botucatu - Rubiao Jr s/n. CEP 18618-970, Botucatu, SP – Brasil

E-mail: bertha.polegato@unesp.br

Artigo recebido em 14/08/2018, revisado em 15/02/2019, aceito em 10/03/2019

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20180140>

Introdução

Embora a mortalidade atribuída à cardiopatia isquêmica esteja diminuindo em alguns países, ela ainda apresenta alta morbidade, diminuindo a qualidade de vida e aumentando os gastos em saúde.¹ Os eventos isquêmicos cardíacos podem ser causados por isquemia parcial ou total do tecido, com disfunção miocárdica reversível ou irreversível e morte celular. Períodos isquêmicos superiores a 20 minutos causam danos irreversíveis aos cardiomiócitos e incapacidade de recuperação funcional, mesmo com a restauração do fluxo sanguíneo.^{2,3}

Durante a isquemia, para atender à demanda energética do miocárdio, o ATP celular é gerado pela glicólise, levando à redução do pH intracelular.^{1,4} Paralelamente, níveis reduzidos de ATP interrompem importantes bombas ativas na homeostase iônica, o que resulta em sobrecarga de Na⁺ e Ca²⁺ citosólico, inviabilizando a repolarização celular e levando à disfunção miocárdica. Além disso, é possível observar níveis elevados de Ca²⁺ no citosol que pode ativar diversas enzimas (fosfolipases, proteases, endonucleases e ATPases) associadas à peroxidação lipídica, à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), à disfunção de proteínas contráteis e à perda da função celular.⁴

Embora seja necessário reverter a isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo pode ser mais prejudicial do que o próprio processo isquêmico.^{1,4,5} Durante a reperfusão, os danos isquêmicos são agravados devido a uma descarga adicional de ERO gerada nas mitocôndrias pela restauração do fluxo de oxigênio.^{5,6} Tem ganhado atenção a pesquisa de drogas e substâncias que possam prevenir danos às células cardíacas em situações e procedimentos que envolvem lesão por reperfusão.⁷ Nesse contexto, observamos grande interesse na ação antioxidante de produtos naturais como o açaí.⁸

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma fruta típica do norte do Brasil recentemente popularizada por sua alta capacidade antioxidante relacionada à presença de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas.⁹⁻¹² Os compostos de polpa de açaí consistem em 31% de flavonoides, 23% de compostos fenólicos, 11% de lignoides e 9% de antocianinas.¹³ As principais antocianinas na polpa do açaí são a cianidina-3-O-glucosídeo e a cianidina-3-O-rutinosídeo, responsáveis pela cor púrpura da fruta.¹³ Os compostos fenólicos mais abundantes são o ácido ferúlico, os ácidos p-hidroxibenzóico, gálico, protocatecúico, elágico, vanílico, p-coumarico e o glicosídeo do ácido elágico.^{13,14}

Em modelos experimentais, a suplementação de açaí reduziu o estresse oxidativo pulmonar⁹ e cerebral,¹⁵ reduziu a formação de ERO em células polimorfonucleares,^{11,16} diminuiu o dano ao DNA e apresentou atividade anticarcinogênica no câncer de bexiga.¹⁰ A administração oral de açaí foi capaz de atenuar quadros de hipertrofia e disfunção do ventrículo esquerdo em ratos submetidos a infarto do miocárdio,¹⁷ mas não foram encontrados estudos sobre o efeito do açaí no modelo global de isquemia ou seu efeito na lesão de reperfusão.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a área de infarto, a função do ventrículo esquerdo, o estresse oxidativo e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético do miocárdio no modelo global de isquemia-reperfusão em ratos após suplementação de açaí.

Método

Desenho do estudo

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA 1111/2014), e está em conformidade com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Vinte ratos Wistar machos com 2 meses de idade, pesando 250-300 g, foram divididos em dois grupos: controle (C; n = 10) e açaí (A; n = 10). O tamanho da amostra foi determinado por conveniência com base em estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo experimental. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas em caixas individuais para controlar a ingestão de alimentos. O grupo C recebeu ração padrão e o grupo A foi suplementado com 5% de açaí¹⁸ por seis semanas. Após o período de suplementação, todos os animais foram anestesiados com tiopental de sódio (80 mg/kg, IP) para induzir o protocolo de isquemia global-reperfusão, após o qual o coração foi dissecado. Foi feito um corte seccional do ventrículo esquerdo para determinar a área de infarto e o restante foi armazenado em um freezer a -80°C para análise posterior. Um rato do grupo controle foi perdido devido a problemas técnicos durante o protocolo de isquemia-reperfusão e o estudo foi concluído com 9 ratos no grupo controle e 10 ratos no grupo açaí.

Preparação da ração suplementada com açaí

A polpa de açaí comercializada (Icefruit®) foi descongelada e incorporada na ração Nuvilab triturada (Nuvital®). Após a homogeneização, a ração foi novamente peletizada, seca a 32°C e armazenada em freezer a -20°C até o momento do uso. A dose utilizada no estudo foi de 5%, conforme proposto por Fragoso et al.¹⁸

Indução de isquemia global, reperfusão e avaliação da função cardíaca

Os ratos foram anestesiados com tiopental de sódio (80 mg/kg, IP), heparinizados (2.000 UI, IP) e submetidos a ventilação com pressão positiva com oxigênio a 100%. Em seguida, foi realizada esternotomia mediana e a aorta ascendente foi canulada para iniciar a perfusão retrógrada com solução de Krebs-Henseleit modificada (NaCl 115 mmol/L, KCl 5,4 mmol/L, CaCl₂ 1,25 mmol/L; MgSO₄ 1,2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1,15 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, 11 mmol/L de glicose e 8 mmol/L de manitol). Os corações foram transferidos para aparato de Langendorff (Modelo 830 Hugo Sachs Elektronik, Alemanha) com pressão de perfusão a 75 mmHg. A solução nutritiva foi constantemente oxigenada com uma mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% de CO₂, e a temperatura foi mantida a 37°C. Um marcapasso foi utilizado para manter a frequência cardíaca sob controle (250 bpm).

O átrio esquerdo foi removido e um balão de látex foi inserido na cavidade ventricular esquerda. O balão foi acoplado a um transdutor de pressão e a uma seringa, o que permitiu variação no volume do balão. Após 10 minutos de estabilização,

os corações foram submetidos a um período de 30 minutos de isquemia global, seguido de 30 minutos de reperfusão.³ A isquemia global foi induzida pela interrupção completa do fluxo da solução de Krebs-Henseleit para o coração.

Após os períodos de isquemia e reperfusão, foi realizada uma avaliação da função ventricular esquerda. O volume dentro do balão foi aumentado progressivamente para obter variação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo de 0 a 25 mmHg. Além disso, para cada aumento de volume no balão, foram registradas as pressões diastólica e sistólica, a taxa máxima de desenvolvimento da pressão ventricular esquerda (+dP/dt) e a taxa máxima de diminuição da pressão ventricular esquerda (-dP/dt). Curvas de pressão-volume diastólica foram construídas.

Análise da área miocárdica infartada

Foi realizado um corte transversal do ventrículo esquerdo (VE) – 5 mm do ápice, com espessura de 2 mm – e incubado em tampão de fosfato a 7,4 pH e cloreto de trifêniltetrazólio a 1% (Sigma Aldrich) por 30 minutos a 37°C. Depois disso, as seções foram incubadas em uma solução de formaldeído a 10% durante a noite. As seções ventriculares foram posicionadas entre duas lâminas de vidro e digitalizadas para obtenção das imagens.

A área de infarto foi medida através do programa *ImageJ* por planimetria e expressa como a porcentagem de infarto em relação à área total. Nas células vivas, o corante é reduzido pelas desidrogenases e aparece com uma coloração vermelha escura. As células mortas sem as enzimas não são coradas e permanecem pálidas.¹⁹

Análise de enzimas antioxidantes e hidroperóxido lipídico

Amostras de aproximadamente 100 mg de tecido do VE foram homogeneizadas em um tampão de fosfato de sódio (0,01 M) com um pH de 7,4 e centrifugadas por 30 minutos a -4°C; as proteínas totais nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford. As atividades de glutatona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase no tecido cardíaco foram determinadas por espectrofotometria, de acordo com os métodos descritos anteriormente.^{20,21} A concentração de hidroperóxido lipídico no tecido cardíaco foi medida pela oxidação do sulfato ferroso amoniacal e determinada por espectrofotometria.²²

Avaliação do metabolismo energético

Amostras de aproximadamente 100 mg de tecido do VE foram homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração proteica e a atividade das enzimas β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase, fosfofructoquinase, lactato desidrogenase, piruvato desidrogenase e citrato sintase.²³ O sedimento foi ressuspenso com tampão de fosfato de sódio (0,1 M) contendo sacarose 250 mM e EDTA 2 mM, e foi utilizado para determinar a atividade de complexos enzimáticos da cadeia de transporte de elétrons (complexos I, II e ATP sintase).²⁴ As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas com o software controlGen5 2.0, e todos os reagentes foram obtidos no laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

Western blot

As amostras de VE (80 mg) foram homogeneizadas com 1 ml de tampão de extração do ensaio de precipitação por radioimunidade (RIPA), centrifugadas e o sobrenadante foi coletado. A proteína nas amostras foi quantificada pelo método de Bradford e as amostras foram usadas para determinar a expressão proteica do fator nuclear κ B (NF- κ B) total e fosforilado, sirtuina 1 (SIRT1) e proteína forkhead box O1 (FOXO1). Para determinar o fator nuclear eritroid 2 (Nrf-2), as amostras de VE foram extraídas com o tampão de extração nuclear.²⁵ Todas as amostras foram diluídas em tampão Laemmli.

A eletroforese de proteínas foi realizada a 4°C em gel de poliacrilamida de 8 a 10% (*Mini-Protean 3 Electroforesis Cell System*, Bio-Rad, Hercules, EUA). Após eletroforese, os géis foram transferidos para as membranas de nitrocelulose (sistema *Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, Hercules, EUA) em um sistema de transferência úmida seguido de bloqueio com solução de leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi lavada e os anticorpos primários foram adicionados (Santa Cruz *Biotechnology*, Inc., Europa). Após incubação durante a noite, a membrana foi lavada com solução basal e foram adicionados anticorpos secundários (Santa Cruz *Biotechnology*, Inc., Europa). Após 2 horas, a membrana foi lavada novamente em solução basal.

A imunodeteção foi realizada com o método de quimioluminescência usando o Kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (*ThermoScientific*, EUA). O fotodocumentador *ImageQuant LAS 4000* (*General Eletricks*) foi utilizado para gerar imagens, que foram analisadas pelo programa *Gel-Pro 32* (*Media Cybernetics*, Rockville, EUA). Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pela expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e o mesmo animal controle foi incluído em todas as eletroforeses para padronização entre os experimentos.

Análise estatística

Os valores obtidos são apresentados como média \pm desvio padrão (variáveis com distribuição normal) ou mediana e quartil 25 e 75% (variáveis com distribuição não-normal). A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* de *Student* não pareado (variáveis com distribuição normal) ou de Mann-Whitney (variáveis com distribuição não-normal). A análise estatística foi realizada pelo software *SigmaStat*, considerando nível de significância de 5% para todas as análises.

Resultados

Características gerais

O peso corporal inicial e final dos animais não diferiu entre os grupos. Além disso, os ventrículos esquerdo e direito, o peso de fígado e o pulmão foram semelhantes entre os grupos. A ingestão diária de ração foi de aproximadamente 26 g para os dois grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Variáveis morfológicas e consumo de ração em ratos submetidos à isquemia-reperfusão miocárdica global

	C (n = 9)	A (n = 10)	Valor de p
PC inicial (g)	274 ± 15	281 ± 11	0,274
PC final (g)	468 ± 29	448 ± 40	0,225
Peso do VE (g)	1,03 ± 0,09	1,02 ± 0,07	0,934
Peso do VD (g)	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,431
Peso do fígado (g)	14,4 ± 1,6	12,9 ± 2,6	0,154
Peso do pulmão (g)	1,62 ± 0,03	1,54 ± 0,18	0,359
Consumo diário de ração (g)	26,1 ± 2,2	26,6 ± 1,8	0,246

C: grupo controle; A: grupo açaí; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão; Valor de p: teste t.

Área miocárdica infartada

Não observamos diferença na área de infarto do miocárdio entre os grupos A e C, conforme observado na Figura 1.

Estresse oxidativo e metabolismo energético do miocárdio

A suplementação de açaí promoveu menor concentração de hidroperóxido lipídico no miocárdio, e foi observada maior atividade das enzimas catalase, SOD e GSH-Px no miocárdio desses ratos (Tabela 2).

Quanto ao metabolismo energético do miocárdio, a suplementação de polpa de açaí promoveu menor atividade das enzimas lactato desidrogenase e fosfofructoquinase e maior atividade das enzimas β -hidroxiacil-coenzima A desidrogenase, citrato sintase e piruvato desidrogenase. Além disso, observamos maior atividade do complexo I, complexo II e ATP sintase no grupo suplementado com açaí (Tabela 3).

Western blot

A expressão das proteínas envolvidas na regulação da via do estresse oxidativo é mostrada na Figura 2. Não houve diferença na expressão de NF- κ B total e fosforilado, FOXO1 total e acetilado, SIRT1 e Nrf-2. Além disso, não foram observadas diferenças nas razões NF- κ B fosforilada/total ou FOXO1 acetilada/total.

Estudo isolado do coração

Não houve diferença entre os grupos em relação ao volume inicial do balão, à pressão sistólica máxima atingida, ou $+dP/dt$, que representa a função sistólica. O grupo A apresentou pior $-dP/dt$ que o C, significando comprometimento da função diastólica nos ratos que receberam suplementação de açaí. As áreas sob as curvas na relação pressão diastólica-volume não diferiram entre os grupos (Figura 3).

Discussão

A lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio é uma das principais causas de morte no mundo, e continua sendo uma situação em que as terapias clínicas atuais são surpreendentemente deficientes.²⁶ A lesão miocárdica irreversível progride com o aumento da duração da isquemia;

portanto, a rápida restauração do fluxo sanguíneo para a área isquêmica é essencial para salvar o miocárdio viável.¹ A reperfusão, no entanto, pode induzir a morte de cardiomiócitos, independentemente do episódio isquêmico, por um processo conhecido como lesão de reperfusão.^{1,5,27} A diminuição da lesão por reperfusão é um dos principais alvos na batalha para preservar a função cardíaca em pacientes com infarto agudo do miocárdio.

Durante a isquemia-reperfusão, ocorrem alterações como liberação de citocinas, interação entre leucócitos e células endoteliais, e produção de espécies reativas de nitrogênio/oxigênio e radicais livres (ERs)²⁷ o que pode levar a danos oxidativos. Os ERs são gerados a partir de várias fontes, e o metabolismo energético, mais precisamente a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE), é uma das fontes mais importantes desses radicais.⁵

A produção contínua de ERs durante processos metabólicos é regulada por um sistema de defesa antioxidante, que limita os níveis intracelulares e controla a ocorrência de danos celulares. O sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático e não-enzimático.^{6,7,28} O sistema de defesa não-enzimático inclui compostos antioxidantes de origem alimentar, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Os flavonoides e outros compostos presentes no açaí podem atuar como antioxidantes não-enzimáticos, inativando espécies reativas.²⁹

Durante a isquemia, há um aumento da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase, óxido nítrico sintase, xantina oxidase, citocromo P450 e ciclooxigenase,^{8,30} o que pode resultar em aumento de geração de ER; da mesma forma, a isquemia está associada a uma diminuição de diferentes enzimas antioxidantes. Todas essas alterações podem resultar em estresse oxidativo. Neste estudo, o grupo A apresentou maior atividade das enzimas antioxidantes, além de menor concentração de hidroperóxido lipídico do miocárdio. O hidroperóxido lipídico é um marcador de dano oxidativo e é originado da lesão oxidativa dos lipídios da membrana. A lesão de membrana pode levar a distúrbios na permeabilidade, a alterações do fluxo iônico e lesão do DNA além de comprometer a matriz extracelular.³¹

Em relação às proteínas envolvidas na regulação da via do estresse oxidativo, os mecanismos pelos quais os compostos alimentares fenólicos atuam na prevenção de patologias

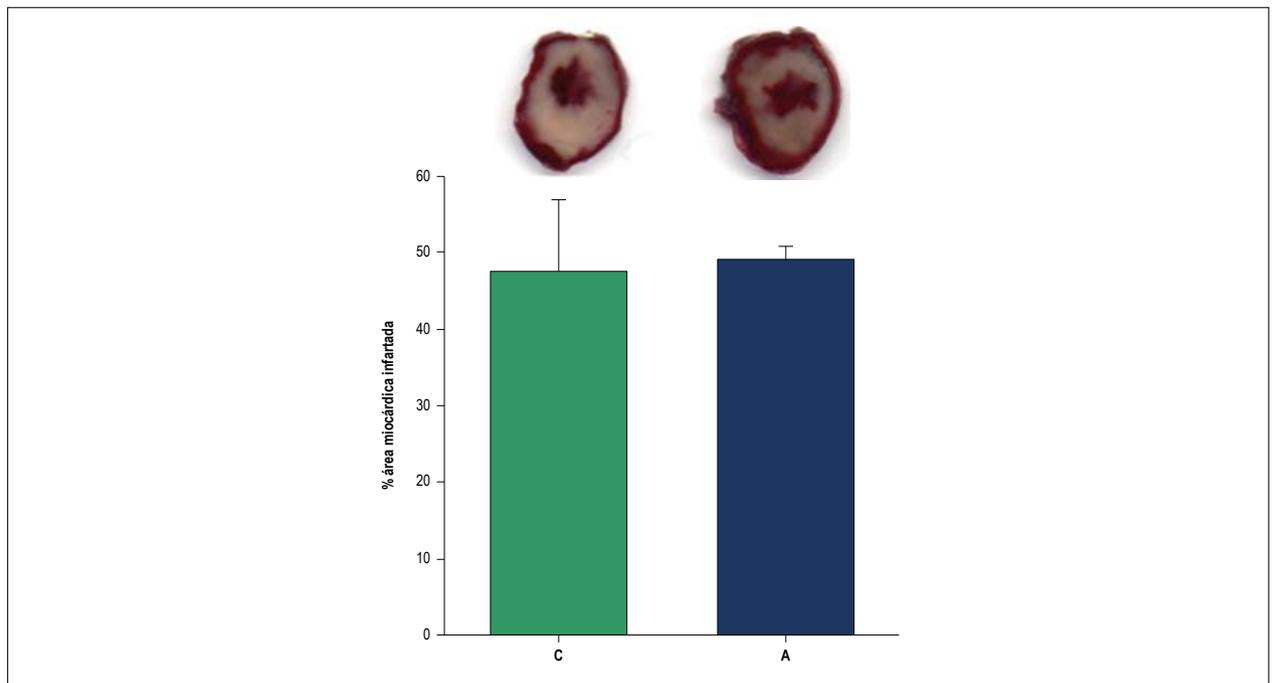


Figura 1 – Área miocárdica infartada após isquemia-reperfusão miocárdica global. A figura mostra as seções de ventrículo esquerdo coradas com cloreto de trifeniltetrazólio a 1%. A área branca representa o miocárdio infartado. C: grupo controle; A: grupo açaí. Não há diferença entre os grupos ($p = 0,710$).

Tabela 2 – Marcador do estresse oxidativo do miocárdio e atividade de enzimas antioxidantes após isquemia-reperfusão global

	C (n = 9)	A (n = 10)	Valor de p
HL (nmol/g de tecido)	330 ± 33	208 ± 22	< 0,001
CAT (μmol/g de tecido)	58,5 ± 6,4	70,0 ± 8,9	0,005
SOD (nmol/mg de proteína)	5,7 ± 0,4	8,1 ± 0,7	< 0,001
GSH-Px (nmol/mg de tecido)	20,2 ± 3,3	32,8 ± 4,7	< 0,001

C: grupo controle; A: grupo açaí; HL: hidroperóxido lipídico; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão; valor de p: teste t.

degenerativas foram parcialmente estudados. As interações complexas entre essas moléculas da dieta e seus alvos moleculares ativam as vias de sinalização da resposta celular, incluindo NF-κB, Nrf2, SIRT1 e FOXO1.³²⁻³⁴

O NF-κB é considerado um importante fator transcricional relacionado ao estresse oxidativo. O tratamento com açaí inibiu a ativação de NF-κB na cultura de células de astrócitos,^{35,36} inibiu a fosforilação de NF-κB em células microgliais³⁷ e a expressão gênica de NF-κB com regulação negativa em cultura de miofibroblastos de cólon.³⁸ Da mesma forma, o Nrf2 é um importante regulador da produção de enzimas antioxidantes. Em resposta ao estresse oxidativo, o Nrf2 se dissocia da proteína Keap1 e migra para o núcleo celular, onde estimula a produção de enzimas antioxidantes.³⁹ A isquemia miocárdica promove aumento da expressão proteica de Nrf2,⁴⁰ e o efeito do açaí na expressão de Nrf2 foi verificado em um estudo de cultura de astrócitos em que o fruto reduziu a expressão proteica de Nrf2.⁴¹ Entretanto, em outro estudo, também com cultura de astrócitos, a administração de açaí aumentou a expressão de Nrf2,³⁶ mostrando que os efeitos do açaí sobre Nrf2 não são completamente compreendidos.

Outro regulador do equilíbrio celular é a proteína SIRT1, que pode atuar na apoptose, na biogênese mitocondrial, em inflamações, no metabolismo de glicose e lipídios, na autofagia e em adaptações ao estresse celular por meio da desacetilação de proteínas-alvo como NF-κB e FOXO1. Quando acetilado pelo SIRT1, o FOXO1 leva ao aumento da expressão de genes gliconeogênicos.³³ O aumento da atividade transcricional do FOXO1 também aumenta a expressão gênica da catalase e superóxido dismutase.³⁴ Até onde sabemos, não existem estudos que tenham avaliado o efeito do açaí na expressão das proteínas FOXO1 e SIRT1.

No coração adulto normal, aproximadamente 95% da produção de ATP é derivada da fosforilação oxidativa mitocondrial. O coração adulto normalmente obtém de 50 a 70% do seu ATP a partir da β-oxidação dos ácidos graxos, em vez da oxidação da glicose.⁴² O dinucleotídeo de flavina adenina e o dinucleotídeo de nicotinamida adenina produzidos durante a oxidação de ácidos graxos são utilizados na síntese de ATP mitocondrial via fosforilação oxidativa.⁴³ Isso depende criticamente da manutenção de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana

Tabela 3 – Atividade miocárdica de enzimas relacionadas ao metabolismo energético após protocolo global de isquemia-reperfusão

	C (n= 9)	A (n=10)	Valor de p
β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (nmol/mg de proteína)	19,8 ± 3,3	49,8 ± 7,0	< 0,001
Fosfofructoquinase (nmol/g de tecido)	181 (160 – 228)	73 (67 – 82)	< 0,001
Lactato desidrogenase (nmol/mg de proteína)	147 (145 – 167)	70 (65 – 77)	< 0,001
Piruvirato desidrogenase (nmol/g de tecido)	114 ± 11	176 ± 19	< 0,001
Citrato sintase (nmol/mg de proteína)	30 (30 – 37)	100 (81 – 117)	< 0,001
Complexo I (nmol/mg de proteína)	3,7 ± 1,0	8,0 ± 1,7	< 0,001
Complexo II (nmol/mg de proteína)	2,1 ± 0,6	3,5 ± 0,5	< 0,001
ATP sintase (nmol/mg de proteína)	22,0 ± 3,9	44,5 ± 6,6	< 0,001

C: grupo controle; A: grupo açaí. Os valores são expressos como média ± desvio padrão ou mediana e 1º e 3º quartil; Valor de p: teste t ou de Mann-Whitney.

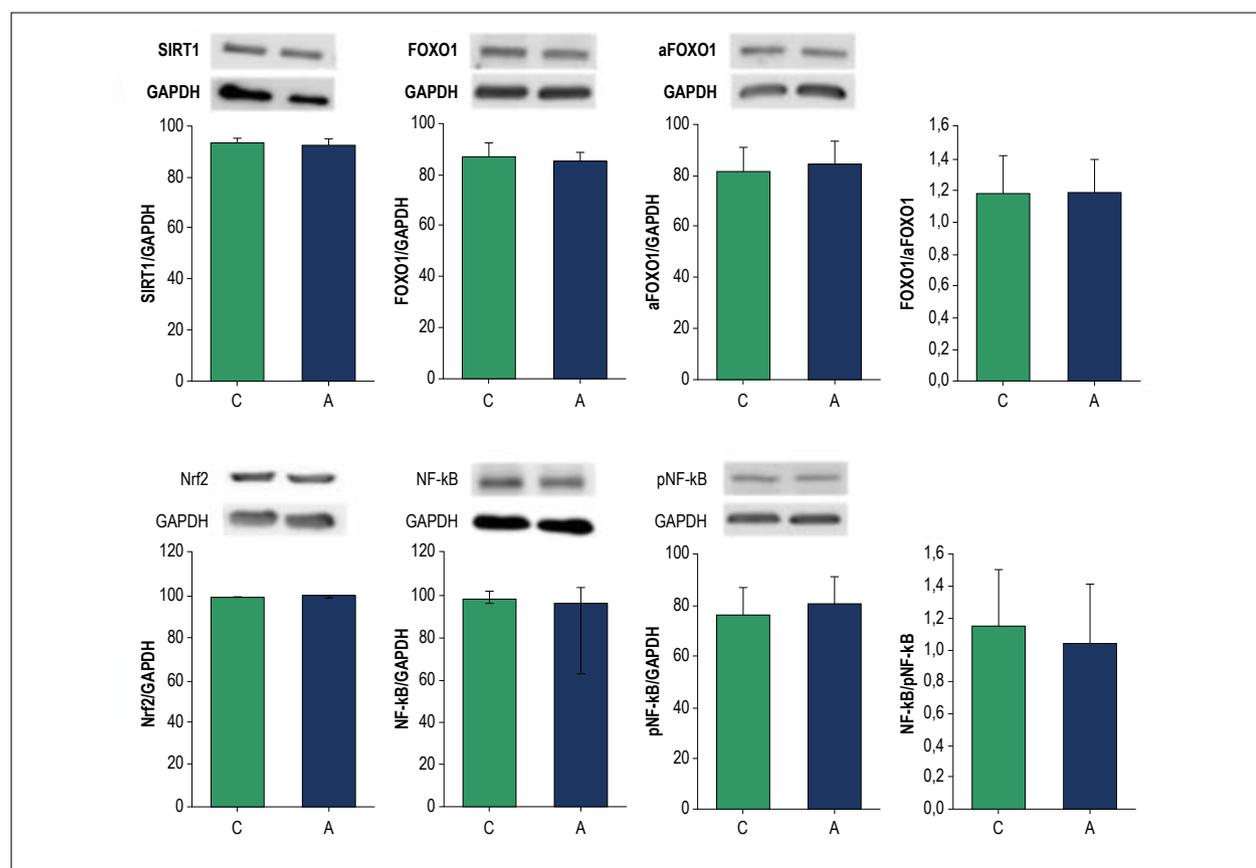


Figura 2 – Expressão proteica avaliada por Western blot. C: grupo controle; A: grupo açaí; SIRT1: regulador silencioso de informações 1; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; FOXO1: proteína garfo cabeça 1; aFOXO1: proteína garfo cabeça acetilada 1; Nrf-2: fator nuclear eritróide 2; NF-kB: fator nuclear kappa B; pNF-kB: fator nuclear fosforilado Kappa B. Todas as expressões proteicas foram normalizadas por GAPDH. Não há diferenças entre os grupos na expressão proteica ($p > 0,05$).

mitocondrial interna gerada pela extrusão de prótons da matriz para o espaço intermembranar pelos complexos I, III e IV, que formam o CTE.⁴⁴

Em nosso estudo, a suplementação de açaí resultou em maior atividade das enzimas β-hidroxiacil CoA-desidrogenase e citrato sintase, que podem caracterizar maior oxidação de ácidos graxos. Além disso, houve menor atividade da fosfofructoquinase, envolvida na glicólise. Isso mostra que a suplementação de

açaí alterou a seleção de substratos de glicose para ácidos graxos, mantendo o metabolismo energético mais próximo de uma situação fisiológica, como mostrado anteriormente em um modelo experimental de isquemia-reperfusão renal.⁴⁵ Além disso, a suplementação de açaí aumentou a atividade dos complexos I, II e ATP sintase, protegendo os danos aos complexos mitocondriais. No entanto, a oxidação de ácidos graxos diminuiu a eficiência metabólica dos corações lesionados.

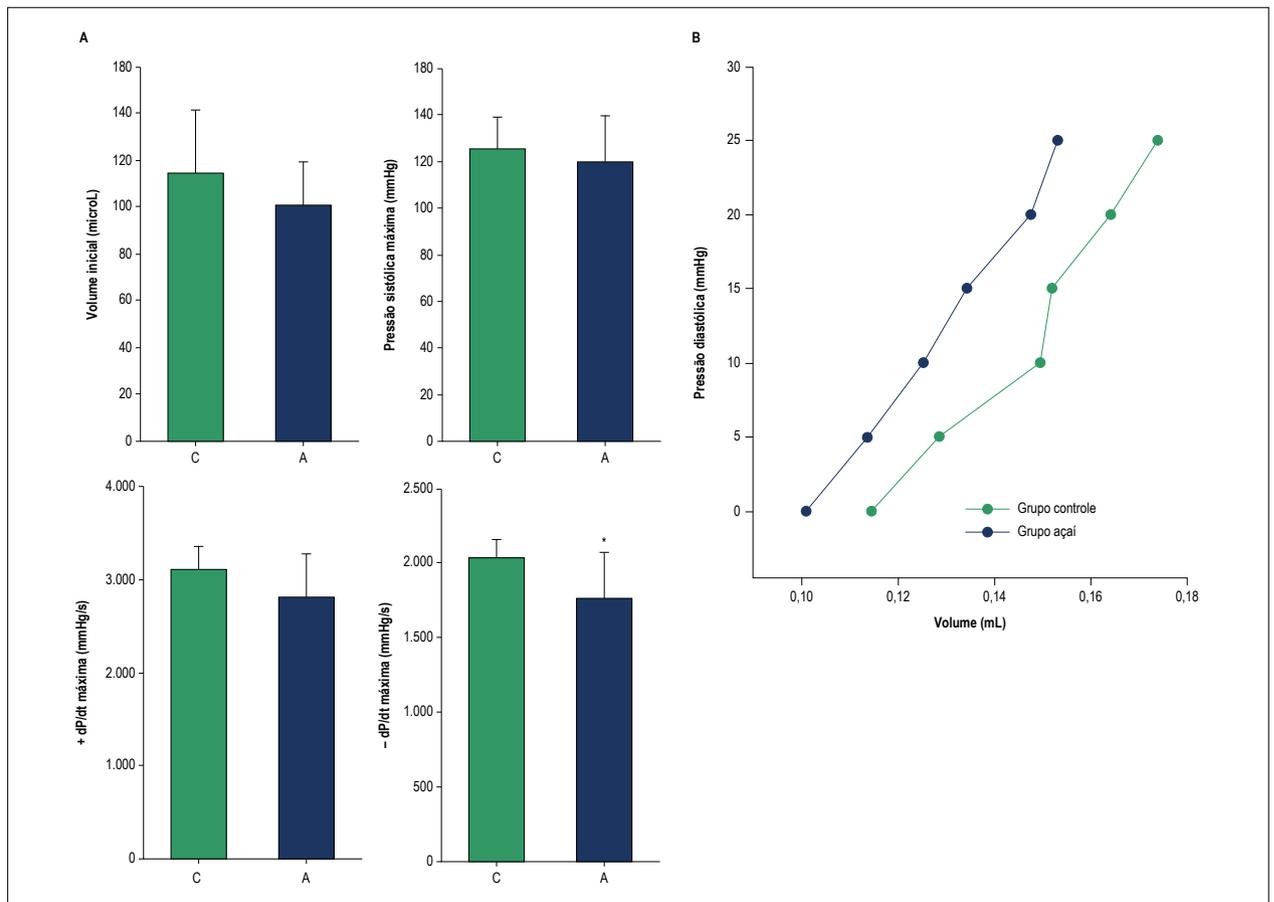


Figura 3 – Estudo cardíaco isolado após isquemia-reperfusão miocárdica global. Painel A: C: grupo controle; A: grupo de açaí. O volume inicial representa o volume dentro do balão quando a pressão diastólica era zero; +dP/dt: taxa de desenvolvimento da pressão ventricular esquerda; -dP/dt: taxa de diminuição da pressão ventricular esquerda; * diferente do grupo C ($p = 0,025$). Painel B: Relação entre pressão diastólica e volume. A área sob a curva e a inclinação foram semelhantes entre os grupos.

Curiosamente, a polpa de açaí é composta predominantemente por lipídios, que correspondem a 48%.⁴⁶ A oferta de mais lipídios poderia contribuir para o aumento da atividade da β -hidroxil-CoA-desidrogenase no grupo tratado com açaí. Esse padrão foi observado no modelo experimental de infarto do miocárdio, que administrava dieta rica em lipídios.⁴⁷

Como esperado para o período de 30 minutos de isquemia, observamos uma grande área de infarto em nosso estudo, de aproximadamente 50% em ambos os grupos. Anteriormente, a suplementação de uma dieta rica em antocianinas em um estudo com modelo experimental de isquemia-reperfusão diminuiu a área miocárdica infartada.⁴⁸ No entanto, no presente estudo, a suplementação de açaí não reduziu o tamanho do infarto.

Grandes infartos geralmente apresentam importante disfunção ventricular esquerda resultante do comprometimento dos processos celulares e de alterações na morfologia cardíaca. O aumento do estresse oxidativo compromete a permeabilidade da membrana plasmática dos miócitos, a atividade das bombas iônicas na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático e o trânsito intracelular de cálcio, comprometendo tanto a sístole quanto a diástole.⁷ Seria de esperar que a atenuação do estresse oxidativo fosse seguida por uma melhora na função ventricular esquerda, como demonstrado em diferentes

modelos de dano miocárdico.^{25,49,50} No entanto, este estudo evidenciou que a administração de açaí piorou a função diastólica após isquemia-reperfusão cardíaca. Isso nos leva a inferir que a disfunção ventricular observada neste modelo depende de outros mecanismos além do dano oxidativo. Curiosamente, um estudo realizado para investigar o efeito do extrato de antocianina na isquemia-reperfusão cardíaca global de ratos sugere que a antocianina era cardioprotetora em baixas doses e poderia ser cardioprotóxica em altas.⁵¹

Além disso, a mudança que ocorre no metabolismo energético em situações de estresse tem papel protetor no miocárdio.⁴² O fato de a suplementação de açaí impedir o uso de glicose e favorecer a manutenção do metabolismo miocárdico próximo ao normal pode ter interferido negativamente nesse mecanismo protetor adaptativo.

Enquanto a isquemia induz alterações morfológicas e funcionais e a lesão de reperfusão pode exacerbar esses aspectos, a descoberta de novos fármacos, substâncias ou estratégias que minimizem o dano cardíaco é essencial. A quantidade de açaí que os ratos ingeriram foi equivalente a 600 mg para um ser humano de 60 kg,⁵² quantidade plausível de ser ingerida por um ser humano. Portanto, o açaí pode ser uma estratégia potencial para atenuar a lesão de isquemia-reperfusão no cenário clínico.

No entanto, existem algumas limitações que dificultam o impacto translacional desses resultados. Primeiro, os ratos compartilham várias vias metabólicas com os seres humanos, mas os organismos são bem diferentes. Segundo, neste estudo avaliamos uma isquemia miocárdica global, que não é a rotina na prática clínica. O processo isquêmico em humanos é o resultado de um longo processo inflamatório que pode modular vias metabólicas completamente diferentes do nosso modelo.⁵³

Conclusão

A suplementação de açaí não diminuiu a área infartada nem melhorou a função ventricular esquerda no modelo global de isquemia-reperfusão, apesar de melhorar o metabolismo energético cardíaco e atenuar o estresse oxidativo do miocárdio, sugerindo que esses mecanismos podem não ser os principais determinantes da piora da função ventricular esquerda diastólica observada após isquemia e reperfusão.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Zornoff L, Paiva SAR, Polegato BF; Obtenção de dados: Alegre P, Mathias L, Lourenço MA, Gonçalves A, Fernandes AA; Análise e interpretação dos dados: Alegre P, Santos PP, Gaiolla PSA, Minicucci MF, Zornoff L, Paiva SAR, Polegato BF; Análise estatística: Minicucci MF,

Paiva SAR, Polegato BF; Redação do manuscrito: Alegre P, Santos PP, Polegato BF; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Alegre P, Mathias L, Lourenço MA, Santos PP, Gonçalves A, Fernandes AA, Gaiolla PSA, Minicucci MF, Zornoff L, Paiva SAR, Polegato BF.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Patricia Alegre pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu sob o número de protocolo CEUA 1111/2014. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

Referências

1. Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71.
2. Kals J, Starkopf J, Zilmer M, Pruler T, Pulges K, Hallaste M, et al. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *Int J Cardiol*. 2008;125(1):133-5.
3. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*. 2004;62(1):97-106.
4. Borges JP, Lessa MA. Mechanisms involved in exercise-induced cardioprotection: a systematic review. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(1):71-81.
5. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med*. 2018 Mar;117:76-89.
6. Martins GF, Siqueira Filho AC, Santos JB, Assuncao CR, Bottino F, Carvalho KG, et al. Trimetazidine on ischemic injury and reperfusion in coronary artery bypass grafting. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(3):209-16.
7. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1201-6.
8. Mahmoudabady M, Haghshenas M, Niazmand S. Extract from *Teucrium polium* L. protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury. *Adv Biomed Res*. 2018 Jan 30;7:15.
9. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):262-9.
10. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açaí fruit (*Euterpe oleracea* Martius) intake. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012;67(3):235-41.
11. Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;49(3):188-94.
12. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem*. 2005;53(8):2928-35.
13. Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem*. 2015 Jul 15;179:137-51.
14. da Silveira TFF, Godoy HT. Non-anthocyanin phenolic compounds in açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice by ultrahigh-performance liquid chromatography-diode array detector (UHPLC-DAD): a multivariate optimization. *J Chromatogr Sci*. 2019;57(2):139-48.
15. Spada PD, Dani C, Bortolini GV, Funchal C, Henriques JA, Salvador M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *J Med Food*. 2009;12(5):1084-8.
16. Wu X, Schauss AG. Mitigation of inflammation with foods. *J Agric Food Chem*. 2012;60(27):6703-17.
17. Zapata-Sudo G, da Silva JS, Pereira SL, Souza PJ, de Moura RS, Sudo RT. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (acai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jul 8;14:227.

18. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2013 Aug;58:68-76.
19. Wang X, Yuan B, Cheng B, Liu Y, Zhang B, Lin X, et al. Crocin alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced endoplasmic reticulum stress via regulation of MIR-34A/SIRT1/NRF2 pathway. *Shock.* 2019;51(1):123-130.
20. Nakamura A, Minakami S. Synthesis of catalase in liver slices from aminotriazole-pretreated rats. *J Biochem.* 1974;75(6):1373-5.
21. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem.* 1995;232(2):243-8.
22. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26(10):853-6.
23. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969;10(2):198-206.
24. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxy-nitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328(2):309-16.
25. Lustosa BB, Polegato B, Minicucci M, Rafacho B, Santos PP, Fernandes AA, et al. Green tea (*Cammellia sinensis*) attenuates ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2016 Dec 15;225:147-53.
26. Lefer DJ, Marbán E. Is cardioprotection dead? *Circulation.* 2017;136(1):98-109.
27. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C, Murphy MP, Krieg T. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfu
28. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):446-56.
29. Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açaí juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2008;56(17):7796-802.
30. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2012;133(2):230-55.
31. Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(12):1797-806.
32. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009;26(8):1001-43.
33. Albertoni G, Schor N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. *J Bras Nefrol.* 2015;37(1):106-14.
34. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther.* 2010;125(3):376-93.
35. Noratto GD, Angel-Morales C, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *J Agric Food Chem.* 2011;59(14):7999-8012.
36. Ajit D, Simonyi A, Li R, Chen Z, Hannink M, Fritsche KL, et al. Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE reporter activities in DI TNC1 astrocytes. *Neurochem Int.* 2016 Jul;97:49-56.
37. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem.* 2012;60(4):1084-93.
38. Dias MM, Martino HS, Noratto G, Roque-Andrade A, Stringheta PC, Talcott S, et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açaí (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. *Food Funct.* 2015;6(10):3249-56.
39. Bai H, Wang Z, Cui J, Yun K, Zhang H, Liu RH, et al. Synergistic radiation protective effect of purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP IV) with grape seed procyanidins. *Molecules.* 2014;19(12):20675-94.
40. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, et al. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(4):576-86.
41. da Silva Santos V, Bisen-Hersh E, Yu Y, Cabral IS, Nardini V, Culbreth M, et al. Anthocyanin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(7):390-404.
42. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SAR, Zornoff LAM. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev.* 2013;21(3):135-40.
43. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):207-58.
44. Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1706(1-2):1-11.
45. El Morsy EM, Ahmed MA, Ahmed AA. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açaí extract preconditioning in a rat model. *Life Sci.* 2015 Feb 15;123:35-42.
46. Alessandra-Perini J, Rodrigues-Baptista KC, Machado DE, Nasciutti LE, Perini JA. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (açaí): a systematic review. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200101.
47. Ardisson LP, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Influence of AIN-93 diet on mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol.* 2012;156(3):265-9.
48. Toufektsian MC, de Lorgeril M, Nagy N, Salen P, Donati MB, Giordano L, et al. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J Nutr.* 2008;138(4):747-52.
49. Carvalho PB, Gonçalves AF, Alegre PH, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, et al. Pamidronate attenuates oxidative stress and energetic metabolism changes but worsens functional outcomes in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;40(3-4):431-42.
50. Zornoff LA, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, et al. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicol Sci.* 2006;90(1):259-66.
51. Zibera L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, et al. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol.* 2010;10(4):283-94.
52. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008;22(3):659-61.
53. Garcia LR, Polegato BF, Zornoff LAM. Challenges of translational science. *Arq Bras Cardiol.* 2017;108(5):388-9.

