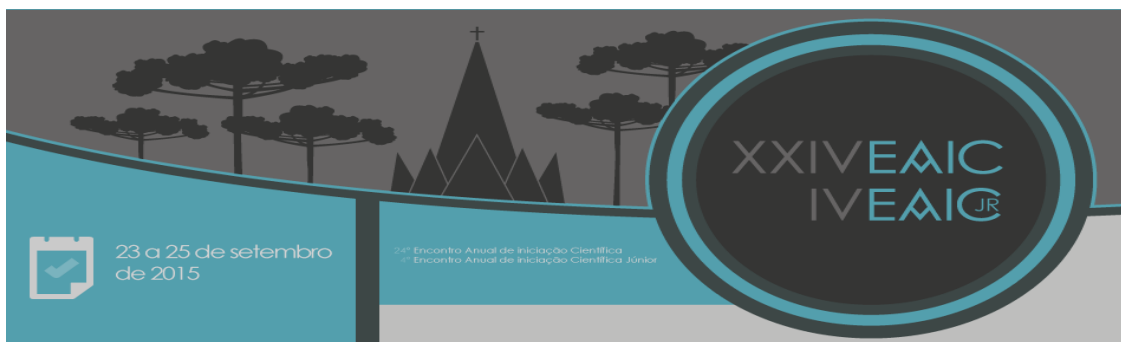




DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Caroline Leite Molina (PIBIC-AF-UEM), Anacharis Babeto de Sá Nakanishi, Adelar Bracht, Jurandir Fernando Comar (Orientador), e-mail: caroline.l.molina@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Departamento de Bioquímica/Maringá, PR.

Ciências Biológicas. Bioquímica.

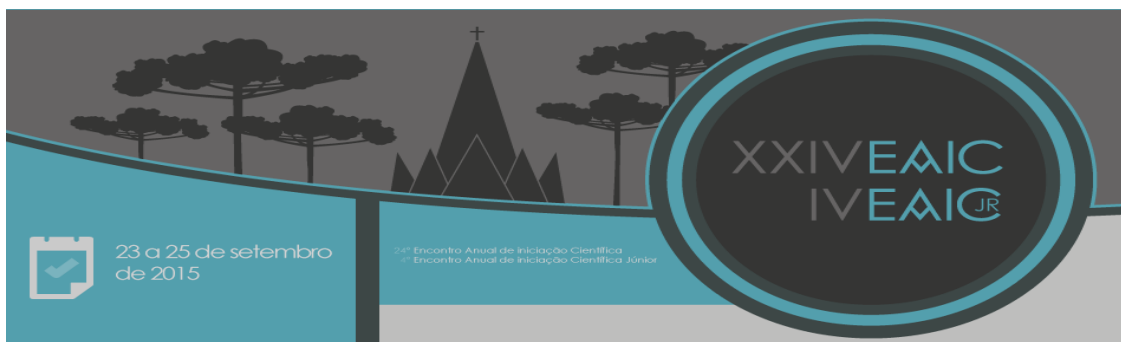
Palavras-chave: artrite induzida por adjuvante, estresse oxidativo.

Resumo:

Artrite induzida por adjuvante é uma imunopatologia experimental em ratos, frequentemente utilizado como um modelo para estudar a inflamação crônica auto-imune e inflamatória caquexia. Alterações metabólicas e aumento do estresse oxidativo ocorrem no fígado de ratos artríticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes no fígado de ratos artríticos. Foram determinados no homogenato de fígado a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase e glicose 6-fostato desidrogenase (G6PDH). Nenhuma diferença foi verificada na atividade da SOD e glutathione reductase, mas a atividade da catalase e glutathione peroxidase foram menores na condição artrítica. Em conclusão, a redução na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase também pode ser responsável pelo aumentado estresse oxidativo que ocorre no fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante.

Introdução

A artrite induzida por adjuvante (AIA) é uma imunopatologia experimental em ratos que apresenta muitas semelhanças com a artrite reumatóide humana: hiperplasia sinovial, inflamação sistêmica, caquexia e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, sendo por isso, utilizado para avaliação de drogas anti-inflamatórias e anti-reumáticas (BENDELE et al., 1999). Sua característica multissistêmica é demonstrada principalmente por alterações no metabolismo das células hepáticas, conforme demonstrado pela reduzida síntese de albumina, aumento na síntese de globulinas e redução no metabolismo de xenobióticos. Recentes estudos conduzidos em nosso



laboratório demonstraram que o estresse oxidativo está aumentado no fígado de ratos artríticos: elevação de espécies reativas de oxigênio (ROS), alta injúria oxidativa (TBARS e proteínas carboniladas) e baixa razão GSH/GSSG (COMAR et al., 2013). Entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes ainda não foram avaliadas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes no fígado de rato com artrite induzida por adjuvante. Adicionalmente serão avaliados alguns parâmetros plasmático que demonstram a caquexia, inflamação crônica e envolvimento hepático nos animais.

Materiais e métodos

A indução da artrite foi feita em ratos machos da linhagem Holtzman com cinquenta dias de idade, os quais foram injetados na pata traseira esquerda com 0,1 ml de adjuvante completo de Freund. Aos 21 dias após a indução, ratos em jejum de 18 horas foram anestesiados, a cavidade peritoneal aberta cirurgicamente, o sangue coletado da veia cava e o fígado imediatamente removido, clampeado e armazenado em nitrogênio líquido. O tecido foi então homogeneizado em homogeneizador Dounce com 10 volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7.4), que foi centrifugado a 11.000g durante 20 minutos e o sobrenadante separado como fração solúvel do homogenato para determinar a atividade das enzimas catalase, SOD, glutathione peroxidase, glutathione reductase e G6PDH (BERGMEYER, 1974). Albumina, proteínas totais e atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas no plasma por espectrofotometria utilizando Kits comerciais.

Resultados e Discussão

Os primeiros experimentos foram feitos para determinar os indicadores de caquexia e inflamação crônica nos ratos após 21 dias da injeção do adjuvante. Os resultados estão mostrados na tabela 1. O peso dos ratos artríticos foram 60% daqueles dos controles saudáveis com idade similar, entretanto, não houve diferença no peso dos fígados. Ratos artríticos apresentaram uma redução de 43% nos níveis de albumina e aumento de 42% nos níveis de globulinas plasmática. Os níveis de proteínas totais foi 13% maior nos animais artríticos. A atividade da AST foi apenas discretamente aumentada na condição artrítica (+43%), mas nenhuma alteração foi observada na atividade da ALT. Os resultados mostrados na tabela 1 mostram que os animais utilizados no presente estudo apresentam muitos sinais de caquexia e inflamação crônica, mas mínimo comprometimento da função hepática.

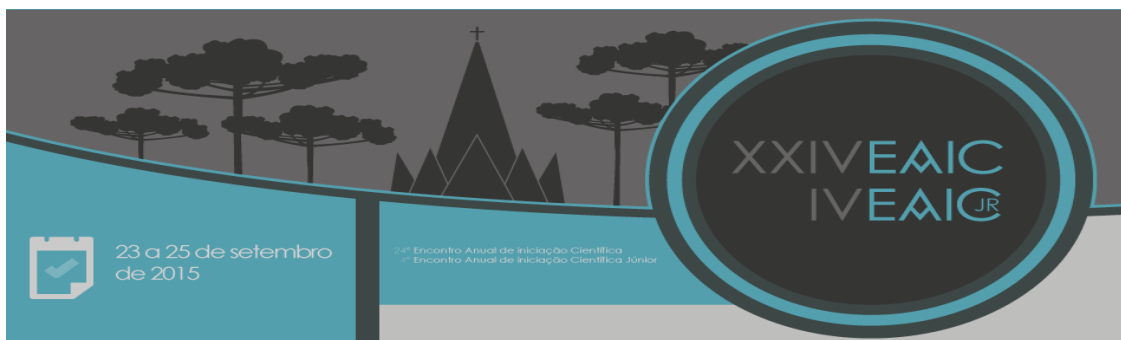


Tabela 1. Parâmetros de caquexia, inflamação crônica e envolvimento hepático em ratos com artrite induzida por adjuvante. Proteínas totais, albumina, AST e ALT foram determinadas no plasma. Globulinas foram calculadas pela subtração da albumina das proteínas totais. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média de cinco a seis determinações para cada condição experimental. Os pares de valores na mesma linha com sinais sobrescritos são estatisticamente diferentes: * $p < 0.0001$; ^{###} $p < 0.05$.

	Controles	Artrite
<i>Parâmetros de caquexia</i>		
Peso do rato (g)	295.7 $\pm$ 5.6*	175.3 $\pm$ 2.6*
Peso fresco do fígado (g)	7.51 $\pm$ 0.36	7.35 $\pm$ 0.38
<i>Parâmetros de inflamação crônica</i>		
Proteínas totais (mg mL ⁻¹)	59.34 $\pm$ 1.82 ^{###}	67.45 $\pm$ 0.61 ^{###}
Albumina (mg mL ⁻¹)	20.00 $\pm$ 0.85*	11.42 $\pm$ 0.51*
Globulinas (mg mL ⁻¹)	39.36 $\pm$ 1.73*	56.03 $\pm$ 0.31*
Razão albumina/globulinas	0.51 $\pm$ 0.04*	0.20 $\pm$ 0.01*
<i>Parâmetros de envolvimento hepático</i>		
AST (U L ⁻¹)	69.6 $\pm$ 4.8 ^{##}	99.8 $\pm$ 9.2 ^{###}
ALT (U L ⁻¹)	31.1 $\pm$ 0.5	29.8 $\pm$ 2.6

A tabela 2 mostra as atividades enzimáticas medidas no homogenato total. Os resultados estão apresentados por peso de tecido fresco e por mg de proteínas (atividade específica). Nenhuma diferença foi verificada na atividade da SOD e glutathione reductase, mas a atividade da catalase e glutathione peroxidase foram menores na condição artrítica. A diferença foi mais pronunciada para a catalase, que na condição artrítica foi somente um terço daquela encontrada para a condição controle. Por outro lado, a atividade da enzima G6PDH foi claramente maior na condição artrítica.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostram que o aumentado estresse oxidativo que ocorre no fígado de rato com artrite induzida por adjuvante é causado não só por redução na razão GSH/GSSG, mas também por uma diminuição na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase.

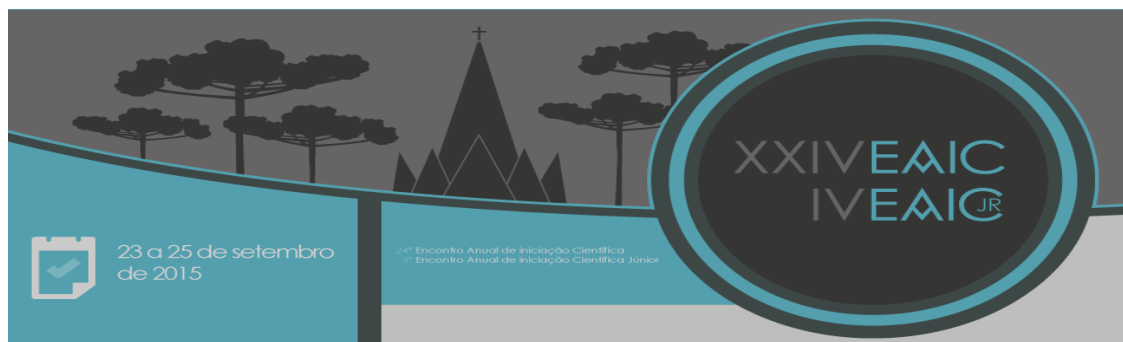


Tabela 2. Atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de fígado de ratos controles e artríticos. As atividades enzimáticas foram expressas por grama de tecido fresco e por mg de proteínas (atividade específica) no sobrenadante do homogenato. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média de cinco a sete animais por condição experimental. Pares de valores na mesma linha marcados com sobrescrito são estatisticamente diferentes: * $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$; # $p < 0.01$; ## $p < 0.05$.

Parâmetros	Referido por peso de tecido		Referido por mg de proteínas	
	Controle	Artrite	Controle	Artrite
Catalase	$\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$		$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
	$88.61 \pm 3.20^*$	$29.43 \pm 1.10^*$	$868.0 \pm 65.7^{**}$	$327.9 \pm 33.1^{**}$
Glutathione redutase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$		$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
	$4.78 \pm 0.18^{\#}$	$3.99 \pm 0.13^{\#}$	48.4 ± 2.2	38.7 ± 3.6
Superoxido dismutase (SOD)	Units g^{-1}		Units mg^{-1}	
	226.5 ± 12.9	184.9 ± 17.2	2.32 ± 0.13	2.15 ± 0.14
Glutathione peroxidase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$		$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
	$25.83 \pm 1.67^{**}$	$14.52 \pm 1.20^{**}$	$258.8 \pm 24.5^{##}$	$172.9 \pm 22.7^{##}$
Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$		$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
	$2.39 \pm 0.28^{##}$	$3.56 \pm 0.30^{##}$	$22.8 \pm 3.2^{**}$	$40.2 \pm 1.9^{**}$

Referências

- BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD T.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n.1, p. 134 - 42, 1999.
- BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**, vol. 1. Weinheim, London: Verlag Chemie-Academic Press, 1974.
- COMAR, J.F.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; OLIVEIRA, A.L.; WENDT, M.M.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 58, p. 144-153, 2013.