



EFEITOS DO ÓLEO DE COPAÍBA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE.

Ana Paula Arssufi Ames (PIBIC/CNPq-UEM), Anacharis Babeto de Sá Nakanishi, Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni, Adelar Bracht, Jurandir Fernando Comar (Orientador), e-mail: jfcomar@uem.br.

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

Ciências Biológicas. Bioquímica.

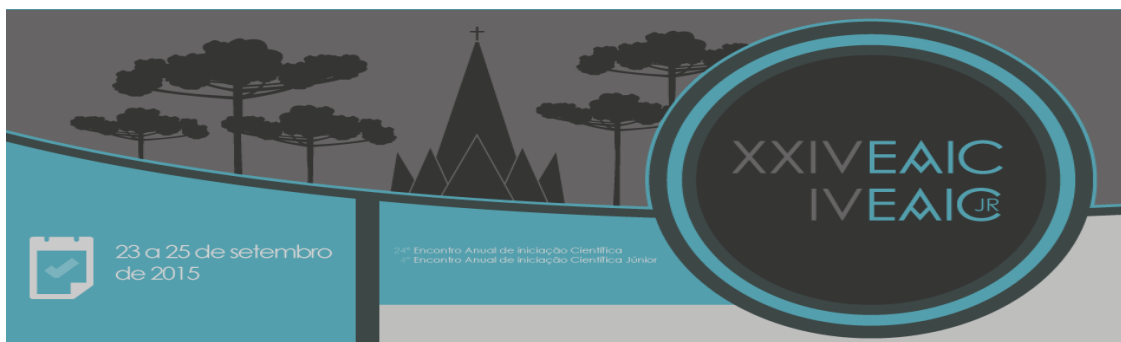
Palavras-chave: artrite, óleo de copaíba, respiração.

Resumo:

O óleo de copaíba é um óleo-resina extraído de plantas pertencentes ao gênero *Copaifera* e é utilizado para tratar diversas doenças inflamatórias. A artrite reumatoide é uma doença inflamatória autoimune, multissistêmica que pode afetar o fígado, cérebro e tecido vascular. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento de ratos artríticos com óleo de copaíba sobre a atividade respiratória e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias isoladas do fígado. A respiração com α -cetoglutarato foi alterada no grupo controle tratado em comparação ao controle. Com malato+glutamato houve um aumento nos estados III e IV nos animais artríticos em relação aos controles, e uma diminuição no estado IV nos animais artríticos tratados em relação aos artríticos. O óleo não foi capaz de alterar a respiração com mitocôndrias rompidas. Em conclusão, os resultados mostram que o consumo mitocondrial de oxigênio é apenas modificado pela artrite quando o substrato utilizado foi o malato+glutamato e que o tratamento com o óleo de copaíba reverteu apenas parcialmente esta alteração. Em adição, a produção mitocondrial de ROS não é afetada pela artrite induzida por adjuvante.

Introdução

O óleo de copaíba é um óleo-resina extraído de plantas pertencentes ao gênero *Copaifera*, abundantes na Amazônia brasileira. É amplamente utilizado na medicina popular e apresenta comprovada atividade anti-inflamatória e antioxidante (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007; LIMA SILVA *et al.*, 2009). A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada por



inflamação crônica e sistêmica que afeta a cartilagem articular, membrana sinovial, ossos, fígado, pulmão e tecido vascular (SANGHA, 2000). A artrite induzida por adjuvante é uma imunopatologia experimental em ratos que apresenta muitas semelhanças fisiopatológicas com a artrite reumatóide humana (BENDELE *et al.*, 1999). Ratos artríticos apresentam alterações nos marcadores de estresse oxidativo tecidual no plasma, nos sítios de inflamação, no fígado e no cérebro (COMAR *et al.*, 2013).

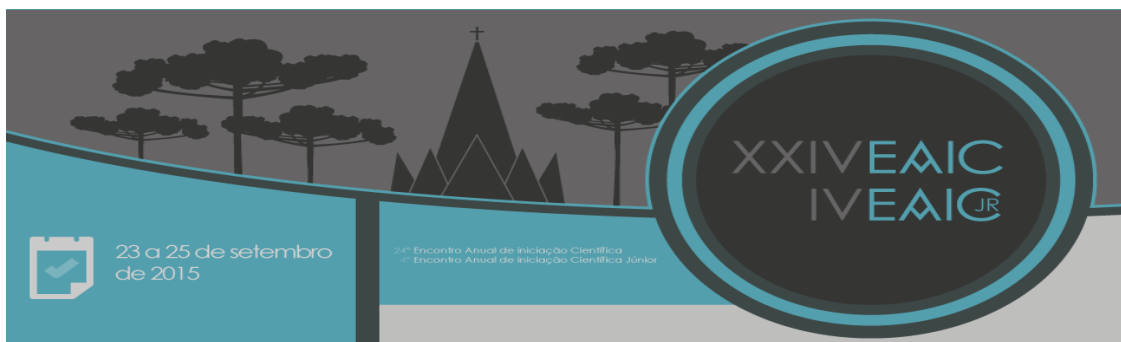
Considerando que o fígado é afetado pela artrite reumatóide, tanto em relação aos aspectos metabólicos quanto ao estresse oxidativo, este estudo foi planejado para investigar os efeitos do tratamento de ratos artríticos (artrite induzida por adjuvante completo de Freund) com óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) sobre a atividade respiratória e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias isoladas do fígado.

Materiais e métodos

Foram utilizando ratos da linhagem Holtzman divididos em quatro grupos: 1) controles, 2) controles tratados, 3) artríticos, e 4) artríticos tratados. O óleo foi administrado por via oral (1,26 ml/kg) nos grupos tratados, por 23 dias (5 antes e 18 depois da indução da artrite). A artrite foi induzida por injeção intradérmica, na pata posterior esquerda, de adjuvante completo de Freund. Mitocôndrias de fígado dos ratos dos quatro grupos foram isoladas por centrifugação diferencial e o consumo de oxigênio determinado por polarografia. A respiração em mitocôndrias intactas foi avaliada na presença dos seguintes substratos: succinato, malato+glutamato e α -cetoglutarato (10 mmol/L). Para mitocôndrias rompidas foi utilizado succinato, NADH e TMPD (10 mmol/L). A velocidade de consumo de oxigênio foi expresso como nmol/min/mg de proteína. O controle respiratório (RC) e razão ADP/O foram calculados para mitocôndrias intactas. Foi avaliada também a produção mitocondrial de ROS em mitocôndrias intactas por espectrofluorimetria utilizando succinato como substrato. A significância estatística foi analisada por ANOVA ONE WAY e pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados utilizando mitocôndrias intactas. Com o succinato (não mostrado) não foi observado diferença entre os grupos. Com α -cetoglutarato (tabela 1) houve um aumento significativo no RC no grupo controle tratado em comparação ao controle. Com malato+glutamato (tabela 2) houve um aumento no estado III e IV nos animais artríticos em relação aos controles, e uma diminuição no estado IV nos animais artríticos tratados em relação aos artríticos.



O ensaio com mitocôndrias rompidas (tabela 3) não demonstrou diferença significativa entre os grupos. O óleo não foi capaz de alterar a geração de espécies reativas de oxigênio entre os grupos (tabela 4).

Tabela 1: Ação do óleo de copaíba sobre a respiração em mitocôndrias com o substrato α -cetoglutarato.

Grupo	Estado II	Estado III	Estado IV	Razão ADP/O	Controle Respiratório
	(nmol O ₂ /min.mg proteína)				
Controle	6,2 $\pm$ 0,69	31,5 $\pm$ 1,88	11,4 $\pm$ 0,70	3,0 $\pm$ 0,22	2,8 $\pm$ 0,19*
Controle Tratado	6,3 $\pm$ 0,72	37,2 $\pm$ 4,08	9,2 $\pm$ 0,77	3,0 $\pm$ 0,14	4,1 $\pm$ 0,49*
Artrítico	5,9 $\pm$ 0,69	36,0 $\pm$ 3,86	13,7 $\pm$ 1,23	2,8 $\pm$ 0,23	2,7 $\pm$ 0,26
Artrítico Tratado	8,1 $\pm$ 0,73	37,1 $\pm$ 3,32	11,8 $\pm$ 0,75	2,9 $\pm$ 0,14	3,1 $\pm$ 0,22

Os resultados são a média de 5-6 animais $\pm$ erro padrão da média. p < 0,05.

*diferença significativa entre os ratos não tratados e tratados; #diferença significativa entre controles e artríticos.

Tabela 2: Ação do óleo de copaíba sobre a respiração em mitocôndrias intactas com o substrato malato+glutamato.

Grupo	Estado II	Estado III	Estado IV	Razão ADP/O	Controle Respiratório
	(nmol O ₂ /min.mg proteína)				
Controle	6,1 $\pm$ 0,53	57,5 $\pm$ 0,80 [#]	10,6 $\pm$ 0,52 [#]	3,2 $\pm$ 0,16	5,5 $\pm$ 0,24
Controle Tratado	6,3 $\pm$ 0,84	63,1 $\pm$ 5,24	9,6 $\pm$ 0,38	3,3 $\pm$ 0,18	6,6 $\pm$ 0,54
Artrítico	8,7 $\pm$ 0,56	74,7 $\pm$ 3,60 [#]	18,4 $\pm$ 1,98 ^{#*}	3,0 $\pm$ 0,15	4,3 $\pm$ 0,38
Artrítico Tratado	9,4 $\pm$ 0,97	70,3 $\pm$ 6,01	13,5 $\pm$ 1,72*	3,3 $\pm$ 0,25	5,4 $\pm$ 0,48

Os resultados são a média entre 5-6 animais $\pm$ erro padrão da média. p < 0,05.

*diferença significativa entre os ratos não tratados e tratados; #diferença significativa entre controles e artríticos.

Tabela 3: Ação do óleo de copaíba sobre a respiração em mitocôndrias rompidas com os substratos succinato, NADH e TMPD.

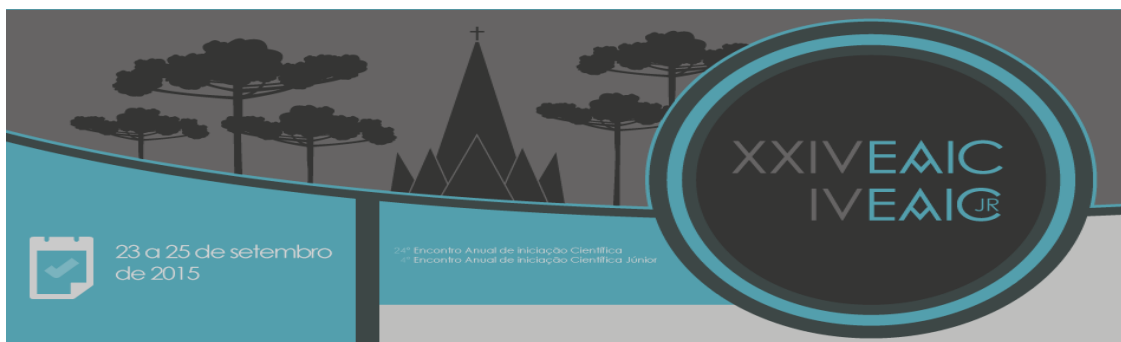
Substratos	Grupos			
	Controles	Controles Tratados	Artríticos	Artríticos tratados
	(nmol O ₂ /min.mg proteína)			
Succinato	51,7 $\pm$ 7,31	42,4 $\pm$ 1,42	52,3 $\pm$ 5,09	46,2 $\pm$ 5,26
NADH	49,6 $\pm$ 3,92	33,9 $\pm$ 3,21	48,2 $\pm$ 8,34	36,0 $\pm$ 1,04
TMPD	105,2 $\pm$ 3,71	101,4 $\pm$ 7,98	121,7 $\pm$ 7,11	108,2 $\pm$ 8,34

Os resultados são a média entre 5-6 animais $\pm$ erro padrão da média. p < 0,05.

*diferença significativa entre os ratos não tratados e tratados; #diferença significativa entre controles e artríticos.

Conclusões

Os resultados mostram que o consumo mitocondrial de oxigênio é apenas modificado pela artrite quando o substrato utilizado foi o malato+glutamato e



que o tratamento com o óleo de copaíba reverteu apenas parcialmente esta alteração. Em adição, a produção mitocondrial de ROS não foi afetada pela artrite induzida por adjuvante.

Tabela 4: Ação do óleo de copaíba sobre a geração de espécies reativas de oxigênio com os substratos succinato e succinato + rotenona.

Substratos	Grupos			
	Controles	Controles Tratados	Artríticos	Artríticos tratados
	(nmol / min.mg proteína)			
Succinato	0,157 ± 0,01	0,156 ± 0,01	0,168 ± 0,02	0,154 ± 0,02
Succinato + Rotenona	0,255 ± 0,02	0,332 ± 0,02	0,264 ± 0,02	0,318 ± 0,03

Os resultados são a média entre 5-6 animais ± erro padrão da média. $p < 0,05$.

*diferença significativa entre os ratos não tratados e tratados; #diferença significativa entre controles e artríticos.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq pela concessão da bolsa.

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.
- COMAR, J.C.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; DE 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, 144-153, 2013.
- LIMA SILVA, J. J.; GUIMARÃES, S. B.; DA SILVEIRA, E.R.; DE VASCONCELOS, P. R.; LIMA, G. G.; TORRES, S. M.; DE VASCONCELOS, R. C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. **Aesthetic. Plast. Surg.**, v. 33, n. 1, p. 104-109, 2009.
- SANGHA, O. Effect size in clinical studies of patients with rheumatoid arthritis. EULAR guidelines and OMERACT core-sets. **Z. Rheumatol.**, v. 59, n. 1, p. 45-49, 2000.
- VEIGA JUNIOR, V. F. ; ROSAS, E. C. ; CARVALHO, M. V.; HENRIQUE M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.