

## EFEITOS DO ALFA-TOCOFEROL SOBRE O ESTADO OXIDATIVO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Any Carolina Chagas (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lucas Stafuza Moreira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Profa. Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi (Orientador), e-mail. [absnakanishi@uem.br](mailto:absnakanishi@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

### Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética

**Palavras-chave:** vitamina E, espécies reativas de oxigênio, inflamação.

### Resumo

A artrite induzida (AIA) é uma doença multissistêmica, que acomete articulações, líquido sinovial, como também fígado, coração, cérebro entre outros. Alterações metabólicas observados no fígado são acompanhadas por modificações no estado oxidativo. Evidências sugerem que o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) previne lesões causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) associada ao distúrbio inflamatório. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do  $\alpha$ -tocoferol sobre o estado oxidativo de fígado de ratos com AIA. Os resultados revelam que esta vitamina modula o estado redox do fígado de animais artríticos reduzindo os níveis de marcadores de lesão oxidativa, como também elevando a atividade do sistema antioxidante enzimático. Desse modo, o  $\alpha$ -tocoferol, é molécula promissora, que precisa ser estudada como um possível coadjuvante no tratamento da artrite reumatoide humana.

### Introdução

A artrite reumatoide é uma patofisiologia que envolve uma intensa hiperplasia da cartilagem articular com participação de linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, fibroblastos e citocinas pró-inflamatórias, especialmente interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). A superprodução de mediadores pró-inflamatórios estimula macrófagos e neutrófilos a secretarem espécies reativas de oxigênio (ROS) os quais atuam como mediadores do dano no sítio da lesão. Como a doença é multissistêmica, em adição a articulação, outros órgãos são também afetados, como fígado, coração e cérebro.

A artrite induzida por adjuvante completo de Freund é uma imunopatologia experimental em ratos que apresenta muitas semelhanças com a artrite reumatoide humana. Os animais com AIA apresentam alterações nos

marcadores do estresse oxidativo no sangue, fígado e cérebro (BRACHT et al., 2016, COMAR et al., 2014, WENDT et al., 2015).

O  $\alpha$ -tocoferol, forma mais ativa da vitamina E, é uma vitamina lipossolúvel, encontra-se nas membranas lipídicas e lipoproteínas, onde atua como antioxidante, impedindo ou minimizando os danos provocados pelos radicais livres. Estudos revelam que os níveis de  $\alpha$ -tocoferol, tanto no sangue quanto no fluido sinovial dos pacientes artríticos estão diminuídos com a doença (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VASANTHI et al., 2009). Desse modo, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com  $\alpha$ -tocoferol sobre o estado oxidativo do plasma e fígado de animais com AIA.

## Materiais e métodos

Todos procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA-UEM), nº 6053280915. Ratos machos, Hotzman, foram tratados com  $\alpha$ -tocoferol (250mg/Kg e 500mg/Kg) oralmente desde o 5º dia antes da indução da artrite e por mais 18 dias após a indução. Ratos controle tratado receberam 500mg/Kg durante 23 dias. Para a indução da artrite por adjuvante foram injetados nos animais 0,1ml da suspensão de *Mycobacteria tuberculosis* inativada pelo calor. No 19º dia, os animais em jejum prévio de dezoito horas, previamente anestesiados, tiveram a cavidade abdominal exposta, o sangue coletado e o fígado removido e clampeado em nitrogênio líquido até posterior análise. O plasma foi utilizado para determinação dos níveis de tióis proteicos, grupos carbonil de proteína, capacidade antioxidante total (TAC-ABTS) e capacidade de redução de íons ferro (FRAP). O homogenato de fígado foi utilizado para determinação dos seguintes marcadores do estado oxidativo: conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), níveis de grupos carbonil de proteína, peroxidação lipídica, conteúdo de ROS e atividade de enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Todos os ensaios foram realizados no espectrofotômetro ou espectrofluorímetro. Análise estatística foi realizada por meio da análise de uma variância (ANOVA one-way, GraphPad Prisma) seguida do pos-test Tukey.

## Resultados e Discussão

No plasma, o conteúdo de grupamentos carbonil de proteínas aumentou nos animais artríticos (+46%) em relação ao controle. Em contrapartida, houve redução nos níveis de tióis (-62%), TAC-ABTS (-37%) e FRAP (-29%). O tratamento dos animais artríticos com  $\alpha$ -tocoferol (500mg/Kg) foi capaz de reduzir os níveis de proteínas carbonilada para níveis semelhantes ao controle. O  $\alpha$ -tocoferol não apresentou alterações nos marcadores séricos que justifica uma melhor capacidade antioxidante plasmática.

Um dos principais marcadores de lesão oxidativa no fígado é o conteúdo de grupamentos carbonil de proteína e os níveis de lipoperóxidos. O conteúdo desses marcadores aumentou substancialmente na condição artrítica, ambos em 34% quando comparado à condição controle. Estes dois ensaios

avaliam indiretamente o estado oxidativo já que quantificam produtos estáveis resultantes da lesão tecidual por ROS. Quanto maior o conteúdo de ROS maior os níveis desses marcadores de lesão. E de fato, os níveis de ROS em homogenato de fígado de rato artrítico (+130%) é bem maior que de animais controle. O tratamento, tanto na concentração de 250mg/Kg como em 500mg/Kg não alterou este parâmetro, mas foi capaz de reduzir os níveis de grupos carbonil de proteínas assim como níveis de TBARS no fígado de animais artríticos para níveis semelhantes a condição controle. Isso decorre da capacidade do  $\alpha$ -tocoferol, presente em membranas, proteger lipídeos e proteínas do ataque por radicais livres, por ação direta, como também indiretamente através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes, como observado abaixo.

Animais artríticos apresentam menores níveis de GSH (-60%) e maiores níveis de GSSG (+115%) quando comparado com ratos controle. Estes parâmetros acarretaram redução da razão GSH/GSSG na condição artrítica em relação ao controle. O tratamento com  $\alpha$ -tocoferol não alterou os níveis de GSH nos animais controle, mas na concentração de 250 mg/kg em animais artríticos promoveu um aumento dos níveis de GSH, que não foi suficiente para modificar a razão GSH/GSSG em relação aos animais artríticos. Em contrapartida, o  $\alpha$ -tocoferol não modificou os níveis de GSSG em ambas condições, controle e artrítico, para os dois protocolos de tratamento.

A atividade da CAT e SOD no fígado de animais com AIA reduziu drasticamente quando comparado ao controle. Esta redução foi de 71% e 37% respectivamente. Este declínio no sistema de proteção explica parcialmente o aumento do estado oxidativo do fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante. O  $\alpha$ -tocoferol não modificou a atividade da SOD nos animais controle, entretanto, aumentou a atividade dessa enzima na condição artrítica para as duas concentrações avaliadas. Este trabalho revela que a administração oral de  $\alpha$ -tocoferol (250mg/Kg ou 500mg/Kg) protege o fígado contra o estresse oxidativo induzido pela artrite. Por outro lado, o  $\alpha$ -tocoferol, independente da dose administrada, não foi capaz de modificar os níveis dessas moléculas altamente reativas. Este resultado contraria vários trabalhos que afirmam que o  $\alpha$ -tocoferol apresenta efeito antioxidante direto sobre radicais livres, diminuindo os níveis de ROS. De fato, acredita-se que a molécula  $\alpha$ -tocoferol exerça ação antioxidante não somente por ação direta sobre radicais livres, mas também indiretamente, exercendo influência sobre cascatas de sinalização. A ação do  $\alpha$ -tocoferol sobre vias de sinalização pode requerer um tempo maior para exercer sua atividade, fato esse que justifica ausência de efeito sobre o conteúdo de ROS. Adicionalmente, outro fator que pode também contribuir para este resultado, é dose de  $\alpha$ -tocoferol administrada aos animais. Provavelmente, a dose utilizada não tenha sido suficiente para reduzir os níveis desse marcador, embora tenha reduzido o conteúdo de marcadores de lesão tecidual.

## Conclusão

Em conclusão, os resultados do presente trabalho revelam que o  $\alpha$ -tocoferol modula o estado oxidativo do fígado de animais artríticos reduzindo os níveis de marcadores de lesão oxidativa, como também elevando a atividade do sistema antioxidante enzimático. Desse modo, esta molécula poderá ser estudada com uma forte coadjuvante no tratamento da artrite reumatoide, podendo contribuir para redução da morbidade relacionada a doença, e para garantir maior qualidade de vida a estes pacientes

## Agradecimentos

Ao PIBIC e ao CNPq pelo apoio à iniciação científica dos acadêmicos.

## Referências

BRACHT, A. M. K.; BROETTO-BIAZON, A. C.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; ISHIIWAMOTO, E. L. ; BRACHT, A. **Low doses of Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin 1 beta Diminish Hepatic Gluconeogenesis from Alanine in vivo. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, p. 335-339, 2006.

COMAR, J. F. ; SÁ-NAKANISHI, A. B. ; DE OLIVEIRA, ANDREA L.; WENDT, M. M. N. ; AMADO, C. A. B.; IWAMOTO, E. L. I.; PERALTA, R. M. ; BRACHT, A. **Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. Free Radical Biology & Medicine**, v. 58, p. 144-153, 2013

HALLIWELL, B. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol**, v. 141, p.312-322, 2006.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. **Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis**, v.12, p. 29-33, 2009.

WENDT, M.M.N.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; GHIZONI, C. V. C.; BERSANI-AMADO, C.A.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; COMAR, J.F. **Oxidative state and oxidative metabolism in the brain of rats with adjuvant-induced arthritis. Experimental and Molecular Pathology** , v. 98, p. 549-557, 2015.