

EFEITO DO METIL-JASMONATO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO E GERAÇÃO DE ROS EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADOS DE ANIMAIS ARTRÍTICOS

Layana Anderson (PIBIC/CNPq//UEM), Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi (Orientadora), e-mail: absnakanishi@uem.br.

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

Área e subárea do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas II/ Bioquímica

Palavras-chave: ROS, fígado, metil-jasmonato.

Resumo

O metil jasmonato (MeJA) é uma ciclopentanona que apresenta similaridade estrutural às prostaglandinas anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do MeJA sobre a atividade respiratória e a geração de ROS em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). Mitocôndrias hepáticas foram isoladas por centrifugação diferencial. Embora *in vitro* o MeJA inibiu o estado III da respiração, em animais tratados o MeJA causou modificações bastante sutis na atividade respiratória. Por outro lado, o MeJA promoveu um aumento da geração de ROS (*in vivo* e *in vitro*) em mitocôndrias de animais controle e artrítico. Desse modo, os resultados mostram que, muito provavelmente o estímulo da geração de ROS não esteja relacionado a respiração mitocondrial.

Introdução

O Metil-jasmonato (MeJa), membro da família dos jasmonatos, é uma ciclopentanona sintetizada por plantas a partir do ácido linolênico. Esta molécula apresenta atividade citotóxica contra células tumorais sem afetar células normais (Cesari et al., 2014). O principal alvo do MeJA em células tumorais são as mitocôndrias. Nesta organela o MeJA estimula a geração de ROS, desloca a hexoquinase da membrana externa mitocondrial, e depleta o ATP, induzindo a morte de células tumorais (Cesari et al., 2014). A artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA) é uma imunopatologia experimental em ratos muito semelhante a artrite reumatóide humana. Há uma íntima associação entre câncer e inflamação crônica. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com metil-jasmonato sobre parâmetros respiratórios e a geração de ROS em mitocôndrias isoladas de fígado de animais com artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA).

Materiais e métodos

Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (parecer CEUA nº 1634270916). Foram utilizados ratos machos da linhagem Holtzman. Para o tratamento os animais foram divididos

em seis grupos: Grupo 1: Ratos Controle óleo - ratos saudáveis + excipiente (óleo de milho). Grupo 2: Ratos Controle tratado - ratos saudáveis + metil-jasmonato (300mg/Kg). Grupo 3: Ratos artríticos óleo - ratos injetados com adjuvante + excipiente (óleo de milho). Grupo 4: Ratos artríticos 75 - ratos injetados com adjuvante + metil jasmonato (75mg/Kg). Grupo 5: Ratos artríticos 150 - ratos injetados com adjuvante + metil-jasmonato (150mg/Kg). Grupo 6: Ratos artríticos 300 - ratos injetados com adjuvante + metil jasmonato (300mg/Kg). Os animais foram tratados por via oral durante 23 dias. Para indução da artrite foi injetado na pata traseira esquerda o adjuvante completo de Freund. Para os experimentos *in vitro* foram isoladas as mitocôndrias de fígado de animais controle e artríticos e incubadas com diferentes concentrações do MeJA (0,312; 0,625; 1,5; 2,5; 5 e 10mM). O metil-jasmonato foi adquirido da Sigma-Aldrich. Mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (Voss *et al.* 1961). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente com eletrodo de prata/platina (Voss *et al.* 1961). Foram utilizados succinato (5 mM) e alfa-cetoglutarato (5 mM) como substratos. Mitocôndrias rompidas por congelamento-descongelamento foram utilizadas para determinar a atividades das oxidases mitocondriais. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) foi estimada em mitocôndrias intactas por espectrofluorimetria (504 nm para excitação e 529 nm para emissão) por meio da sonda de diacetato de diclorofluoresceína (DCFA-DA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Resultados e Discussão

A velocidade de produção de EROS foi 58 e 28% maior, respectivamente, em mitocôndrias de ratos controles e artríticos tratados com 300 mg kg⁻¹ MeJA. Ou seja, o MeJA estimulou a geração de ROS de modo similar as células tumorais. No entanto, não houve diferença entre ratos controle e artríticos tratados com óleo de milho. Considerando que a geração de ROS e a atividade respiratória mitocondrial são fenômenos relacionados, foi determinado se o MeJA afeta a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado. A respiração basal foi de 37% (com succinato) e 58% (com α -cetoglutarato) menor nas mitocôndrias de ratos artríticos não tratados. O tratamento com MeJA diminuiu a respiração basal (-30%) nos controles quando o succinato era o substrato, mas estimulou (+110%) quando o α -cetoglutarato era o substrato na artrite. No estado III, a respiração não foi modificada nas mitocôndrias de ratos controle tratados com MeJA, mas foi estimulada (+90%) em mitocôndrias de ratos artríticos quando o α -cetoglutarato era o substrato. A respiração do estado IV, o RC e a razão ADP/O não foram modificados pelo tratamento com MeJA.

Experimentos *in vitro* foram feitos com o intuito de detectar possíveis efeitos reversíveis de curto prazo do MeJA. A figura abaixo revela que na ausência de MeJA, a produção de EROS foi 23% maior em ratos com artrite. O MeJA estimulou EROs em ambas as mitocôndrias de ratos controles e artríticos. O incremento final foi aproximadamente o mesmo 0,116 e 0,124 nmol mL⁻¹ para as condições controle e artrítica respectivamente.

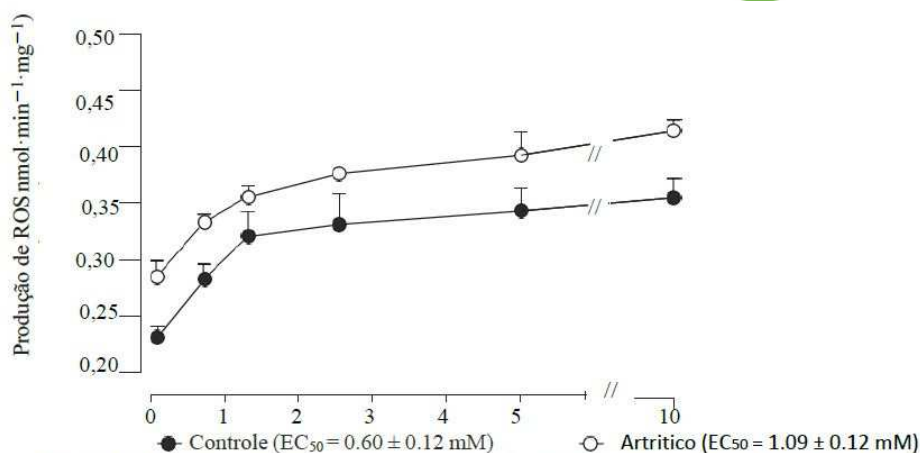


Figura 1: Estimulação da produção de ROS mitocondrial por MeJA exogenamente adicionado

Entretanto, em baixas concentrações de MeJA, as mitocôndrias dos ratos controle foram mais sensíveis, como pode ser observado pela mais baixa concentração que produz 50% de estimulação. A respiração basal na ausência de MeJA foi aproximadamente 50% menor nas mitocôndrias de ratos artríticos ($p < 0,05$). O MeJA diminuiu a respiração basal apenas na condição artrítica e com o substrato α -cetoglutarato. O estado III da respiração diminuiu de forma dependente da concentração, com os substratos (succinato ou α -cetoglutarato) em ambas condições. A EC_{50} do MeJA para a inibição do estado III da respiração foi 22% menor para ratos artríticos quando comparados aos controles. Não é possível inferir se esta inibição de curto prazo é significativa *in vivo*, já que são requeridas altas concentrações de MeJA no sítio mitocondrial (em torno de 1mM). O estado IV da respiração foi inibido em menor grau quando comparado ao estado III. O controle respiratório (RC) foi diminuído e/ou abolido com o aumento das concentrações de MeJA.

Considerando que o estado III da respiração foi inibido pelo MeJA, as atividades da NADH oxidases e succinato oxidases foram determinadas em mitocôndrias rompidas. Ambas as atividades foram progressivamente diminuídas com o aumento das concentrações de MeJA em animais controles e artríticos. Os valores de EC_{50} para a inibição da succinato oxidase foram semelhantes para ambas condições, mas o valor de EC_{50} para a inibição da NADH oxidase para os animais controles foi de apenas um terço do que para animais artríticos. No entanto, é importante destacar que a atividade da NADH oxidase na ausência da MeJA foi 30% menor em ratos com artrite. Os efeitos da MeJA sobre o consumo de oxigênio das mitocôndrias rompidas usando a combinação TMPD mais ascorbato como substrato não foi modificado por MeJA em ambas as condições. Desse modo, a geração de ROS mitocondrial ocorre por outro mecanismo não dependente da atividade respiratória. Em células tumorais o MeJA desloca a hexoquinase da mitocôndria, uma condição que estimula a geração de ROS (Goldin et al., 2008). Desse modo, este mecanismo poderia explicar pelo menos parcialmente, a geração de ROS mitocondrial induzida pelo MeJA em ratos controles e artríticos.

Conclusões

Em conclusão, o estímulo da geração de ROS em mitocôndrias de ratos controles e artríticos pelo MeJA provavelmente envolve um mecanismo não dependente da atividade respiratória. Experimentos são necessários para verificar a possível ação do MeJA sobre a atividade da enzima glicocquinase.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

CESARI, M.I; CARVALHO, E; RODRIGUES. M.; MENDONÇA, S. B.; AMÔEDO, D. N.; RUMJJANEK, D. F. Methyl Jasmonate: Putative Mechanisms of Action on Cancer Cells Cycle, Metabolism, and Apoptosis. **International Journal Cell Biology**, Rio de Janeiro, v. 2014, ID 572097, p. 25, 2014.

GOLDIN, N.; ARZOINE, L.; HEYFELS, A.; ISRAELSON, A.; ZASLAVSKY, Z.; BRAVMAN, T.; BRONNER, V.; NOTCOVICH, A.; SHOSHAN-BARMATZ, V.; FISCHER, E. Methyl. Jasmonate binds to a detaches mitochondrial-bound hexokinase. **Oncogene**, v. 27, n. 34, p. 4636-4643, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, St. Louis, v. 193, p. 265-275, 1951.

VOSS, D.O., CAMPELLO, A.P., BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 48-51, 1961.