EFEITOS DO METIL-JASMONATO SOBRE A INTERAÇÃO DA HEXOQUINASE COM A MITOCÔNDRIA NO CÉREBRO DE RATOS ARTRÍTICOS

Layana Anderson (PIBIC/FA//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: Artrite induzida, geração de ROS, metil-jasmonato.

Resumo:

O metil jasmonato (MeJA) é uma ciclopentanona que apresenta similaridade estrutural às prostraglandinas anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do MeJA sobre a neuroinflamação e a interação da hexoquinase com mitocôndrias de cérebro de ratos com artrite induzida por adjuvante. O homogenato tecidual foi preparado em tampão e o sobrenadante obtido após centrifugação foi utilizado para determinar a atividade da mieloperoxidase e da hexoquinase. Mitocôndrias cerebrais foram isoladas por centrifugação diferencial. A atividade da MPO foi aumentada no cérebro de ratos artríticos, o MeJA reduziu esse parâmetro na mesma proporção que o ibuprofeno, enquanto que o potencial de membrana, a geração de ROS, a síntese de ATP e a respiração mitocondrial não foram modificados pelo mesmo. Já, o tratamento com MeJA promoveu um aumento aparente da atividade da hexoquinase, muito provavelmente devido ao deslocamento da mesma da membrana mitocondrial. Desse modo, os resultados mostram que, o tratamento com o MeJA diminuiu a inflamação no cérebro de ratos com artrite induzida por adjuvante, porém induziu dissociação da hexoquinase da mitocôndria, o qual poderia prejudicar o metabolismo da glicose cerebral.

Introdução

O Metil-jasmonato (MeJA) pertencente à 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 com a artrite reumatoide humana. Assim como no câncer a artrite apresenta uma inflamação crônica e sistêmica. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com metil-jasmonato sobre a neuroinflamação e a interação da

hexoquinase com mitocôndrias de cérebro de ratos com artrite induzida por adjuvante.

Materiais e métodos

Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (CEUA nº 1634270916). Foram utilizados ratos machos da linhagem Holtzman. Para o tratamento os animais foram divididos em sete grupos: Grupo 1: Controle: ratos saudáveis sem tratamento (óleo de milho). Grupo 2: Controle MeJA300: ratos saudáveis + MeJA 300 mg/Kg. Grupo 3: Artríticos: ratos artríticos sem tratamento (óleo de milho). Grupo 4: Artríticos MeJA75: ratos artríticos + MeJA 75 mg/Kg. Grupo 5: Artríticos MeJA150: ratos artríticos + MeJA 150 mg/Kg. Grupo 6: Artríticos MeJA300: ratos artríticos + MeJA 300 mg/Kg. Grupo 7: Artríticos AIBU: ratos artríticos + ibuprofeno 30 mg/Kg. Os animais foram tratados por via oral durante 18 dias. Para indução da artrite foi injetado na pata traseira esquerda adjuvante completo de Freund. Para os experimentos o MeJA foi administrado diariamente pela manhã nas doses de 75, 150 ou 300 mg/Kg. O metil-jasmonato foi adquirido da Sigma-Aldrich.
Mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada por espectrofotometria no sobrenadante do homogenato cerebral. A geração de ROS foi estimada medindo o aumento da fluorescência linear devido à formação de DCF (BIAZON et al., 2016). O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido por polarografia usando um eletrodo de platina. A energização da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) foi determinada por espectrofluorimetria (excitação a 520 nm e emissão a 580 nm) usando safranina (WENDT et al., 2015). As atividades de NADH-oxidase e succinato-oxidase foram medidas polarograficamente usando mitocôndrias rompidas. A atividade da ATPase foi quantificada pela medição da liberação de fosfato inorgânico do ATP por espectrofotometria. A atividade da hexoquinase solúvel foi determinada na fração citosólica obtida após centrifugação adicional do sobrenadante do homogenato de cérebro (29.000g), por espectrofotometria (340 nm).

Resultados e Discussão

A figura 1 apresenta a atividade da MPO em cérebro de ratos artríticos e controles, e os efeitos do tratamento com MeJA. A atividade do MPO aumentou 2,5 vezes em cérebro de ratos artríticos. O tratamento com 75 $mg \cdot Kg^{-1}$ de MeJA diminuiu a atividade desta enzima em 20%. Já, as doses de 150 e 300 $mg \cdot Kg^{-1}$ de MeJA e ibuprofeno mantiveram a atividade MPO em valores próximos aos dos ratos controles. A enzima MPO é um marcador de inflamação, ela reflete os níveis de recrutamento de leucócitos nos tecidos (KHAN et al., 2018). Desse modo, o tratamento com MeJA aponta em diminuição da inflamação em cérebro de ratos.

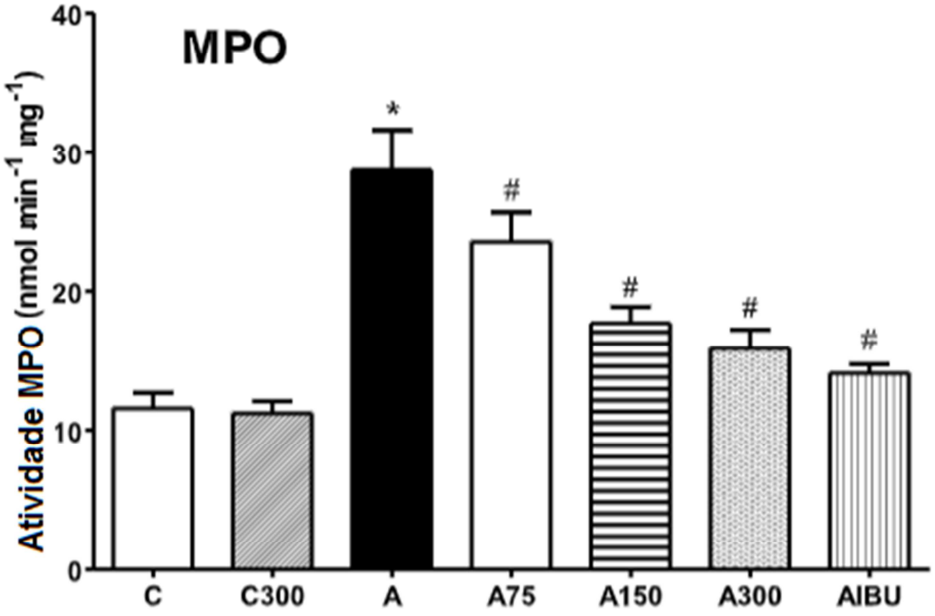

Figura 1 – Efeito do metil-jasmonato sobre a atividade da mieloperoxidase no cérebro de ratos controles e artríticos. C, controles tratados com óleo de milho; C300, controles tratados com 300 mg·Kg^{-1} de MeJA; A, ratos artríticos tratados com óleo de milho; ratos artríticos A75, A150 e A300 tratados respectivamente com 75, 150 e 300 mg·Kg^{-1} de MeJA; AIBU: ratos artríticos tratados com 30 mg·Kg^{-1} de ibuprofeno. Os dados correspondem as médias ± erro padrão da média de cinco animais para cada experimento. *p < 0,05: difere dos controles (C); #p 0,05: difere de ratos artríticos não tratados (A).

O tratamento com MeJA não modificou o potencial de membrana (Δψm), a produção de ROS e a síntese de ATP (relação ADP/O) em mitocôndrias cerebrais isoladas de ratos saudáveis e artríticos. Já a atividade respiratória mitocondrial foi modificada minimamente. De modo específico, uma pequena modificação do estado IV da respiração (e consequentemente redução da RC) em ratos artríticos tratados e não tratados foi observada quando o glutamato + malato foram utilizados como substratos. Por outro lado, a atividade da hexoquinase (HK) foi aparentemente aumentada em cérebro de ratos tratados com o MeJA, para ambas condições controle e artrítico. No entanto, isso parece refletir uma dissociação da HK da membrana mitocondrial. É bom lembrar que, no cérebro de ratos, grande parte da HK encontra-se ligada a membrana mitocondrial, e que, o MeJA dissocia a enzima da mesma. De fato, a atividade da HK não foi alterada no cérebro de ratos saudáveis e artríticos tratados com o MeJA. No entanto, este fato não garante que a fosforilação da glicose seja eficiente *in vivo*, pois a dissociação da HK da mitocôndria impede seu acesso imediato ao ATP mitocondrial, podendo assim interferir com o metabolismo de glicose cerebral.

Conclusões

O tratamento com MeJA diminuiu a inflamação no cérebro de ratos com artrite induzida por adjuvante. Por outro lado, o MeJA induziu a dissociação da hexoquinase (HK) das mitocôndrias cerebrais de ratos saudáveis e artríticos, mas

não modificou o potencial da membrana mitocondrial e a produção de ROS em mitocôndrias cerebrais. O deslocamento da hexoquinase mitocondrial poderia comprometer a fosforilação de glicose como também o metabolismo no cérebro. As doses efetivas de MeJA foram relativamente altas, porém os resultados do presente estudo fazem deste composto um ponto de partida para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias e anti-reumáticas. Finalmente, abordagens futuras devem considerar as possíveis modificações no metabolismo da glicose no cérebro.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

BRACHT, A.; SILVEIRA, S.S.; CASTRO-GHIZONI, C.V.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; OLIVEIRA, M.R.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; PERALTA, R.M.; COMAR, J.F. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. **SpringerPlus**, v. 5, n. 36, p. 36-50, 2016.

BIAZON, A.C.B.; WENDT, M.M.N.; MOREIRA, J.R.; CASTRO-GHIZONI, C.V.; SOARES, A.A.; SILVEIRA, S.S.; SA-NAKANISHI, A.B.; BERSANI-AMADO, C.A.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; COMAR, J.F. The in vitro antioxidant capacities of hydroalcoholic extracts from roots and leaves of *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) do not correlate with their in vivo antioxidant action in diabetic rats. **J Biosci Med**, v. 4, n. 2, p. 15-27, 2016.

CESARI, I.M.; CARVALHO, E.; RODRIGUES, M.F.; MENDONÇA, B.S.; AMÔEDO, N.D.; RUMJANEK, F.D. Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis. **Int J Cell Biol**, ID 572097, 2014.

KHAN, A.; AlSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: Recent biochemical and pathological perspectives. **Med. Sci**, v. 6, n. 2, p. 33, 2018.

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. **Exp Mol Pathol,** v. 98, n. 3, p. 549-557, 2015.