

EFEITOS DO METIL-JASMONATO SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO DE RATOS ARTRÍTICOS

Gustavo Henrique de Souza (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi (Orientador), e-mail: absnakanishi@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Bioquímica.
Maringá/PR

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

Palavras-chave: artrite induzida por adjuvante, inflamação, antioxidante

Resumo

O metil-jasmonato (MeJA) é uma ciclopentanona encontrada no reino vegetal, atuando como molécula sinalizadora associada ao estresse biótico e abiótico. Estudos prévios descrevem que o MeJA apresenta atividade antitumoral e anti-inflamatória, além de reduzir o estresse oxidativo de ratos com artrite induzida por adjuvante. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com MeJA (75-300mg/Kg) sobre a inflamação e estresse oxidativo no cérebro de animais com artrite induzida por adjuvante. Ratos Holtzman receberam o reagente de Freund para indução de artrite e depois de 23 dias foram eutanasiados e coletado o cérebro para o homogenato. Foram utilizados o homogenato total e o sobrenadante para determinar aspectos inflamatórios e oxidativos do cérebro de ratos artríticos e saudáveis. O MeJA preveniu o aumento da atividade da xantina oxidase e da mieloperoxidase, além de diminuir os níveis de nitrito + nitrato, TBARS, proteínas carboniladas e espécies reativas de oxigênio em ratos artríticos. Além disso, o MeJA atuou na melhora do sistema glutatona e da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase nestes animais. Devido a isso, pode-se concluir que o MeJA atuou na redução da inflamação e do estresse oxidativo no cérebro de ratos artríticos induzido por adjuvante.

Introdução

Os jasmonatos são ciclopentanonas derivadas de ácidos graxos amplamente distribuídos no reino vegetal, atuando como moléculas sinalizadoras. Esses compostos apresentam semelhança estrutural às prostaglandinas e, devido a isso, tem-se estudado sua atividade anti-inflamatória (CESARI, 2014). Recentes estudos mostram que o metil-jasmonato (MeJA) foi efetivo na diminuição da inflamação articular e sistêmica de ratos com artrite induzida por adjuvante (SÁ-NAKANISHI, 2018). Esta doença é sistêmica e pode acometer diversos órgãos, como o cérebro, fígado e pulmões. Sendo assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar os efeitos do MeJA sobre a inflamação e estresse oxidativo no cérebro de ratos artríticos induzida por adjuvante.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA 4475171016). Para indução da artrite por adjuvante, ratos machos da linhagem Holtzman (sessenta dias de idade) receberam uma injeção com 0,1 mL de adjuvante completo de Freund® (1mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* da cepa H37Ra, inativadas pelo calor e liofilizadas). O MeJA foi solubilizado em óleo de milho. Os animais foram divididos em 7 grupos: controle (sem artrite) tratado com óleo de milho (0,5 mL), controle tratado com MeJA (300 mg/Kg), artríticos tratado com óleo de milho (0,5 mL), artríticos tratados com MeJA (75 mg/Kg, 150 mg/Kg e 300 mg/Kg) e artríticos tratados com ibuprofeno (AIBU) 30 mg/Kg.

Os ratos foram previamente anestesiados com uma overdose de tiopental de sódio (100 mg/kg) e o cérebro foi removido e homogeneizado em um homogeneizador tipo van Potter-Elvehjem com tampão de fosfato de potássio (0,1 M pH 7,4). Foi separado uma alíquota do homogenato total para quantificação de TBARS e glutationas e o restante foi centrifugado, sendo o sobrenadante utilizado na quantificação de proteínas carboniladas, nitrito + nitrato e para avaliar a atividade enzimática.

Os parâmetros de estresse oxidativo como a quantificação de proteínas carboniladas, lipoperóxidos e enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) e pró-oxidantes (mieloperoxidase e xantina oxidase) foram determinados por espectrofotometria. O conteúdo de glutathiona reduzida e espécies reativas de oxigênio foi quantificado por espectrofluorometria. A produção de óxido nítrico foi quantificada indiretamente pela determinação de nitrito mais nitrato por meio da reação de Griess e nitrato redutase.

A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância One-way ANOVA pos-teste Newman-Keuls do Programa GrapPad Prisma versão 8. P <0,05 será adotado como nível de significância.

Resultados e Discussão

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi 2,5 vezes maior no cérebro de ratos artríticos quando comparado com o grupo controle. As doses de MeJA 150 e 300 mg.Kg⁻¹ e ibuprofeno mantiveram a atividade da MPO em valores próximos ao encontrado no grupo controle. Os níveis de nitrito + nitrato foram aumentados 1,4 vezes no cérebro de ratos artríticos enquanto o tratamento com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ e ibuprofeno mantiveram-se próximos aos valores obtidos no grupo controle. No presente estudo os níveis de nitrito mais nitrato e a atividade da MPO foram utilizados como marcadores inflamatórios. Esses resultados corroboram com a observação de que o MeJA reduziu os níveis de IL-6, TNF α e nitrito mais nitrato em ratos com neuroinflamação induzida por rotenona, um fenômeno que também indica a regulação negativa da expressão do fator NF- κ B. Além disso, o MeJA melhorou a disfunção da memória associada a neuroinflamação em ratos (SOLOMON, 2017).

A figura 1 apresenta os níveis de TBARS, proteínas carboniladas e espécies reativas de oxigênio (ROS) no cérebro de ratos artríticos e controles tratados com MeJA. Os níveis de TBARS e proteínas carboniladas foram 2,2 e 1,7 vezes aumentadas no cérebro de ratos artríticos respectivamente. O tratamento com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ diminuiu os níveis de TBARS e proteínas carboniladas a valores próximos aos do grupo controle. Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram 1,4 vezes maior no cérebro de ratos artríticos, enquanto o tratamento com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ manteve-os próximos ao grupo controle. O tratamento com ibuprofeno nos animais artríticos não modificou nenhum dos parâmetros oxidativos no cérebro.

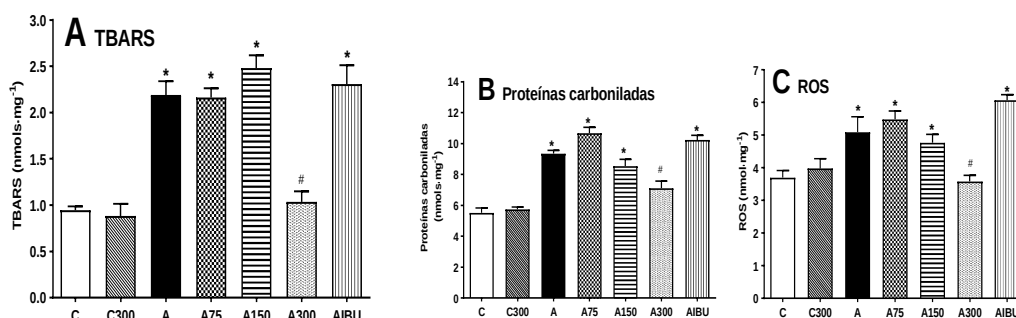


Figura 1: Efeitos do tratamento com MeJA no estresse oxidativo no cérebro de ratos saudáveis e artríticos. Sendo ratos tratados com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ (C300), ratos artríticos sem tratamento (A), ratos artríticos tratados com MeJA 75 mg.Kg⁻¹ (A75), ratos artríticos tratados com MeJA 150 mg.Kg⁻¹ (A150), ratos artríticos tratados com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ (A300) e ratos artríticos tratados com Ibuprofeno 30 mg.Kg⁻¹ (AIBU). Os valores representam a média ± erro padrão de 5 animais para cada condição experimental, e estão expressos em mg por proteína. *p < 0,05; diferentes do grupo controle (C); #p < 0,05; diferente do grupo artrítico não tratado (A).

Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram diminuídas em 25% e 40% respectivamente no cérebro de ratos artríticos. O tratamento com MeJA 150 e 300 mg.Kg⁻¹ e ibuprofeno aumentou a atividade da catalase para os valores próximos ao grupo controle. A atividade da xantina oxidase (XO) foi 1,4 vezes maior no cérebro de ratos artríticos, enquanto o tratamento com MeJA 300 mg.Kg⁻¹ manteve os valores próximos ao grupo controle.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e razão GSH/GSSG foram, 35% e 70% menor, respectivamente no cérebro dos animais artríticos. Os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) não foram modificados nos ratos artríticos, mas foram aumentadas com o tratamento com MeJA 75, 150 mg.Kg⁻¹ e ibuprofeno. Tratamento de ratos artríticos com MeJA 300 mg.Kg⁻¹, diferente do ibuprofeno, aumentaram os níveis de GSH para valores próximos ao grupo controle, e a razão GSH/GSSG foi aumentada em 50%.

O efeito da diminuição do estresse oxidativo causado pelo MeJA deve-se portanto, a atuação do composto sobre os sistemas de produção de ROS. Este sistema inclui enzimas normalmente estimuladas pela presença de mediadores inflamatórios na artrite. No presente estudo, foi analisado a atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, em circunstâncias específicas, é capaz de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxido e óxido nítrico (WENDT, 2015). Sua atividade, que normalmente

está aumentada em ratos artríticos, foi diminuída para valores próximos ao controle no tratamento com o MeJA. A melhora do sistema de defesa antioxidante promovida pelo MeJA, pode ser atribuída, pelo menos em parte, sobre a redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o MeJA aumentou os níveis de GSH e na razão GSH/GSSG, concluindo assim que o composto melhora as defesas antioxidantes. Em paralelo a esse estudo, outro trabalho em nosso laboratório mostrou que o MeJA atuou no aumento da atividade da enzima isocitrato desidrogenase, o que poderia resultar em um aumento da produção de NADPH. Desse modo, a preservação da atividade da isocitrato desidrogenase pelo MeJA em ratos artríticos pode contribuir na manutenção de uma alta razão NADPH/NADP⁺. Isso vai contribuir com o aumento da regeneração do sistema GSH e na redução do estresse oxidativo pelo sistema das glutations.

Conclusões

O tratamento com MeJA nas maiores concentrações diminuiu a quantidade de nitrito + nitrato e a atividade das enzimas mieloperoxidase no cérebro de ratos artríticos, o que caracteriza uma possível atividade anti-inflamatória. Além disso, melhorou o sistema antioxidante no cérebro de ratos artríticos, diminuindo os valores de TBARS, proteínas carboniladas, ROS e a atividade da enzima pró-oxidante xantina oxidase e elevou os níveis de glutathione reduzida e a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. Sendo assim, os resultados do presente estudo mostram que o MeJA pode ser um potencial ponto de partida para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias.

Agradecimentos

Ao PIBIC e ao CNPq pelo apoio à iniciação científica.

Referências

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.

SÁ-NAKANISHI, A.B.; SONI-NETO, J.; MOREIRA, L.S.; GONÇALVES, G.A.; SILVA-COMAR, F.M.S.; BRACHT, L.; BERSANI-AMADO, C.A., PERALTA, R.M.; BRACHT, A.; COMAR, J.F. Anti-inflammatory and antioxidant actions of methyl jasmonate are associated with metabolic modifications in the liver of arthritic rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, ID:2056250, 2018.

SOLOMON, U.; TAGHOGHO, E.A. Methyl jasmonate attenuates memory dysfunction and decreases brain levels of biomarkers of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide in mice. **Brain Res Bull**, v.131, p. 133-141. 2017.

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, p.549-557. 2015.