

ATIVIDADES DE ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS (SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE) NO TECIDO PANCREÁTICO DE RATOS WISTAR, SUPLEMENTADOS COM MELATONINA.

Guilherme Nizan Silva Almeida¹; João Gabhriel Beserra Borges²; Mateus dos Santos Feitoza³; Lucas Max Barbosa de Oliveira⁴; Welton Daniel Nogueira Godinho⁵

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, gniizan_08@hotmail.com¹
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, gabhriel.borges@aluno.uece.br²
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, mateusfeitoza@outlook.com³
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, lucas.max@aluno.uece.br⁴
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, weltondaniel@hotmail.com⁵

1 INTRODUÇÃO

1.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

No organismo dos seres humanos, existem espalhados pelo corpo alguns agentes tóxicos que podem gerar algumas condições patológicas ou até mesmo doenças, são os chamados Radicais Livres (RL). (GASTELL & ALEJO, 2000). Os RL constituem-se de um grupo de substância químicas que tem como característica principal um ou mais elétrons desemparelhados em uma das órbitas. (DROGE, 2002). Devido a essa particularidade dos mesmos, lhes conferem a reatividade e uma certa instabilidade química, que fazem com que os RL procurem interagir com outras moléculas, através da captação (oxidantes) ou por cedência (redutores) de elétrons e átomos de hidrogênio. (FRIDROVICH, 1995)

Em relação aos radicais livres do oxigênio (RLO), alguns radicais que se sobressaem por possuírem uma maior relevância biológica, trazem uma série de danos moleculares em diversas células, são as chamadas: Espécies Reativas do Oxigênio (ERO). São eles os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (HALLIWELL, 1991) Existem também duas moléculas onde suas ações se equivalem as dos dois radicais dos RLO, que é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). (FREI, 1999).

Devido a sua grande utilização pelos organismos aeróbios, torna-se necessária uma diversidade de agente antioxidantes para proteger as células dessas ERO. (BANERJEE et al, 2003). Os mecanismos de defesa antioxidantes agem em diferentes tecidos, podendo assim, serem classificados em função de sua ação predominante (Antioxidantes de Prevenção, de Intercepção e de Separação), de sua localização (Intracelulares e Extracelulares) e da sua proveniência, como através da dieta (Exógenos) ou da síntese endógena (Endógenos). (GOLDFARB, 1999). Dentre os

antioxidantes intracelulares de Prevenção, as principais são a Superóxido Dismutase (SOD), a Glutaciona Peroxidase (GPX) e a Catalase (CAT), pelas quais cada uma tem a capacidade de catalisar ou de neutralizar os metabólitos e a produção dessas ERO. (BANERJEE et al, 2003) (POWERS & LEEUWENBURGH, 1999).

Em suma, a SOD metaboliza o ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 . A GPX é a mais importante para a oxidação do H_2O_2 em água e a Catalase é responsável pela conversão do H_2O_2 em água e oxigênio. (MOTA et al, 2004).

1.2 TECIDO PANCREÁTICO

O Pâncreas é uma glândula que faz parte do sistema digestivo e endócrino dos vertebrados. O mesmo produz o suco pancreático, que tem um papel importantíssimo na digestão. E possui umas ilhotas onde são produzidos e secretados alguns hormônios, chamadas de Ilhotas de Langerhans. Essas ilhotas possuem 3 tipos de células: α = Células Alfa, que são as que produzem o Glucagon, hormônio que age no fígado, sinalizando para a “quebra” de glicogênio que está armazenado em glicose, para que as taxas de açúcar no sangue normalizem. β = Células Beta, que são as responsáveis pela produção da Insulina, que facilita a entrada de glicose nas células e o armazenamento no fígado em forma de glicogênio. E a Δ = Células Delta, responsáveis pela secreção e produção da Somatostatina, a mesma age bloqueando a liberação do GH. (FOGAÇA & ELIA, 2006).

1.3 MELATONINA

A Melatonina (MLT) é um hormônio, que é secretado e liberado pelas células endócrinas da glândula pineal. (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Ela é responsável por parte de alguns mecanismos homeostáticos do corpo e tem uma capacidade mais conhecida, como a de controlar o relógio biológico, através de ciclos circadianos. A mesma também é conhecida como hormônio da escuridão, pelo fato de sua produção ser exclusivamente no período noturno. (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1992). Uma de suas principais características é a de Solubilidade, devido à isso, possui uma grande facilidade em atravessar membranas celulares e organelas, podendo assim, interagir com esses sistemas funcionais das células, como a Mitocôndria e até mesmo as barreiras do encéfalo, tornando-a capaz de atingir todos os compartimentos do organismo. (CRESPO *et al.*, 2010).

A MLT também tem ações essenciais no organismo, como a de Imunomodulatória (GUERRERO & REITER, 2002), Anti-inflamatória (MAYO *et al.*, 2005), Antioxidante (HARDELAND & FUHRBERG, 1996), Cronobiológica, regulação dos ritmos circadianos,

regulação do sistema cardiovascular, metabolismo energético, regulação dos processos antienvhecimento (AIRES, 2011), entre outras.

Portanto, o intuito da pesquisa é entender qual vai ser a resposta no tecido pancreático, tendo como objetivo verificar se as análises enzimáticas da CAT e da SOD irão ter alguma mudança significativa, após os animais receberem a suplementação da Melatonina.

2 METODOLOGIA

Esse trabalho foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS/UECE, (CEUA) nº2214971/2017. Foram utilizados 12 ratos da linhagem Wistar, onde os mesmos ficavam no biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais foram mantidos em caixas de plástico, em condições ideais, em ciclo claro/escuro (12h/12h), e com ração e água *ad libitum* sendo colocados de 3 em 3 dias. O estudo está sendo composto por 2 grupos experimentais, Controle (C) (n=6) e o Suplementado com Melatonina (SMLT) (n=6).

Para se dar início aos estudos, os animais precisam atingir o peso de 250 à 300g. Para essa verificação do peso ideal dos ratos, toda semana foi verificado o peso dos mesmos. Atingindo os pesos, os ratos do grupo (C) passaram pelo processo de Gavagem, que foram 14 dias sendo feita a ingestão somente de 3mL de salina (soro fisiológico). Já o grupo (SMLT), vai ser feita a ingestão de 5mg/kg de Melatonina que vai ser diluída em 3mL de salina. O processo de Gavagem é feito através de uma seringa com uma cânula específica para introduzir a dosagem, sem prejudicar o tecido do animal. Após os 14 dias de Gavagem, é feito o sacrifício dos animais. Onde logo foi feita a dissecação do tecido a ser estudado (Pâncreas), posteriormente sendo armazenados em nitrogênio líquido e a -80°C em um freezer. O processo de sacrifício é feito através do método físico (Guilhotinamento), onde será realizado todo um cuidado matendo a higienização do ambiente para que evitar ao máximo o stress dos animais. O método de Guilhotinamento é justificado devido o método anestésico promover alterações químicas que iriam interferir nos resultados das atividades enzimáticas (Catalase e Superóxido Dismutase).

Para a homogeneização e extração de proteínas será utilizado o tampão fosfato de sódio 110mM (pH 7,4). O tampão será colocado na proporção de dez vezes o peso do tecido por micrograma. Após a adição do tampão as amostras serão centrifugadas a 14000 RPM durante 20 minutos na temperatura de 4oC. Após o término da centrifugação será retirado o sobrenadante dos eppendorfs e armazenados a -80°C até o seu uso. A atividade da enzima CAT foi mensurada em

resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio pelo método de AEBI (1984) e os valores da CAT foram corrigidos pelo valor da proteína de cada amostra (U catalase/mg proteína. Já para atividade enzimática da SOD será, assim como a CAT, homogeneizada em tampão fosfato de potássio (KPE) em aproximadamente 10, 20 e 40 μ L de amostra.

Os reagentes usados são o Tampão Glicina (970 μ L para o Branco, sendo o único que vai variar de acordo com a quantidade de amostra do tecido), Catalase (10 μ L) e a Adrenalina (20 μ L), onde Catalase e Adrenalina não mudam. O processo é de 180 segundos para cada uma dessas etapas e para cada amostra, sendo que a cada 10 segundos faz-se a anotação.

Vale a pena deixar claro que todos os animais não foram pinealectomizados, ou seja, sua produção de MLT endógena não foi comprometida.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com vários estudos, têm-se pesquisado bastante o real papel da Melatonina (MLT) no tecido pancreático. Inúmeros estudos mostram o efeito inibidor da MLT, em relação a liberação de insulina das células β pancreáticas, pelo fato da mesma ter várias ações no organismo, sendo uma delas a de antioxidante. (ZEPHY; AHMAD, 2015; NAGORNY et al, 2011). Mas estudos recentes, vem mostrando essa distúrbio metabólico, de que o papel da MLT nas células β é de inibição para secreção de insulina, provavelmente pela redução dos níveis de AMP-cíclico, fazendo com que se leve à uma hiperglicemia, com grande risco de com o tempo adquirir a Diabetes Tipo 2. (TUOMI et al, 2016), (FORRESTEL et al, 2016).

Diante disso, até o presente momento o único grupo que foram feitas as análises enzimáticas da SOD e da CAT foi o grupo controle (C). Logo abaixo pode-se observar os dados das análises de SOD e CAT no tecido pancreático, respectivamente.

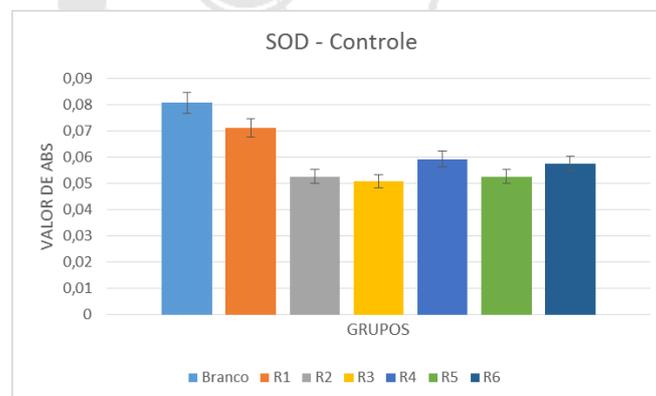


Fig.1: Valores de Absorbância da Análise Enzimática Superóxido Dismutase do grupo Controle.

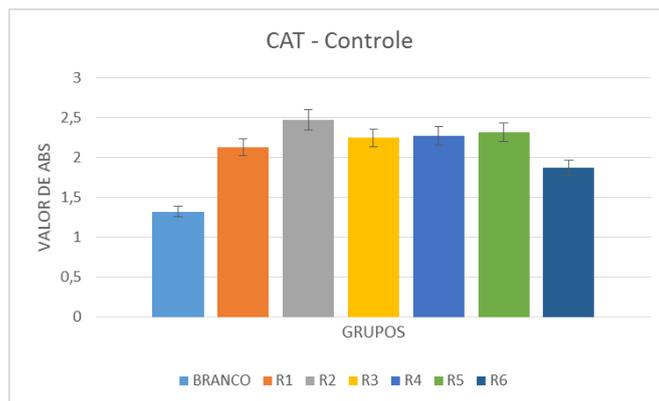


Fig. 2: Valores de Absorbância da Análise Enzimática Catalase do grupo Controle.

4 CONCLUSÃO

Portanto, especula-se que a Melatonina pode vir a gerar a sua verdadeira função antioxidante nas células β pancreáticas, embora que teoricamente essas células não estejam funcionando corretamente devido à possível ação do hormônio. Diante disso, espera-se os resultados das análises enzimáticas do grupo (SMLT), para que a partir daí, perceba-se alguma variação nos níveis dessas enzimas e posteriores conclusões de seu papel antioxidante em células do tecido pancreático.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AIRES, Margarida de Mello. *Fisiologia*. In: *Fisiologia*. Guanabara Koogan, 2012.
- BANERJEE, Alok K. et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 253, n. 1, p. 307-312, 2003.
- CLAUSTRAT, Bruno; BRUN, Jocelyne; CHAZOT, Guy. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.
- CRESPO, Irene et al. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *Journal of pineal research*, v. 49, n.2, p. 193-200, 2010.
- DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- FOGAÇA, H. S. & ELIA, C. C. S. *Gastroenterologia - Doenças do pâncreas e das vias biliares*. 1º Edição, Revinter, 2006).
- FORRESTEL, Andrew C. et al. Chronomedicine and type 2 diabetes: shining some light on melatonin. *Diabetologia*, p. 1-15, 2016.
- FREI, Balz. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *The FASEB journal*, v. 13, n. 9, p. 963-964, 1999.

FRIDOVICH, Irwin. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual review of biochemistry, v. 64, n. 1, p. 97-112, 1995.

GOLDFARB, Allan H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. Canadian Journal of Applied Physiology, v. 24, n. 3, p. 249-266, 1999.

GUERRERO, Juan M.; REITER, Russel J. Melatonin-immune system relationships. Current topics in medicinal chemistry, v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

HALLIWELL, Barry. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. The American journal of medicine, v. 91, n. 3, p. S14-S22, 1991.

HARDELAND, Ruediger; FUHRBERG, Birgit. Ubiquitous melatonin—presence and effects in unicells, plants and animals. Trends Comp Biochem Physiol, v. 2, p. 25-45, 1996.

MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. Journal of neuroimmunology, v. 165, n. 1, p. 139-149, 2005.

MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. Revista portuguesa de ciências do desporto, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.

NAGORNY, C. LF et al. Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. Journal of pineal research, v. 50, n. 4, p. 412-417, 2011.

PÉREZ GASTELL, P. L.; DE ALEJO, P.; LUIS, J. Métodos para medir el daño oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar, v. 29, n. 3, p. 192-198, 2000.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. Medicine and science in sports and exercise, v. 31, n. 7, p. 987-997, 1999.

TUOMI, T. et al. Increased melatonin signaling is a risk factor for type 2 diabetes. Cell metabolism, v. 23, n. 6, p. 1067-1077, 2016.

ZEPHY, D.; AHMAD, J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonin and oxidative stress. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, v. 9, n. 2, p. 127-131, 2015.