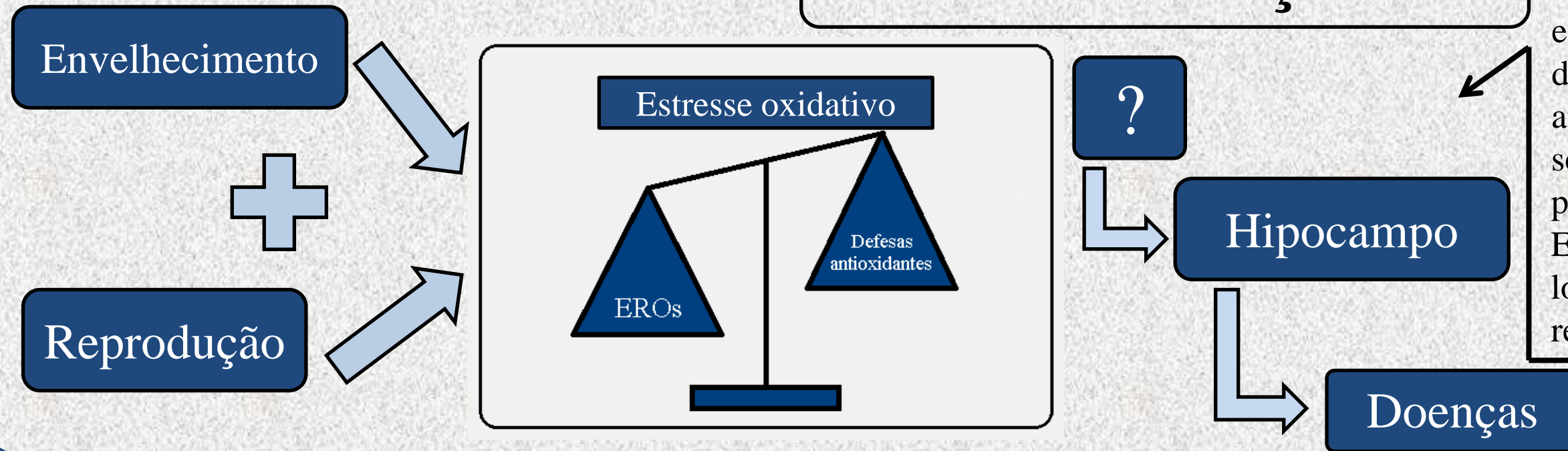


Mensuração do perfil redox em hipocampo de ratos reprodutores e não reprodutores ao longo do envelhecimento

Orientado: Nikolas R. O. Giannakos - Orientadora: Profª. Dra. Mara S. Benfato;
Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

nikolasrapha@gmail.com

INTRODUÇÃO



Segundo a teoria de envelhecimento por radicais livres, conforme os organismos vão envelhecendo, ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e uma diminuição da atividade das defesas antioxidantes. O desequilíbrio entre estes dois fatores é chamado de **estresse oxidativo**, que ao longo do envelhecimento e com atividade reprodutiva, poderia levar a danos no cérebro, que é um órgão bastante sensível ao estresse oxidativo. O dano em determinadas estruturas, como no **hipocampo**, pode estar relacionado a **doenças neurodegenerativas**, como a doença de Alzheimer. Este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações causadas pela **reprodução**, ao longo do **envelhecimento** em hipocampo de ratos machos com e sem atividade reprodutiva.

MATERIAL E MÉTODOS

80 ratos Wistar

| GRUPOS | Reprodutores | | | | Não reprodutores | | | |
|--------|--------------|---------|----------|----------|------------------|---------|----------|----------|
| | 3 meses | 6 meses | 12 meses | 24 meses | 3 meses | 6 meses | 12 meses | 24 meses |

Ratos machos com atividade reprodutiva foram mantidos um por caixa com uma fêmea da mesma idade.

Ratos sem atividade reprodutiva foram mantidos em cinco indivíduos por caixa, sem contato com fêmeas

Para os experimentos, o hipocampo foi separado, assim como as outras estruturas do cérebro, e foi congelado em nitrogênio líquido, para, posteriormente serem macerados manualmente em tampão fosfato (100mmol/L) com inibidor de proteases (PMSF 50µmol/L), e homogeneizados por sonicação. Após, foram centrifugados, os sobrenadantes foram alíquotados em eppendorfs e posteriormente mantidos em freezer -80°C até serem analisados.

Os princípios de cuidados de animais de laboratório (publicação no. 85-23, revisão de 1985 do NIH) foram aplicados a todos os experimentos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (nº 23957 de 13/12/2012).

Os resultados foram normalizados pela quantificação total de proteínas, pelo método de Bradford.^[6] Após a realização do teste estatístico *Independent samples Kruskal Wallis test*, foram consideradas significativas, as diferenças quando $p \leq 0,05$.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nitritos e nitratos

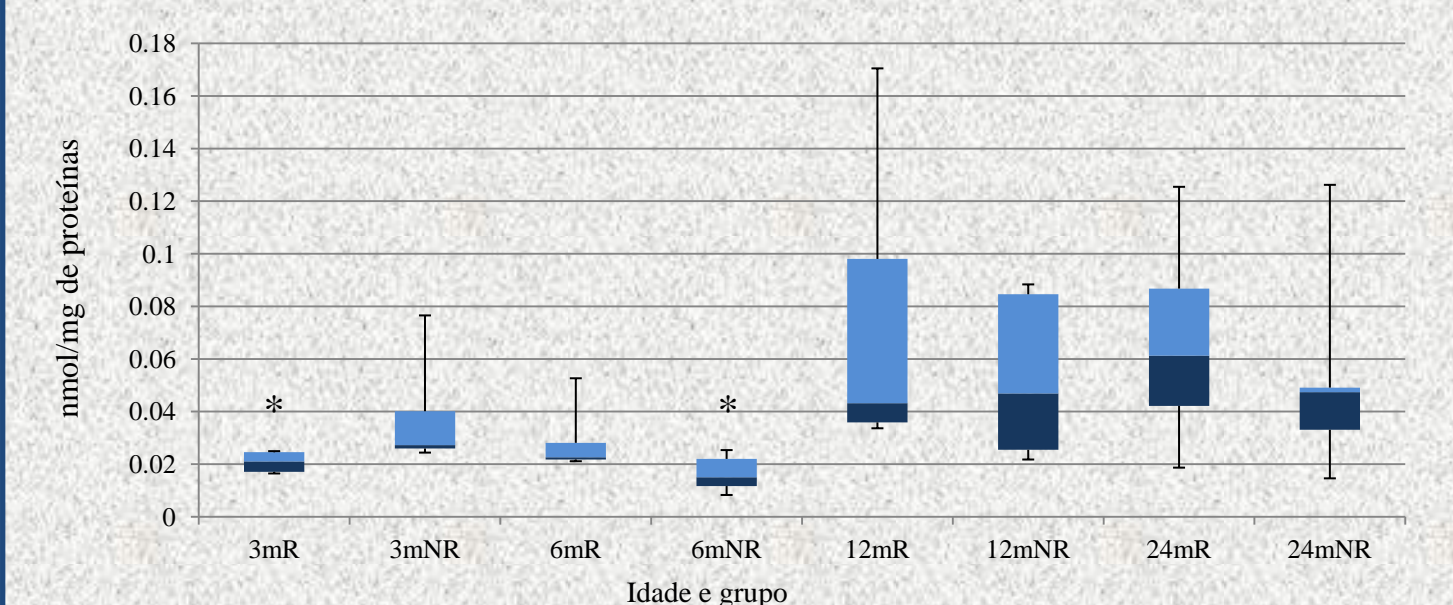


Figura 1: Níveis de nitritos e nitratos, uma medida indireta de dano. * Difere das idades de 12 e 24 meses do mesmo grupo. Diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

Proteínas carboniladas

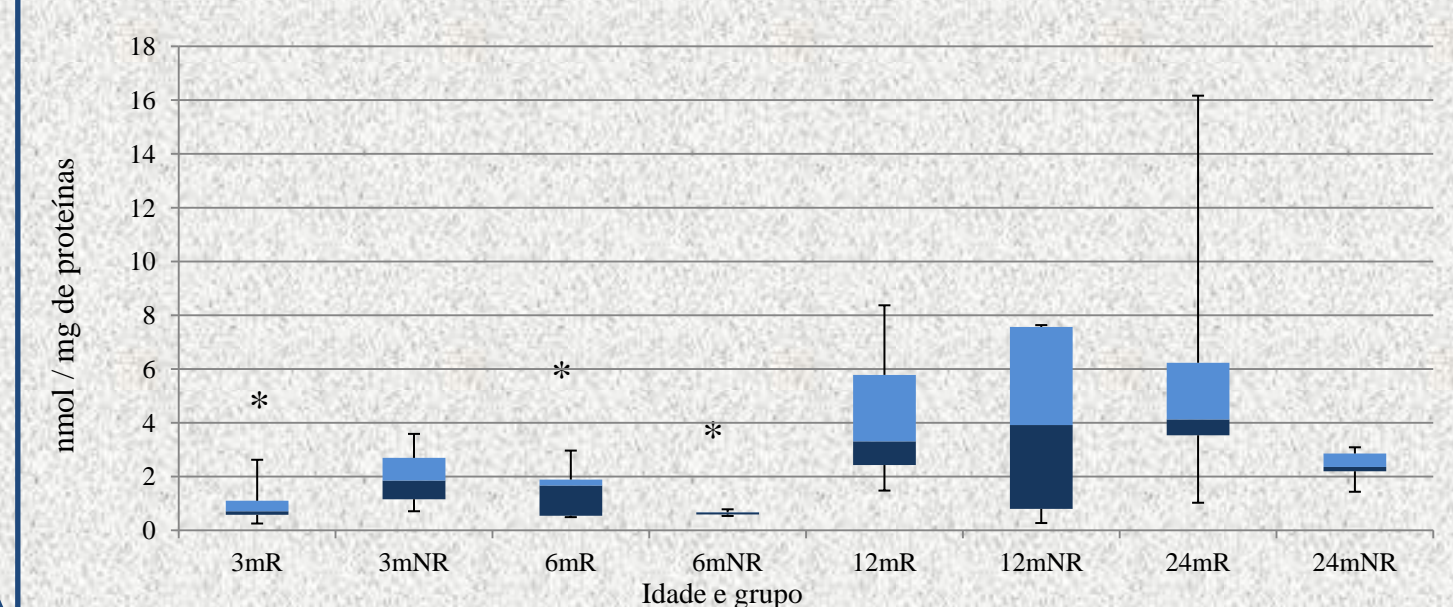


Figura 2: Níveis de proteínas carboniladas, medida de dano. * Difere das idades de 12 e 24 meses do mesmo grupo. Diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

Os resultados de nitritos e nitratos (**Figura 1**) mostram uma diferença significativa entre as idades de 3 meses em reprodutores e 6 meses em não reprodutores, com menores níveis, em relação às idades 12 e 24 meses, com maiores níveis, no mesmo grupo. Os resultados de proteínas carboniladas (**Figura 2**) mostram uma diferença significativa entre as idades de 3 e 6 meses em reprodutores e 6 meses em não reprodutores, com menores níveis, em relação às idades 12 e 24 meses, com maiores níveis, no mesmo grupo. Os resultados de glutaciona total, uma defesa antioxidante não enzimática (**Figura 3**), mostram uma diferença significativa entre as idades de 3 meses em reprodutores e 6 meses em não reprodutores, com menores níveis, em relação às idades 12 e 24 meses, com maiores níveis, no mesmo grupo. Os testes realizados para a mensuração da atividade de defesas antioxidantes enzimáticas, não mostraram diferenças significativas (**Tabela 1**)

Nos dois testes realizados para a avaliação de dano oxidativo, mostram que há um dano maior em ratos mais velhos, em relação aos mais jovens. O teste realizado para a mensuração de níveis de glutaciona total, mostraram níveis maiores para os ratos mais velhos, podemos sugerir que mesmo com altos níveis, entretanto, ainda não é suficiente para impedir o maior dano em ratos mais velhos.

Glutaciona total

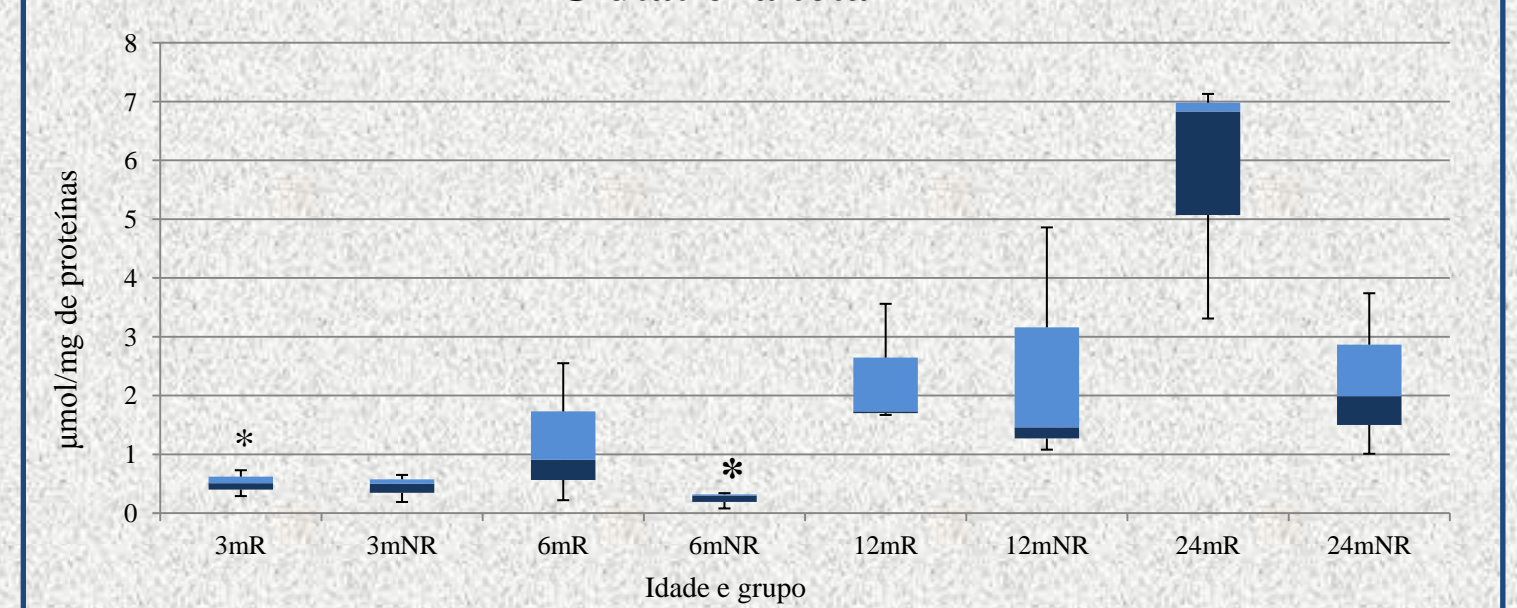


Figura 3: Níveis de glutaciona total, medida de defesa antioxidante não enzimática. * Difere das idades de 12 e 24 meses do mesmo grupo. ** Diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

| | | SOD (U/mg de proteína) | GPx (U/mg de proteína) |
|----------|----|-------------------------|------------------------|
| 3 meses | R | 9,087E-04 ± 0,002031827 | 45,44791 ± 17,98993 |
| | NR | 3,488E-03 ± 0,005989876 | 21,24806 ± 7,931218 |
| 6 meses | R | 3,946E-03 ± 0,00341825 | 35,51747 ± 21,93375 |
| | NR | 5,030E-03 ± 0,006183077 | 38,21083 ± 29,92597 |
| 12 meses | R | 3,062E-06 ± 2,24159E-06 | 23,0856 ± 9,811489 |
| | NR | 1,246E-05 ± 4,54907E-06 | 36,07096 ± 26,04195 |
| 24 meses | R | 4,278E-06 ± 1,23082E-06 | 10,86415 ± 9,341784 |
| | NR | 2,547E-06 ± 2,08922E-06 | 97,76254 ± 81,83051 |

Tabela 1: atividade da superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPx), defesas antioxidantes enzimáticas, expressa como: média dos valores do grupo ± desvio padrão.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram um aumento dos níveis de nitritos e nitratos, de proteínas carboniladas, ao longo do envelhecimento, tanto em ratos reprodutores, quanto em ratos não reprodutores. Podemos falar então que o dano por espécies reativas aumenta com o envelhecimento. Sabendo que o cérebro em geral é um órgão com altas concentrações de defesas antioxidantes não enzimáticas e baixas concentrações de defesas antioxidantes enzimáticas, os resultados mostraram que os níveis de glutaciona total, uma defesa antioxidante não enzimática, aumentaram, ao passo que, e os níveis de superóxido dismutase (SOD) e de glutaciona peroxidase (GPx), defesas antioxidantes enzimáticas, não tiveram resultados com diferenças significativas. Podemos observar que não há diferença significativa entre os resultados do grupo 12 e 24 meses, tanto reprodutor, quanto não reprodutor. E também que os resultados que nos grupos reprodutores, têm uma diferença significativa a partir dos 3 meses, enquanto que nos grupos não reprodutores, apenas aos 6 meses. Podemos concluir então, que o grupo reprodutor tem, alterações, em relação testes realizados, quando mais jovens, em relação ao grupo não reprodutor.

REFERÊNCIAS

- Rahman, Irfan, Aruna Kode, and Saibal K. Biswas. "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method." *Nature protocols* 1.6 (2006): 3159-3165.
- Levine, Rodney L., et al. "[37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." *Methods in enzymology* 233 (1994): 346-357.
- Grisham, Matthew B., Glenda G. Johnson, and Jack R. Lancaster. "Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids." *Methods in enzymology* 268.A (1996): 237-246.
- Kit comercial RanSOD®.
- Kit comercial GPx RANSEL®.
- Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976): 248-254.