

## DEFESA ANTIOXIDANTE NO FÍGADO DE RATOS WISTAR PÓS INIBIÇÃO POR ALOPURINOL

*(Antioxidant defense in Wistar rats liver after Alopurinol inhibition)*

Denner Silvino da SILVA\*; Paulo Elesson Guimarães de OLIVEIRA; Maria Alice Felipe OLIVEIRA; Jonathan Elias Rodrigues MARTINS; Juliana Osório ALVES; Vânia Marilande CECCATTO

Universidade Estadual do Ceará (UECE), Centro de Ciências da Saúde, Avenida Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP:60.740-000.

\*E-mail: [denner.silvino@aluno.uece.br](mailto:denner.silvino@aluno.uece.br)

### RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais livres derivadas do oxigênio. O fármaco Alopurinol (ALO) possui um efeito inibidor da enzima Xantina Oxidase, uma das vias da produção de EROs. Para combater esse ataque oxidativo no nosso organismo, existe uma defesa antioxidante enzimática, composta pelas enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX). O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do alopurinol na defesa antioxidante no fígado de ratos Wistar. Foram utilizados 20 ratos machos divididos em dois grupos: Controle (C) e Alopurinol (ALO). A droga foi administrada para os animais do grupo ALO, enquanto que no grupo C houve uma administração de veículo (salina), ambos durante 3 dias. Os resultados apontaram uma redução significativa na atividade das enzimas antioxidantes no grupo ALO em comparação ao grupo C. A partir desses resultados sugeriu-se que o alopurinol foi eficiente na inibição de EROs.

**Palavras-chave:** Alopurinol, antioxidante, EROs.

### SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) are free radicals derived from oxygen. The drug Allopurinol (ALO) has an inhibitory effect of the enzyme Xanthine Oxidase, one of the routes of ROS production. To combat this oxidative attack in our body, there is an enzymatic antioxidant defense, composed by the enzymes Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX). The aim of the present study was to analyze the effects of allopurinol on the antioxidant defense in the liver of Wistar rats. Twenty male rats were divided into two groups: Control (C) and Allopurinol (ALO). The drug was administered to the animals of the ALO group, while in group C there was a vehicle (saline) administration, both for 3 days. The results indicated a significant reduction in the activity of the antioxidant enzymes in the ALO group compared to the group C. From these results it was suggested that allopurinol was efficient in inhibiting ROS.

**Key words:** Allopurinol, antioxidant, ROS.

\*Endereço para correspondência:  
[denner.silvino@aluno.uece.br](mailto:denner.silvino@aluno.uece.br)

## INTRODUÇÃO

Os Radicais Livres são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna instáveis e extremamente reativos na busca do intercâmbio de elétrons com outras moléculas biológicas. Entre os Radicais livres, as moléculas denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são derivadas do oxigênio. Entretanto, existem outras famílias de Radicais Livres, como as espécies reativas de nitrogênio (ERN) e enxofre (ERS) (SILVA e GONÇALVES, 2010). Dentre as EROs produzidas na metabolização do oxigênio ( $O_2$ ) estão o ânion radical Superóxido ( $O_2^-$ ) e o Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ), metabólito deletério de meia vida longa comparado às demais EROs (BARBOSA *et al.*, 2010). Para combater estas EROs, nosso organismo conta com o sistema antioxidante enzimático, composto pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX), que impedem ou controlam a produção de radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010).

A enzima Xantina Oxidase (XO), que está envolvida na produção de  $O_2^-$ , possui um papel catalítico na degradação de purinas, com o papel de metabolizar hipoxantina em xantina e esta em ácido úrico. A XO é uma enzima formada a partir de modificações pós traducionais da enzima Xantina Desidrogenase (CANTU-MEDELLIN e KELLEY, 2013). Neste contexto, sua ação catalítica é utilizada em pesquisas, com o uso de drogas inibidoras da XO, dentre elas, o alopurinol, um composto com estrutura análoga à hipoxantina (KHAMBATA *et al.*, 2015).

O alopurinol é uma purina nitrogenada utilizada frequentemente no tratamento de hiperuricemia, pois é um fármaco que leva à diminuição da concentração sérica de ácido úrico (SILVA *et al.*, 2004). Além disso, é um fármaco que possui um efeito inibidor da enzima XO, o que o torna um regulador indireto da síntese de SOD (RODHEN *et al.*, 2000). Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do alopurinol na defesa antioxidante no fígado de ratos Wistar jovens.

## METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA/UECE, nº 5236655/2016. Foram utilizados 20 ratos machos Wistar com 60 dias de vida e peso entre 200-230g, obtidos do Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram divididos em grupo controle (C) e alopurinol (ALO). A droga foi administrada para os animais do grupo ALO via oral com 4 mL de alopurinol, enquanto que no grupo controle houve uma administração de 4 mL de veículo (salina), ambos durante 3 dias. A eutanásia foi realizada com Tiopental sódico (150mg/Kg) 24 horas após o terceiro dia de administração da droga.

Após a eutanásia, o fígado foi dissecado, pesado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente acondicionadas em freezer -80 °C. Cada 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão TRIS/HCl (pH=7.4) e inibidores de protease, utilizando homogeneizador Polytron - modelo NT 136 – Novatécnica - São Paulo/Brasil. As amostras foram homogeneizadas de 3 a 4 vezes, por cerca de 10 segundos, na temperatura de 4 °C e posteriormente, foram centrifugadas por 10 min na velocidade de

\*Endereço para correspondência:

[denner.silvino@aluno.uece.br](mailto:denner.silvino@aluno.uece.br)

720 G à 4 °C. O sobrenadante foi utilizado no ensaio das atividades enzimáticas. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), onde a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante SOD foi feita a partir da inibição da auto-oxidação da adrenalina. O homogenato do fígado dos grupos experimentais (diferentes doses: 10, 20 e 40 µL) foi diluído em tampão glicina (ácido amino acético 3,75 mg/mL + 200 mL de água destilada, com pH= 10,2), catalase (2,4 mg/mL de água destilada) e adrenalina (60 mM). A mudança de cor na mistura foi detectada através de espectrofotômetro (Biomate 35, Thermoscientific. Wilmington, DE, USA), no comprimento de onda de 480 nm (BANNISTER e CALABRESE, 1987).

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante CAT foi mensurada em resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). A atividade da enzima antioxidante GPX foi avaliada através da medida da oxidação do NADPH em um meio de reação contendo solução reguladora de fosfatos (50 mmol/L, pH 7,0), NADPH (0,1 mmol/L), GSH (0,17 mmol/L), glutatona redutase (0,2 U/mL). Através de leituras da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm a atividade da GPX foi determinada em nmoles/minuto/mg proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984). Os valores das enzimas SOD, CAT e GPX foram normalizados pelo valor da proteína de cada amostra (U/mg proteína).

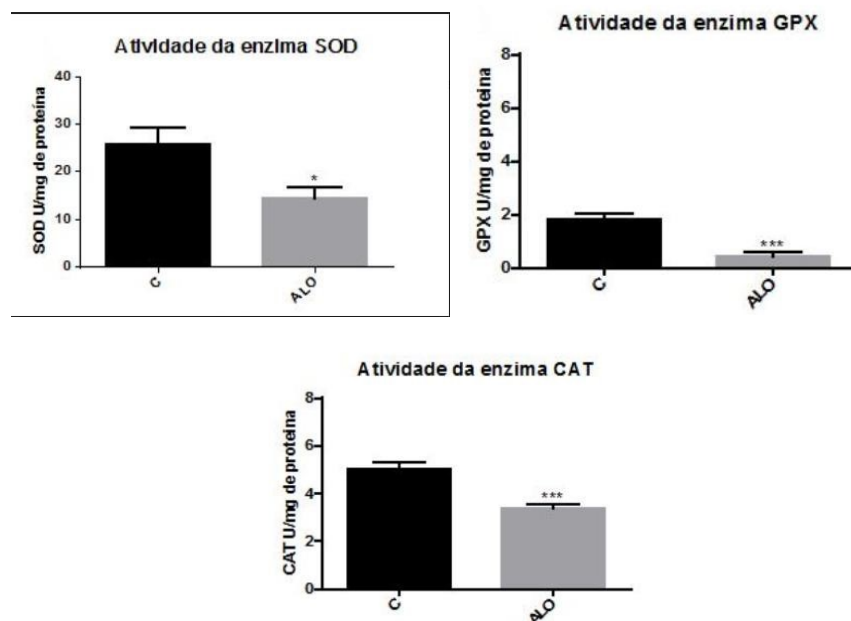
A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentassem probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação dos grupos foi realizado o teste t de Student não pareado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 apresenta a análise da defesa antioxidante no fígado de ratos pós inibição por alopurinol. Os resultados da atividade da enzima SOD no fígado apontaram uma redução significativa no grupo ALO ( $14,138 \pm 2,413$  U/mg de proteína) quando comparado ao grupo controle ( $25,584 \pm 3,515$  U/mg de proteína). (Fig. 1a). Na atividade da enzima CAT também foi observado uma redução significativa no grupo ALO ( $3,363 \pm 0,207$  U/mg de proteína) quando comparado com o grupo Controle ( $5,056 \pm 0,238$  U/mg de proteína (Fig. 1b). Quanto à atividade da enzima GPX o grupo ALO apresentou uma redução significativa ( $0,447 \pm 0,120$  U/mg de proteína) quando comparado com o grupo C ( $1,812 \pm 0,253$  U/mg de proteína (Fig. 1c).

Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX no grupo alopurinol indicam uma ação efetiva do alopurinol na inibição de uma das vias de produção de EROs: a via da xantina oxidase. Assim, podemos sugerir que não houve produção significativa de EROs e conseqüentemente não houve necessidade da ação das enzimas antioxidante no tecido hepático. Contudo, há outra hipótese que pode explicar os resultados obtidos. Com a via da XO inibida pelo alopurinol, o tecido hepático, em resposta, buscou regular o equilíbrio homeostático e produziu em excesso EROs por outras vias, como o complexo NADPH oxidase (RABÊLO *et al.*, 2010) e conseqüentemente pode ter causado no tecido um dano oxidativo.

\*Endereço para correspondência:  
[denner.silvino@aluno.uece.br](mailto:denner.silvino@aluno.uece.br)



**Figura 1:** Análise da atividade enzimática das enzimas antioxidantes.

Gráfico a) Atividade da enzima SOD; b) Atividade da enzima CAT; c) Atividade da enzima GPX. Os valores foram expressos em média±erro padrão da média de unidade de enzimas por miligrama de proteína. Diferenças estatísticas significantes são indicadas por \* ( $p<0,05$ ), \*\* ( $p<0,01$ ) e \*\*\* ( $p<0,001$ ).

## CONCLUSÕES

A partir desses resultados sugeriu-se que o alopurinol foi eficiente na inibição de EROs. Ainda, estes dados fornecem informações para melhor entender a função hepática e com isso permitir a utilização de drogas antioxidantes que inibem vias produtoras de EROs, tendo como base a resposta da defesa antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, v.105, p.121-126, 1984.
- BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for Superoxide Dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, v.32, p.279-312, 1987.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: Conceito Implicações e Fatores Modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- CANTU-MEDELLIN, N.; KELLEY, E.E. Xanthine Oxidase-catalyzed reduction of nitrite oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*, v.1, p.34-41, 2013.

\*Endereço para correspondência:  
[denner.silvino@aluno.uece.br](mailto:denner.silvino@aluno.uece.br)

FERNANDO, B.; OLASO-GONZALEZ, G. SEBASTIA, V.; VIOSCA, E.; GOMEZ-CABRERA.; VIÑA, J. Allopurinol and its role in the treatment of sarcopenia. *Revista Española de Geriatria e Gerontologia*, v.49, n.6, 2014.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology*, v.105, p.114-120, 1984.

KHAMBATA, R.S.; GHOSH S.M.; AHLUWALIA, A. "Repurposing" of Xanthine Oxidoreductase as a Nitrite Reductase: A New Paradigm for Therapeutic Targeting in Hypertension. *Antioxide & Redox Signiling*, v.23, n.4, 2015.

RABÊLO, L.A.; SOUZA, V.N.; FONSECA, L.J.S.; SAMPAIO, W.O. Desbalanço Redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*, v.94, n.5, 2010.

RHODEN, E.L.; LIMA, L.P.; RHODEN, C.R.; LUCAS, M.L.; MAURI,M.; ZETTLER, C.G. Análise das alterações histopatológicas dos figado de ratos pré-tratados com alopurinol e submetidos à isquemia: reperfusão hepática. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.27, n.6, 2000.

RHODEN, E.L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; DACANAL, F.; PILLA, M.; BELLÓ-KLEIN, A.; TELÖKEN, C.; BARROS, E.; RHODEN, C.R. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.13, n.2, 1998.

SILVA, A.A.; GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciencia Rural*, v.40, n.4, 2010.

SILVA, S.L.; SANTOS, A.S.; PREGAL, A.L.; PEDRO, E.; FERREIRA, M.B.; CARLOS, A.P.; BARBOSA, M.P. Alopurinol: experiência em dessensibilização. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. v.12, p.390-399. 2004.