

## **Tratamento com Resveratrol reduz a Produção de Óxido Nítrico após Isquemia e Reperfusão no Íleo de Ratos Wistar**

**Stephanie Carvalho Borges<sup>1</sup>, Evandro José Beraldi<sup>1</sup>, Larissa Carla Lauer Schneider<sup>1</sup>, Lia Mara Teobaldo Tironi<sup>1</sup>, Nilza Cristina Buttow<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Ciências Morfológicas  
Av. Colombo, 5790 – CEP 87020-900 Maringá – Paraná – E-mail:  
[stephaniecarvalhoborges@hotmail.com](mailto:stephaniecarvalhoborges@hotmail.com)

### **RESUMO**

*Como consequência da injúria causada pela isquemia e reperfusão (I/R) intestinal, a liberação do óxido nítrico (ON) tecidual apresenta destaque devido a seus efeitos danosos. Assim, objetivamos quantificar o óxido nítrico e avaliar o efeito do tratamento com resveratrol em animais submetidos à I/R intestinal. Trinta ratos Wistar foram distribuídos em 5 grupos: grupo C (controle), SC (falso operado controle), STR (falso operado tratado), IRC (isquêmico controle) e IRTR (isquêmico tratado). Os animais foram tratados com 7 mg/kg de resveratrol. Os níveis de ON encontrados no íleo foram significativamente maiores no grupo IRC em relação ao grupo C ( $p < 0,001$ ) e os grupos tratados apresentaram níveis de ON próximos aos níveis encontrados nos animais do grupo controle ( $p > 0,05$ ). Embora a I/R promova o aumento de ON presente no tecido, o resveratrol é capaz de diminuir a produção desta molécula podendo beneficiar o tecido atingido.*

**Palavras-chave:** Radicais livres, Óxido Nítrico Sintase, Reação de Griess.

### **INTRODUÇÃO**

O óxido nítrico (ON) é uma molécula gasosa simples e muitas células são capazes de sintetizá-lo através de hemeoproteínas da família citocromo P450-*like* denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (WANG; MARDSEN, 1995). Estas enzimas são encontradas em três diferentes isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) e estão envolvidas em processos como neurotransmissão, controle da pressão arterial e peristaltismo (TAKAHASHI et al., 2001). Apesar do ON atuar como um importante mensageiro intracelular, altos níveis dessa molécula sintetizados em situações de injúria podem gerar processos inflamatórios e lesar células saudáveis (FILHO; ZILBERSTEIN, 1998).

Com o progressivo envelhecimento da população, as síndromes isquêmicas intestinais vêm se tornando mais frequentes. Isquemia e reperfusão intestinal (I/R) é uma condição grave que comumente ocorre em vários casos clínicos. A restauração do fluxo sanguíneo para um tecido isquêmico pode levar a um dano maior do que aquele originalmente causado pela isquemia (KOHLENER et al., 2011). Como consequência da injúria causada pela I/R estão a excitotoxicidade causada pelo excesso de glutamato (CALCINA et al., 2005), o estresse oxidativo, inflamação, liberação de óxido nítrico e consequente morte celular por necrose e/ou apoptose (KASTE, 1997; KIM, 1997; MASSBERG, 1998).

O resveratrol (RSV) é um polifenol que possui propriedades farmacológicas que o faz atuar de forma benéfica sobre os sistemas biológicos possuindo potencial antioxidante, anti-inflamatório (ZHANG; LIU; SHI, 2010; SGAMBATO et al., 2001) e neuroprotetor (Wang et al., 2002), além disso é capaz de modular e melhorar as defesas antioxidantes celulares (FREMONTTE, 2000; BAUR; SINCLAIR, 2006). Assim, objetivou-se quantificar o óxido nítrico presente no tecido intestinal de animais submetidos a isquemia e reperfusão e avaliar o efeito do tratamento com resveratrol nestes animais.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 30 ratos albinus da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com peso corporal entre 230 e 250g. Os animais foram divididos em 5 grupos de 6 animais: grupo C (controle não operado), grupo SC (submetido à cirurgia mas sem oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) e tratado com veículo), grupo STR (submetido à cirurgia mas sem oclusão da AMS e tratado com resveratrol), grupo IRC (submetido à cirurgia com oclusão da AMS e tratado com veículo) e grupo IRTR (submetido à cirurgia com oclusão da AMS e tratado com resveratrol). Os animais foram tratados a cada 48 horas tendo início 5 dias antes da cirurgia e mantendo o tratamento até 7 dias depois, por meio de gavagem com 7 mg/kg de peso corporal de resveratrol, o qual foi diluído em 20% de álcool de cereais e 80% de água destilada. Os grupos C, SC e IRC foram tratados apenas com o veículo, uma solução contendo 20% de álcool de cereais e 80% de água destilada antes e depois da cirurgia.

Após os animais serem anestesiados com uma mistura de 20 mg/kg de Xilazina® e 100 mg/kg de Ketamina®, a injúria por I/R (isquemia seguida de reperfusão) intestinal foi estabelecida por oclusão por 45 minutos da artéria mesentérica superior (AMS) com um *clamp* microvascular. A isquemia mesentérica foi determinada pela perda da pulsação da artéria mesentérica superior e pela coloração roxa do segmento ileal. Durante o período de reperfusão de 7 dias, os animais permaneceram em gaiolas individuais. Após a eutanásia, realizada com dose letal de 100 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico®, foi feita a coleta do segmento a ser estudado que havia sido devidamente delimitado. Após ser lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1 M, pH 7,4), 1 cm do segmento foi macerado e diluído em 4 ml de PBS, e centrifugado à 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação do óxido nítrico, realizada através da reação de Griess, onde foram quantificados os subprodutos nitrato e nitrito; 50 µl da solução de Griess (A+B) e 50 µl do sobrenadante foram adicionados em placa de Elisa. A leitura foi realizada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de NaNO<sub>2</sub>, de 100 mM a 1.56 mM. Os resultados foram expressos em µM/ml.

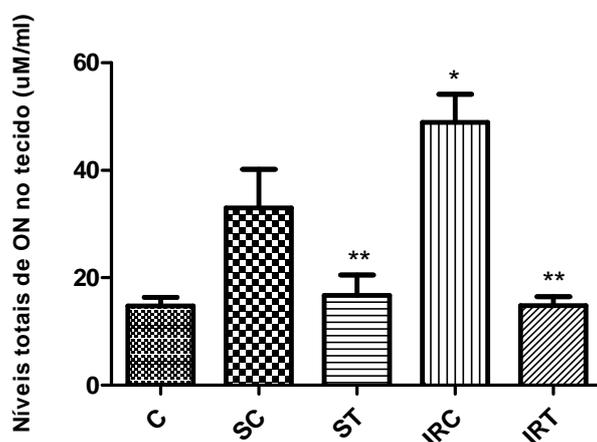
A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do programa GraphPad Prisma v.5, sendo expressos como média ± erro padrão, com intervalo de confiança de 95 %. Para a comparação entre os grupos, foram realizadas análises de variância One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. Para ambas as análises o valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os níveis totais de óxido nítrico encontrados no íleo foram significativamente maiores no grupo IRC em relação ao grupo C (*p* < 0,001) e em relação aos grupos ST e IRT (*p* < 0,01) (Figura 1). O óxido nítrico é sintetizado tanto em condições fisiológicas quanto em condições fisiopatológicas. Embora o ON possua um papel protetor em caso de injúria,

quando sintetizado em excesso ele pode tornar-se excitotóxico para as células permanecendo em atividade por horas. Esta importante característica é que pode levar à morte da célula em determinadas circunstâncias. (NATHAN; XIE, 1994 e SCHMIDT; WALTER, 1994). A isquemia e reperfusão, além de causar várias outras disfunções, promove um aumento no glutamato extracelular (CALCINA et al., 2005) e a exposição após algumas horas ao glutamato ativa receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que abrem canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Com o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ocorre a ativação da óxido nítrico sintase (NOS), produzindo o radical livre óxido nítrico (ON), o qual reage com espécies reativas de oxigênio (EROs) produzindo o radical peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (RIVERA et al., 2011), sendo este um poderoso agente oxidante que pode causar alterações celulares ou até mesmo levar as células à morte.

Os grupos tratados com resveratrol apresentaram os níveis de ON próximos aos níveis encontrados nos animais do grupo controle, não apresentando diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ) (Figura 1). O resveratrol pode atuar diretamente na neutralização de radicais livres ou indiretamente modulando a síntese de enzimas antioxidantes (DE LA LASTRA; VILLEGAS, 2007), e promovendo o aumento da captação de glutamato extracelular (QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011), o que pode ter contribuído para a redução do ON observada nos animais tratados. Embora o resveratrol também estimule a produção de ON durante a I/R em benefício das células (CHANDER; CHOPRA, 2005), acredita-se que as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do resveratrol (ZHANG; LIU; SHI, 2010; SGAMBATO et al., 2001) tenham sido capazes de amenizar os danos sofridos pela I/R, não sendo necessário o aumento do óxido nítrico na porção distal do íleo dos animais tratados com este polifenol.



**Figura 1** – Níveis totais de óxido nítrico no íleo distal dos grupos controle (C), sham controle (SC), sham tratado (ST), isquêmico controle (IRC) e isquêmico tratado (IRT), expressos em  $\mu\text{M}/\text{ml}$ . Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*diferença significativa em relação ao grupo controle (C); \*\*diferença significativa em relação ao grupo isquêmico controle (IRC).

### CONCLUSÕES

Embora a isquemia intestinal seguida de reperfusão sanguínea promova o aumento de óxido nítrico presente no tecido ileal, o resveratrol é capaz de agir contra os efeitos nocivos dessa injúria impedindo que o excesso do ON cause maiores danos ao tecido.



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

**Agências de Fomento:** Capes e CNPq.

### REFERÊNCIAS

- BAUR, J. A; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006.
- CALCINA, F et al. Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience.* V. 134, p. 39-49, 2005.
- CHANDER, V; CHOPRA, K. Role of nitric oxide in resveratrol-induced renal protective effects of ischemic preconditioning. **Journal of Vascular Surgery.** V. 42, n. 6, 2005.
- DE LA LASTRA, C. A; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. **Biochem Soc Trans.** V. 35, p. 1156-1160, 2007.
- FILHO, R. F; ZLBERSTEIN, B. O óxido nítrico como neurotransmissor no sistema nervoso entérico: Fisiopatologia e implicações no íleo adinâmico. v. 25, n. 5, 1998.
- FREMONT L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000.
- KASTE, M. Current therapeutic options for brain ischemia. **Neurology.** v. 49. P. 49-56, 1997.
- KIM, H. K. Experimental models of cerebral ischemia. **Acta Anaesthesiol Scand Suppl.** 1997.
- KÖHLER, H. F; DELUCCA, I. M. S; NETO, L. S. Antioxidantes enterais em lesões de isquemia e reperfusão em ratos. **Rev Col Bras Cir.** V. 38, n. 6, 2011.
- MASSBERG, S; MESSMER, K. The nature of ischemia/ reperfusion injury. **Transplant Proc.** 1998.
- NATHAN, C; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem.** v. 26 n. 13, p. 725-728, 1994.
- QUINCOZES-SANTOS, A; GOTTFRIED, C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011.
- RIVERA, L. R et al. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. **Cell Tissue Res.** 2011.
- SCHMIDT, H. H. H. W; WALTER, U. NO at work. **Cell.** v. 78, p. 919-925, 1994.
- SGAMBATO, A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. **Mutat Res.** 2001.
- TAKAHASHI, A et al. Intestinal Motility in a In Vivo Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion With Special Reference to the Effects of Nitric Oxide on the Motility Changes. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.** V. 33, n. 3, p. 283-288, 2001.
- WANG Q et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* 2002.
- WANG, Y; MARDSEN, P. A. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. **Cur Opin Nephrol Hypert.** V. 4, p. 12-22, 1995.
- ZHANG, F; LIU, J; SHI J. S. Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. **Eur J Pharmacol.** v. 636, p. 1-7, 2010.