



Evento: XXVII Jornada de Pesquisa

## **BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES COM ARTRITE REUMATOIDE APÓS TRATAMENTO FARMACOLOGICO<sup>1</sup>**

### **OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN WOMEN WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AFTER PHARMACOLOGICAL TREATMENT**

**Karine Raquel Uhdich Kleibert<sup>2</sup>, Emelli Fin Hermann<sup>3</sup>, Gabriela Matte Bertoldi<sup>4</sup>, Lenara Schalanski Krause<sup>5</sup>, Raida Ahmad Musa Mheisen Husein<sup>6</sup>, Christiane de Fatima Colet<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa desenvolvido na UNIJUÍ.

<sup>2</sup> Farmacêutica, Mestranda em Atenção Integral a Saúde UNIJUÍ/UNICRUZ. Bolsista PROSUC/CAPES.

<sup>3</sup> Farmacêutica, formada pela UNIJUÍ.

<sup>4</sup> Farmacêutica, Mestranda em Sistemas Ambientais e Sustentabilidade. Bolsista PROFAP.

<sup>5</sup> Acadêmica do curso de Farmácia da UNIJUÍ, Bolsista de Iniciação científica PIBITI/CNPQ.

<sup>6</sup> Médica reumatologista, Mestre em Atenção Integral à Saúde (UNIJUÍ).

<sup>7</sup> Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas, professora da UNIJUÍ, dos mestrados de Sistemas Ambientais e Sustentabilidade, e Atenção Integral à Saúde, e dos cursos de Graduação da saúde. chriscolet@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** Metotrexato, Catalase. Superóxido Dismutase. Hidroxicloroquina. Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico.

## **INTRODUÇÃO**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória e sistêmica que acomete cartilagens e ossos (MATEEN, 2016). Esta condição crônica e progressiva, afeta cerca de 0,5 a 1% da população mundial e 1 a 2% da população brasileira, sendo que as mulheres são três vezes mais propensas, principalmente na faixa etária de 40 a 60 anos (MOTA, 2012; ÁLVAREZ, 2012). A etiologia e patogênese da artrite reumatoide são desconhecidas, mas acredita-se que pode estar relacionado a diversos fatores, entre eles os genéticos e ambientais, que resultam em um processo inflamatório ocasionando danos às estruturas sinoviais (MCINESS, 2011). No entanto, independente do gatilho exato, estudos recentes mostram que o estresse oxidativo também está relacionado a este processo (FONSECA, 2019; MATEEN, 2016).

De acordo com uma meta-análise realizada por Quiñonez-Flores et al. (2016) que avalia ensaios clínicos de indivíduos com AR, há uma correlação entre as espécies reativas de

oxigênio (EROs) e a atividade da doença, o que sugere associação entre essas variáveis. Como alternativa, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os corticóides, as drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) e os imunossupressores são empregados para o manejo da AR, e estes agentes também vem se mostrando eficazes na redução do estresse oxidativo (MOTA, 2012).

No entanto, há inúmeros marcadores que podem ser investigados, os quais podem contribuir com dados acerca do entendimento do EO. Diante disso, este estudo pretende comparar os biomarcadores de estresse oxidativo catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), tióis não-protéicos (NP-SH) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de mulheres antes e após 3 meses de tratamento para AR.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de uma pesquisa transversal, com abordagem quantitativa e analítica, para avaliação do perfil de estresse oxidativo de pacientes de uma clínica reumatológica do município de Ijuí/RS após o tratamento farmacológico. Os critérios de inclusão da amostra foram pacientes recém diagnosticados com AR, com exame de Proteína C Reativa (PCR) reagente, maiores de 18 anos e iniciar tratamento contínuo prescrito por profissional médico para tratamento da AR. Os critérios de exclusão da amostra foram pacientes que possuíam outras doenças inflamatórias ou que não aceitaram participar da pesquisa.

A amostragem foi do tipo intencional e foram selecionados 11 pacientes na primeira consulta com a reumatologista e com diagnóstico clínico de AR, confirmado posteriormente com PCR. Os resultados foram comparados com um grupo controle, composto por 11 indivíduos, sem comorbidades diagnosticadas, sem uso de medicamentos ou qualquer problema inflamatório. Os grupos foram pareados quanto ao sexo e quanto a idade. Todos os participantes aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A primeira coleta de dados, antes do início do tratamento farmacológico, ocorreu entre agosto e setembro de 2020, por meio um questionário, e também através de coletas sangue. A aplicação dos instrumentos e coleta de amostras dos pacientes ocorreu na clínica supracitada e dos controles em domicílio, mas o mesmo procedimento foi realizado para ambos os grupos. Após três meses de tratamento farmacológico, entre novembro e dezembro, foi coletado



novamente material biológico dos pacientes e as análises dos dados também foram feitas nos mesmos meses das coletas.

Para as análises dos biomarcadores de estresse oxidativo utilizou-se tubos à vácuo de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) para obtenção dos eritrócitos (RBC), que após processamento foram congeladas em freezer a menos de zero graus celsius até a análise. Para quantificar a presença dos biomarcadores do EO foram utilizadas as técnicas laboratoriais a seguir: A atividade da CAT nas hemácias foram medidas por método Aebi (AEBI, 1984). A atividade da SOD foi analisada pelo método descrito por McCord e Fridovich (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Os grupos tiol não proteicos de hemácias permitem verificar indiretamente os níveis de GSH (BOYNE; ELLMAN, 1972). O TBARS utiliza leitura realizada em 532nm (MOORE; BRUMMITT; MANKAD, 1989). As técnicas foram realizadas utilizando espectrofotômetro UV –VIS, modelo IL-592-LC-BI.

Os A realização das curvas foi através do programa Microsoft Excel e os demais dados foram analisados por meio do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 18.0). Foi utilizada estatística descritiva e para a análise de associações entre os grupos foi utilizado teste de t de Student para amostras pareadas e para amostras independentes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), com o número do parecer 4.019.693/2020.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Participaram do estudo 11 pacientes, destes 90,1% eram do sexo feminino, com idade média de  $55,72 \pm 11,7$  anos; 8 (72,7%) se declararam brancos e 3 (27,3%) pardos; 9 (81,8%) possuem ensino fundamental completo; 7 (63,6%) são casados. Em relação ao grupo controle, foi composto por 10 (100%) mulheres, com idade média de  $57,09 \pm 8,44$  anos; 9 (90%) se reconheceram brancos e 1 (10%) pardos.

Entre os pacientes com AR, 9 iniciaram o tratamento da doença com metotrexato e 1 com hidroxiquina. Quanto a posologia, 60% tomam 6 comprimidos/dia de metotrexato, 10% usam 4 comprimidos/dia, 10% administram 8 comprimidos/dia e 10% usam 1 comprimido/dia de hidroxiquina 400mg. O objetivo do tratamento geralmente é a remissão da atividade da doença, sendo aceitável baixa atividade em casos selecionados. Considerando o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para a Artrite Reumatóide, o



metotrexato é a primeira escolha de tratamento, sendo que no caso de intolerância deste, pode se optar por leflunomida ou sulfassalazina, ou ainda a Hidroxicloroquina (BRASIL, 2019). Desta maneira, os presentes resultados estão de acordo com as recomendações do Ministério da saúde, com o predomínio do uso de metotrexato pelos pacientes.

No que se diz respeito aos marcadores do estresse oxidativo, observa-se que os níveis de CAT aumentaram após o tratamento com metotrexato ( $p=0,015$ ), já os níveis de NP – SH diminuíram, entretanto, sem diferença estatística ( $p=0,845$ ), demais dados, estão apresentados na Tabela 1. Em trabalhos com ratos, observou-se, diminuição de enzimas antioxidantes como CAT, SOD, glutathione peroxidase, glutathione peroxidase e glutathione e aumento da peroxidação lipídica no fígado dos animais (ALI et al., 2014; DE; SEN; CHATTERJEE, 2015). Apesar dos resultados contrários em relação a CAT, os níveis de TBARS em nosso estudo, apresentaram o mesmo perfil de aumento, embora sem diferença estatística ( $p=0,549$ ). Tais diferenças de resultados podem ser explicadas, pelo tempo de tratamento com o metotrexato, e o tipos de estudo.

Tabela 1 - Níveis dos biomarcadores do estresse oxidativo de pacientes com artrite reumatoide antes e depois do tratamento farmacológico em uma clínica reumatológica do município de Ijuí, RS, 2020.

Variáveis	GC	AR1 (antes)	AR2 (depois)	Intergrupo	Intragrupo
CAT	79,62±29,79	62,90±20,58	101,23±30,77	0,173	0,015*
SOD	190,87±120,94	250,98 ± 128,93	263,74±299,93	0,567	0,903
NP – SH	1409,53 ± 427,51	2287,27±641,09	2203,84±1010,74	0,063	0,845
TBARS	2,52±1,23	4,89±1,44	5,65±4,32	0,030*	0,549

\* $p < 0,05$  pela análise do teste de t de Student para amostras pareadas.

Legenda: (GC) Grupo Controle; (AR<sub>1</sub>) Pacientes com AR primeira coleta, antes do tratamento farmacológico; (AR<sub>2</sub>) Pacientes com AR, coleta após três meses de tratamento farmacológico; (CAT) Catalase - mmol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mL eri; (SOD) Superóxido Dismutase - SOD/mL Hb; (NP-SH) Tióis Não-Proteicos - nmol NP-SH/mL eri; (TBARS) Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - nmol MDA/mL eri. Intergrupo: AR<sub>2</sub> x GC; Intragrupo: AR<sub>1</sub> X AR<sub>2</sub>.

O presente estudo apresenta algumas limitações, como tamanho da amostra e análise de apenas um período de tratamento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS



Observou-se que o tratamento farmacológico aumentou os níveis de CAT, e não demonstrou efeito nos demais marcadores, desta maneira, são necessárias mais pesquisas acerca do assunto, considerando os diversos fatores que podem afetar tais resultados.

## AGRADECIMENTOS

CNPQ/UNIJUÍ, PROSUC/CAPES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MATEEN, S. et al. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. **PloS One**, v. 11, n. 4, p. e0152925, 2016.
- MOTA, L. M. H. DA et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, p. 152–174, 2012.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Catastrophic health expenses and impoverishment of households of patients with rheumatoid arthritis. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 8, n. 4, p. 168–173, 2012.
- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.
- FONSECA, L. J. S. DA et al. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. e7536805, 2019.
- QUÍÑONEZ-FLORES, C. M. et al. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 6097417, 2016.
- AEBI, H. Catalase in vitro. Em: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological Systems. [s.l.] Academic Press, 1984. v. 105p. 121–126.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.
- BOYNE, A. F.; ELLMAN, G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Analytical Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 639–653, 1972.
- MOORE, R. B.; BRUMMITT, M. L.; MANKAD, V. N. Hydroperoxides selectively inhibit human erythrocyte membrane enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 273, n. 2, p. 527–534, 1989.
- ALI, N. et al. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 215–223, 2014.
- DE, S.; SEN, T.; CHATTERJEE, M. Reduction of oxidative stress by an ethanolic extract of leaves of Piper betle (Paan) Linn. decreased methotrexate-induced toxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 409, n. 1, p. 191–197, 2015.
- BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Artrite Reumatóide**. Brasília: Ministerio da Saude, 2019.