

MINICURSO: TÉCNICAS DE PERFUSÃO HEPÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS



LABORATÓRIO DE METABOLISMO HEPÁTICO

Professores:

Adelar Bracht
Anacharis B. de Sá Nakanishi
Jurandir Fernando Comar
Livia Bracht

Pós-graduandos:

Ânglea Parizotto
Gabriela Bueno Franco Salla
Geferson de Almeida Gonçalves
Jamil Soni Neto
Lorena de Castro
Marcos Rodrigues Maldonado
Mariana Marques N. Wendt
Mellina Simões
Vanessa Pateis

1. INTRODUÇÃO

O fígado, por excelência, é o órgão central do metabolismo, o que o torna alvo de estudos básicos (metabolismo) e aplicados (doenças, como a artrite reumatoide). Para tal, técnicas utilizando o órgão íntegro ou em frações celulares são de grande valor científico.

1.1. Perfusão hepática

A perfusão do fígado é uma técnica na qual o vaso aferente (de entrada, veia porta) e o vaso eferente (de saída, veia cava) do órgão são canulados, de tal maneira que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e colher, para posterior análise, o líquido venoso (perfusado).

No fígado em perfusão podem ser medidas várias vias metabólicas, como por exemplo, a neoglicogênese, a glicólise, a glicogenólise, o consumo de oxigênio, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante. Por exemplo, a gliconeogênese é uma via anabólica responsável pela produção da glicose (em condições metabólicas específicas) a partir de precursores estruturalmente simples como piruvato, lactato e alanina. Após a infusão de um desses substratos pode-se medir no perfusado a formação de piruvato, glicose, lactato e de outros parâmetros, além do consumo de oxigênio.

A figura 1 ilustra as principais partes do sistema de perfusão monovascular utilizado no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá. Ele é formado por uma bomba peristáltica, um oxigenador de membrana e pela câmara do fígado. A este sistema estão acoplados um microeletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico, um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido e um cilindro contendo a mistura carbogênica (O₂:CO₂/95:5).

O tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato é o líquido de perfusão padrão. O pH deste tampão é inicialmente ajustado em 7,6 e após saturação com a mistura carbogênica o pH desce para 7,4. Neste é adicionado albumina de soro bovino, que ajuda na manutenção da integridade do órgão. Substratos e drogas podem ser infundidos diretamente ou dissolvidos no líquido de perfusão.

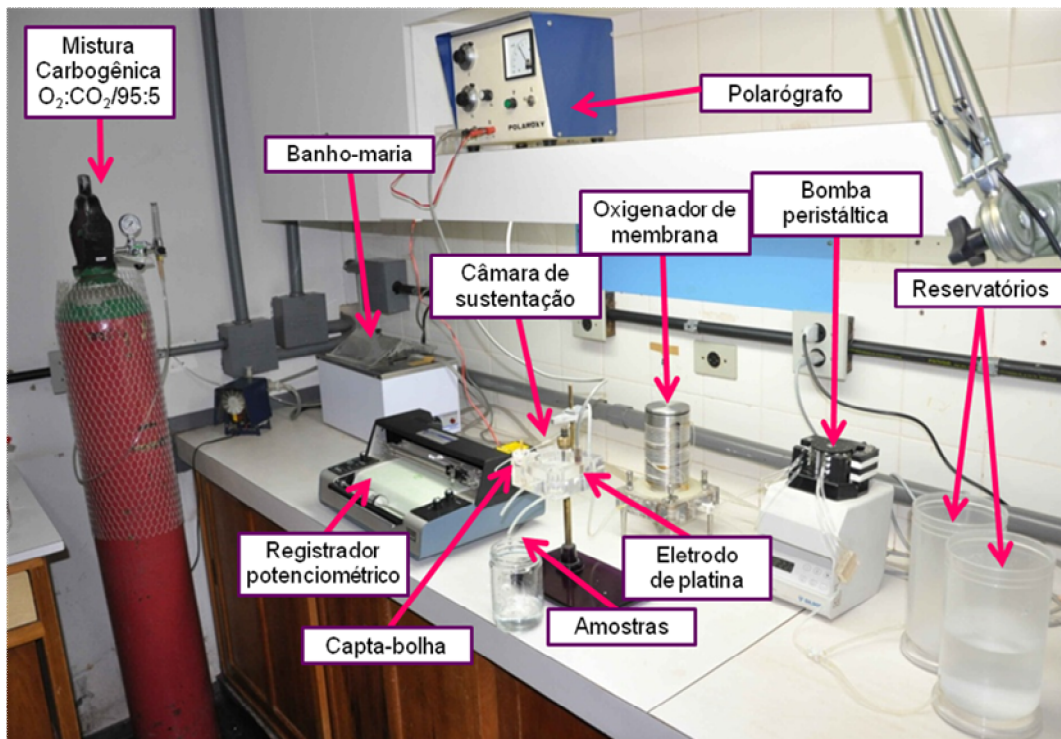


Figura 1. Representação da aparelhagem de perfusão do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá. Os componentes estão indicados na figura.

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro de alumínio ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha de silicone. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostaticada pelo banho-maria com bomba de circulação externa. O cilindro de alumínio está separado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo no seu interior uma atmosfera rica em oxigênio.

A câmara do fígado é de acrílico transparente, contém um capta-bolhas, uma câmara para a coleta de amostras e um dispositivo de inserção e fixação do eletrodo de platina. O líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador, de forma que seu fluxo deve ser ajustado conforme o peso do animal. Neste local ocorrem simultaneamente a oxigenação e o aquecimento para 37 °C. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão e após passar pelo eletrodo de platina, a amostra é coletada.

No procedimento cirúrgico da perfusão monovascular canula-se a veia porta (via de influxo do líquido de perfusão) e a veia cava (via de efluxo do líquido de perfusão).

1.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a sua remoção pelos sistemas de defesa antioxidante. A elevada concentração de ROS causa danos moleculares às estruturas celulares com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo e cerebral. No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta. Em humanos, o estresse oxidativo encontra-se ligado a diversas doenças, como a artrite reumatoide, aterosclerose, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.

Em condições fisiológicas aproximadamente 1 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias são convertidos em ROS e radicais livres devido à incompleta redução do oxigênio por reações de transferência de elétrons. As espécies reativas de oxigênio incluem o radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Estas são em geral eliminadas por um sistema de defesa antioxidante, que consiste de enzimas que varrem radicais livres e moléculas de baixo peso molecular com atividade antioxidante. Quando as ROS escapam do sistema antioxidante, estas causam dano oxidativo lesando macromoléculas como DNA, proteínas, e lipídios, além de mutações no DNA mitocondrial.

O radical $\text{HO}\bullet$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e facilmente gerar o radical $\text{HO}\bullet$. O H_2O_2 oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupo tiol muito reativos, por exemplo, GSH. O $\bullet\text{O}_2^-$ ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio.

O maior sistema antioxidante que protege o organismo contra as ROS é composto por enzimas e moléculas biológicas que são capazes de neutralizar os radicais livres, entre estas incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, além das moléculas glutathione reduzida, glutathione oxidada, vitamina C e vitamina E.

1.3. Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica e sistêmica, que afeta as membranas sinoviais, cartilagens articulares e ossos. A patofisiologia da artrite envolve uma hiperplasia intensa da cartilagem articular, com a participação de células T, células B, macrófagos, fibroblastos e citocinas pró-inflamatórias. Além das citocinas, as ROS, também desempenham um papel importante na artrite reumatoide. O excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem ROS no fluido sinovial, que atuam como mediadores de lesão tecidual.

Além de afetar a cartilagem articular, a artrite reumatoide provoca respostas inflamatórias com alterações imunológicas em outros órgãos, como o fígado. Para o minicurso foi escolhido um modelo animal de artrite induzida por adjuvante padronizada pelo Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá.

1.4. Gliconeogênese hepática

O glicogênio é a reserva de glicose que se encontra principalmente no fígado e nos músculos. É rapidamente utilizável nos intervalos entre as refeições, durante a atividade muscular, dieta baixa em carboidratos e após um trauma. O glicogênio encontra-se no citoplasma celular sob a forma de grânulos que contêm também as enzimas que participam do seu metabolismo.

A reserva corporal de glicogênio pode ser suficiente para suprir as necessidades de glicose de um dia, entretanto quando o jejum se prolonga por mais de oito horas, o organismo recorre à gliconeogênese (figura 2) no intuito de manter os níveis homeostáticos.

O fígado desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis de glicose sanguínea durante o jejum, ao converter seu glicogênio armazenado

em glicose (glicogenólise) e ao sintetizar a glicose, principalmente a partir de moléculas precursoras não glicídicas, incluindo lactato, piruvato, glicerol e muitos aminoácidos (gliconeogênese). Isso é de vital importância, já que o cérebro e os eritrócitos dependem fundamentalmente da glicose para satisfazer suas necessidades energéticas. Os rins também são locais importantes para a gliconeogênese, pois somente as suas células e as do fígado possuem quantidades suficientes de glicose-6-fosfatase, a enzima que remove o grupo fosfato da glicose-6-fosfato para produzir glicose.

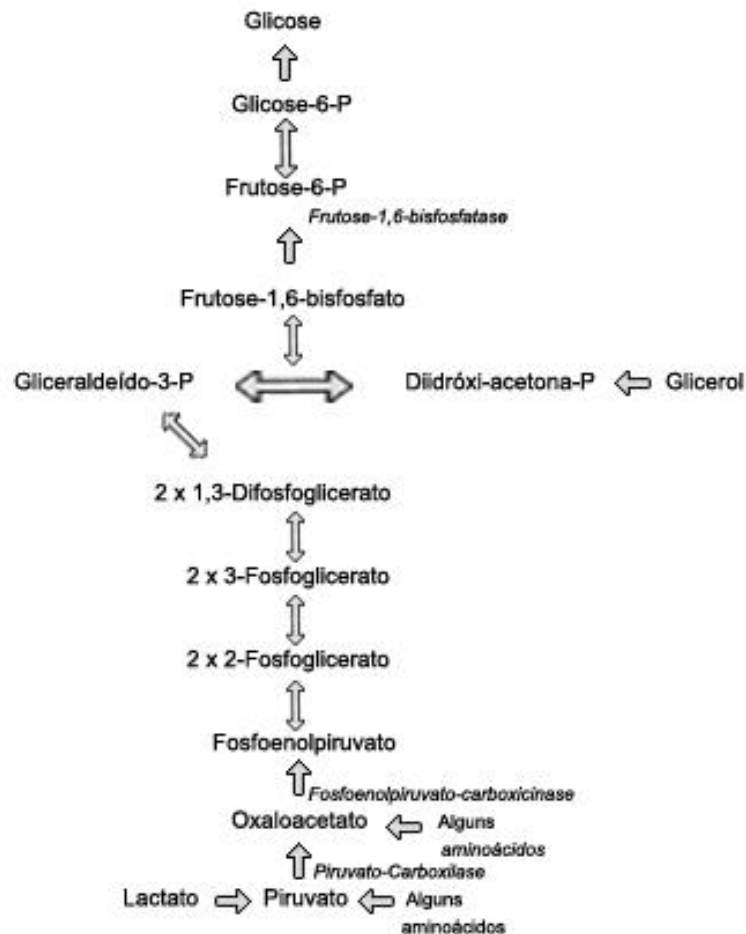


Figura 2. Gliconeogênese hepática. (Fonte: Cingolani; Houssay; 2003).

O músculo quando está em uma atividade física intensa, faz a fermentação, convertendo a glicose armazenada em lactato. O lactato cai na corrente sanguínea e vai para o fígado, onde, por ação da lactato-desidrogenase e em presença de NAD^+ , se transforma em piruvato que é utilizado na gliconeogênese.

No estado de jejum, o tecido adiposo quebra seus estoques de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. O glicerol vai para fígado e pode ser convertido em glicose.

Um dos sinais mais importantes para ocorrer a gliconeogênese é a liberação de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Quando quantidades normais de carboidratos não estão disponíveis para as células, a adenohipófise começa a secretar quantidades aumentadas do hormônio corticotropina. Isto leva o córtex adrenal a produzir grandes quantidades de glicocorticóides, especialmente o cortisol. Este mobiliza as proteínas das células de todo o organismo, disponibilizando-as na forma de aminoácidos nos líquidos corporais. Uma grande quantidade é rapidamente deaminada no fígado, fornecendo substratos para a conversão em glicose.

1.5. Resultados de estudos da gliconeogênese em fígados artríticos

Modificações nas propriedades de sistemas de membranas isoladas, organelas ou órgãos intactos, incluindo o fígado, foram demonstradas em ratos com artrite induzida por adjuvante. Os resultados revelaram que o fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante apresenta um estresse oxidativo acentuado com alta lesão de lipídios e proteínas.

Os fígados de ratos artríticos produzem menos glicose e uréia que fígados de ratos normais a partir de substratos precursores do oxalacetato e do aspartato, o que sugere o envolvimento de enzimas chaves da gliconeogênese. É possível que a atividade da piruvato carboxilase ou da fosfoenolpiruvato carboxiquinase encontrem-se alteradas nesta situação. A atividade da piruvato carboxilase é essencialmente dependente de cátions bivalentes, principalmente o magnésio, e monovalentes, em especial o potássio. Uma das hipóteses possíveis seria que a dependência destes cátions pudesse estar alterada na artrite.

Em fígados de ratos artríticos, as velocidades de produção de glicose foram menores com L-alanina e piruvato como substratos, mas com L-lactato e sorbitol não foram encontradas diferenças quando comparadas com a condição normal. Estas diferentes respostas do rato artrítico estão provavelmente relacionadas: a capacidade gliconeogênica prejudicada dos fígados quando a

L-alanina e o piruvato, mas não o L-lactato e o sorbitol, são os precursores gliconeogênicos.

Foi sugerido, que a regulação da gliconeogênese com piruvato como substrato ocorre em um sítio entre a fosfoenolpiruvato e a glicose. Assim, a explicação mais provável para a supressão do estímulo da gliconeogênese quando o piruvato e a L-alanina foram os substratos é a de que uma inibição em uma etapa que precede a síntese da fosfoenolpiruvato e que não está envolvida na gliconeogênese a partir de L-lactato tenha limitado os mecanismos regulatórios induzidos pela noradrenalina. Esta etapa poderia ser a transferência de equivalentes de redução da mitocôndria para o citosol e, para a L-alanina como substrato, também a reação da alanina aminotransferase.

2. OBJETIVOS

Ensinar as técnicas de perfusão hepática e duas técnicas de avaliação do estado oxidativo com o intuito de mostrar alterações que podem ocorrer no metabolismo utilizando o modelo animal de artrite como exemplo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Holtzman, pesando em torno de 200 g, foram injetados na pata traseira esquerda com 0,1 ml de Adjuvante de Freund (*Micobacterium tuberculosis*, obtido a partir da estirpe H37Rv humano, inativado pelo calor) suspenso em óleo mineral. Os animais que apresentem lesões características em 18 dias após a injeção adjuvante serão selecionados para os experimentos. Os ratos de pesos semelhantes foram injetados com óleo mineral e serviram como controles. Todos os experimentos de indução de artrite adjuvante foram feitas de acordo com as diretrizes éticas mundialmente aceitas para a experimentação animal e previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Para os experimentos os ratos serão submetidos a um jejum de 18 horas.

3.2. Procedimento para perfusão hepática

3.2.1. Soluções

I. Soluções estoque para o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato:

- Solução A: NaCl (2,32 M; concentração final: 116 mM);
- Solução B: NaHCO₃ (0,5 M; final: 25 mM);
- Solução C: KCl (0,118 M; final: 5,9 mM), Na₂SO₄ (24 mM; final: 1,2 mM), MgCl₂ (23,6 mM; final: 1,18 mM); NaH₂PO₄ (24,8 mM; final: 1,24 mM);
- Solução D: CaCl₂ (50 mM; final 2,5 mM).

II) Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro (KH) (para cada animal):

Colocar em um béquer 2400 mL de água destilada, 150 mL de cada uma das soluções estoque A, B, C e D, adicionar 0,75 g de albumina e acertar pH para 7,6 (volume final de 3000 mL).

III) Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo L-alanina 5 mM:

Separar 1200 mL de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro e dissolver 0,5345 g de L-alanina (PM 89,09). Ajustar o pH para 7,6.

3.2.2. Procedimento cirúrgico

Para remoção cirúrgica do fígado o rato é previamente anestesiado com tiopental sódico (50 mg/kg).

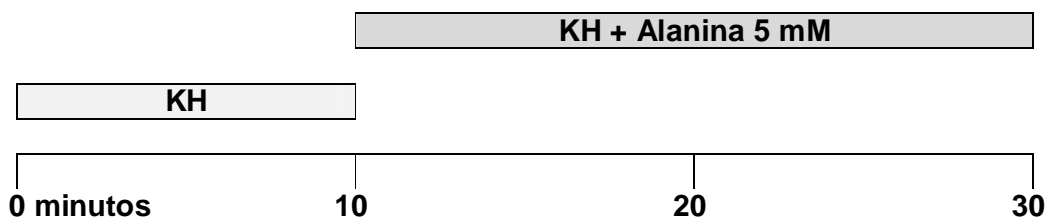
- O animal é deitado em decúbito dorsal numa plataforma ao lado da câmara do fígado;
- O abdômen é aberto longitudinalmente e o tecido conjuntivo que cerca o fígado é seccionado com cuidado para evitar hemorragias;
- O estômago deve ser separado do esôfago da seguinte forma: fixam-se duas ligaduras ao redor do esôfago, uma distal outra proximal em relação ao estômago e corta-se o esôfago entre as duas ligaduras;

- Desloca-se o estômago e os intestinos para o lado esquerdo do rato (direito do operador), para expor a veia porta e uma porção da veia cava inferior nas proximidades do rim direito;
- Coloca-se uma ligadura na veia esplênica, para ocluí-la;
- Colocam-se duas ligaduras frouxas ao redor da veia porta;
- Uma ligadura frouxa deve ser colocada ao redor da veia cava inferior, acima do rim direito;
- Ajusta-se o fluxo do líquido de perfusão em torno 8 mL/minuto;
- Segurando com uma pinça fina o operador deverá efetuar uma pequena incisão na veia porta e introduzir a ponta da cânula;
- Após o dessangramento do fígado (cor marrom-avermelhada), devem-se amarrar as ligaduras da veia porta;
- Secciona-se a veia cava inferior distalmente;
- Deve-se abrir o tórax, cortando o esterno, o diafragma e as costelas para exposição completa do coração;
- Aumenta-se o fluxo para 20 mL/minuto para a inserção da cânula da veia cava. Então, colocam-se duas ligaduras ao redor da veia canulada. Amarra-se a um mesmo laço as porções anteriormente seccionadas do diafragma;
- Fecha-se a ligadura frouxa colocada anteriormente na veia cava inferior;
- Deve-se remover o fígado cortando por baixo do diafragma, segurando a cânula da veia cava através das ligaduras, até uma completa separação do órgão do restante do animal, para então posicioná-lo na plataforma;
- Uma vez colocado na câmara do fígado, o fluxo através do órgão deve ser ajustado para valores que permitam oxigenação adequada (entre 4 e 5 mL por minuto por grama de fígado).

3.2.3. *Protocolo experimental*

Após verificar que o consumo de oxigênio está estável, dar início ao experimento acionando o cronômetro e coletando a primeira amostra

(perfusado). Coletar as amostras de 2 em 2 minutos conforme o esquema abaixo.



Tubos:

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

3.2.4. Dosagem enzimática de glicose por kit

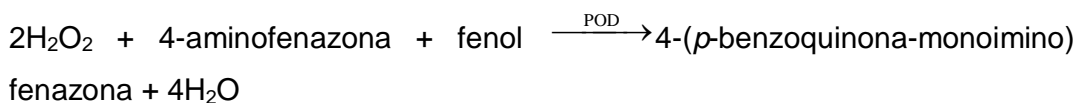
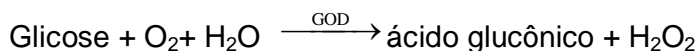
I) Procedimento:

	Branco	Padrão	Amostra
Mistura reativa	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
KH	0,4 mL	-	-
Padrão	-	0,4 mL	-
Perfusado	-	-	0,4 mL

- Incubar em banho-maria a 37 °C por 20 minutos;
- Ler em espectrofotômetro a 505 nm.

II) Princípio da técnica:

A glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada. Esta última, na presença de peroxidase (POD), produz a conjugação do fenol presente na solução com a 4-aminofenazona, dando lugar a um composto colorido que absorve luz a 505 nm.



A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

3.2.5. Procedimentos para a avaliação da concentração venosa de oxigênio

I) No início o líquido de perfusão está saturado com ar e o registrador mostra uma linha estável que corresponde à concentração de oxigênio de uma solução saturada com ar; a 37 °C e à pressão atmosférica, esta concentração é aproximadamente igual a 190 μM no papel do registrador isto corresponde a x cm.

II) Após a substituição do ar pela mistura carbogênica (O₂:CO₂/95:5), a concentração do oxigênio aumenta e, depois de algum tempo, estabiliza-se em torno de 860 μM. A deflexão do registrador ultrapassa os limites do papel, sendo necessário compensar (y cm).

III) A concentração de oxigênio no perfusado venoso pode ser determinada medindo-se a distância entre o ponto nulo e a posição do traçado da pena (z cm).

3.2.6. Cálculo dos fluxos metabólicos

Os fluxos metabólicos serão expressos em μmol por minuto por grama de fígado (μmol/min.g). A fórmula geral para o cálculo nas dosagens espectrofotométricas é:

$$\text{Fluxo metabólico} = \text{fator} \times \text{absorbância}$$

O fator para a dosagem enzimática da glicose é:

$$\text{Fator} = \frac{\text{fluxo} \times \text{concentração do padrão}}{\text{peso do fígado} \times \text{absorbância do padrão}}$$

Para o consumo de oxigênio, a fórmula a ser usada será:

$$\text{Fator} = \left(\frac{\text{fluxo}}{\text{peso do fígado} \times 1000} \right) \times \left(860 - \frac{(z + y) \times 190}{x} \right)$$

3.3. Estresse oxidativo

3.3.1. Preparação do homogenato de fígado para determinação dos conteúdos de glutathiona reduzida (GSH) e atividade da catalase (CAT)

Os conteúdos de GSH e a atividade da enzima antioxidante CAT serão determinados no homogenato de fígados de ratos controle e artríticos. Para a realização destes ensaios, os ratos serão decapitados e o fígado retirado por laparotomia e clampeado em nitrogênio líquido, pesado e separado em uma

porção de 1,2 g. Essa porção será macerada e homogeneizada com homogeneizador Van Potter em 9 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (tudo em gelo). Para a determinação da atividade específica da CAT, o homogenato será centrifugado a 9800 rpm por 15 minutos para a obtenção do sobrenadante.

3.3.2. Dosagem Fluorimétrica de GSH e princípio da técnica

Para a realização deste ensaio, o homogenato será adicionado a um meio de precipitação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes 10 mM, pH 7,4. A esta mistura serão adicionados ácido tricloroacético (TCA) 13%. Após centrifugação, o conteúdo de GSH será dosado, através da adição de alíquotas desse sobrenadante em tampão fosfato 0,1 M + EDTA 5,0 mM (pH 8,0). Para avaliação do conteúdo de GSH, serão utilizados padrões, através da adição de GSH 1,0 mg%.

A adição de OPT a esse sobrenadante resulta na formação de um produto altamente fluorescente, com o máximo de fluorescência sendo obtido após cerca de 15 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, o fluoróforo GSH-OPT é então determinado.

Após a realização da primeira leitura, uma segunda leitura será realizada com a adição do padrão nas amostras. Essa segunda leitura, tem como finalidade eliminar interferências, causadas pela presença de proteínas, sobre a fluorescência do composto GSH-OPT (quenching).

3.3.3. Cálculo GSH

A quantidade de GSH existente no tecido hepático será calculada de acordo com a fórmula:

$$Q_{GSH} = \left(C_p \times \left(\frac{F_a - F_b}{F_p - F_a} \right) \right) \times \frac{15}{\text{mg prot}}$$

C_p = Concentração de padrão GSH 0,4 μg (40 μl de GSH 1,0 mg%)

F_a = Fluorescência da Amostra

F_b = Fluorescência do Branco

F_p = Fluorescência do padrão + Fluorescência da Amostra.

A concentração de GSH será expressa em termos de μg de GSH por mg

de proteína presente no homogenato.

3.3.5. Determinação da atividade específica da catalase (CAT) e princípio da técnica

A atividade da enzima CAT será avaliada pela decomposição enzimática do H₂O₂ medida diretamente por espectrofotometria em 240 nm. O sobrenadante (diluído 100 vezes) será adicionado a uma solução contendo Tris 50 mM, EDTA 0,25 mM e H₂O₂ 30 mM (pH 8,0) e a queda da absorbância monitorada por um minuto a 25°C.

3.3.6. Cálculo da CAT

A velocidade inicial da reação será extrapolada e a atividade da enzima (Acat) será calculada utilizando o coeficiente de extinção do H₂O₂ (ϵ , 33,1 M⁻¹), e os valores expressos como μ mol de H₂O₂ por minuto por mg de proteína com a fórmula:

$$A_{cat} = \frac{((x \times 0,1) + y) \div 33,1 \times 1000}{\text{mg prot}}$$

x = cateto oposto ao ângulo formado

y = cm correspondentes a 0,1 de absorbância

3.3.7. Procedimento para a dosagem de proteínas

Misturar os reativos A, B e C, na seguinte ordem e volumes: 0,1 mL de B, 0,1 mL de C e 10 mL de A

Diluir o homogenato e o sobrenadante 100 vezes (990 μ L de água + 10 μ L da amostra do homogenato).

Adicionar em tubos de ensaio:

	Branco	Padrão	Amostra
Água	100 μ L	-	-
Padrão	-	100 μ L	-
Amostra diluída	-	-	100 μ L
Mistura reativa	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
• Homogeneizar e aguardar 10 min (ambiente)			
Folin 1N	100 μ L	100 μ L	100 μ L

• Homogeneizar e aguardar 10 min (ambiente)

- Ler em espectrofotômetro a 700 nm, contra o branco.

A concentração de proteína será calculada com base na absorbância encontrada para o padrão albumina 20 mg%.

3.3.8. Cálculo proteínas

$$\frac{\text{mg}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 20}{\text{Absorbância do padrão}} \right) \times \frac{\text{diluição}}{100}$$

4. Referências Bibliográficas

Babeto de Sá-Nakanishi, A.; Comar, J.F.; Kelmer-Bracht, A. M.; Bracht, A. **Determinação da atividade da piruvatocarboxilase em fígados de ratos artríticos**. 2003.

Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. L.; Kelmer-Bracht, A. M. **O estudo do metabolismo no fígado em perfusão**. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (eds), Métodos de Laboratório em Bioquímica, Manole, São Paulo, pp. 275–289, 2003.

Cingolani, H. E.; Houssay, A. B. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Comar, J. F.; Babeto de Sá-Nakanishi, A.; de Oliveira AL, Marques Nogueira Wendt M, Bersani Amado CA, Ishii Iwamoto EL, Peralta RM, Bracht A. **Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis**. 2013.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Trad. Bárbara de Alencar Martins et al. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006.

Halliwell, B. **Free radicals and antioxidants: A personal view**. Nutrition reviews, 52:253-265, 1994.

Hissin, P. J.; Hilf, R. **A fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues**. Analyt Biochem, 74:214-226, 1976.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Editora Savier, Quarta Edição, 2007.

Linnane, A. W.; Marzuki, S.; Ozawa, T.; Tanaka, M. **Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease**. Lancet 1, 642-645, 1989.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. **Protein measurement with Folin phenol reagent**. J. Biol. Chem. 193:131-138, 1952.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. **Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction**. Analyt Biochem, 95:351-358, 1979.

Reiter, R. J. **Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain**. The FASEB Journal, 9:526-533, 1995.

Silva, P. M. S.; Ishii-Iwamoto, E. L.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L. **Influência na artrite induzida por adjuvante nas propriedades cálcio-**

dependentes de mitocôndrias isoladas e na resposta neoglicogênica de fígados à noradrenalina. 2007.

Silverthorn, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada.** 2^a. ed. Trad. Ivana Beatrice Mânica da Cruz. São Paulo: Manole, 2003.

Wei, Y. H. **Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events.** Mutat. Res. 275, 145-155, 1992.