

## ESTUDO SOBRE TIMO DE RATOS CARENTES EM VITAMINA E.

## STUDIES ON THYMUS OF RATS DEFICIENT ON VITAMIN E.

P. T. P. SILVA\*  
I. H. HIGUTI\*\*  
A. J. NASCIMENTO\*\*\*  
W. A. HADLER\*\*\*\*  
A. O. CRUZ\*\*\*\*\*

RECEBIDO EM 21/09/83  
APROVADO EM 30/09/83

### INTRODUÇÃO

O papel biológico da vitamina E tem sido amplamente estudado. Essa vitamina se localiza na fração lipídica, onde atua como poderoso anti-oxidante (9) e fornece estabilidade para membranas contendo ácidos graxos poli-insaturados (8). Além disso, parece atuar como agente regulador no metabolismo intermediário (13).

Deficiência em vitamina E produz alta taxa de respiração em músculo esquelético, em distrofia muscular nutricional (5) e desacopla a fosforilação oxidativa em homogeneizado muscular. Segundo Quintanilha *et alii* (12), mitocôndrias de músculo e fígado de rato exibem aumento em lipoperoxidação, diminuição no potencial elétrico transmembrana, decréscimo no acoplamento fosforilativo e baixas velocidades de transporte de elétrons, quando comparados com mitocôndrias controle.

Em trabalho anterior, analisamos o timo de rato em carência de vitamina E, através de microscopia ótica e eletrônica e o conteúdo de citocromos em mitocôndrias isoladas de ratos normais e carentes em vitamina E (6). No presente trabalho analisamos a atividade de algumas enzimas de mitocôndrias isoladas de timo de ratos normais e carentes em vitamina E

---

\* Professora auxiliar do Departamento de Farmácia da UFPR, Curitiba, PR.

\*\* Aluna de Mestrado em Bioquímica no Departamento de Bioquímica da UFPR.

\*\*\* Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da UFPR.

\*\*\*\* Professor Titular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, SP.

\*\*\*\*\* Professor Titular do Departamento de Fisiologia da UFPR.

bem como a análise morfo-histológica e histoquímica das glândulas de timo desses animais.

Parte desse trabalho foi apresentado em Congresso (15).

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e seis ratos normais e vinte e seis ratos tratados com dieta carente de vitamina E, como descrito anteriormente (6), foram sacrificados e as glândulas de timo isoladas e colocadas em meio de extração gelado (18). As mitocôndrias foram isoladas (6) e a concentração protéica foi determinada pelo método de LOWRY *et alii* (7).

O ensaio da atividade da enzima NADH desidrogenase foi realizado pelo método de SOTTOCASA *et alii* (16). O sistema de reação continha: 50 mM tampão fosfato, pH 7,5, 1 mM cianeto de potássio, 0,2 mM NADH, 80  $\mu$ g proteína mitocondrial, 0,2 a 0,6 mM ferricianeto de potássio. Volume final, 1,0 ml. A redução do ferricianeto foi monitorada a 420 nm, em espectrofotômetro Beckman DB, USA. As mitocôndrias foram congeladas durante 1 h a  $-18^{\circ}$  e descongelados antes do uso. A atividade enzimática foi obtida por extrapolação para concentração infinita de ferricianeto.

O ensaio da atividade da NADH oxidase (10) foi realizado com mitocôndrias rompidas por congelamento. O sistema de incubação continha: 50 mM tampão fosfato, pH 7,3, 0,2 mM NADH, 400  $\mu$ g proteína mitocondrial. Volume final 1,0 ml. A oxidação do NADH foi monitorada a 340 nm.

O ensaio da atividade de succinato desidrogenase foi realizado como descrito por DOUCE *et alii* (1). O sistema de incubação continha: 500 mM de tampão fosfato, pH 7,3, 50  $\mu$ M citocromo c, 0,3 mM cianeto de potássio, 30 mM succinato, 350  $\mu$ g proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram rompidas por congelamento e pré-aquecida a  $30^{\circ}$ . A redução do citocromo c foi monitorada a 550 nm.

O ensaio da atividade da malato desidrogenase foi monitorado conforme a técnica descrita por DOUCE *et alii* (1). O sistema de incubação continha: 0,1 M tampão glicina-NaOH, pH 10,0, 2,5 mM  $\text{NAD}^{+}$ , 90  $\mu$ M malato de potássio e 100  $\mu$ g de proteína mitocondrial. As mitocôndrias foram rompidas por congelamento.

A atividade da ATPase foi monitorado em mitocôndrias intactas, pelo método de PERRY & GREY (11). O sistema de incubação continha: 12,5 mM tampão tris-HCl, pH 7,4, 50 mM sacarose, 3 mM cloreto de magnésio, 3 mM ATP, 0,2 mg de mitocôndrias intactas. Tempo de incubação, 4 min. Volume final 1ml. A reação foi iniciada pela adição da enzima e terminada pela adição de 0,2 ml de ácido tricloroacético a 10%. A solução foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 min. O sobrenadante foi ensaiado para fósforo inorgânico, pelo método de SUMNER (17).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muita atenção tem sido dada, nos últimos anos, ao fato de que a

vitamina E protege as organelas subcelulares, particularmente as mitocôndrias. O conceito de que a vitamina E funciona como protetor de componentes lipídicos oxidáveis tornou-se bastante aceitável e serve para explicar as alterações histológicas que aparecem durante a deficiência em vitamina E. A importância fisiológica da vitamina E em proteger a membrana interna mitocondrial está relacionada a sua capacidade antioxidante, bem como a propriedade de estabilizante estrutural, de vez que a lipoperoxidação altera a estrutura e permeabilidade da membrana mitocondrial (2).

A análise histoquímica e histológica das glândulas de timo de ratos normais e deficientes em vitamina E apresentaram os seguintes resultados: 1 - Grupo normal. Aparência histológica normal. Os corpúsculos tímicos (corpúsculos de Hassall) apresentaram reação positiva para colesterol (3) e tocoferol (4), mas negativa para vitamina D, o que constitui resultado normal para o timo de rato.

2 - Grupo carente de vitamina E. Histologicamente, o timo apresentou seus lóbulos com atrofia relativa da cortical e hipertrofia da medular, onde as células reticulares se apresentaram em maior número e com menor tendência em se transformarem em células queratinizadas. Por esse motivo, o número de corpúsculos tímicos foi menor que no timo de animais controle. Histoquimicamente, os corpúsculos tímicos não apresentam reação positiva para tocoferol. No entanto, a reação para colesterol é positiva, embora a intensidade seja aparentemente menor, em comparação com os corpúsculos tímicos dos animais controle.

Ensaio enzimáticos realizados com mitocôndrias isoladas de timo de ratos normais e carentes de vitamina E estão representados na Tabela I.

**TABELA I**  
**Atividades de Enzimas Mitocondriais de Timo**  
**de Ratos Normais e Deficientes em Vitamina E.**

Enzima	Atividade específica	
	normal	deficiente
ATPase <sup>1</sup>	0,74	0,68
NADH desidrogenase <sup>2</sup>	1,24	0,62
NADH oxidase <sup>3</sup>	12,37	7,60
Succinato desidrogenase <sup>4</sup>	3,87	6,35
Malato desidrogenase <sup>5</sup>	0,37	0,52

A atividade específica foi expressa em: 1 -  $\mu$ moles Pi/min/mg. 2 -  $\mu$ moles NADH/min/mg. 3 - nmoles NAD<sup>+</sup>/min/mg. 4 - nmoles citocromo c/min/mg. 5 -  $\mu$ moles NADH/min/mg.

Esses resultados indicam que, exceto a ATPase, as enzimas analisadas apresentaram níveis de atividades diferentes em função da dieta ministrada aos ratos. Das enzimas analisadas, a succinato desidrogenase e malato desidrogenase indicam níveis de atividade específica maiores em animais deficientes que em ratos normais. Esses resultados não confirmam os resultados de Quintanilha *et alii* (12) que observaram decréscimos nos níveis de latência de enzimas celulares, acompanhando a deficiência em vitamina E.

A atividade específica da ATPase, em mitocôndrias de timo normal apresenta valores mais altos que os obtidos em mitocôndrias de fígado normal, ao passo que todas as outras enzimas analisadas apresentam atividades específicas menores que as das enzimas ensaiadas em mitocôndrias de fígado normal (14).

Das enzimas analisadas, apenas a malato desidrogenase é enzima solúvel. A diferença na atividade específica entre normal e deficiente é pouco expressiva. As restantes são enzimas particuladas, associadas ao ambiente lipídico da membrana interna mitocondrial. Observa-se na tabela I que as enzimas NADH desidrogenase e NADH oxidase tem maior atividade em mitocôndrias normais que em deficientes. O aumento na atividade dessas enzimas foi também observado em mitocôndrias de fígado de rato (14) quando a estrutura mitocondrial era preservada. A enzima succinato desidrogenase também é bastante sensível a alterações da membrana mitocondrial (14), porém respostas opostas foram observadas entre amostras normais e deficientes em mitocôndrias de músculo e fígado (12).

### RESUMO

Foram ensaiadas as atividades de algumas enzimas de mitocôndrias de timo de ratos Wistar, tratados em dietas clássicas normais e carentes em vitamina E. Os resultados obtidos, expressos em atividades específicas, respectivamente para ratos normais e carentes, foram os seguintes: ATPase, 0,74 e 0,68  $\mu$ moles Pi/mg/min. NADH desidrogenase, 1,24 e 0,62  $\mu$ moles NADH/mg/min. NADH oxidase, 12,37 e 7,60 nmoles NAD/mg/min. Succinato desidrogenase, 3,86 e 6,35 nmoles cit. c/mg/min. Malato desidrogenase, 0,37 e 0,52  $\mu$ moles NADH/mg/min. Esses resultados indicam que, exceto a ATPase, as enzimas analisadas apresentam níveis de atividades diferentes em função da dieta ministrada aos ratos. A análise morfo-histológica e histoquímica realizada em timo de ratos carentes, indicam uma diminuição do tamanho de células reticulares da medula, bem como ausência de vitamina E nos corpúsculos de Hassall.

PALAVRAS CHAVE: timo, vitamina E, enzimas mitocondriais.

### SUMMARY

Mitochondria were isolated from the thymus of rats, normal and deficient in vitamin E, and the activities of a number of component enzyme were assayed. The results obtained, in terms of specific activities, respective-

ly for normal and deficient rats, were as follows: ATPase: 0,74 and 0,68  $\mu$ moles Pi/mg/min; NADH dehydrogenase: 1.24 and 0.62  $\mu$ moles Pi/mg/min; NADH oxidase: 12.37 and 7.60 nmoles NAD/mg/min; succinate dehydrogenase: 3.86 and 6.35 nmoles cyt. c/mg/min; malate dehydrogenase: 0.37 and 0.52  $\mu$ moles/mg/min. These results indicated that, except for ATPase, the assayed enzymes have different levels of activity depending on the diet. The morpho-histological and histochemical analyses carried out on thymuses of rat deficient in vitamin E, indicated a decrease in the size of medullar reticulate cells and an absence of vitamin E in Hassall corpuscle.

KEY WORDS: thymus, vitamin E, mitochondrial enzymes.

### RÉSUMÉ

L'activité de quelques enzymes mitochondriales du thymus de rats Wistar, soumis soit à une diète classique, soit à une diète avec déficit en vitamine E, a été étudiée. Les résultats obtenus sont exprimés en activité spécifique des enzymes, pour le groupe recevant une diète normale et pour les animaux soumis à un état de carence. Ces résultats sont les suivants: ATPase 0,74 et 0,68  $\mu$ moles Pi/mg/min., NADH dehydrogenase 1,24 et 0,62  $\mu$ moles NADH/mg/min., NADH oxydase 12,37 et 7,60 nmoles NAD/mg/min., dehydrogenase du succinate 3,86 et 6,35 nmoles cit. c/mg/min., dehydrogenase du malate 0,37 et 0,52  $\mu$ moles NADH/mg/min. Sauf dans le cas de l'ATPase, les enzymes étudiées ont présenté des niveaux d'activité variables suivant la diète à laquelle les rats étaient soumis. L'analyse morpho-histologique et histochimique du thymus des rats soumis à une diète avec déficit en vitamine E montre que les cellules réticulaires de Hassall des animaux soumis à carence de vitamine E.

MOTS CLÉS: thymus, vitamine E, enzymes des mitochondries.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Benvinda Fabris pelos cuidados dispensados aos animais de laboratório.

### BIBLIOGRAFIA

1. DOUCE, R., MANNELLA, C. A., BONNER Jr., W. D. The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, Nova York, **292**:105-116, 1973.
2. GUEDES, L. S., STENCEL, M., CAMPELLO, A. P. e NASCIMENTO, A. J. Studies on rat liver mitochondria. II. Formation of lipid peroxides in mitochondria preserved at 0 - 4°. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* Nova York, **38**:125-132, 1982.

3. HADLER, W. A. A histochemical method suitable to discriminate free cholesterol from its esters and both from 7-dehydrocholesterol and vitamins D. (Em publicação).
4. HADLER, W. A. e SILVEIRA, S. Identification of tocopherol (vitamin E) in the skin and its histochemical detection. *Acta histochem.*, Jena, **68**:11-21, 1981.
5. HUMMEL, J. P. e BASINSKI, D. H. Oxidative phosphorylation process in nutritional muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, **172**:417-422, 1948.
6. KREISEL, U., ETO, A. N., NASCIMENTO, A. J. e CRUZ, A. O. Estudo das modificações estruturais do timo de rato albino em carência de vitamina E. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, **22**:116-19, 1979.
7. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, L. e RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, **193**:265-275, 1951.
8. LUCY, J. A. Functional and structural aspects of biological membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Nova York, **203**:4-11, 1972.
9. McCAY, P. B. e KING, M. M. Biochemical function of vitamin E. in: *Vitamin E*. L. J. Machin ed. p. 289-316, Marcel Dekker, Inc. Nova York e Basel, 1980.
10. NASCIMENTO, A. J. Estudos metabólicos em coração de láparos infectados com vírus da febre aftosa. Curitiba, 1972, 36 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
11. PERRY, S. V. e GREY, T. C. A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the magnesium-activated myofibrillar adenosine triphosphatase. *Biochem. J.*, Londres, **64**:754-768, 1956.
12. QUINTANILHA, A. T., PACKER, L., DAVIES, J. M. S., ROCANELLI, T. L. e DAVIES, K. J. A. Membrane effects of vitamin E deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Nova York, **393**:32-47, 1982.
13. SCHWARZ, K. Cellular mechanism of vitamin E action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Nova York, **203**:45-52, 1972.
14. SILVA, P. T. P. Estudo sobre a estabilidade de enzimas mitocondriais durante o envelhecimento de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Curitiba, 1983. 49 p. Tese. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
15. SILVA, P. T. P., HIGUTI, I. H., NASCIMENTO, A. J. HADLER, W. A. e CRUZ, A. O. Estudo sobre timo de ratos carentes em vitamina E. in: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA. 18. São Lourenço, 1983. *Resumos*. São Lourenço, Sociedade Brasileira de Fisiologia, 1983, p. 231.
16. SOTTOCASA, G. L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L. e BERGSTRAND, A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, Nova York, **32**:415-438, 1967.
17. SUMNER, J. B. Scientific apparatus and laboratory methods. *Scien-*

- ce, Lancaster, 100:413-414, 1944.
18. VOSS, D.O., CAMPELLO, A. P. e BACILA, M. Respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Nova York, 4:48-51, 1961.