

EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE O METABOLISMO HEPÁTICO DE CARBOIDRATOS EM RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Any Carolina Chagas (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi (Orientador), e-mail: anacharis@bol.com.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: resveratrol, artrite induzida, metabolismo de carboidratos.

Resumo:

O resveratrol é um antioxidante que tem sido muito utilizado no controle do envelhecimento e de doenças cardiovasculares. O presente estudo teve por principal objetivo avaliar os efeitos do resveratrol sobre o metabolismo de carboidratos de ratos artríticos e ratos controles. Para isto, foi utilizada a técnica de perfusão de fígado isolado. O resveratrol inibiu a gliconeogênese e o consumo de oxigênio tanto em ratos controles como em artríticos. Já a glicólise e a glicogenólise foram reduzidas pelo resveratrol somente em animais controles. Estes resultados sugerem que este polifenol apresenta um amplo espectro de ação sobre o metabolismo de carboidratos em fígado de ratos e que, pelo menos na dose e protocolo experimental utilizado, não esteja modificando o estado redox celular dos animais artríticos.

Introdução

A artrite reumatóide é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica que afeta a cartilagem articular, mas também cérebro, fígado, pulmões. A artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA) é uma imunopatologia experimental em ratos que apresenta muitas semelhanças com a artrite reumatoide humana. Além do aumento do estresse oxidativo que acomete o fígado, coração, e cérebro, significativas alterações também ocorrem no metabolismo hepático dos animais artríticos, especialmente aquelas associadas com o metabolismo energético, como a via glicolítica, glicogenolítica e neoglicogênica (Fedatto et al., 2002; Wendt et al., 2015; Comar et al., 2013).

O resveratrol é um antioxidante da classe dos polifenois com propriedades benéficas de retardar o envelhecimento e prevenir doenças cardiovasculares (Vang et al., 2011). Pertence à classe dos "*sacrificial antioxidants*", os quais neutralizam diretamente os radicais livres e são inativados durante o processo antioxidante, de tal forma que precisam ser repostos por outros, já que normalmente não podem ser reciclados de forma eficiente.

Acredita-se que uma modificação do estado oxidativo celular no fígado para uma direção menos oxidada possa diminuir tanto o estresse oxidativo quanto o aumentado fluxo através das vias catabólicas hepáticas. Este seria o caso de substâncias antioxidantes, como o resveratrol, que poderiam diretamente diminuir o estresse oxidativo tecidual. Assim, seriam poupados equivalentes redutores de forma a restabelecer, ao menos em parte, as razões NAD(P)H/NAD(P)^+ e um ambiente menos oxidado, que por sua vez, cessaria o estímulo no fluxo através de vias catabólicas. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do resveratrol sobre o metabolismo hepático de carboidratos. Para isso, foi utilizado a técnica de perfusão de fígado, que permite determinar o fluxo de várias vias metabólicas sob condições controladas, tais como a glicólise, glicogenólise e gliconeogênese (Bracht et al., 2003)

Materiais e métodos

Animais, indução da artrite, técnica de perfusão hepática

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM (Protocolo número CEUA **2495130916**). Ratos machos da linhagem Holtzman foram utilizados para indução da artrite por adjuvante, por meio da injeção com o adjuvante completo de Freund[®]. No 19º dia após a indução da artrite, os animais foram anestesiados e o fígado isolado por remoção cirúrgica. Ratos de mesma idade foram utilizados como controle. A perfusão de fígado isolado foi realizada em um sistema não recirculante. Resumidamente, após a canulação das veias cava e porta, o fígado foi removido e posicionado em uma câmara de acrílico aberta. O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit bicarbonato que perfunde o fígado pela cânula introduzida na veia porta e deixa o órgão pela cânula conectada à veia cava. Os substratos foram dissolvidos diretamente no tampão e os metabólitos foram determinados no perfusado por meio de ensaios colorimétricos determinados no espectrofotômetro. O consumo de oxigênio foi monitorado continuamente por meio de um eletrodo prata-platina posicionado na saída do perfusado efluente.

Foram realizados dois protocolos experimentais: um com animais em jejum de 18 horas a fim de avaliar a gliconeogênese, utilizando como substrato o L-lactato. E um segundo protocolo experimental com intuito de avaliar a glicólise e a glicogenólise foram utilizados fígado de ratos alimentados. O fluxo da glicólise foi quantificado pela soma das determinações de piruvato mais lactato divididos por dois, considerando que a glicose gera duas moléculas de piruvato. Já a glicogenólise foi quantificada pela soma da glicose liberada no perfusado mais glicose metabolizada pela via glicolítica. Os resultados foram expressos em gráficos e tabelas como médias $\pm$ erros-padrão das médias. Diferenças entre médias foram avaliadas por meio do teste *t* de Student (duas médias) ou por meio do teste de Student-Newman-Keuls (três ou mais médias). O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

Resultados e Discussão

A gliconeogênese hepática foi avaliada em ratos em jejum de 18 horas para garantir baixos níveis de glicogênio. A infusão de lactato promoveu um aumento na produção de glicose e piruvato e no consumo de oxigênio, tanto em animais controles quanto nos artríticos. Entretanto, a capacidade de produção de glicose está reduzida em aproximadamente 50% em animais artríticos, enquanto o consumo de oxigênio não diferiu entre os grupos. Acredita-se que esta diminuição da gliconeogênese em animais inflamados esteja relacionada a um comprometimento das enzimas chaves da via ou ainda há uma reduzida disponibilidade de equivalentes redutores no citosol das células hepáticas inflamadas.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o resveratrol é bastante ativo sobre o metabolismo hepático de carboidratos. A perfusão direta desse polifenol foi capaz de modificar as vias metabólicas relacionadas ao metabolismo energético em fígado de ratos em perfusão isolada. O resveratrol, nas três concentrações avaliadas (25, 50 e 100µM), inibiu a biossíntese de glicose (gliconeogênese), via dependente do ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa mitocondrial. Em animais controles esta redução foi de aproximadamente 75%. No grupo artrítico o resveratrol reduziu a produção de glicose para níveis semelhantes ao basal. O consumo de oxigênio foi reduzido com o tempo de perfusão em ambos os grupos. Esta redução tendeu a ser dependente da concentração até 50µM mantendo-se praticamente estável até 100µM. No entanto, apresentou diferença significativa somente para as concentrações de 50 e 100µM no grupo artrítico. Estes efeitos foram parcialmente revertidos com a remoção da infusão do resveratrol. Os resultados não permitem descrever um mecanismo de ação, mas sugere-se que, pelo menos dois fatores possam estar relacionados a diminuição da síntese de glicose hepática induzida pelo resveratrol: 1) menor eficiência da transdução de energia mitocondrial e 2) diminuição da atividade de enzimas chaves da gliconeogênese.

A via glicogenolítica e a liberação de glicose foram significativamente menores nos animais artríticos. Esta redução é consequência do menor conteúdo de glicogênio no fígado desses animais, como observado em trabalhos anteriores. A via glicolítica não diferiu entre os grupos analisados. O consumo de oxigênio foi aproximadamente 17% menor na condição artrítica. Embora em animais artríticos o resveratrol não tenha modificado o fluxo da glicogenólise e da glicólise o mesmo reduziu progressivamente ambas as vias no grupo controle. O grau de redução foi similar para as três doses de resveratrol utilizadas.

Nos animais controles, a liberação de glicose foi levemente reduzida pelo resveratrol no início da perfusão e em seguida foi estabilizada, mantendo-se reduzida para as três concentrações avaliadas. Embora o consumo de oxigênio tendeu a aumentar transitoriamente com resveratrol nos primeiros minutos, não apresentou diferença significativa em ambos os grupos. A produção de piruvato e lactato foi maior nos animais controles na ausência

de resveratrol. No entanto o resveratrol reduziu a produção de lactato nos animais controles para níveis semelhantes aos artríticos (25, 50 e 100 μ M) sem afetar a produção de piruvato ou a razão piruvato/lactato, utilizada normalmente como um indicador da razão NADH/NAD⁺ citosólica no fígado. A lactato desidrogenase no fígado está próxima ao equilíbrio, isso significa que provavelmente o resveratrol não altera a razão NAD⁺/NADH em animais controles como também em animais artríticos.

Conclusões

Em conclusão, os resultados do presente trabalho demonstram que o resveratrol é um composto que modifica de maneira ampla o metabolismo de carboidratos no fígado. Além disso, exerce efeitos distintos em fígados de animais saudáveis e artríticos. Embora não seja possível afirmar o mecanismo de ação, sugere que o resveratrol possa exercer seus efeitos por mecanismos distintos, que precisam ser posteriormente investigados.

Agradecimentos

Ao PIBIC e ao CNPq pelo apoio à iniciação científica dos acadêmicos.

Referências

BRACHT, A.; SILVEIRA, S. S.; CASTRO-GHIZONI, C. V.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; OLIVEIRA, M. R. N.; BERSANI-AMADO, C. A.; PERALTA, R. M.; COMAR, J. F. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. **SpringerPlus**, v. 5, p. 36-50, 2016.

COMAR, J. F.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; OLIVEIRA, A. L.; WENDT, M. M. N.; BERSANI-AMADO, C. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Rad Biol Med**, v. 58, p. 144-153, 2013.

FEDATTO, Z. JR; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; VICENTINI, G. E.; BRACHT, A.; KELMER-BRACHT, A. M. Glycogen levels and glycogen catabolism in livers from arthritic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 229, p. 1-7, 2002.

VANG, O.; AHMAD, N.; BAILE, C. A.; BAUR, J. A.; BROWN, K.; CSISZAR, A.; et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS ONE**, v. 6: e19881, 2011.

WENDT, M. M. N.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; GHIZONI, C. V. C.; BERSANI-AMADO, C. A.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; COMAR, J. F. Oxidative state and oxidative metabolism in the brain of rats with adjuvant-induced arthritis. **Exp Mol Pathol**, v. 98, p. 549-557, 2015.