

## EFEITO DO BOLDINE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATO EM FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO

Milena Thais F. da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anacharis Babeto de Sá Nakanishi (Orientador), e-mail: absnakanishi@uem.br.

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

**Área e subárea do CNPq/CAPES:** Ciências Biológicas II/ Bioquímica

**Palavras-chave:** boldine; gliconeogênese; perfusão hepática

### Resumo:

Boldine é um alcalóide (classe aporfina) principalmente encontrado nas folhas e tronco do boldo chileno (*Peumus boldus*). Estudos comprovam que o boldine apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e vem apresentando capacidade de redução da glicemia plasmática em ratos diabéticos. No entanto, nada se tem sobre a potencial atividade deste alcalóide sobre o metabolismo hepático. Desse modo, o objetivo geral do presente trabalho foi realizar um estudo dos efeitos do boldine sobre as principais vias do metabolismo de carboidratos no fígado de rato em perfusão isolada. O boldine inibiu a gliconeogênese de forma dependente de concentração com uma  $IC_{50}$  de 71,85  $\mu$ M. Em adição, este alcaloide aumentou o fluxo da glicólise, sem interferir no consumo de oxigênio. Estas ações auxiliam a justificar a redução da hiperglicemia em ratos diabéticos tratados com o boldine. Desse modo, este alcalóide pode ser considerado uma potencial ferramenta terapêutica para o manejo o controle e tratamento do diabetes.

### Introdução

Boldine é um alcalóide (classe aporfina) principalmente encontrado nas folhas e tronco da árvore boldo chileno (*Peumus boldus*). Ações farmacológicas tem sido associada com a habilidade deste alcalóide de “neutralizar” radicais livres<sup>(2;3)</sup>. Outros estudos demonstraram que, o boldine apresenta ação anti-hiperglicêmica<sup>(1;2)</sup> em animais por inibir a absorção de glicose e estimular a secreção de insulina. Ainda, é altamente possível que o mesmo possa interferir diretamente ou indiretamente sobre a síntese e degradação de glicose hepática. Entretanto, nada se tem a este respeito. Sendo assim, o objetivo geral da presente proposta foi realizar um estudo sistemático dos efeitos metabólicos do boldine no metabolismo de carboidratos em fígado de rato em perfusão isolada.

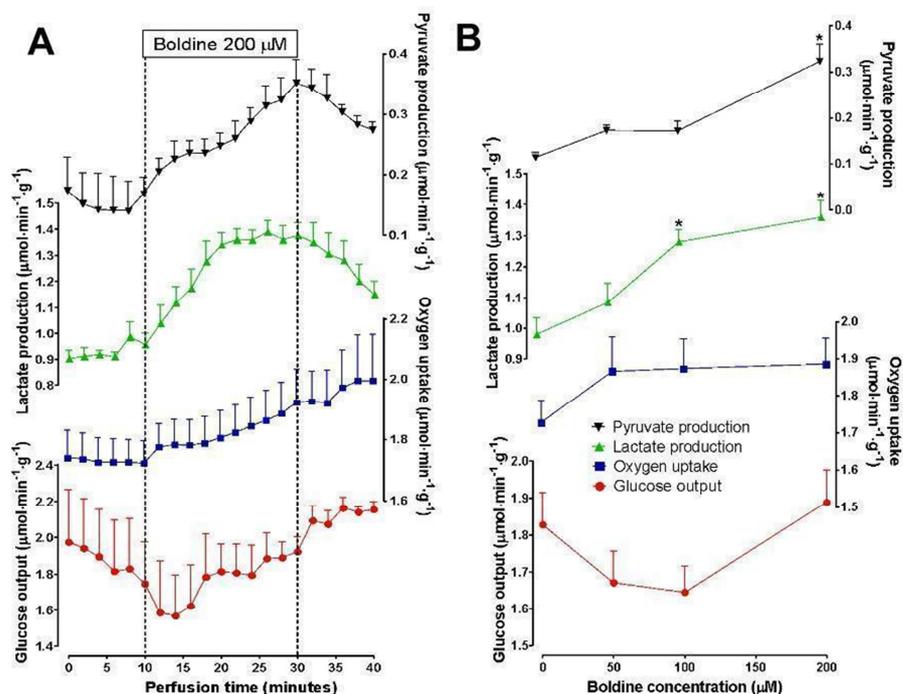
### Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar (200 a 230 g). Todos procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela CEUA (nº6416011220). Para a

remoção cirúrgica do fígado os animais foram previamente anestesiados (cetamina+xilazina 70+7mg/Kg). As amostras do perfusado efluente foram coletadas e quantificados o conteúdo de glicose, lactato e piruvato, por meio de reações enzimáticas. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia. O substrato gliconeogênico foi lactato (2 mM). O boldine foi infundido em 3 concentrações (50, 100 e 200  $\mu$ M).

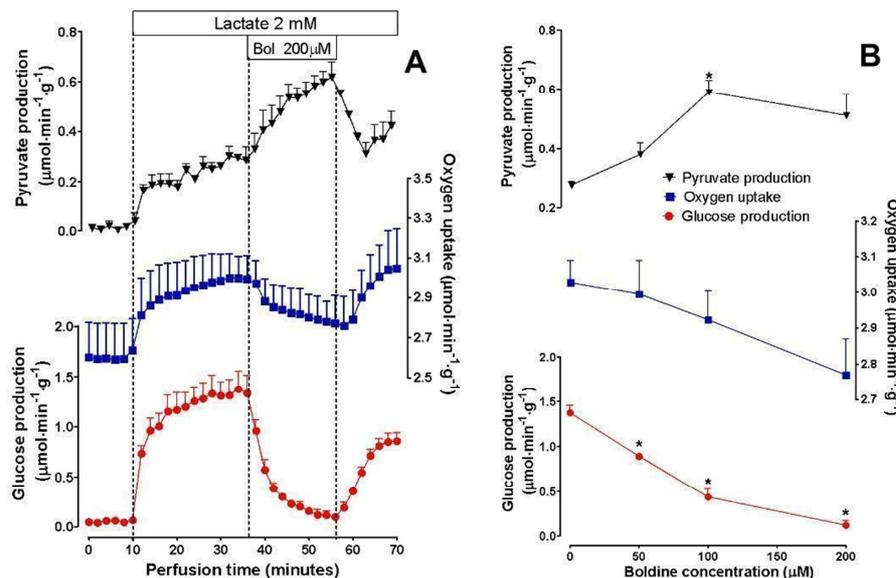
## Resultados e Discussão

Inicialmente, com intuito de avaliar o efeito do boldine sobre metabolismo do glicogênio foi utilizado fígado de ratos alimentados. A figura 1A ilustra o decurso temporal dos efeitos de 200  $\mu$ M boldine na liberação de glicose, produção de lactato e piruvato e consumo de oxigênio. Após 10 minutos de infusão do tampão Krebs-Henseleit bicarbonato, foi iniciado a infusão de boldine. O boldine aumentou claramente a produção de lactato e piruvato, mas apresentou uma pequena tendência a elevação da glicose e o consumo de oxigênio. A Fig.1B apresenta os efeitos dependentes de concentração do alcalóide. O boldine tendeu a elevar a glicose e o consumo de oxigênio somente na concentração mais alta, mas sem significância estatística. Entretanto, foi observado um claro estímulo da glicólise, como revelado pelo aumento de piruvato e de lactato de forma dependente de concentração. Afim de verificar o efeito do boldine sobre a gliconeogênese hepática, foi utilizado fígado do rato em jejum de 18h. A infusão de lactato induziu, como esperado, aumento da produção de glicose, piruvato e do consumo de oxigênio. Nesta condição, a produção de glicose reflete principalmente a velocidade da gliconeogênese. A infusão de boldine (200  $\mu$ M), foi iniciada aos 36 minutos após estabilização dos parâmetros avaliados, o boldine reduziu progressivamente a produção de glicose atingindo uma inibição completa (níveis basais) 16 minutos após o início da infusão. Esta inibição foi parcialmente revertida após a cessação da infusão do boldine. O consumo de oxigênio foi ligeiramente reduzido e estabilizado em níveis mais baixos, mas foi completamente revertida após a parada da infusão do boldine. A produção de piruvato, por outro lado, foi progressivamente elevada, e completamente abolida após a paralisar a infusão do alcaloide. O mesmo protocolo experimental foi realizado com outras duas concentrações e os efeitos versus concentração estão apresentados na Fig. 2B. A produção de glicose foi progressivamente reduzida com o aumento das concentrações do alcalóide, de forma que, a concentração capaz de inibir 50% a gliconeogênese foi de 71,85  $\mu$ M. A produção de piruvato aumentou em praticamente mesmo grau com as concentrações de 100 e 200  $\mu$ M. O consumo de oxigênio por sua vez, embora tenha apresentado uma tendência de redução, o mesmo não apresentou significância estatística. Os resultados do presente trabalho revelam que, o boldine foi capaz de modificar vias metabólicas ligadas ao metabolismo dos carboidratos no fígado em perfusão. De maneira específica, foi observado um aumento da glicólise a partir do glicogênio hepático e inibição da gliconeogênese a partir de lactato. Esses efeitos podem ser considerados o mecanismo que auxiliam a justificar a diminuição da hiperglicemia sanguínea em animais diabéticos tratados com esse alcalóide<sup>(1;2)</sup>.



**Figura 1: Efeitos do boldine sobre o metabolismo do glicogênio e consumo de oxigênio.** Painel 1A: Fígado de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit, boldine foi infundido a partir de 10 min. O líquido efluente da perfusão foi coletado em intervalos de 2 minutos para dosagens. O consumo de oxigênio foi monitorado de forma contínua por polarografia. Painel 1B: Os valores correspondem a média do steady state obtido após infusão de boldine (tempo 28 min de perfusão). Controle (0  $\mu\text{M}$  boldine) são valores obtidos previamente à infusão da droga (8 min.).

Um estímulo da via glicolítica, normalmente se ocorre em virtude da inibição da respiração celular e comprometimento da produção de ATP. No presente estudo isso não ocorreu, pois boldine não afetou consumo de oxigênio hepático. Desse modo, uma possível explicação para ativação da via glicolítica seria um aumento da concentração do modulador frutose-2,6-bifosfato pela droga. Tal aumento de frutose-2,6-bifosfato estimularia a fosfofrutoquinase-1, principal enzima controladora da velocidade da via. De maneira semelhante, um aumento desse modulador inibi a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase, contribuindo para a redução da gliconeogênese, também observada no presente trabalho. Porém essa hipótese não poderia explicar a nítida inibição da gliconeogênese a partir de lactato. Desse modo considerando a ausência de modificação do consumo de oxigênio, especula-se que o boldine possa interferir diretamente com outras enzimas chaves da síntese de glicose.



**Figura 2: Efeito do boldine sobre a gliconeogênese a partir de lactato em fígado em perfusão isolado.** Painel 1A: Fígado de ratos em jejum por 18 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit. O consumo de oxigênio foi monitorado de forma contínua por polarografia. Painel 1B: Os valores correspondem a média do steady-state obtido após infusão de boldine (tempo 54 min de perfusão). Controle (0  $\mu\text{M}$  boldine) são valores obtidos previamente à infusão do boldine (34 min). \*  $p < 0,05$ .

## Conclusões

A capacidade da boldine de modular o metabolismo da glicose no fígado, inibindo a gliconeogênese e estimulando a glicólise, associada à falta de interferência no consumo de oxigênio, poderia ser um importante mecanismo subjacente a redução da glicemia plasmática em animais diabéticos tratados com boldine. Desse modo, os resultados do presente trabalho fazem deste alcalóide uma potencial ferramenta terapêutica para o controle e tratamento do diabetes.

## Agradecimentos

Ao PIBIC, CNPq e CAPES pelo apoio à iniciação científica.

## Referências

- (1) Hernández-Salinas R, Vielma AZ, Arismendi MN, Boric MP, Sáez JC, & Velarde V. Boldine prevents renal alterations in diabetic rats. *J. Diabetes Res.* 2013. DOI: 10.1155/2013/593672
- (2) Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2000;42:361–71.
- (3) Jiménez I, Speisky H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. *Phytother Res.* 2000;14(4):254-60. doi:10.1002/1099-1573(200006)14:4<430::CO;2-M.