

EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O METABOLISMO HEPÁTICO DE RATOS

Isadora de Brito Hilário (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Naiara Cristina Lucredi, Jurandir Fernando Comar (Orientador). jfcomar@uem.br.

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

Área e sub-área do conhecimento: Ciências biológicas/ Bioquímica.

Palavras-chave: metilglioxal, gliconeogênese hepática, perfil lipídico.

Resumo:

O metilglioxal (MG) é um α -oxaldeído muito reativo produzido a partir da glicólise. Este composto reage com moléculas celulares para os produtos terminais de glicação avançada (AGEs). Os efeitos do MG e dos AGEs sobre o desenvolvimento de doenças hepáticas têm sido bastante investigados, porém pouco se sabe sobre os efeitos destes compostos sobre o metabolismo hepático e como eles contribuem para a evolução do fígado saudável em direção ao órgão doente. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do MG sobre o metabolismo hepático. Para este propósito, ratos Wistar de 60 dias receberam por via intraperitoneal salina ou MG 100 ou 200 mg/kg por 7 dias. No oitavo dia, após jejum de 16h, os fígados dos animais previamente anestesiados foram canulados e perfundidos para avaliação da gliconeogênese. A atividade das enzimas gliconeogênicas chaves fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6-bifosfatase (FBPase-1) e glicose 6-fosfatase (G6Pase) e os níveis de lipídios foram adicionalmente determinadas no fígado. Por fim, a atividade das transaminases foi determinada no plasma. O MG diminuiu a produção de glicose a partir de lactato em cerca de 32%. Em adição, o MG causou uma redução na atividade de G6Pase de 18% para a dose de 100 mg/Kg e 39% para a dose de 200 mg/Kg. A atividade da PEPCK foi reduzida em 57% e a FBPase-1 por 40% no fígado de animais que receberam MG em ambas as doses. Em adição, aumentou a atividade das transaminases séricas. Em suma, os resultados indicam que o MG está associado com dano hepático e, por consequência, com redução da gliconeogênese hepática.

Introdução

A hiperglicemia que caracteriza o diabetes é responsável por alterações no metabolismo corporal, já que aumenta o fluxo de várias vias glicotóxicas, como a produção do metilglioxal (MG), um α -oxaldeído altamente reativo, principalmente como um subproduto da glicólise [BRINGS et al., 2017]. Elevados níveis celulares e séricos de MG reagem com macromoléculas para formar os produtos terminais de glicação avançada (AGEs) (THORNALLEY, 2007). O fígado é muito susceptível aos danos causado pelas glicotoxinas, como o MG e os AGEs, visto que este órgão

expressa vários tipos de receptores para AGEs (YAMAGISHI & MATSUI, 2015). De fato, estes compostos se acumulam no fígado de indivíduos com doenças crônicas e estão associados com a progressão de doenças hepáticas. Entretanto, pouco se sabe sobre como o MG contribui para a evolução do fígado saudável para o fígado esteatótico e resistente a insulina. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do MG sobre o perfil lipídico sérico e hepático, a atividade sérica de transaminases, a gliconeogênese a partir de lactato no fígado em perfusão e a atividade das enzimas gliconeogênicas chaves fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6-bifosfatase (FBPase-1) e glicose 6-fosfatase (G6Pase).

Materiais e Métodos

Ratos Wistar com 60 dias de idade receberam por via intraperitoneal salina ou MG nas doses de 100 ou 200 mg/kg por 7 dias. No oitavo dia, após jejum de 16h, os fígados dos animais previamente anestesiados com xilazina (9 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg) foram removidos e utilizados de acordo com os diferentes protocolos experimentais. Os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da UEM (protocolo CEUA 9185221019).

Para a perfusão hepática, os animais foram submetidos à laparotomia, as veias cava e porta foram canuladas e o fígado perfundido com tampão Krebs/Henseleit bicarbonato (pH 7,4) (KELMER-BRACHT et al., 2003). Lactato (2mM) foi utilizado como substrato gliconeogênico. Os conteúdos de glicose e piruvato foram determinados por métodos enzimático-colorimétricos em amostras coletadas do perfusato efluente a cada 2 minutos. O consumo de oxigênio hepático foi monitorado por polarografia.

Para a coleta dos tecidos, os animais foram submetidos à laparotomia e sangue foi coletado da veia cava hepática, depositado em tubos com EDTA (0,2 M, pH 7,4), centrifugado (3000g/10 min) e o plasma utilizado para determinar a atividade das transaminases AST e ALT utilizando Kits comerciais. O fígado foi imediatamente removido, fragmentado e homogeneizado em meio de isolamento de microsomas. Após centrifugação (101.000g/1 h), o sedimento foi isolado como fração microsomal e utilizada para determinar a atividade da enzima G6Pase por espectrofotometria. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da PEPCK e FBPase-1 também por espectrofotometria.

Os dados obtidos estão expressos em gráficos e tabelas como médias e erros-padrão das médias. Diferenças estatísticas foram avaliadas por meio de ANOVA ONE-WAY com pós teste de Newman-Keuls.

Resultados e Discussão

A Figura 1A mostra o decurso temporal da gliconeogênese no fígado em perfusão. Nota-se que ao infundir lactato, houve um aumento progressivo na produção de glicose e piruvato e no consumo de oxigênio, que tenderam a se estabilizar em 30-35 minutos de tempo de perfusão e foram diferentes para os animais que receberam MG. Os valores nos Painéis B, D e F são as velocidades de produção dos metabólitos do fígado no estado estacionário basal e após a infusão de lactato.

Observa-se que os valores basais não foram diferentes enquanto que aqueles na presença de lactato diferiram entre os diferentes grupos. Para facilitar a comparação, os Painéis C, E e G mostra os incrementos na produção dos metabólitos causados pela infusão de lactato. O incremento na produção de glicose foi 35% menor nos animais que receberam MG em ambas doses se comparados aos controles (Figura 1B e C). Não houve diferença entre os grupos controles e tratados para o consumo de oxigênio (Figura 1D e E). A produção de piruvato foi aumentada em 67%, mas apenas pelo MG 200 mg/kg.

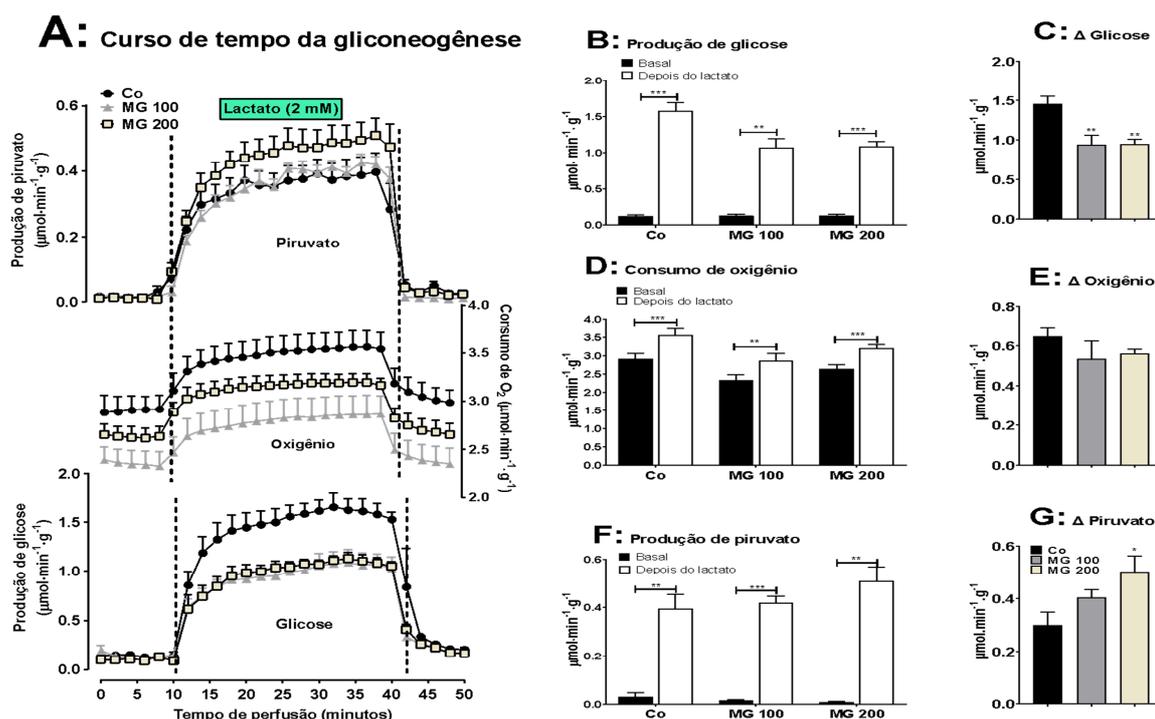


Figura 01: Efeitos do MG sobre a gliconeogênese no fígado de ratos perfundidos com glicerol.
A: Decurso temporal de produção de glicose, lactato e piruvato e consumo de oxigênio no fígado em perfusão causados pela infusão de lactato. Os valores nos Painéis B, D e F são as velocidades de produção dos metabólitos do fígado no estado estacionário basal (barras pretas: tempo 8 minutos na Figura 1A) e no estado estacionário após a introdução do lactato (barras brancas: tempo 38 minutos na Figura 1A). Os valores nos Painéis C, E e G são os incrementos na produção dos metabólitos causados pela infusão de lactato e foram calculados como [valores no final do período de infusão com lactato; 38 min] - [valores antes da infusão de lactato; 8 min] na Figura 1A. Os dados são a média ± SEM de 5 animais para cada condição.

Parâmetro	Controle	MG (100 mg/kg)	MG (200 mg/kg)
AST (U/L)	38,9 ± 1,2	68,3 ± 4,7*	63,1 ± 1,9*
ALT (U/L)	30,8 ± 1,2	28,4 ± 1,3	26,2 ± 3,0

Tabela: Marcadores plasmáticos de dano hepático. Os dados são a média ± erro padrão de 6 animais para cada grupo. *p < 0,0001: diferente dos controles.

A Figura 2 mostra o efeito do MG sobre a atividade das enzimas gliconeogênicas. O MG causou uma redução na atividade de G6pase de 18% para a dose de 100 mg/Kg e 39% para a dose de 200 mg/Kg. A atividade da PECK foi reduzida em 57%

e a FBPase-1 por 40% no fígado de animais que receberam MG em ambas as doses.

Em relação aos marcadores de dano hepático, a atividade da enzima AST foi aumentada em aproximadamente 70% para o MG em ambas concentrações porém, não se observou alterações na atividade da enzima ALT (Tabela 1).

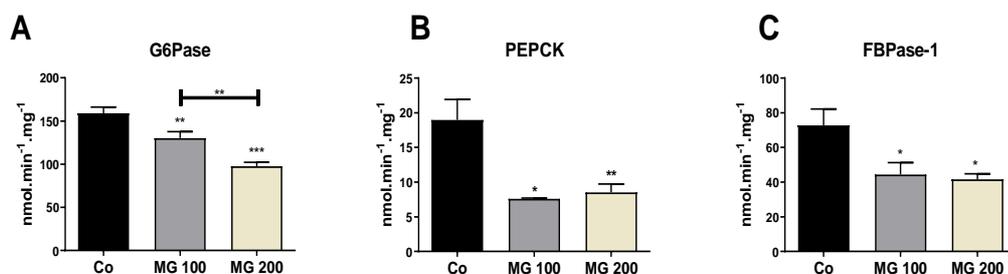


Figura 02: Efeitos da administração de MG sobre a atividade das enzimas regulatórias da gliconeogênese no fígado de ratos. A: Atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase). B: Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). C: Atividade da fosfofrutocinase-1 (FBPase-1). Os dados são a média \pm erro padrão da média de 3 – 6 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados.

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostram que a administração intraperitoneal do MG durante 7 dias nas doses de 100 e 200 mg/Kg causa na redução da gliconeogênese hepática e parece estar principalmente relacionada a uma menor atividade das enzimas chaves reguladoras da via. A menor atividade das enzimas pode estar relacionada com modificações estruturais causadas por danos diretos do MG ao órgão.

Agradecimentos

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo fomento e incentivo dados à pesquisa científica.

Referências

- BRINGS, S., FLEMING, T., FREICHEL, M., MUCKENTHALER, M., HERZIG, S., NAWROTH, P. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention. **Int J Mol Sci**, v.18, p.984, 2017.
- THORNALLEY, P. J. Endogenous alpha-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage. **Novartis Foundation symposium**, v.285, p.229–246, 2007.
- YAMAGISHI, S., MATSUI, T. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. **Eur J Med Res**, v.20, p.15, 2015.
- KELMER-BRACHT, A. M., SANTOS, C. P., ISHII-IWAMOTO, E. L., BROETTO-BIAZON, A. C., BRACHT, A. Kinetic properties of the glucose 6-phosphatase of the liver from arthritic rats. **Biochim Biophys Acta**, v.1638, p.50-56, 2003.