

EFEITOS DA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

Amanda Pagliarini da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carla Indianara Bonetti (Coorientadora), Livia Bracht (Orientador). E-mail: lbracht@uem.br.
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências Biológicas II/Bioquímica

Palavras-chave: catequinas; respiração mitocondrial; fosforilação oxidativa.

RESUMO

A epigalocatequina-3-galato (EGCG) é a principal catequina do chá-verde com propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antineoplásicas. No entanto, foi relatado que a EGCG em altas doses causa lesão hepática. Os mecanismos moleculares exatos subjacentes a estes efeitos não são bem compreendidos. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do EGCG no metabolismo energético de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Maringá (CEUA 6436291021). As mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas por centrifugação diferencial e o consumo de oxigênio foi quantificado a 37° C em um oxígrafo. A respiração basal mitocondrial foi estimulada pela EGCG quando foram utilizados dois substratos, nomeadamente glutamato e succinato. Na presença de ADP exógeno (estado III), a respiração foi significativamente inibida pela EGCG a partir de 250 µM quando foi utilizado succinato como substrato, mas nenhuma inibição foi observada quando foi utilizado glutamato. A respiração no estado IV foi estimulada pela EGCG, começando em 500 µM, na presença de ambos os substratos e, conseqüentemente o controle respiratório (CR) foi inibido. As atividades enzimáticas ligadas à membrana dos complexos mitocondriais I, II e IV foram medidas usando mitocôndrias rompidas. As atividades dos complexos I e II foram diminuídas pela EGCG em 1000 µM. Por outro lado, a oxidação do TMPD + ascorbato (complexo IV) não foi afetada pelo EGCG. A EGCG atua tanto como inibidor mitocondrial dos complexos I e II quanto como agente desacoplador da fosforilação oxidativa.

INTRODUÇÃO

A epigalocatequina-3-galato (EGCG) é a mais abundante e potente catequina do chá-verde. Esta substância possui inúmeros efeitos benéficos, como antioxidante, antiinflamatório, antineoplásico, anti-angiogênico e antialérgico. Apesar dos inúmeros benefícios que o chá verde pode proporcionar à saúde, reações de hepatotoxicidade têm sido associadas a seu uso, principalmente quando é utilizado para o controle do peso corporal (SHI et al., 2021). O uso de preparações a base de chá-verde pode estar associado ao aumento da

atividade das transaminases séricas, ocorrência de lesão hepatocelular e presença de infiltrados inflamatórios no fígado (MAZZANTI et al, 2015).

Apesar dos estudos sobre os efeitos tóxicos da EGCG em hepatócitos isolados, o mecanismo exato de sua toxicidade não está bem esclarecido. Sabe-se que ela interfere com a respiração celular, prejudicando a capacidade de geração de energia celular, como observado em experimentos utilizando hepatócitos isolados (KUCERA et al., 2015). Todavia, experimentos utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato não foram conduzidos até o momento, o que é muito interessante do ponto de vista mecanístico. Por este motivo, o presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos diretos do EGCG sobre a bioenergética mitocondrial, utilizando mitocôndrias isoladas do fígado de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, pesando entre 180 a 230 g. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM n. 6436291021). A alimentação dos animais consistiu em ração balanceada e água *ad libitum*. Para a remoção do fígado e subsequente isolamento de mitocôndrias, os animais foram previamente anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (9 mg/kg). Após remoção, o fígado foi picotado em meio de isolamento, homogeneizado e as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Para realizar a atividade respiratória mitocondrial, o consumo de oxigênio foi medido polarograficamente utilizando um eletrodo de platina revestido por teflon. Mitocôndrias intactas (1 mg proteína/mL) foram incubadas na câmara fechada do oxígrafo em meio contendo manitol 250 mM, KCl 10 mM, etileno glicol ácido tetra-acético (EGTA) 5 mM, TRIS 10 mM (pH 7.4) e fosfato de potássio 5 mM (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). Succinato (10 mM), glutamato (10 mM) e ascorbato (10 mM) mais N,N,N',N'-tetrametil-p-fenileno-diamina dihidroclorato (TMPD, 0,4 mM) foram utilizados como substratos. ADP, em concentração final de 125 μ M, foi adicionado nos tempos adequados. As velocidades de consumo de oxigênio foram computadas a partir das inclinações dos registros de concentração versus tempo e expressas em $\text{nmol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da figura 1 mostram os efeitos da EGCG sobre a respiração de mitocôndrias intactas quando o substrato utilizado foi o glutamato. Pode-se observar que houve um estímulo de 206% no estado basal da respiração em concentrações a partir de 750 μ M, e de 230%, para concentrações de 1000 μ M. Já no estado IV, os estímulos foram de 285% e 400%, com concentrações de 750 μ M e 1000 μ M, respectivamente. Contudo, no estado III (estimulado por ADP) a EGCG não causou efeito significativo. Desse modo, a taxa de controle respiratório (RC) reduziu a partir da concentração de 750 μ M, indicando que a mitocôndria perdeu completamente a capacidade de retorno ao estado de

respiração mais baixa, o que sugere um efeito de desacoplamento da fosforilação oxidativa.

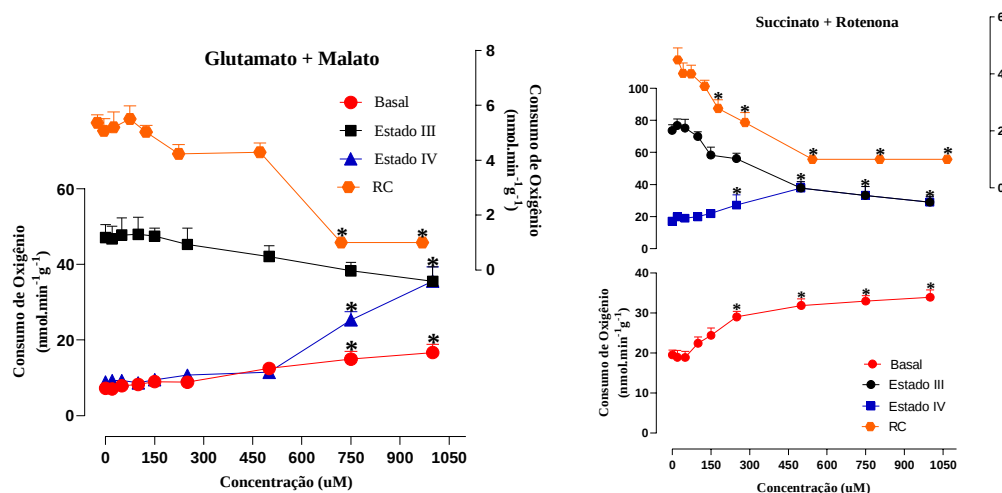


Figura 1. Efeitos da EGCG na atividade respiratória de mitocôndrias intactas de fígado de rato com o substrato glutamato (+ malato) e succinato (+ rotenona). Mitocôndrias ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram adicionadas ao meio de reação no recipiente fechado do oxígrafo. A EGCG foi dissolvida em DMSO e adicionada ao meio de reação nas concentrações de 20, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000 μM . Experimentos de controle contendo apenas DMSO também foram feitos (concentração 0).

A figura 1 também ilustra os resultados obtidos do efeito da EGCG com o substrato succinato. Pode-se observar que no estado basal ocorreu estímulo de 149%, a partir da concentração de 250 μM , seguido de 164%, 169% e 174% com as concentrações de 500 μM , 750 μM e 1000 μM , respectivamente. Um declínio, a partir da concentração 500 μM foi observado na curva de consumo de oxigênio no estado III, alcançando inibição máxima com a concentração de 1000 μM . Em relação ao estado IV, em concentrações menores do que 500 μM houve um discreto estímulo, entretanto, concentrações a partir de 750 μM provocaram um discreto declínio. Como consequência da inibição da respiração do estado III e no estado IV, houve diminuição do controle respiratório a partir de 150 μM , alcançando o valor de 1 na concentração de 500 μM .

Com a finalidade de melhor compreender os resultados obtidos em mitocôndrias intactas, a atividade dos complexos enzimáticos mitocondriais I, II e IV foram avaliados em mitocôndrias rompidas por congelamento/descongelamento. Os substratos propostos para os medir o funcionamento dos complexos foram, respectivamente, NADH, succinato e TMPD + ascorbato e os resultados podem ser observados na figura 2. O NADH é responsável por doar elétrons para o complexo enzimático I na cadeia transportadora. De fato, a droga foi capaz de atuar de maneira inibitória, reduzindo em até 66% e 58% nas concentrações de 750 μM e 1000 μM o consumo de oxigênio quando em altas concentrações. Da mesma maneira, ao utilizar o succinato como substrato, fornecendo assim elétrons ao complexo II da cadeia, houve diminuição de 66% e 60% nas concentrações de 750 μM e 1000 μM respectivamente, do funcionamento das suas atividades, mostrando

outra vez caráter inibitório na respiração. No entanto, ao avaliar o complexo IV, no qual o TMPD + ascorbato atua como doador de elétrons, não foram observadas diferenças significativas.

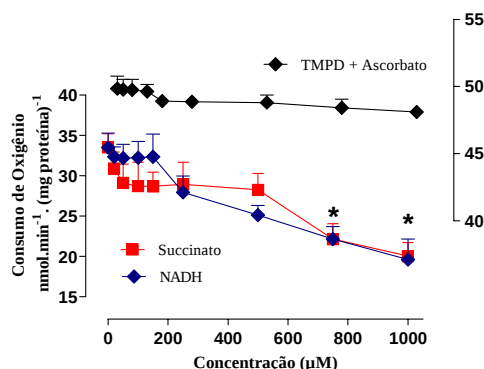


Figura 2. Efeitos da EGCG na atividade das enzimas ligadas à membrana mitocondrial.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a EGCG tem atividade desacopladora e também inibidora do transporte de elétrons nos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial. Estes efeitos podem interferir negativamente com a capacidade de geração de ATP mitocondrial, o que pode estar relacionado com os efeitos tóxicos atribuídos à EGCG.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. [s.l.] Manole, 2003.
- KUCERA, O; MEZERA, V.; MORAVCOVA, A.; ENDLICHER, R.; LOTKOVA, H.; DRAHOTA, Z.; CERVINKOVA, Z. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 20, n. 15, p. 01-02, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/476180>
- MAZZANTI, G.; DI SOTTO, A.; VITALONE, A. Hepatotoxicity of green tea: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, p. 1175-1191, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1521-x>.
- SHI, Z.; ZHU, J. X.; GUO, Y. M.; NIU, M.; ZHANG, L.; TU, C; HUANG, Y.; LI, P. Y.; ZHAO, X.; ZHANG, Z. T.; BAI, Z. F.; ZHANG, G. Q.; LU, Y.; XIAO, X. H.; WANG, J. B. Epigallocatechin gallate during dietary restriction—potential mechanisms of enhanced liver injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 609378, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.609378>