

## **AVALIAÇÕES METABÓLICAS EM UM MODELO MURINO PARA A SÍNDROME METABÓLICA: PAPEL DO EIXO CATALASE/PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO/“STATUS” REDOX.**

Wellington Sabino-Souza<sup>1\*</sup>, Valéria Nunes-Souza<sup>3</sup>, Nelson Miguel Dias-Júnior<sup>1</sup>, Marcos A. Eleutério-Silva<sup>1,2</sup>, Vanessa P. Neves<sup>1</sup>, Luiza A. Rabelo<sup>1\*\*</sup>

1. Laboratório de Reatividade Cardiovascular (ICBS-UFAL)/\*\* Orientadora
2. Faculdade de Medicina (FAMED-UFAL)
3. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (CB-UFPE)

### **Resumo:**

A Síndrome Metabólica (SMet) é um quadro clínico complexo que congrega, além de obesidade corporal e/ou visceral, diversos fatores de risco cardiovasculares e metabólicos. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação dietética hiperlipídica, compatível com a veiculação de candidatos a fármacos e/ou estes, para indução de SMet em camundongos, bem como estudar os efeitos da inibição crônica da enzima catalase. Para tanto, dividiu-se camundongos C57BL/6 machos em 3 grupos: 1) Controle (CT; dieta “chow”; n=6); 2) “high fat” (HFD; n=6); 3) HFD suplementada com o inibidor da catalase 3-amino-triazole (ATZ) na dose de 500mg.kg<sup>-1</sup> (HFD+ATZdieta; n=6). Interessantemente, os animais tratados com o ATZ apresentaram melhoras metabólicas-hepáticas significativas, cita-se: a diminuição do peso corporal, melhora no perfil lipídico plasmático e hepático, diminuições nos lipídios totais, colesterol e triglicerídeos, bem como, cronicamente, a modulação do eixo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Catalase/status REDOX.

**Autorização legal:** CEUA-UFAL (Protocolo # 029/2104).

**Palavras-chave:** Síndrome Metabólica; Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas; Status REDOX.

**Apoio financeiro:** CNPq, INCT-NanoBiofar

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFAL

### **Introdução:**

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) são descritas como um novo componente da Síndrome Metabólica (SMet) (Alberti, Eckel et al. 2009; Jung, Cho et al. 2014). Esta última apresenta-se como um quadro clínico complexo que congrega, além de obesidade corporal e/ou visceral, diversos fatores de risco cardiovasculares e metabólicos (Grundy, Brewer et al. 2004). Nestes, tem-se o diabetes tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, resistência à insulina (RI), hiperinsulinemia (Alberti, Eckel et al. 2009) e, mais recentemente, as DHGNA (Kotronen and Yki-Jarvinen 2008; Byrne and Targher 2014), como indicadores para diagnóstico. Além disso, diversos componentes da SMet, incluindo-se a circunferência da cintura e a deposição de gordura visceral, positivamente, relacionam-se com concentração de lipídios no fígado (Kotronen and Yki-Jarvinen 2008).

No cenário exposto, poucos são os estudos em modelos animais experimentais que correlacionam os efeitos da dieta obesodiabetogênica com o *status* redox hepático. Ademais, o papel da catalase nas DHGNA tem sido investigado. Assim, hipotetiza-se que a elucidação de vias metabólicas na fisiopatologia da SMet, bem como a identificação de novas rotas de sinalização, contribuem para a identificação de possíveis alvos terapêuticos e/ou marcadores que possam ser utilizados futuramente em estudos translacionais.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulação dietética hiperlipídica, compatível com a veiculação de candidatos a fármacos e/ou estes, para indução de SMet em camundongos, bem como estudar os efeitos da inibição crônica da enzima catalase.

### **Metodologia:**

Camundongos machos C57BL/6 (6-8 semanas de idade), foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas com livre

acesso à comida e à água. Após uma semana de aclimação, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: 1) Controle (CT; dieta "chow"); 2) "high fat" (HFD; (58% da carga energética lipídica) e 3) grupo de animais submetido à intervenção dietética com a HFD suplementada com o inibidor da catalase 3-amino-triazole (ATZ) na dose de  $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (HFD+ATZdieta) por 12 semanas de tratamento, iniciado após 8 semanas de intervenção dietética. Nos ensaios *in vivo*, avaliou-se o peso corporal e a gliconeogênese hepática. O peso corporal foi avaliado semanalmente utilizando-se balança semi-analítica ( $0,001\text{ g}$ ; Shimatzu®). Para se avaliar a gliconeogênese hepática, procedeu-se com o teste para o piruvato. Sucintamente, após a restrição alimentar de 16 horas, fez-se a glicemia basal e administrou-se piruvato de sódio (i.p) em dose  $2\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso animal. Após este procedimento, mensurou-se a glicemia nos intervalos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após jejum de 12 horas, verificou-se os níveis de glicose e peso corpóreo de cada animal. Na sequência, estes foram anestesiados e em seguida sacrificados por punção cardíaca.

Quanto aos ensaios *ex vivo*, realizou-se a análise do perfil lipídico plasmático, a avaliação da DHGNA, a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e avaliação da atividade da catalase.

Para as mensurações plasmáticas do colesterol total (CoIT), triglicerídeos (TG) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), utilizou-se "kits" comerciais de acordo com as instruções do fabricante. A avaliação da DHGNA foi realizada pela técnica descrita por Folch e colaboradores (1957). Após extração, quantificou-se os lipídios gravimetricamente. Na sequência, mensurou-se triglicerídeos e colesterol total hepático.

A quantificação das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  plasmáticas e hepáticas foi realizada com base no ensaio da oxidação de ferro em xilenol-orange, com adaptações para microplacas. Mensurou-se a atividade da enzima antioxidante catalase em microplacas (da Fonseca, Nunes-Souza et al. 2014).

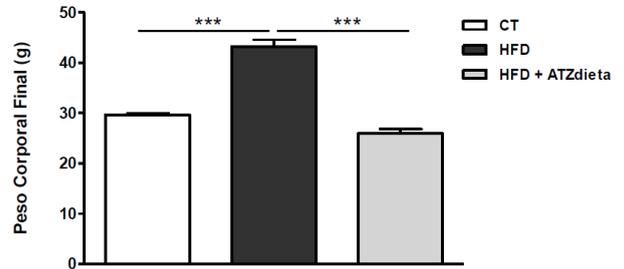
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, utilizou-se ANOVA uma e duas vias, seguidas por testes de *Bonferroni*. Considerados estatisticamente significativos valores  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão:

### Peso Corporal

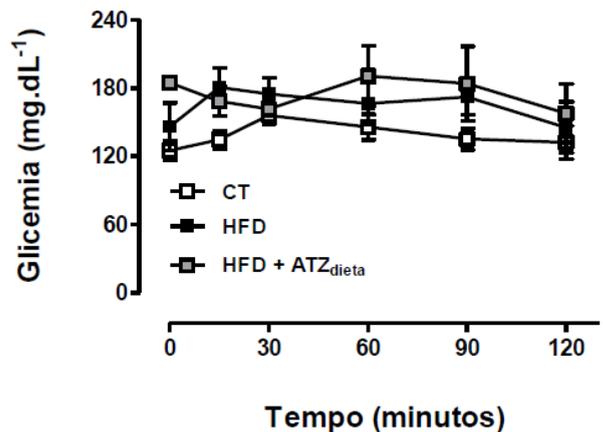
Após 3 semanas de intervenção dietética, observou-se um aumento

significativo ( $p < 0,001$ ) no peso dos camundongos alimentados com dieta HF comparados ao grupo CT. Interessantemente, a administração do ATZ, diminuiu significativamente o peso corporal quando comparados aos animais do grupo HF, ao final do tratamento ( $p < 0,001$ ; Figura 1).



**Figura 1.** Peso corporal ao término do período experimental. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=5-6$ ). ANOVA (uma via), \*\*\*  $p < 0,001$ .

A gliconeogênese hepática não foi diferente entre os grupos (Figura 2).



**Figura 2.** Gliconeogênese em camundongos C57BL/6, após intervenção dietética por 20 semanas. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM ( $n=5-6$ ). ANOVA (duas vias) com pós-teste de *Bonferroni*.

### Perfil lipídico plasmático

A dieta HF induz fenótipo lipídico para a SMet. Observou-se aumento do colesterol total plasmático (Figura 3A) comparado ao CT ( $p < 0,01$ ). Contudo, não se observou alterações significativas de triglicerídeos (Figura 3B) e NEFAs plasmáticos (Figura 3C). Interessantemente, a administração do ATZ foi efetiva em reduzir de forma significativa os triglicerídeos ( $p < 0,001$ ) e NEFAs plasmáticos ( $p < 0,01$ ), (Figuras 3A – C) quando comparados ao grupo HF.

### Perfil lipídico hepático

Associado a avaliação do perfil lipídico plasmático, analisou-se o perfil lipídico hepático, no que corresponde: lipídios totais, colesterol e triglicerídeos hepáticos.

Interessantemente, os níveis de lipídios

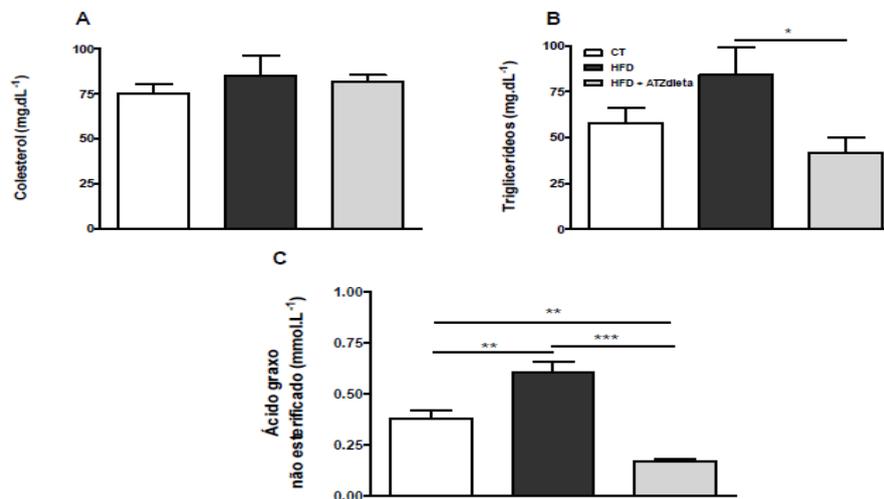
totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos (Figuras 4A - C) se mostraram significativamente aumentados no grupo HF quando comparados ao CT ( $p < 0,001$ ) e seguiram o mesmo padrão decrementar após tratados com ATZ ( $p < 0,001$ ). A partir dos resultados apresentados, suscita-se que o ATZ promoveu diminuição do fluxo de lipídios entre o plasma e o fígado, sem existir aparentes prejuízos funcionais, conforme demonstrado pelo perfil glicêmico do teste de gliconeogênese (Figura 2).

### Quantificação de $H_2O_2$ e avaliação da atividade da catalase

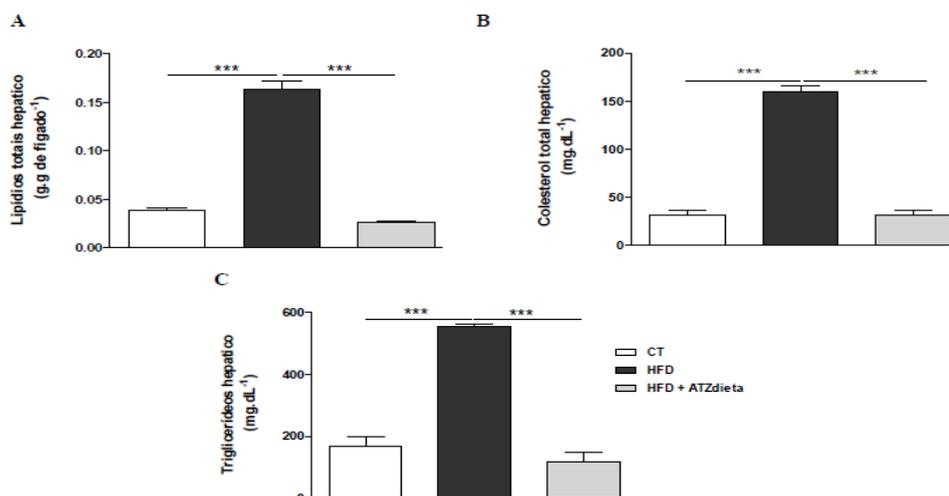
Presente nos peroxissomos, a enzima catalase é central para o sistema de defesa antioxidante (Lei, Zhu et al. 2016), apresentando a função de clivar o excesso de  $H_2O_2$ .

Recentemente, descreveu-se o  $H_2O_2$  na regulação metabólica, ativando vias semelhantemente ao  $\cdot NO$  (Óxido Nítrico), apresentando grande facilidade de difusão membranar através das aquaporinas (Sies 2014).

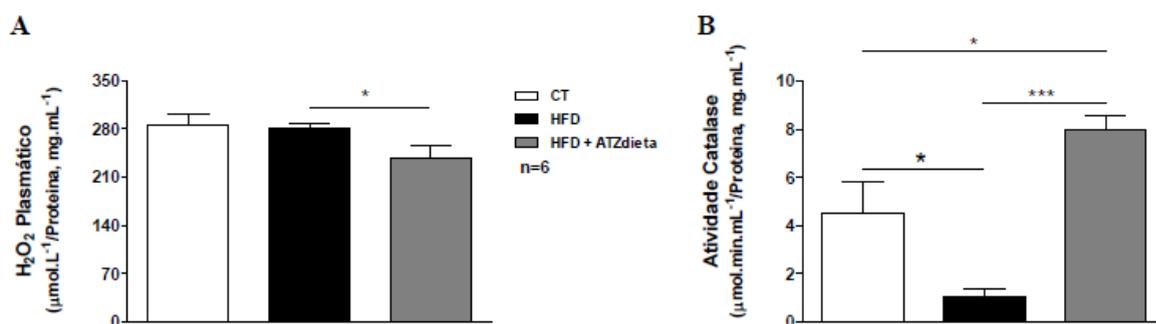
Os dados obtidos para estes dois parâmetros mostram que o ATZ promoveu uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos do substrato para a catalase, o  $H_2O_2$  (Figura 5A). Por outro lado, este tratamento com o inibidor para enzima induziu a uma contrarregulação para um aumento na atividade desta enzima (Figura 5B).



**Figura 3.** Perfil lipídico plasmático. A: Concentração de colesterol total no plasma (mg.dL<sup>-1</sup>). B: Concentração de triglicerídeos no plasma (mg.dL<sup>-1</sup>). C: Concentração de ácidos graxos não esterificados – NEFA no plasma (mmol.L<sup>-1</sup>). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA (uma via); n=5-6; \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



**Figura 4.** Perfil lipídico hepático. A: Lipídeos totais hepáticos (g.g de fígado<sup>-1</sup>). B: Concentração hepática de triglicerídeos (mg.dL<sup>-1</sup>). A: Concentração de colesterol total hepático (mg.dL<sup>-1</sup>). Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via); n=5-6; \*\*\* p <0,001.



**Figura 5** – A: Concentração plasmática de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (μmol.L<sup>-1</sup>). B: Atividade da catalase no plasma (μmol.min.mL<sup>-1</sup>). Os valores são expressos como média ± EPM. ANOVA (uma via); n=5-6; \*p <0,05; \*\*\* p <0,001.

### Conclusões:

Após a intervenção experimental por 12 semanas com o inibidor da enzima catalase, o ATZ, em camundongos C57BL6 com SMet dietética, observou-se que os animais tratados apresentaram melhoras metabólicas-hepáticas significativas: diminuição do peso corporal, melhora no perfil lipídico plasmático e hepático, bem como, cronicamente, a modulação do eixo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Catalase/status REDOX.

### Referências bibliográficas

Alberti, K. G., R. H. Eckel, et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* **120**(16): 1640-1645.

Byrne, C. D. and G. Targher (2014). "Ectopic Fat, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Cardiovascular Disease." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.

Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." *Circulation* **109**(3): 433-438.

Kotronen, A. and H. Yki-Jarvinen (2008). "Fatty

liver: a novel component of the metabolic syndrome." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(1): 27-38.

da Fonseca, L. J., V. Nunes-Souza, et al.(2014). "Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis." *Oxidative medicine and cellular longevity*: 898501.

Lei, X. G., J. H. Zhu, et al. (2016). "Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications." *Physiol Rev* **96**(1): 307-364.

Sies, H. (2014). "Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress." *J Biol Chem* **289**(13): 8735-8741.