

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO NEUROPROTETOR DA METFORMINA
NAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS ASTROCITÁRIAS INDUZIDAS PELO
METILGLIOXAL**

MARIANNE PIRES FLORES

Porto Alegre, dezembro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO NEUROPROTETOR DA METFORMINA
NAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS ASTROCITÁRIAS INDUZIDAS PELO
METILGLIOXAL**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de farmacêutica pelo
curso de Farmácia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.**

MARIANNE PIRES FLORES

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Co-orientador: Dr. Adriana Fernanda K. Vizuet

Porto Alegre, dezembro de 2018.

*“Uma coletânea de pensamentos é
uma farmácia moral onde se
encontram remédios para todos os
males”*

Voltaire

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Valquíria e Claudio, e à minha irmã Gabrielle, que foram essenciais e fundamentais para que a minha trajetória acadêmica acontecesse da maneira mais leve possível. Obrigada pelo apoio incondicional, pela força nos momentos mais difíceis e pela compreensão ao longo de todos esses anos. Sem vocês nada disso teria acontecido.

Agradeço às minhas amigas da Universidade Federal de Pernambuco, que estiveram comigo no início de tudo, me ajudaram a entrar no ritmo da faculdade, compartilharam dias de semana e finais de semana de muito estudo e se fizeram presente ao longo de toda a graduação mesmo à distância. Valeu pela amizade desde 2011, vocês me deram muita força nessa jornada.

Agradeço às amigas que fiz aqui na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que me ajudaram diariamente. Vocês fizeram a diferença na minha graduação, sem a presença de vocês tudo teria sido mais difícil. Obrigada por alegrarem meus dias ao longo desses 5 anos, vibrarem comigo nos bons momentos e me ajudarem nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador do TCC, Prof^o Carlos Alberto S. Gonçalves, por ter me cedido o local para realização dos experimentos e por toda a atenção que me deu ao longo do semestre. Muito obrigada pela oportunidade.

Agradeço as excelentes profissionais, Prof^a Fernanda Hansen e Dr^a Adriana Fernanda K. Vizuete, minha co-orientadora, que tornaram este trabalho menos exaustivo. Obrigada pela ajuda durante a elaboração, pela paciência, por todo o ensinamento, pelas horas e horas de explicações e por estarem sempre atentas aos meus chamados. Contribuíram muito para a minha formação. Vocês são profissionais excelentes e se tornaram um exemplo para mim.

Por fim, aos demais amigos e familiares que estiveram comigo durante esta caminhada, meu mais sincero obrigada.

RESUMO

Diabetes *mellitus* (DM), caracterizada como uma doença metabólica que afeta o nível de glicose no sangue, o metabolismo lipídico e proteico, se encontra na lista de doenças consideradas epidemias deste século e conta com a metformina (Met) como tratamento de primeira escolha. O excesso de glicose intracelular sobrecarrega a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e desencadeia distúrbios na via glicolítica, o que leva a síntese de metilglioxal (MG), que através do processo de glicação forma *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). O MG sofre ação do sistema glioxalase, uma via metabólica que o detoxifica e conta com a enzima glioxalase 1 (GLO1). Dentre as células do tecido cerebral encontram-se os astrócitos, responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo e pela síntese de glutamato e glutatona (GSH). O glutamato é o neurotransmissor excitatório majoritário no sistema nervoso central (SNC) e a GSH funciona no processo de detoxificação celular. Com isso, distúrbios no metabolismo de GSH e toxicidade do glutamato estão associados às doenças neurológicas, como Doença de Alzheimer (DA).

Para avaliar o efeito da metformina foram utilizadas fatias hipocámpais de 20 ratos Wistar machos, com 30 dias de idade e foram realizados os ensaios de: atividade GLO1, integridade e viabilidade celular, conteúdo de GSH e de DCF, captação de glutamato, atividade da enzima glutamina sintetase (GS), medida de S100B, dosagem de proteína e análise estatística.

Nos tratamentos com MG e MG co-incubado com Met não foram observadas alterações na redução de MTT, na oxidação de DCF e na atividade da GS. O tratamento com MG aumentou a atividade da enzima GLO1 e esse aumento se manteve no tratamento concomitante com Met. O MG diminuiu a secreção de S100B e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), e essa diminuição se manteve quando o tratamento foi concomitante com Met. Foi observada diminuição na captação de glutamato na presença de MG e a Met foi capaz de reverter esse resultado. Em relação ao conteúdo de GSH, na presença de MG houve aumento e a Met foi capaz de reverter essa elevação.

Neste estudo não foi possível identificar com clareza o motivo do MG diminuir a captação de glutamato, sendo necessários mais experimentos para esclarecimentos maiores.

Palavras chave: Diabetes *mellitus*. Metilglioxal. Glutamato. Astrócitos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do MG e da Met na viabilidade celular, na integridade celular e na formação de EROs.....	17
Figura 2. Efeito do MG e da Met no metabolismo astrocitário.....	19
Figura 3. Representação esquemática do sistema glioxalases.....	19
Figura 4. Efeito do MG e da Met na secreção de S100B.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct.</i>
DA	Doença de Alzheimer
DCF	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DM	Diabetes mellitus
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCL	Glutamato cisteínaligase
GLO1	Glioxalase 1
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona
LDH	Lactato desidrogenase
Met	Metformina
MG	Metilglioxal
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 MATERIAIS	12
3.2 ANIMAIS	12
3.3 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE HIPOCAMPO	12
3.4 ENSAIO DE ATIVIDADE GLO1	13
3.5 ENSAIO DE INTEGRIDADE CELULAR	13
3.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	13
3.7 ENSAIO DE CONTEÚDO DE GLUTATIONA	13
3.8 CONTEÚDO DE DCF	14
3.9 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	14
3.10 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE	14
3.11 MEDIDA DE S100B	15
3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNA	15
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 EFEITO DA MET SOBRE O MG	15
4.2 EFEITO DO MG E DA MET NA VIABILIDADE CELULAR, NA INTEGRIDADE CELULAR E NA FORMAÇÃO DE EROS EM FATIAS HIPOCAMPAIS	16
4.3 EFEITO DO MG E DA MET NA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO, NA SÍNTESE DE GSH E NA ATIVIDADE DA GLO1 EM FATIAS HIPOCAMPAIS	17
4.4 EFEITO DO MG E DA MET NA SECREÇÃO DE S100B	20
5. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença caracterizada por altos níveis de glicose no sangue e alterações no metabolismo lipídico e proteico. Quando a quantidade de glicose no sangue aumenta, ocorre liberação do hormônio insulina, proveniente do pâncreas. A insulina estimula as células musculares e gordurosas a remover a glicose do sangue, e estimula o fígado a metabolizá-la, fazendo com que os níveis de glicose no sangue diminuam para níveis normais. Em pessoas portadoras de DM, os níveis de glicose no sangue permanecem altos. Isso porque a insulina não está sendo produzida, ou está sendo produzida em níveis insuficientes e/ou devido à resistência na sua ação. [1,2]

As formas mais comuns são o DM tipo 1, caracterizado por um distúrbio autoimune, e o DM tipo 2, que está associado ao estilo de vida atual, marcado por inatividade física e hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal. Considerada uma das grandes epidemias mundiais do século XXI (cerca de 240 milhões de pessoas eram portadoras da doença em 2005 e há projeção para este número subir para 366 milhões em 2030), o DM tipo 2 é visto como um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como em países que estão em desenvolvimento. [1,2,16]

O excesso intracelular de glicose pode resultar em fluxo aumentado da via poliol com aumento de sorbitol e frutose decorrente da maior atividade das enzimas aldose redutase (AR) e sorbitol desidrogenase. A glicólise excessiva sobrecarrega a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, gera espécies reativas de oxigênio (EROs), reduz os níveis de NADPH e, consequentemente, aumenta o estresse oxidativo. O excesso de EROs induz alterações intracelulares no retículo endoplasmático e no DNA. Glicose elevada também aumenta os níveis de metilglioxal, através das reações de Maillard, que produzem *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). [9,12]

Com a geração de AGEs ocorre a ativação de monócitos, células endoteliais, aumento de citocinas, moléculas de adesão intracelular (ICAM, *Intra celular adhesion molecules*) e fatores vasculares danificando a função biológica das proteínas. A ligação de AGE com o receptor extracelular (RAGE) inicia uma cascata de efeitos inflamatórios através da NADPH oxidases, o que provoca mais estresse oxidativo. Os AGEs interagem com receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*) e com RAGE, ativando o fator de transcrição NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α . [9,12,16]

Sabe-se que o tecido cerebral é altamente dependente de glicose como fonte energética e também para a síntese de glutamato e glutatona (GSH). Glutamato, o principal

neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC), está envolvido na maioria das funções cerebrais, no entanto, a concentração de glutamato na fenda sináptica é variável e pode atuar como uma excitotóxina quando seus receptores são superestimulados. A GSH é uma substância essencial nos processos de detoxicação celular porque é doadora de elétrons na redução de peróxidos, catalisada pela GSH peroxidase, e reage com carbonilas reativas do metilglioxal endógeno e formaldeído formando intermediários que são substratos de enzimas detoxificantes. Devido a esta dependência nos processos celulares, os distúrbios do metabolismo de GSH estão associados a doenças neurológicas, tais como a Doença de Alzheimer (DA). Esta patologia também pode ser associada à toxicidade do glutamato. [10,14,16,23]

Na fisiopatologia do DM, ocorre elevação de glicose no tecido neurológico, o que pode levar ao aumento da via glicolítica e aumentar os níveis de metilglioxal (MG), pois é principalmente através desta via que este composto dicarbonil reativo é produzido, a partir da degradação dos intermediários glicolíticos dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. O MG é responsável pela formação de AGEs a partir de reações de glicação em proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Os AGEs causam disfunção das proteínas afetadas que se ligam ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), desencadeando a formação de EROs e apoptose. [9,24]

Sabendo disso, o sistema glioxalase, uma via metabólica que conta com a enzima glioxalase 1 (GLO1) e é responsável pelo processo de detoxificação dos α -oxoaldeídos, particularmente do MG. É o sistema que mantém as concentrações de MG sob controle, impedindo a formação de AGEs. [3,4]

Tradicionalmente os astrócitos possuem a função de regular e otimizar o ambiente no qual os neurônios atuam. Sendo assim, é responsabilidade dos astrócitos manter um controle rigoroso da homeostase dos íons e do pH, distribuir glicose e fornecer substratos metabólicos aos neurônios. Além disso, os astrócitos têm a função de expressar e secretar a proteína de origem predominantemente astrogliar, a S100B, a qual possui diversos alvos intracelulares e está envolvida na regulação, proliferação, diferenciação e plasticidade do citoesqueleto, e também tem um efeito neurotrófico sobre os neurônios, protegendo contra excitotoxicidade, estresse oxidativo, toxicidade de β -amilóide e modulando a neurotransmissão. [3,5,6]

Outra atividade dos astrócitos consiste em regular os níveis de neurotransmissores liberados durante a transmissão sináptica, que são removidos da fenda sináptica através da ação de transportadores astrocitários, além disso os astrócitos desempenham um papel de defesa contra o estresse oxidativo. Essa defesa se dá mediante a captação de glutamato, síntese e

liberação de GSH. Com isso, entende-se que os astrócitos são células multifuncionais essenciais para a sobrevivência dos neurônios permitindo que os mesmos se tornem progressivamente especializados nas tarefas de processamento, codificação e transferência de informações. [7,17,23]

Embora os astrócitos tenham um sistema de glioxalase mais desenvolvido que os neurônios, tem sido sugerido que os astrócitos que apresentam aumento dos níveis de glicose (característica presente em portadores de DM), e conseqüente aumento dos níveis de MG, tem comprometimento de suas funções devido a toxicidade celular causada pelo MG e produtos por ele produzidos, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, com acúmulo de AGEs nos neurônios e placas amiloides. [8,9,10,11,12]

Um dos tratamentos do DM2 é a utilização da metformina (1,1-dimetilbiguanida) (Met), fruto de estudos dos efeitos da *Galega officinalis*, tendo seu uso relatado desde a Idade Média para o tratamento da poliúria do diabetes. A Met é um derivado de biguanida, que atua como sensibilizador de insulina, recomendado em todos os estágios da terapia, em monoterapia e em combinação com outras drogas hipoglicemiantes orais e insulina. A Met exerce potente atividade anti-hiperglicêmica aumentando a captação de glicose e diminuindo a gliconeogênese hepática. Estudos recentes mostraram que a Met possui várias funções biológicas além de seus efeitos antidiabéticos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores que podem estender suas indicações clínicas. Nas células endoteliais, a Met reduz os níveis de EROs intracelular através da via AMPK-FoxO3a. [18,19,20]

Está bem estabelecido que esta droga ultrapassa a barreira hematoencefálica e se distribui no SNC, além de apresentar grande eficiência e toxicidade baixa, com poucos efeitos adversos que se delimitam praticamente ao início do tratamento, o que o coloca, no Brasil, na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. [19,21,22]

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o possível efeito neuroprotetor da metformina nas alterações neuroquímicas astrocíticas induzidas pelo metilglioxal em fatias de hipocampo aguda de ratos *Wistar*.

2.2. Objetivos específicos

Investigar o metabolismo astrocítico em fatias mediante exposição aguda ao metilglioxal e à metformina.

Analisar a integridade e a viabilidade celular em fatias mediante exposição aguda ao metilglioxal e à metformina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais: Metilglioxal (MG), brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT), glutationa (GSH), ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-L-etanossulfônico (HEPES) e materiais para preparação de fatias hipocámpais aguda da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). Outros reagentes foram comprados de fornecedores locais (Porto Alegre, RS, Brasil).

3.2 Animais: Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade da colônia de reprodução (Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil). Os animais foram mantidos sob luz controlada e condições ambientais (ciclo de 12 h de luz/12 h de escuro a uma temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e tiveram livre acesso a comida comercial e água. Este estudo foi realizado de acordo com as Diretrizes Institucionais para o Cuidado e Uso de Animais e o *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC), que aprovou os procedimentos realizados neste trabalho (aprovação número 34321).

3.3 Obtenção de amostras de hipocampo: Os animais foram decapitados e, em seguida, os cérebros foram removidos e colocados em tampão HEPES salina gelado com a seguinte composição (em mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄, 10 de glicose e pH 7,4. O hipocampo foi dissecado e fatias transversais de 0,3 mm foram obtidas a partir de um picador de tecidos McIlwain. As fatias foram transferidas imediatamente para placas de cultura de 24 poços para estabilização por 120 minutos, em temperatura ambiente. Após, o meio de incubação foi trocado para a realização dos tratamentos em triplicatas por 1

hora à 37°C. Os grupos de tratamentos foram: 1) Basal; 2) MG (metilglioal, 500 µM); 3) Met (Metformina 500 µM); 4)MG + Met (metilglioal, 500 µM + Metformina 500 µM). Após tratamento, foi mensurado captação de glutamato, secreção de S100B, atividade da glutamina sintetase e glioalase 1, conteúdo de GSH e DCF, e viabilidade e integridade celular.

3.4 Ensaio de atividade GLO1: Fatias foram lisadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Posteriormente, as fatias foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para atividade enzimática e medida do conteúdo proteico. A atividade do GLO1 foi testada de acordo com [13] com algumas modificações. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços usando um espectrofotômetro de microplacas (UV Star-Greiner). A mistura reacional (200 µL / poço) continha tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2, 2 mM MG e 1 mM GSH (pré-incubado por 30 min em temperatura ambiente). A proteína da amostra (10-20 µg por poço) foi adicionada ao tampão. A formação de S- (D) - lactoilglutaciona foi linear e monitorizada a 240 nm durante 15 min a 30 ° C. Uma unidade de atividade de GLO1 é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de S-(D)-lactoilglutaciona por minuto. A atividade específica foi calculada em miliunidades por miligrama de proteína (mU / mg de proteína).

3.5 Ensaio de integridade celular: A atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação foi determinada por um kit comercial colorimétrico (K014, Bioclin, Brasil), de acordo com a instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como porcentagens do controle.

3.6 Ensaio de viabilidade celular: As fatias hipocampais foram incubadas com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 0,05 mg/mL à 37°C. Em seguida, o meio de incubação foi removido e os cristais formados foram dissolvidos em DMSO. Os valores de absorbância foram medidos em dois comprimentos de onda, 560 e 650 nm e o cálculo foi realizado subtraindo o valor de absorbância lido em 650 nm do valor obtido em 560 nm. [29] Os resultados foram expressos como porcentagens do controle.

3.7 Ensaio de conteúdo de glutaciona: Os níveis intracelulares de GSH (nmol / mg proteína) foram medidos como descrito anteriormente (Browne e Armstrong 1998). Este ensaio detecta apenas o teor reduzido de glutaciona. Fatias foram diluídas em dez volumes de tampão fosfato de sódio 10mM, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA e a proteína foi precipitada com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante foi testado com oftaldialdeído (1mg/mL de metanol) à temperatura ambiente durante 15 min. A fluorescência foi medida usando comprimentos de

onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi empregada usando soluções padrão de GSH (0 a 500 μ M). As concentrações de GSH foram expressas em pmol/mg proteína.

3.8 Conteúdo de DCF: A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi detectada por composto 2',7'-diclorofluoresceíndiacetato (DCF-DA). DCF-DA é hidrolisado por esterases intracelulares e depois oxidado por EROS a um composto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). As fatias foram tratadas com DCF-DA (10 μ M) por 30 min em 37°C. Após a exposição ao DCF-DA, as fatias foram lisadas em PBS com Triton X-100 a 0,2%. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectra Max Gemini XPS, MolecularDevices, USA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. Todos os procedimentos foram realizados no escuro (Quincozes-Santos et al. 2010,2014). O conteúdo de DCF foi expresso em U.A./mg de proteína.

3.9 Ensaio de captação de glutamato: A captação de glutamato foi realizada conforme descrito anteriormente. As fatias foram incubadas a 37°C em Hank's balanced salt solution (HBSS). O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1 mM de l-glutamato e 0,66 μ Ci / mL de L-[2,3-3H] glutamato. A incubação foi parada após 5 min, quando o meio foi removido e as fatias foram lavadas duas vezes com HBSS gelado. As fatias foram então lisadas numa solução de NaOH a 0,5 M. A captação independente de sódio foi determinada utilizando N-metil-d-glucamina em vez de NaCl. A captação de glutamato dependente de sódio foi obtida pela subtração da captação inespecífica da captação total para obter a captação específica. A radioatividade foi medida em um centilador. Os resultados foram calculados em mmol/mg proteína/min.

3.10 Ensaio da atividade da enzima glutamina sintetase: O ensaio enzimático para a atividade da glutamina sintetase (GS) foi realizado seguindo protocolo prévio com modificações. Resumidamente, fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 50 mM de tampão de imidazol. Os homogenatos então, foram incubados com (mM): 50 imidazol, 50 de hidroxilamina, 100 de L-glutamina, 25 arseniato de sódio dibásicohepta-hidratado, 0,2 ADP, cloreto de manganês 2, pH 6,2 durante 15 min a 37 ° C. As reações foram terminadas pela adição de 0,2 ml de FeCl₃ 0,37M, 200 mM ácido tricloroacético e 670 mM HCl. Após centrifugação foi medido a absorvância do sobrenadante a 530nm. Os valores foram calculados a partir de curva padrão (0,1 a 10 mmol / mL) de ácido γ -glutamylhydroxamato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA). A atividade de GS foi expressa em pmol/h/mg.

3.11 Medida de S100B: S100B foi medido por um ensaio imunoenzimático, como descrito anteriormente. Resumidamente, 50 µL de amostra e 50 µL de tampão Tris foram incubados por 2 horas em uma placa de microtitulação previamente revestida com anticorpo monoclonal anti-S100B (SH-B1). O anticorpo policlonal anti-S100 foi incubado durante 30 min, e depois foi adicionado anticorpo anti-rabbit conjugado com peroxidase por mais 30 min. Uma reação colorimétrica com o-fenilenediamina (OPD) foi medida a 492 nm. A curva padrão S100B variou de 0,002 a 1 ng. Os dados foram calculados como ng/mL.

3.12 Dosagem de proteína: A proteína do homogenato de tecido foi mensurada através do método de Lowry modificado, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.13 Análise estatística: Os dados estão mostrados como média \pm erro padrão médio (EPM) e foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas em GraphPadSPSS IBM versão 20.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da Met sobre o MG

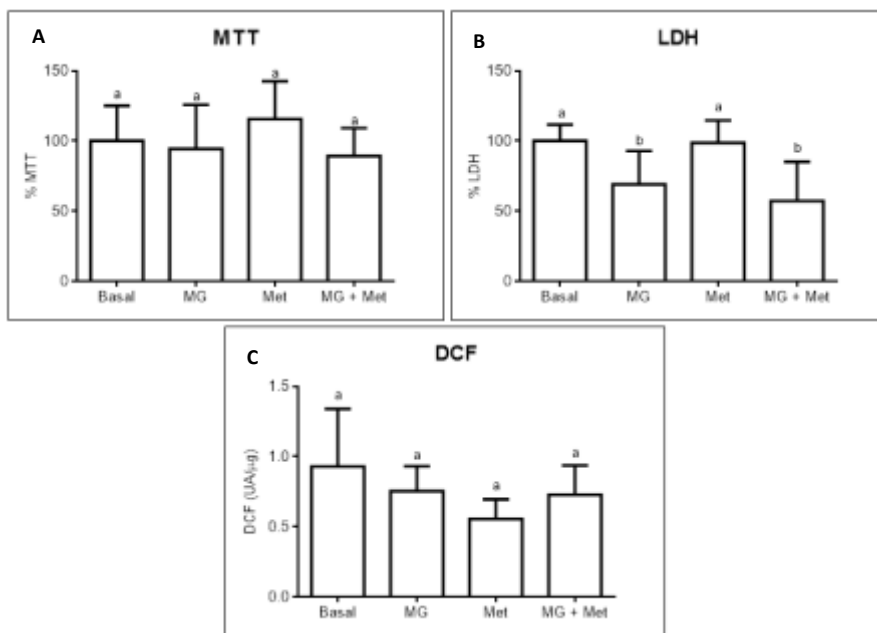
A Met vem sendo estudada como uma droga com efeito de detoxificar o MG excessivo encontrado no organismo de pacientes com DM. Uma teoria já avaliada é a da reação da Met com MG para formar alguns compostos como hidroimidazolona e triazepinona, no entanto a reação avaliada não é satisfatória, sendo controverso o efeito da Met na diminuição das taxas de MG. Acredita-se que, em vez da Met, a própria resistência à insulina em pacientes diabéticos possa ser responsável pelo decaimento dos níveis séricos deste composto. Outras linhas de pesquisa levam em consideração o potencial anti-glicante da Met devido a sua estrutura semelhante à aminoguanidina (sabidamente uma eliminadora de MG), a qual possibilita a reação que gera inatividade de compostos dicarbonil como MG. Resultados que demonstram diminuição de níveis plasmáticos de MG em pacientes que faziam uso de altas doses de Met em comparação a pacientes que não utilizavam esta droga como tratamento, podem abrir espaço para a confirmação desse potencial anti-glicante. [30,31,32]

4.2 Efeito do MG e da Met na viabilidade celular, na integridade celular e na formação de EROs em fatias hipocâmpais

Fatias hipocâmpais foram expostas à 500 μM de MG e à co-incubação desta substância com 500 μM de Met a fim de avaliar se os tratamentos realizados eram capazes de alterar a viabilidade e a integridade celular, além da análise do efeito protetor da Met sobre as EROs. A viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios de redução de MTT e a integridade celular foi analisada através da atividade da LDH extracelular. Não se observou diferença significativa na viabilidade celular (Figura 1A, $P = 0,4402$; $F = 0,9494$) tanto com MG quanto com a co-incubação deste com Met. A Met não foi capaz de reverter a redução da atividade de LDH induzida por MG (Figura 1B, $P = 0,0001$; $F = 9,494$), ou seja, não houve atividade anti-glicante da Met quando comparada ao grupo exposto somente ao MG. Cabe ressaltar que os níveis de LDH extracelular são relacionados com alteração da permeabilidade de membrana celular. MG *per se* não altera a integridade da membrana, mas sim diminui a atividade da enzima e isso se dá possivelmente por glicação da mesma.

O mesmo foi observado na formação de EROs (Figura 1C, $P = 0,2619$; $F = 1,484$), não houve alterações no conteúdo de espécies oxidantes em todos os tratamentos. Um estudo anterior já havia encontrado resultados inalterados na oxidação de DCF quando exposto ao MG. [29]

Figura 1. Efeito do MG (500 μ M) e da Met (500 μ M), após uma hora de incubação dos tratamentos, na viabilidade celular, na integridade celular e na formação de EROs em fatias hipocâmpais. Os tratamentos foram realizados em triplicata, os dados estão mostrados como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.



4.3 Efeito do MG e da Met na captação de glutamato, na síntese de GSH e na atividade da GLO1 em fatias hipocâmpais

A síntese de GSH é formada e regulada por aminoácidos e conta com duas enzimas dependentes de ATP, são elas: a glutatona sintetase (GS) e a glutamato cisteína ligase (GCL), enzima limitante da síntese e responsável pelo feedback negativo na produção de GSH. A GS é responsável por adicionar glicina a γ -glutamilcisteína criada pela GCL para formar a GSH e sua regulação é menos conhecida. Estudos recentes demonstraram aumento da síntese de GSH com a elevação dos níveis de glicose. Sabendo destes resultados e tendo conhecimento que o aumento da via glicolítica acarreta elevação dos níveis de MG podemos, então, sugerir que os níveis elevados de MG podem ser o fator que interfere no conteúdo de GSH. [33,34]

No presente trabalho os níveis de GSH aumentaram na presença de MG (Fig. 3A, $P = 0,0005$; $F = 9,137$) e houve reversão dos níveis de GSH quando o MG foi co-incubado com a

Met, resultado previsto, visto que, a co-incubação com Met preveniu a alteração induzida pelo MG na captação de glutamato em fatias (Fig. 3B, $P < 0,0001$; $F = 16,74$) e com a reversão da captação de glutamato existe mais substrato para a síntese de GSH. Nos resultados também pode ser observado que a Met *per se* aumentou a captação de glutamato, mas o mecanismo envolvido neste processo é desconhecido.

Este aumento *per se* também foi observado em um estudo que buscou entender o papel da guanosina na neuroproteção do SNC. O aumento encontrado no estudo em questão se deu de forma dependente da concentração de guanosina, sugerindo assim que existe um possível mecanismo de ação protetora desta molécula mediante a excitotoxicidade do glutamato. [37,38]

Com isso, a reversão na captação de glutamato desencadeada pela presença de Met encontrada no presente estudo, indica que essas alterações são, em parte mediadas pela glicação dos transportadores glutamatérgicos. Pode ser levado em consideração que exista outro mecanismo para essa neuroproteção e este se apresenta como uma via de compensação celular que, ao notar a diminuição de glutamato intracelular, desencadeia um sistema de compensação ligado a interferência do MG no sistema de glioxalases (Figura 3), o qual a GLO1 faz parte e é o sistema responsável pela detoxificação de MG. Foi observado que esta enzima apresentou aumento no tratamento com MG (Fig. 2C, $P = 0,0394$; $F = 3,643$), resultado esperado devido ao aumento da demanda de detoxificação e este aumento se manteve quando o tratamento foi concomitante com Met, o que pode ser explicado porque a Met não foi eficaz na eliminação de MG e com isso a demanda do sistema de glioxalases, e em consequência maior necessidade de atividade da GLO1, foi aumentada.

Alguns estudos demonstraram que, com o aumento na concentração de MG, ocorre aumento significativo da atividade da GLO1. Estes estudos observaram redução na captação de glutamato quando houve um aumento dos níveis de MG, mas a aminoguanidina, outro fármaco anti-glicante, não foi capaz de reverter este quadro [17,33]. A atividade da enzima GS (Fig. 2D, $P = 0,4053$; $F = 1,04$) se manteve em todos os tratamentos, pois a regulação desta enzima não foi bem elucidada ainda.

Figura 2. Efeito do MG (500 μ M) e da Met (500 μ M), após uma hora de incubação dos tratamentos, no metabolismo astrocitário. Foram analisados o conteúdo de GSH, a captação de glutamato, a atividade da GLO1 e a atividade da GS. Os tratamentos foram realizados em triplicata, os dados estão mostrados como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

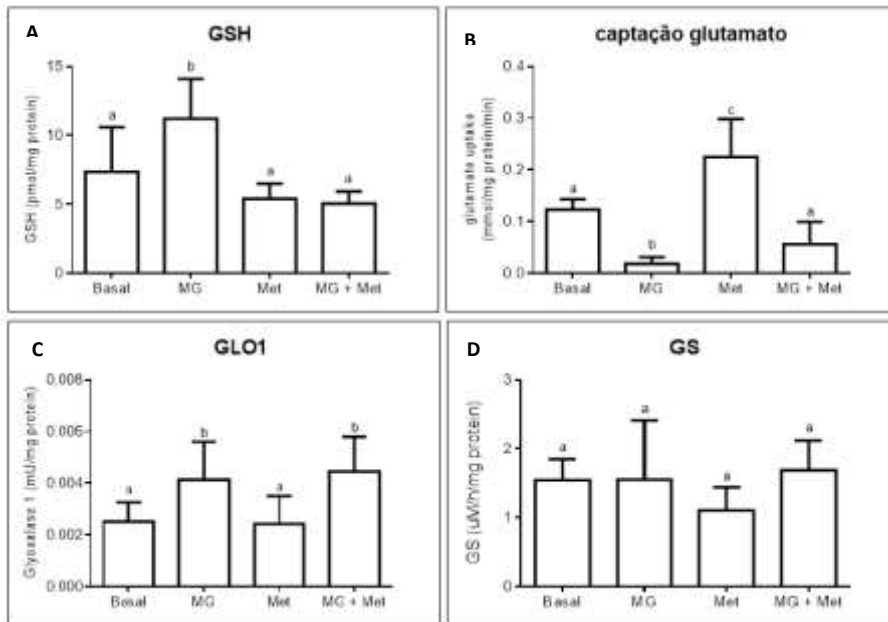
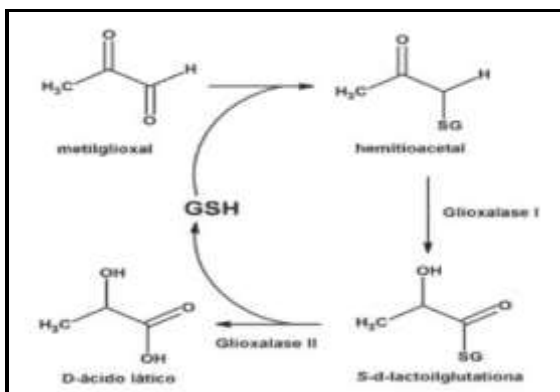


Figura 3. Sistema de glioxalases, descoberto em 1913, cujo papel é a regulação dos níveis de metilglioxal através da detoxificação do mesmo por meio da produção de lactato, utilizando glutatona como reagente. Este sistema tem como enzimas reguladoras a glioxalase 1 e a glioxalase 2.



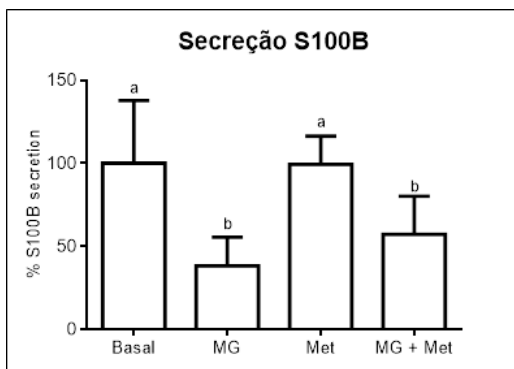
Fonte: Sartori (2010)

4.4 Efeito do MG e da Met na secreção de S100B

A S100B é uma proteína sintetizada e secretada pelos astrócitos, que tem relação com dano cerebral, podendo ser usada como um marcador da ativação glial em algumas situações. Alguns estudos anteriores já demonstraram que altos níveis de glutamato extracelular são capazes de gerar alterações caracterizadas pela diminuição da secreção desta proteína, no entanto, os mesmos estudos demonstraram que altos níveis de glicose não foram capazes de gerar alterações significativas na secreção desta proteína. In vitro, S100B pode ter efeito trófico ou apoptótico sobre os neurônios [29,35,36].

Neste estudo a secreção de S100B foi diminuída com a presença de MG e essa diminuição se manteve no tratamento concomitante com Met (Fig. 5, $P < 0,0001$; $F = 11,8$), portanto, pode ser levado em consideração que a S100B estava atuando de forma trófica e essa diminuição surgiu devido ao dano causado pelo MG. Outro ponto de vista seria que o dano glial criado pela presença do MG não conseguiu ser revertido pela Met, o que pode ser explicado pelo pouco tempo de exposição da droga sobre as células hipocâmpais.

Figura 4. Efeito do MG (500 μM) e da Met (500 μM), após uma hora de incubação dos tratamentos, na secreção de S100B. Os tratamentos foram realizados em triplicata e dados estão representados como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.



5. CONCLUSÃO

MG é um dos principais metabólitos produzidos durante o desequilíbrio da glicose no DM. Podemos observar que em fatias hipocampais agudas, o MG promoveu alterações na atividade astrocitária, diminuindo a captação de glutamato e a secreção de S100B, e elevando a atividade da GLO1 e o conteúdo de GSH. O fármaco Met foi capaz de reverter alguns desses efeitos, como a captação de glutamato e conteúdo de GSH.

Uma redução na secreção de S100B e alterações na atividade glutamatérgica podem ser mecanismos envolvidos na toxicidade astrocitária e podem contribuir para o dano cerebral observado em pacientes com DM. A avaliação de citocinas pró-inflamatórias pode trazer respostas em relação a esta possível toxicidade da proteína S100B.

No presente estudo não foi possível identificar com clareza o motivo do MG diminuir a captação de glutamato, com isso fica aberta a oportunidade de uma linha de pesquisa para investigar a utilização concomitante de MG e um ativador dos transportadores glutamatérgicos EAAT-2 como o GT949 e, assim como, analisar a ação da Met, que aumenta a captação de glutamato, com um inibidor dos transportadores glutamatérgicos EAAT-2, o DL-TBOA.

REFERÊNCIAS

- 1 –HANSEN, F. **Efeitos do Metilglioxal em parâmetros comportamentais e neuroquímicos in vitro e ex vivo**. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015, 78p.
- 2 - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/>>. Acesso em: 7 ago. 2018.
- 3 – GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M.; RANSOM, B. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. **Trends in Neurosciences**, Nova Iorque, Estados Unidos, v. 26, n. 10, p.523-530. out, 2003.
- 4 – AMICARELLI, F. *et al.* Methylglyoxal causes strong weakening og detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, L'Aquila, Itália, n. 40, p. 245-257. ago, 2008.
- 5 – KIELIAN, T. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. **Journal of neurochemistry**, Arkansas, Estados Unidos, n. 106, p. 1000-1016. abr, 2008.
- 7 –MELDOLESI, J. ; VOLTERRA, A. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature**, Milão, Itália, v. 6, p. 626-640. ago, 2005.
- 8 - FULLER, S. ; MUNCH, G. ; STEELE, M. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease - Do they neglect their neurosupportive roles? **Mutation Research**, v. 690. set, 2010. 10p.
- 9 – ARENDT, T. *et al.* Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation endproductsin intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. **Cerebral Cortex** , v. 15, p. 211-220. jul, 2005.
- 10 –ALLAMAN, I. *et al.* Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. **The Journal of Neuroscience**, Lausanne, Suíça, v. 31, p. 18338–18352. dez, 2011.
- 11 - ALLAMAN, I. ; BÉLANGER, M. ; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, Suíça, v. 9. fev, 2015. 12p.
- 12 – NICHOLSON, L. F. B.; SHAIKH, S. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. **Journal of Neuroscience**, Auckland, Nova Zelândia, v. 86, p. 2071–2082. mar, 2008.
- 13 – ARONSSON, A. *et al.* Glyoxalase I (ratliver). **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 297–301. jan, 2004.
- 14 – FRIZZO, M. *et al.* Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. **Mechanisms of Agend and Development**, Porto Alegre, Brasil, v. 125, p. 475-481. mai, 2004.

- 15 – ALMEIDA, L. *et al.* A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, Porto Alegre, Brasil, v. 169, p.93-99. mar, 2008.
- 16 – BIESSELS, G. *et al.* Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurol**, Amsterdam, Holanda, v. 5, p. 64-74. jan,2006.
- 17 – GALLAND, F. *et al.* Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Porto Alegre, Brasil, v. 2017. jun, 2017. 11p.
- 18 – BELTOWSKI, J. *et al.* Metabolic Effects of Metformin in the Failing Heart. **International Journal of Molecular Sciences**, Lublin, Polônia, v. 19. set, 2018. 22p.
- 19 – CHEN, H. *et al.* Metformin Produces Anxiolytic-like Effects in Rats by Facilitating GABA_A Receptor Trafficking to Membrane. **British Journal of Pharmacology**, Wuhan, China, v.176, p. 297-316. out, 2018.
- 20 – HOSKOVÁ, L. *et al.* Pathophysiological Mechanisms of Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity and Arterial Hypertension. **Physiological Research**, Prague, República Tcheca, v. 66, p. 167-180. dez, 2016.
- 21- ALLAHTAVAKOLI, M. *et al.* The effect of the anti-diabetic drug metformin on behavioral manifestations associated with ovariectomy in mice. **Neuroscience Letters**, Rafsanjan, Irã, v. 690, p. 95-98. jan, 2018.
- 22- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Artigos de Revisão Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2010: **Rename 2010**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.
- 23 – GONÇALVES, C.; LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, Porto Alegre, v. 41, p. 755-763. jul, 2008.
- 24 - BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, New York, USA, v. 414, p. 813-820. dez, 2001.
- 25 – BERG, K.; HANSEN, M.; NIELSEN, S. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. **Journal of Immunological Methods**, Copenhagen, Dinamarca, v. 119, p. 203-210. mai, 1989.
- 26 – PETERSON, G. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, Wisconsin, Estados Unidos, v. 83, p. 346- 356. dez, 1977.
- 27 – CYNOBER, L. *et al.* Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clinica Chimica Acta**, Clermont-Ferrand, França, v.268, p. 121-132. dez, 1997.
- 28 – BECHARA, E.; SARTORI, A. Is methylglyoxal an endogenous toxin? **Química Nova**, São Paulo, Brasil, vol.33, p. 2193-2201. out, 2010.

- 29 – BATTÚ, C. *et al.* Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation. **Amino Acids**, Porto Alegre, Brasil, v. 48, p. 375-385. fev, 2016.
- 30 – AHMED, N.; BATTAH, S.; THORNALLEY, P. Kinetics and mechanism of the reaction of metformin with methylglyoxal. **International Congress Series**, Essex, Reino Unido, v. 1245, p. 355-356. nov, 2002.
- 31 - BEISSWENGER, P. *et al.* Metformin Reduces Systemic Methylglyoxal Levels in Type 2 Diabetes. **American Diabetes Association**, New Hampshire, Estados Unidos, v. 48, p. 198-202. jan, 1999.
- 32 – ANUMOL, T. *et al.* Metformin Scavenges Methylglyoxal To Form a Novel Imidazolinone Metabolite in Humans. **Chemical Research in Toxicology**, Arizona, Estados Unidos, v. 29, p. 227-234. fev, 2016.
- 33 – BATASSINI, C. *et al.* Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. **Physiology & Behavior**, Porto Alegre, Brasil, v. 164, p. 93-101. out, 2016.
- 34 - FORMAN, H.; DICKINSON, D. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, Birmingham, Estados Unidos, v. 64, p. 1019-1026. set, 2002.
- 35 – ARCURI, C. *et al.* S100b's double life intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Perugia, Itália, v. 1793, p. 1008- 1022. jun, 2009.
- 36 – FRIZZO, J. *et al.* High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependente on the glutamate transporter. **Neurochemical Research**, Porto Alegre, Brasil, v. 31, p. 815-820. jun, 2006.
- 37 – DAHM, K. *et al.* Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuroreport**, Porto Alegre, Brasil, v. 12, p. 879-881. mar, 2001.
- 38 – FRIZZO, J. *et al.* Guanosine Enhances Glutamate Transport Capacity in Brain Cortical Slices. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Porto Alegre, Brasil, v. 25, p. 913-921. ago, 2005.