

## EFEITOS DO TRICLOSAN SOBRE A PRODUÇÃO DE GLICOSE NO FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO

Heloisa Vialle Pereira Maróstica<sup>1</sup>, Lais Lima Silva<sup>2</sup>, Lívia Bracht<sup>3</sup>, Jurandir Fernando Comar<sup>4</sup>, Adelar Bracht<sup>5</sup>, Anacharis Babeto de Sá Nakanishi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista Capes. helovialle@hotmail.com

<sup>2</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. lf.lima.1008@gmail.com

<sup>3</sup>Professora, Doutora, Departamento de Bioquímica, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. lbracht@uem.br

<sup>4</sup>Professor, Doutor, Departamento de Bioquímica, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. jfcomar@uem.br

<sup>5</sup>Professor, Doutor, Departamento de Bioquímica, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. abracht@uem.br

<sup>6</sup>Orientadora, Doutora, Departamento de Bioquímica, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. absnakanishi@uem.br

### RESUMO

O triclosan (TCS) é um antimicrobiano de alto espectro de ação, amplamente utilizado como antisséptico e conservante, tanto em produtos de higiene pessoal, como produtos de limpeza. O TCS pode afetar vários processos fisiológicos, podendo atuar diretamente sobre as mitocôndrias como um desacoplador do potencial de membrana. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo sistemático sobre os efeitos do TCS sobre vias metabólicas dependentes do ATP. O sistema experimental utilizado foi o fígado de rato em perfusão isolado. Foram avaliados os efeitos de uma curva de concentração de TCS (20 a 100  $\mu$ M) sobre a gliconeogênese, ureagênese e sobre o conteúdo de adenina mononucleotídeos (ATP, ADP e AMP), no fígado de ratos. Os resultados demonstraram que o TCS inibiu de maneira dependente da concentração, a gliconeogênese e a ureagênese, vias estritamente dependentes do ATP gerado na mitocôndria. Além disso, o TCS diminuiu o conteúdo de ATP celular em condições em que a cadeia respiratória mitocondrial era a única fonte desse composto, confirmando o seu potencial desacoplador. Desse modo, os resultados do presente trabalho revelam que o efeito direto do TCS sobre o fígado pode acarretar em animais um quadro de toxicidade caracterizado por hipoglicemia, excesso de amônia e muito provavelmente acidose, devido à reduzida conversão de lactato e piruvato em glicose.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobiano; Desacoplador; Gliconeogênese; Perfusão Hepática; Ureagênese.

## 1 INTRODUÇÃO

O triclosan (5-cloro-2'-(2,4-diclorofenoxi)-fenol) (TCS) é um antimicrobiano bifenólico sintético, com alto espectro de ação. Comumente presente em produtos de higiene pessoal e de higiene hospitalar (NEWTON *et al.*, 2005). O uso constante do TCS ao longo dos últimos 50 anos, permitiu a disseminação descontrolada desta molécula no ambiente como também no corpo humano. De fato, a população mundial está diariamente exposta, de maneira crônica ao TCS, devido à grande utilização de produtos de cuidado pessoal como também por meio do consumo de alimentos e água contaminada com este antimicrobiano (WEATHERLY and GOSSE, 2017).

A atividade antibacteriana do TCS se dá pela inibição da enoil-ACP-redutase, enzima chave da biossíntese de ácidos graxos (MCMURRY *et al.*, 1998). Entretanto, nos últimos anos, tem-se visto que o TCS também pode afetar vários processos fisiológicos em eucariotos, podendo induzir hepatotoxicidade e neurotoxicidade (ZHANG *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019). Trabalhos recentes têm demonstrado que o TCS dissipa o potencial de membrana ( $\Psi$ ) de mitocôndrias isoladas (NEWTON *et al.*, 2005; TEPLOVA *et al.*, 2017) e na presença de substrato doador de elétrons para complexo 2, o TCS pode atuar também como inibidor da cadeia respiratória mitocondrial em concentrações maiores que 10  $\mu$ M.

Nesse sentido, considerando sua interferência sobre a bioenergética mitocondrial, muito provavelmente o TCS possa interferir com o fluxo de vias metabólicas dependentes de energia. Desse modo, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo sistemático dos efeitos diretos do TCS sobre o metabolismo de fígado de ratos em perfusão.

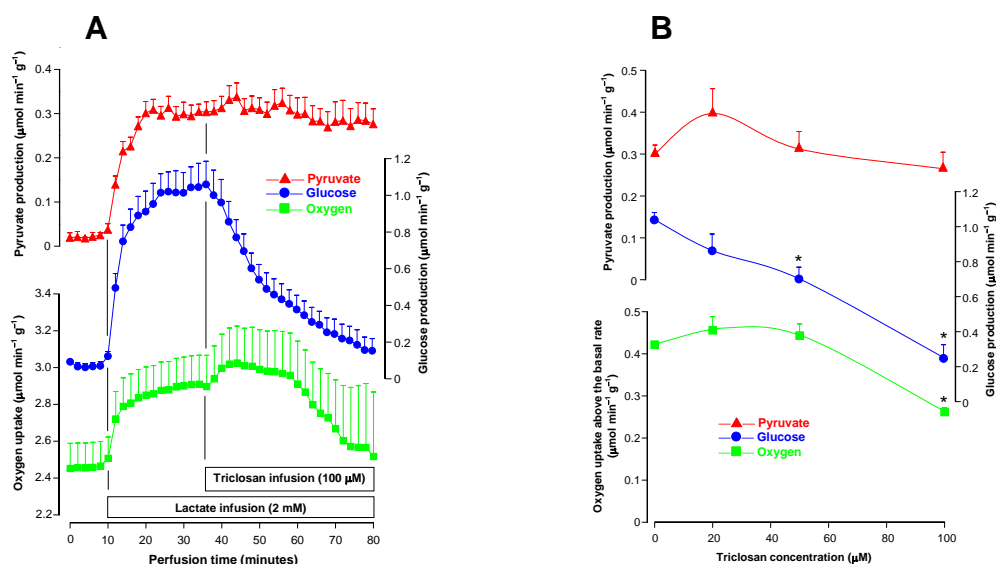
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 240g), em jejum de 18 horas e previamente anestesiados (IP cetamina 90 mg/Kg e xilazina 9 mg/Kg). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Maringá (nº 6416011220).

Foi realizada perfusão não-recirculante, livre de hemoglobina (BRACHT *et al.*, 2003). Após canulação das veias porta e cava, o fígado foi removido e posicionado numa câmara de acrílico. O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit bicarbonato (pH 7,4), saturado com uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono (95:5) e aquecido a 36°C. O fluxo da perfusão foi mantido constante (~30 mL/min). Foram utilizados como substratos gliconeogênicos: lactato (2 mM) e alanina (2,5 mM). As amostras do perfusado efluente foram coletadas de acordo com o protocolo experimental e quantificados o teor de glicose, piruvato lactato, amônia e ureia por meio de dosagens enzimáticas (lactato desidrogenase, glutamato desidrogenase, urease e glicose oxidase) (BERGMAYER and BERNT, 1974). TCS foi infundido em diferentes concentrações (20, 50 e 100 µM). O consumo de oxigênio foi monitorado continuamente com um eletrodo de prata/platina acoplado a um polarógrafo (BRACHT *et al.*, 2003). O conteúdo hepático de mononucleotídeos de adenina (AMP, ADP e ATP) foi determinado por cromatografia de alto desempenho (HPLC) (MITO 2014).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 1A apresenta o protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do TCS sobre a gliconeogênese a partir do lactato.

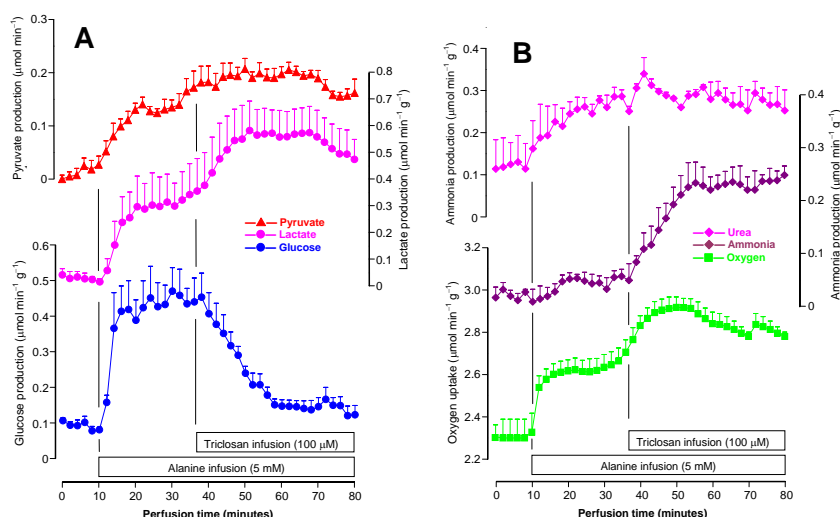


**Figura 1:** Decurso temporal (A) e efeito das concentrações dependente do triclosan sobre a gliconeogênese a partir de lactato em fígado em perfusão e parâmetros relacionados.

Fígados de ratos em jejum de 18h foram perfundidos para minimizar a interferência do catabolismo de glicogênio. Após um período de pré-perfusão de 10 min na ausência de substrato, lactato (2 mM) foi infundido por 26 min, seguido por 34 min adicionais de TCS (100 µM) mais lactato. Como esperado, a infusão de lactato produziu um aumento rápido e sustentado na produção de glicose, captação de oxigênio e produção de piruvato (Fig. 1A). Esses aumentos tenderam a estabilização aos 30 min de perfusão. A infusão de TCS

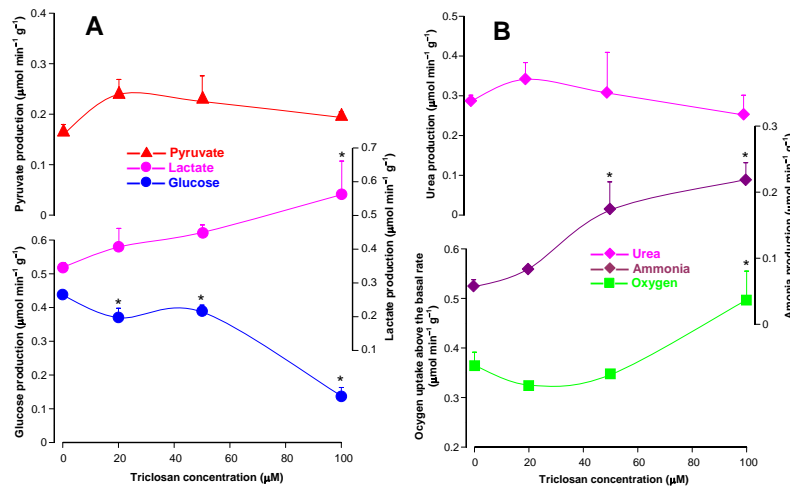
(aos 36 min) causou aumento imediato no consumo de oxigênio atingindo um novo estado estacionário na primeira metade do período de infusão (até o 58 min). Após esse tempo, o consumo de oxigênio foi inibido progressivamente até atingir níveis semelhantes ao estado basal. A gliconeogênese foi completamente inibida pelo TCS. A taxa de diminuição da produção de glicose foi maior na primeira metade do período de infusão de TCS, mas a inibição continuou ao longo do tempo e foi estabilizada mesmo após a interrupção da infusão do TCS. Experimentos como o descrito na Fig. 1A foram realizados com outras concentrações de TCS e estão resumidos na Fig. 1B. O TCS inibiu a produção de glicose de maneira dependente da concentração. A diminuição do consumo de oxigênio ocorreu apenas na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e esta redução foi de 38% em relação ao estado estacionário do lactato (estado estimulado).

Experimentos semelhantes àqueles com lactato como precursor gliconeogênico também foram realizados com alanina na concentração de 2,5 mM. A Fig. 2 mostra a evolução dos seis parâmetros determinados nos experimentos com TCS 100  $\mu\text{M}$ , sendo eles, produção de glicose, lactato, piruvato, amônia, ureia e consumo de oxigênio.



**Figura 2:** Decurso temporal (A) e efeito das concentrações dependente (B) das ações do triclosan na gliconeogênese a partir de alanina em fígado de ratos em perfusão e parâmetros relacionados.

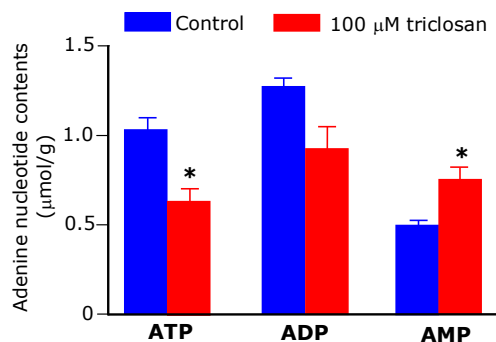
A infusão de alanina aumentou todos os seis parâmetros avaliados. A introdução do TCS (36 min), novamente, aboliu completamente a produção de glicose e a taxa basal foi mantida mesmo após a interrupção do TCS. O consumo de oxigênio, entretanto, aumentou rapidamente na primeira metade da infusão de TCS e, na sequência, tendeu a diminuir levemente, mas ainda manteve 36% maior do que o estado estimulado no final da perfusão. A produção de lactato e de amônia aumentou progressivamente e atingiu um novo estado estacionário com a infusão de TCS. Esses aumentos foram de 63% e 290% respectivamente em relação ao estado estacionário da alanina. De maneira geral, as modificações induzidas pelo TCS foram mantidas após cessar a infusão do mesmo. O mesmo protocolo experimental foi repetido e os efeitos dependentes da concentração estão apresentados na Fig. 3.



**Figura 3:** Efeitos dependentes das concentrações do triclosan sobre o metabolismo da alanina em fígado de ratos em perfusão isolada.

A produção de glicose foi reduzida em aproximadamente 15% para as concentrações de 20 e 50 μM de TCS e foi marcadamente reduzida com 100 μM. Já a produção de lactato e o consumo de oxigênio foram estimulados apenas pela maior concentração (100 μM). A produção de amônia aumentou de forma dependente da concentração a partir de 50 μM de TCS.

Os níveis de mononucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) foram medidos com intuito de avaliar o estado energético do fígado na presença de TCS (100 μM). Estas avaliações foram realizadas no fígado de ratos em jejum na presença de lactato. Os resultados estão demonstrados na Fig. 4. O TCS diminuiu o conteúdo de ATP e ADP. Essas reduções foram de 40% e 27% respectivamente. O conteúdo de AMP, no entanto, foi aumentado em 73%. Em consequência, as razões ATP/AMP e ATP/ADP diminuíram pelo TCS.



**Figura 4:** Influência do triclosan (100 μM) sobre o conteúdo hepático de mononucleotídeos de adenina em fígado de rato em jejum.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que os resultados do presente estudo corroboram com trabalhos publicados sobre o potencial de hepatotoxicidade do TCS em animais. De fato, a ação do TCS como um desacoplador mitocondrial é comprovada em fígado em perfusão por meio do aumento do consumo de oxigênio e redução dos níveis de ATP. Esta alteração da bioenergética mitocondrial justifica uma redução da gliconeogênese como também da ureagênese, vias estritamente dependentes do ATP mitocondrial. Desse modo, o uso constante do TCS em animais pode desenvolver um quadro de toxicidade, que inclui hipoglicemia, excesso de amônia e dano celular devido à deficiência da manutenção da homeostase.

## REFERÊNCIAS

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. UV-assay with pyruvate and NADH. *In: Methods of enzymatic analysis* (pp. 574-579). Academic press, 1974.

BRACHT, A. (ed.). **Métodos de laboratório em bioquímica**, 2003.

LIU, M.; AI, W.; Sun, L.; FANG, F.; WANG, X.; CHEN, S.; WANG, H. Triclosan-induced liver injury in zebrafish (*Danio rerio*) via regulating MAPK/p53 signaling pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, 222, 108-117, 2019.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, 166(2), 305-309, 1998.

MITO, M. S.; CASTRO, C. V.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. Effects of ranolazine on carbohydrate metabolism in the isolated perfused rat liver. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, 4(04), 87, 2014.

NEWTON, A. P. N.; CADENA, S. M. S.; ROCHA, M. E. M.; CARNIERI, E. G. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **Toxicology letters**, 160(1), 49-59, 2005.

TEPLOVA, V. V.; BELOSLUDTSEV, K. N.; KRUGLOV, A. G. Mechanism of triclosan toxicity: Mitochondrial dysfunction including complex II inhibition, superoxide release and uncoupling of oxidative phosphorylation. **Toxicology letters**, 275, 108-117, 2017.

WEATHERLY, L. M.; GOSSE, J. A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 20(8), 447-469, 2017.

ZHANG, H.; SHAO, X.; ZHAO, H.; LI, X.; WEI, J.; YANG, C.; CAI, Z. Integration of metabolomics and lipidomics reveals metabolic mechanisms of triclosan-induced toxicity in human hepatocytes. **Environmental Science & Technology**, 53(9), 5406-5415, 2019.