

Ações fotoinduzidas da hipericina copolimerizada com P123 (Pluronic®) sobre a gliconeogênese hepática de camundongos

Gabriella Saory Kondo (PIBIC/CNPq), Juliana Nunes de Lima Martins, Jurandir Fernando Comar (Orientador), e-mail: saory.kondo@outlook.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas, PR.

Área e subárea do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas / Bioquímica

Palavras-chave: fotossensibilizador, perfusão hepática, metabolismo.

Resumo:

A hipericina é uma promissora molécula a ser empregada como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica, que é utilizada principalmente para eliminar células tumorais por estresse oxidativo induzido por luz. A hipericina se acumula preferencialmente em células tumorais, mas as células saudáveis também a captam e podem, diante de fotossensibilização, passar pelos mesmos danos oxidativos. O aumento do estresse oxidativo no fígado causa estímulo de vias catabólicas e inibição de vias anabólicas, uma condição que pode acentuar a caquexia associada às neoplasias. A hipericina é altamente hidrofóbica e seu uso endovenoso exige formulações que permitam sua distribuição em sistemas aquosos, como é o caso de micelas copoliméricas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar em camundongos Swiss os efeitos fotoinduzidos da hipericina, copolimerizada com P-123 (Pluronic®), sobre a gliconeogênese hepática. O fígado em perfusão isolada foi utilizado como ferramenta experimental e o lactado (2 mM) utilizado como substrato gliconeogênico. A infusão de hipericina copolimerizada inibiu a produção de glicose estimulada pelo lactato tanto na presença quanto na ausência de fotoindução. Entretanto, as micelas copoliméricas sem hipericina já inibiram a produção de glicose na mesma extensão que a hipericina. Os resultados mostram que das micelas copoliméricas e não a hipericina foram responsáveis inibição da gliconeogênese hepática. Diante deste efeito, é necessário repensar se as moléculas P123 são adequadas para carrear a hipericina.

Introdução

A terapia fotodinâmica é utilizada no tratamento do câncer e consiste na administração sistêmica de um fotossensibilizador, que é estimulado por iluminação localizada a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), que promove a morte celular por estresse oxidativo. A hipericina é um fotossensibilizador promissor e seus efeitos fototóxicos têm sido mostrados em vários tipos de células tumorais, inclusive hepáticas, como as células de hepatoblastoma (BARATHAN et al., 2013). A hipericina se acumula preferencialmente em células tumorais, mas as células saudáveis também a

captam e podem, mesmo que em menor grau, passar por danos oxidativos. Desta forma, é importante avaliar se a hipericina fotoinduzida também afeta as células saudáveis do fígado.

O aumento do estresse oxidativo no fígado causa alterações no fluxo de vias metabólicas. Esta condição estimula vias catabólicas, como a glicogenólise, e inibe as vias anabólicas, como a gliconeogênese (CASTRO-GHIZONI et al., 2017). Estas alterações podem, por exemplo, acelerar a caquexia que ocorre nas neoplasias. O conhecimento dos efeitos da hipericina sobre o metabolismo das células de mamíferos é bastante restrito, especialmente o metabolismo hepático.

A hipericina, entretanto, é altamente hidrofóbica e a administração endovenosa exige formulações que permitam sua distribuição em sistemas aquosos. Este é o caso das micelas copoliméricas do tipo Pluronic[®]. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar em camundongos Swiss os efeitos fotoinduzidos da hipericina, copolimerizada com P-123 (Pluronic[®]), sobre a gliconeogênese hepática, uma via muito sensível a alterações oxidativas celular (SOARES et al., 2013). O presente estudo pretende apresentar uma formulação para a administração da hipericina por via endovenosa, que se efetiva poderá contribuir para a terapia fotodinâmica de tumores hepáticos.

Materiais e métodos

A gliconeogênese foi avaliada no fígado de camundongos Swiss (20-25 g) em perfusão isolada. Os animais em jejum de 12 h foram anestesiados por via intraperitoneal com tiopental/lidocaína (100/10 mg·kg⁻¹) e, após a canulação das veias cava e porta, o fígado foi removido e posicionado em uma câmara de perfusão (BRASHT et al., 2003). O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit (pH 7,4) saturado com uma mistura de O₂ e CO₂ (95:5) por meio de oxigenador de membrana e ajuste simultâneo da temperatura (37°C). O líquido de perfusão entra no fígado pela cânula portal e o deixa pela cânula conectada à veia cava. Lactato (2 mM) foi utilizado como substrato gliconeogênico. Amostras do perfusado efluente foram coletadas para a dosagem de glicose e piruvato.

As micelas para carrear hipericina foram preparadas com copolímero P-123 (Pluronic[®]) e foram feitas por dispersão sólida. As micelas com hipericina foram dissolvidas diretamente no tampão Krebs nas de concentrações de 2,0 mg·L⁻¹, 1,0 mg·L⁻¹ e 0,5 mg·L⁻¹. A fotoindução foi feita com lâmpadas LED próximas ao fígado em perfusão. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação - CEAE, da UEM (8309170117)

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra os efeitos da hipericina 2 µg·mL⁻¹ (P123 1000 µg·mL⁻¹) e também apresenta o protocolo de perfusão utilizado para as demais concentrações. Após 10 min de perfusão apenas com tampão Krebs, o lactato (2 mM) foi infundido por 25 min isoladamente e por mais 25 min

junto com micelas vazias (grupo 1), micelas com hipericina na ausência (grupo 2) ou na presença (grupo 3) de iluminação. Após a entrada do lactato (10 min), a produção de glicose e piruvato foram estimuladas e a infusão de micelas com e sem hipericina inibiu a produção de glicose. A parte inferior da Figura 1 mostra a produção de glicose e piruvato no estado estacionário (35 min) antes da infusão de hipericina ou micelas ([0,0]) e após a infusão de micelas e hipericina (grupos 1, 2 e 3; 60 min).

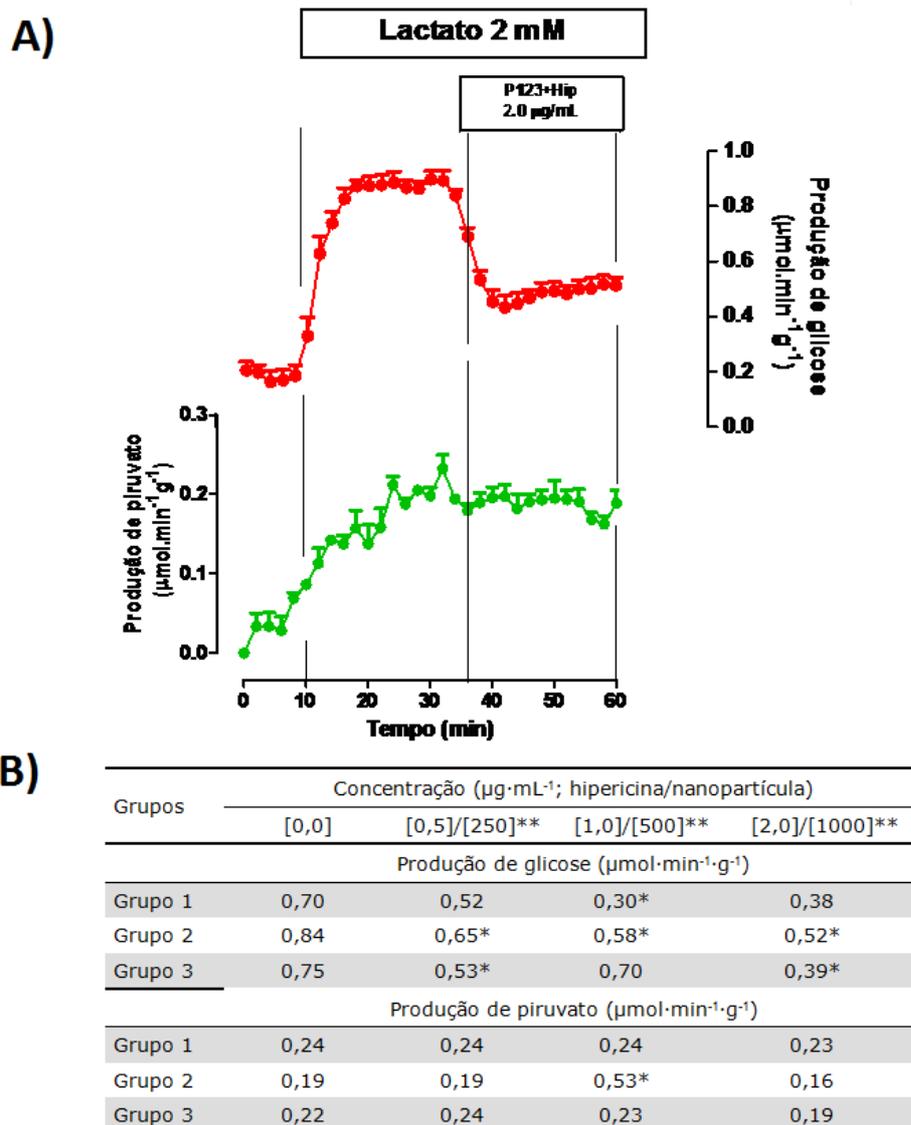


Figura 1. **Efeitos fotoinduzidos da hipericina copolimerizada sobre a gliconeogênese hepática de camundongos.** Decurso temporal da gliconeogênese a partir de lactato (2 mM) (A). Os valores em (B) são aqueles obtidos aos 35 min apenas com a infusão de lactato ([0,0]) e aos 60 min com a infusão de lactato + micelas vazias (grupo 1), hipericina sem (grupo 2) e com iluminação (grupo 3). (**) dois asteriscos referem-se à concentração das nanopartículas P123 vazias do grupo 1. Os valores são as médias \pm SEM de 4 experimentos em cada condição. Valores com asteriscos sobrescritos na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

A infusão de micelas vazias (grupo 1) inibiu a produção de glicose em 57 e 46% nas concentrações 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A infusão de micelas com hipericina sem fotoindução diminuiu a produção de glicose em 23, 31 e 38% nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A infusão de micelas com hipericina e fotoindução inibiu a produção de glicose em 29 e 48% nas concentrações de 0,5 e 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A produção de piruvato não foi alterada, exceto por um estímulo com 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no grupo 2.

Conclusões

Os resultados mostraram que apenas a infusão das micelas copolímeras vazias já produziu o máximo de inibição da gliconeogênese hepática que foi observada e, por isso, sem efeitos para a hipericina. Diante destes resultados, é necessário repensar se as nanopartículas de P123 são adequadas para carrear a hipericina.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo fomento e incentivo dados à pesquisa científica.

Referências

BARATHAN, M., MARIAPPAN, V.; SHANKAR, E. M.; ABDULLAH, B. J. J.; GOH, K. L.; VADIVELU, J. Hypericin-photodynamic therapy leads to interleukin-6 secretion by HepG2 cells and their apoptosis via recruitment of BH3 interacting-domain death agonist and caspases. **Cell Death Dis**, v.4, e697, 2013.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; KELMER-BRACHT, A. M. O estudo do metabolismo no fígado em perfusão. In: **Métodos de Laboratório em Bioquímica**, Manole Ltda São Paulo, 275–289, 2003.

CASTRO-GHIZONI, C.V.; AMES, A.P.A.; LAMEIRA, O.A.; BERSANI-AMADO, C.A.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; BRACHT, L.; NATALI, M.R.M.; PERALTA, R.M.; BRACHT A.; COMAR, J.F. Anti-inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. **J Cell Biochem**, v.118, 3409–3423, 2017.

SOARES, A.A.; OLIVEIRA, A.L.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; COMAR, J.F.; RAMPAZZO, A.P.S.; VICENTINI, F.A.; NATALI, M.R.M.; COSTA, S.M.G.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Effects an *Agaricus blazei* aqueous extract pretreatment on paracetamol-induced brain and liver injury in rats. **Biomed Res Int**, 2013.