EFEITO DA IVERMECTINA NA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA DE LIPOSSOMAS DE POPC

Vinícius Moraes Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM); Ana Clara Magno Borges; Pedro Furquim Lanza Alves; Kellen Brunaldi (Orientador). E-mail: kbrunaldi@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Biofísica/Biofísica molecular

Palavras-chave: bicamada lipídica; calceína; perturbação de membrana.

RESUMO

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário amplamente utilizado, cujos mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados. Devido a sua elevada hidrofobicidade, apresenta alta afinidade por membranas celulares, podendo modificar propriedades biofísicas da bicamada lipídica. Este estudo avaliou o efeito da IVM na permeabilidade de lipossomas unilamelares grandes (LUVs- *large unilamellar vesicles*) de palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), livres de proteínas e contendo calceína encapsulada. As LUVs foram preparadas pelo método de filme fino seguido de extrusão e incubadas com IVM (8,3; 16,6; 24,9 e 33,3 mol% em relação ao POPC) por 0,5, 1, 2 e 4 h. A permeabilidade foi avaliada pelo ensaio de vazamento de calceína, utilizando Triton X-100 como referência de permeabilização máxima. A incorporação da IVM às LUVs promoveu a liberação dose e tempo dependente de calceína, atingindo aproximadamente 20% de liberação de calceína para o meio externo ao final de 4 h. Esses achados evidenciam o efeito perturbador da IVM sobre a bicamada lipídica, possivelmente associado a alterações em sua organização, e reforçam sua capacidade de modular propriedades biofísicas da membrana, contribuindo para a compreensão de seus mecanismos de ação e de seu potencial em estratégias de terapia lipídica de membrana.

INTRODUÇÃO

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário derivado das avermectinas, cujos mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados (SULIK et. al, 2023). Sua elevada hidrofobicidade favorece a interação com membranas celulares (HIBBS & GOUAUX, 2011), podendo alterar propriedades biofísicas da bicamada lipídica.

Neste estudo, avaliou-se o efeito perturbador de membrana da IVM utilizando lipossomas livres de proteínas como modelo biomimético. Alterações na permeabilidade da bicamada foram investigadas pelo ensaio de vazamento de calceína, no qual o aumento da fluorescência decorrente da liberação da sonda indica aumento da permeabilidade da membrana.

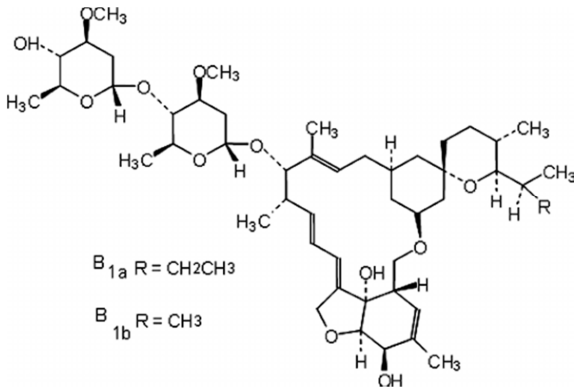


Figura 1 – Estrutura molecular da IVM. A IVM consiste em uma mistura de dois homólogos, 80% de 22,23-dihidroavermectina B1a e 20% de 22,23-dihidroavermectina B1b.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lipossomas unilamelares grandes (LUVs - *large unilamellar vesicles*) de palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) foram preparados pelo método de filme fino seguido de extrusão em membrana de policarbonato de 0,1 µm, utilizando tampão contendo calceína. A calceína não encapsulada foi removida por filtração em gel (Sephadex G-100), e o diâmetro hidrodinâmico das LUVs, determinado por espalhamento dinâmico de luz, foi de aproximadamente 100 nm.

Para o ensaio de vazamento de calceína, as LUVs (240 µM de POPC) foram incubadas com IVM (8,3; 16,6; 24,9 e 33,3 mol% em relação ao POPC) por 0,5, 1, 2 e 4 h. A calceína foi excitada em 490 nm e a emissão coletada em 518 nm. A porcentagem de calceína liberada foi calculada como: % liberação = $[(I_{IVM} - I_0)/(I_{triton} - I_0)] \times 100$, em que I_0 corresponde à intensidade de fluorescência inicial, I_{IVM} à intensidade após incubação com IVM e I_{Triton} à fluorescência após permeabilização completa das LUVs com triton X-100.

Os resultados apresentados correspondem a um experimento representativo. Posteriormente, serão realizados pelo menos três experimentos independentes para análise estatística, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta um ensaio representativo de vazamento de calceína. Inicialmente, observa-se baixa fluorescência devido à auto extinção da calceína encapsulada nas LUVs. Após a adição de IVM, a fluorescência aumentou de forma gradual e contínua ao longo dos 10 minutos de registro, correspondendo a menos de 10% de liberação de calceína. Esse resultado indica a saída da sonda para o meio externo e recuperação da fluorescência, gerado pelo aumento da permeabilidade da bicamada lipídica. Ao final do ensaio, a adição de triton X-100 promoveu a permeabilização completa das LUVs, estabelecendo a fluorescência máxima, correspondente a 100% de liberação de calceína.

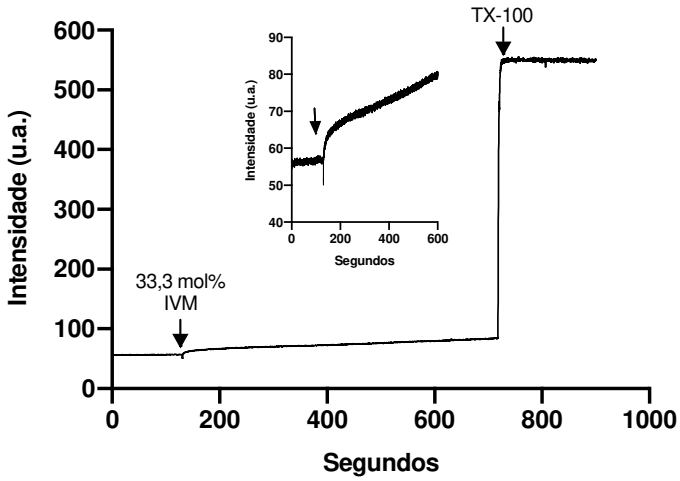


Figura 2 – Ensaio de liberação de calceína. As setas indicam o momento da adição de IVM e do triton X-100 à suspensão de LUVs com calceína encapsulada. POPC: 240 µM. Triton X-100 20%: 7,5 µL. λ_{exc}: 490 nm. λ_{em}: 518 nm. Fendas de emissão e excitação: 2,5 nm cada.

Como a fluorescência não atingiu um platô após 10 minutos (em detalhe na Figura 2), o tempo de incubação com IVM foi ampliado para até 4 horas. Conforme observado na Figura 3, a liberação de calceína aumentou com o tempo de incubação e com a concentração de IVM. Após 4 horas, observou-se tendência à estabilização do efeito, com liberação máxima de 20% da calceína encapsulada na maior concentração de IVM testada. Esses resultados demonstram que a IVM aumenta a permeabilidade da bicamada lipídica de maneira dependente do tempo e da concentração, caracterizando seu efeito perturbador de membrana.

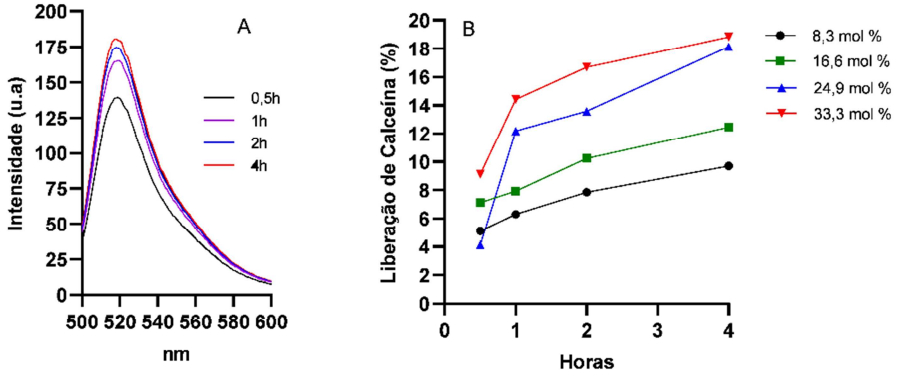


Figura 3 – Efeito da concentração de IVM e do tempo de incubação sobre a liberação de calceína**.** (A) Espectros de emissão da calceína após incubação com IVM (33,3 mol% em relação ao POPC) por 0,5; 1; 2 e 4 h. (B) Liberação de calceína (%) após incubação com IVM (8,3–33,3 mol% em relação ao POPC) nos diferentes tempos. POPC: 240 µM; λ_{exc}: 490 nm; λ_{em}: 518 nm. As curvas representam a média de três registros.

Esse efeito pode estar relacionado às propriedades físico-químicas da IVM e a sua forma de interação com a membrana. Sua elevada hidrofobicidade favorece a partição na bicamada lipídica, enquanto sua estrutura molecular volumosa contribui para o acúmulo preferencial no folheto externo (HIBBS; GOUAUX, 2011). Estruturalmente, o grupamento benzofurano da IVM se insere na região hidrofóbica da bicamada, enquanto o dissacarídeo permanece próximo à interface aquosa (KUSTOVSKIY; YEMETS, 2023). Essa orientação pode interferir no empacotamento dos fosfolipídios e, consequentemente, aumentar a permeabilidade da membrana.

Como as LUVs de POPC utilizadas neste estudo eram constituídas exclusivamente por fosfolipídios e desprovidas de proteínas, o aumento do vazamento de calceína evidencia um efeito direto da IVM sobre a bicamada lipídica, independente de sua ação sobre alvos proteicos. Assim, os resultados sugerem que a perturbação da organização lipídica pode contribuir para os mecanismos de ação da IVM.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a IVM aumenta a permeabilidade das LUVs de POPC de forma dependente da concentração e do tempo, sem causar ruptura completa das vesículas. Esses achados evidenciam seu efeito perturbador sobre a bicamada lipídica e sua capacidade de modular propriedades biofísicas da membrana, contribuindo para a compreensão de seus mecanismos de ação e potencial em estratégias de terapia lipídica de membrana.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pelo incentivo à pesquisa e concessão da bolsa de iniciação científica e, claro, aos meus orientadores pelos ensinamentos.

REFERÊNCIAS

HIBBS, R. E.; GOUAUX, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. **Nature**, v. 474, n. 7349, p. 54-60, 2011.

KUSTOVSKIY, Y. O.; YEMETS, A. I. Structural patterns of ivermectin allosteric interaction with glutamate-gated chloride channel of Caenorhabditis elegans. **Biotechnologia Acta**, v. 16, n. 2, p. 32-34, 2023.

SULIK, M. et al. Ivermectin and its synthetic derivatives–A new class of anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, p. 100176, 2024.