



## **Avaliação do efeito do fotossensibilizador Clorofila-a e seus derivados sobre o metabolismo hepático da glicose em hepatócitos isolados de ratos Wistar não diabéticos (NDM1) e diabéticos tipo 1 (DM1).**

Wunderlich, A.L.M.<sup>1</sup>, MENDES, S.C.S.<sup>2</sup> e GODOI, V.A.F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas PFS/UEM.

<sup>2</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas PBC/UEM.

<sup>3</sup> Professora credenciada do PFS e PBC/UEM.

### **RESUMO**

O fígado é o principal órgão envolvido na homeostase metabólica e participa na regulação de inúmeros processos biológicos, como as vias hepáticas de regulação glicêmica. A insuficiência ou ausência desses mecanismos glicorregulatórios predispõe o indivíduo a várias doenças e complicações relacionadas à homeostase glicêmica, dentre elas o Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1). Existe uma associação entre o desenvolvimento e progressão de DM1 e de suas complicações crônicas por meio da hiperglicemia e o excesso de radicais livres, resultando em um quadro exacerbado de estresse oxidativo por redução da capacidade antioxidante dos tecidos. Sendo a Terapia Fotodinâmica (TFD) uma alternativa para tratamentos invasivos e a Clorofila-a e seus derivados agentes antioxidantes e fotossensíveis, esse projeto teve como objetivo avaliar os efeitos da Clorofila-a e derivados, na ausência e presença de iluminação (650 nm), sobre os parâmetros hepáticos relacionados ao metabolismo energético do fígado por meio da técnica de hepatócitos isolados com colagenase em modelos experimentais de ratos Wistar não diabéticos tipo 1 (NDM1) e DM1. A análise parcial dos resultados constatou que a Clorofila-a iluminada alterou todos os parâmetros hepáticos analisados, ao passo que seus derivados não apresentaram a mesma ação, levantando a possibilidade daquela em contribuir para a redução da liberação de glicose pelo fígado de animais DM1 e redução da glicemia.

**Palavras chave:** Terapia Fotodinâmica. Diabetes Mellitus. Clorofila. Hepatócitos.

### **1. INTRODUÇÃO**

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, resultante da perda da secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas (ASSOCIATIONAD, 2005), considerada um problema de saúde pública que já provocou 1,5 milhões de mortes em 2012 e estima-se que será a sétima principal causa de morte no mundo em 2030 (Organização Mundial de Saúde, 2016). De acordo com a

Sociedade Brasileira de Diabetes (2016), no Brasil, a taxa de mortalidade (por 100 mil habitantes) é de 33,7, com progressão prevista de 0,5 para a faixa etária de 0 a 29 anos a 223,8 para acima de 60 anos.

A associação entre a progressão do DM1 e de suas complicações crônicas, com a hiperglicemia e o excesso de radicais livres, resulta na redução da capacidade antioxidante dos tecidos e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tanto em pacientes como em modelos experimentais de DM1 (KASHYAP; FARRUGIA, 2011; WINIARSKA et al., 2009).

A Terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica não invasiva e alternativa para as terapias convencionais. Compreende a administração de um agente fotossensibilizador (FS), irradiação luminosa e excitação do FS, e melhora concomitante na capacidade antioxidante celular. Dentre os agentes FS, destacamos a Clorofila A e seus derivados, eficiente no tratamento de tumores, mas ainda não explorada no contexto metabólico. A caracterização físico-química dos FS utilizados neste trabalho, foi realizada pelo grupo de pesquisas Nupesf (Núcleo de Pesquisas em Tratamento Fotodinâmico/UEM). Contudo, não há relatos na literatura sobre os efeitos da clorofila sobre os parâmetros metabólicos do fígado *per se* em modelos *in vivo*. Amparados nessa perspectiva, o presente estudo teve por objetivo avaliar a ação biológica dos FS (Clorofila-a, feoforbídeo, clorofilida de zinco e lapachol com clorofidila de zinco) sobre os parâmetros hepáticos relacionados ao metabolismo energético do fígado (liberação hepática de glicose, glicólise e glicogenólise), em células hepáticas isoladas com colagenase. Em termos estatísticos, buscou-se saber se a média dos parâmetros hepáticos mantinha-se igual para todos os FS ou se ela diferia entre eles.

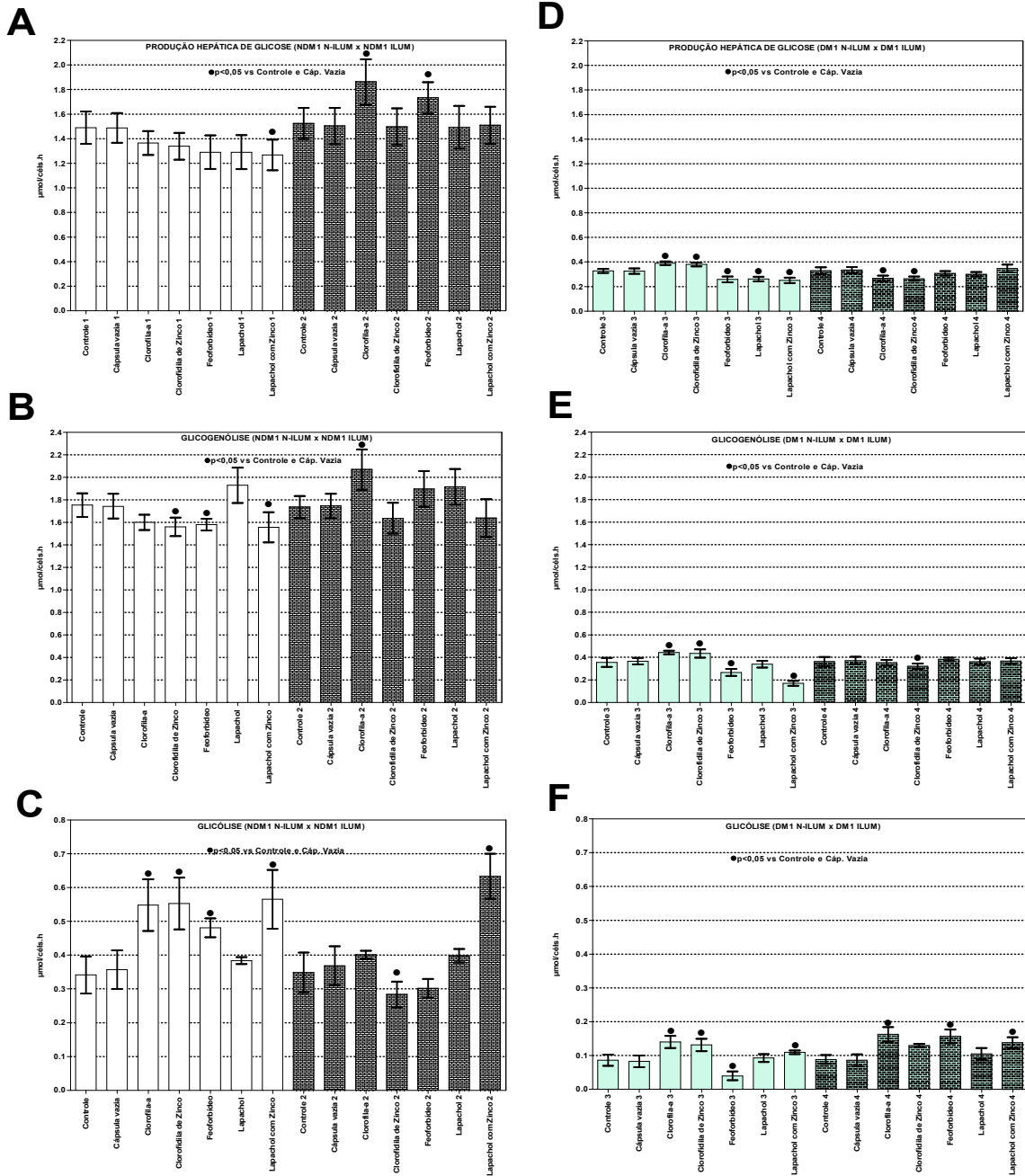
## 2. RESULTADOS

Dentre as vantagens da técnica de isolamento dos hepatócitos destaca-se o alto rendimento celular que permite a administração de várias substâncias químicas simultaneamente utilizando-se um número menor de animais. Segundo a Lei Arouca de 2008, o número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto deve ser o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo (MIZIARA et al, 2012). A participação dos Comitês de Ética no uso de Animais, tanto em âmbito nacional quanto internacional, tem se mostrado mais forte do que as estimativas para um desejável *n* amostral. Prova desse fato foi um estudo realizado na Turquia, no qual a amostra ideal para cada grupo experimental era de nove animais, ao passo que o Comitê institucional permitiu a utilização de apenas seis (KAFA et al, 2015). A exemplo desse estudo, este projeto também contou com seis animais em cada grupo – quantidade liberada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá e que se mostrou suficiente em várias pesquisas (dados não apresentados) com animais em fornecer um resultado homogêneo dos grupos estudados -- a saber: grupo diabético tipo 1 (DM1) e não diabético tipo 1 (NDM1) ou controle, sendo que cada grupo foi dividido em dois subgrupos: grupos cujas células não foram iluminadas (NDM1NI e DM1NI) e grupos cujas células foram iluminadas com luz vermelha de comprimento de onda de 650 nm, durante 1 hora de incubação, na presença dos fotossensibilizadores (NDM1I e DM1I).

A Figura 1 mostra que a média dos parâmetros hepáticos avaliados é menor nos grupos DM1 comparada a dos grupos NDM1. Isso porque o DM1

resulta no surgimento de anormalidades metabólicas típicas como a redução da atividade das enzimas da via glicolítica e glicogenogênica (RUI, 2014; FERRANNINI et al., 1990). Dessa forma, na ausência de insulina a utilização e metabolização da glicose estão reduzidas, contribuindo com o quadro de hiperglicemia crônica, característico da doença (COTRAN et al., 1994).

Figura 1. Efeitos dos FS sobre diferentes parâmetros do metabolismo hepático da glicose, em hepatócitos isolados de animais não diabéticos (A, B e C) e diabéticos tipo 1 (D, E e F), na ausência e presença da luz, respectivamente apresentados. Análise da média  $\pm$  desvio padrão, n=6 animais/grupo.



Ainda, os dados apresentados na Figura 1 ilustram a distribuição da produção hepática de glicose, glicogenólise e glicólise entre os grupos. Todos

os valores observados diante da exposição dos FS foram comparados à amostra cuja incubação foi realizada sem a presença de nenhum agente, ou seja, amostra controle. Para a comparação intragrupo, foi realizada análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas – visto que as células provenientes de um mesmo animal foram incubadas com todos os tipos de FS, caracterizando dados dependentes --, pós teste de Tukey e pré-fixando o nível de significância em 95% ( $p < 0,05$ ). Já a análise do efeito de um mesmo FS entre os grupos amostrais foi avaliada através da análise de variância One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Essa análise teve como objetivo avaliar o efeito da iluminação sobre o FS e, conseqüentemente, sobre as respostas dos parâmetros hepáticos em estudo. As análises entre grupos cujos resultados foram significativos, foram submetidas ao teste de Cohen a fim de avaliar o tamanho deste efeito (Tabela 1).

Tabela 1. Ação dos FS sobre diferentes parâmetros do metabolismo hepático da glicose, em hepatócitos isolados de animais não diabéticos e diabéticos tipo 1, na ausência e presença da luz, n=6 animais/grupo.

Agente Fotossensibilizador	Parâmetro Hepático	Grupo Não-Diabético		Teste de Cohen	Grupo Diabético		Teste de Cohen
		Estimativa Pontual	Estimativa Intervalar		Estimativa Pontual	Estimativa Intervalar	
Clorofila A	Liberação de Glicose	-0,4969	-0,8015 a -0,1923	0,61	0,1227	0,07024 a 0,1751	2,34
	Glicogenólise	-0,4693	-0,7656 a -0,1730	0,43	0,09055	0,01369 a 0,1674	2,08
	Glicólise	0,1471	0,03014 a 0,2641	2,56	-0,02269	-0,06685 a 0,02148	-
Clorofidila de Zinco	Liberação de Glicose	-0,1585	-0,4631 a 0,1461	-	0,1169	0,05311 a 0,1807	0,28
	Glicogenólise	-0,07706	-0,3622 a 0,2080	-	0,1133	0,03027 a 0,1963	0,21
	Glicólise	0,2693	0,1523 a 0,3863	4,31	0,001443	-0,04272 a 0,04561	-
Feoforbídeo	Liberação de Glicose	-0,443	-0,7596 a -0,1265	-	-0,04945	-0,1047 a 0,005801	-
	Glicogenólise	-0,3154	-0,6278 a -0,003117	-	-0,1166	-0,1996 a -0,03358	1,81
	Glicólise	0,1793	0,04967 a 0,3089	6,32	-0,1164	-0,1647 a -0,06797	6,13
Lapachol com	Liberação de Glicose	-0,2425	-0,5762 a 0,09115	-	-0,09721	-0,164 a -0,02954	2,95
	Glicogenólise	-0,08242	-0,3618 a 0,1969	-	-0,1993	-0,2880 a -0,1105	3,59
Clorofidila de Zinco	Glicólise	-0,0682	-0,2158 a 0,07934	-	-0,02822	-0,07239 a 0,01595	-

Embora o Feoforbídeo tenha apresentado efeitos maiores pelo teste de Cohen, a Clorofila-a iluminada foi o único FS cujos efeitos nos parâmetros hepáticos foram alterados em ambos os grupos (NDM1 e DM1). No grupo NDM1 a Clorofila-a iluminada aumentou a liberação hepática de glicose – como possível consequência do estímulo da glicogenólise e/ou da diminuição da via glicolítica. Já no grupo DM1, o FS iluminado diminuiu a liberação hepática de glicose e a glicogenólise, enquanto aumentou a glicólise. Embora este último parâmetro não tenha apresentado alterações significativas entre os grupos DM1NI e DM1I, ele foi significativo na análise intragrupo quando comparado à amostra controle.

Ainda que os resultados sejam parciais, do ponto de vista metabólico, é de considerável importância, pois podemos presumir que a Clorofila-a, ao aumentar a utilização da glicose por estimulação da via glicolítica e diminuir a liberação hepática de glicose para a corrente sanguínea, não contribui com o aumento já instalado da hiperglicemia característico do DM1.

## Referências

1. ASSOCIATIONAD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 28, p.37-42, 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade.
3. COTRAN, S. R. et al. Pâncreas. In: KUMAR; COTRAN; ROBBINS. *Patologia básica*. 5ª. Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

4. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
5. FERRANNINI, E. et al. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism*, v. 39, p.1082-1088, 1990.
6. KAFA, N. et al. Effects of kinesiologic taping on epidermal-dermal distance, pain, edema and inflammation after experimentally induced soft tissue trauma. *Physiother Theory Pract.* v. 31, n. 8, p. 556-561, 2015.
7. Kashyap, P. and Farrugia, G. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterology & Motility*, 23: 111–114, 2011.
8. MIZIARA, I.D. et al. Ética da pesquisa em modelos animais. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* v. 78, n 2, 2012.
9. RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*, v. 4, p. 177-197, 2014.
10. WINIARSKA, K. et al. Hypoglycaemic, antioxidative, and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*, v. 91; p. 261-270, 2009.