

HIDROXICLOROQUINA INIBE A GLICONEOGÊNESE NO FÍGADO DE ANIMAIS NORMAIS

Emanuele Parreira de Lima¹, Gustavo Henrique de Souza², Melina da Silva Simões³,
Naiara Cristina Lucredi⁴, Laís Cristina de Lima Silva⁵, Jurandir Fernando Comar⁶.

¹Doutoranda do programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR. Bolsista CAPES – UEM. parreiraemanuele@gmail.com

²Mestrando do programa de Pós Graduação de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR. gustavo.hsouza99@gmail.com

³Doutoranda do programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR. Bolsista CAPES – UEM. mellinadssimoes@hotmail.com

⁴Doutoranda do programa de Pós-Graduação de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR. Bolsista CAPES – UEM. naiara_lucredi@hotmail.com

⁵Mestranda do programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá/PR. lf.lima.1008@gmail.com

⁶Orientador, pós-doutor, departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, campus Maringá-PR. jfcomar@uem.br

RESUMO

Com a pandemia do coronavírus (SARS-CoV-2), que se deu no início de dezembro de 2019 na China, houve uma maçante busca por medicamentos que pudessem ser eficazes contra o vírus. Alguns dos medicamentos mais comentados pela mídia e pela população foram a hidroxiclороquina e a cloroquina, isso porque alguns estudos *in vitro* mostraram que a cloroquina foi eficaz contra alguns vírus, entre eles o coronavírus, por inibir o estágio inicial da replicação. A hidroxiclороquina é sintetizada a partir da cloroquina e uma meta-análise publicada indicou que seu uso como profilaxia mostrou uma redução significativa de cerca de 24% de hospitalização ou morte. Porém, até onde vimos, não há estudos que mostrem seus possíveis efeitos no metabolismo hepático. Assim, objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da hidroxiclороquina na via da gliconeogênese, para isso fizemos uma perfusão hepática em animais wistar com hidroxiclороquina na concentração de 200 uM e foi visto que a droga inibi o consumo de oxigênio e a produção de glicose. Concluímos assim que a hidroxiclороquina altera o funcionamento da gliconeogênese e o motivo pelo qual isso ocorre está sendo investigado pela nossa equipe de trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: Consumo de oxigênio; Metabolismo hepático; Perfusão; Produção de glicose.

1 INTRODUÇÃO

Com a pandemia do coronavírus (SARS-CoV-2), houve uma maçante busca por medicamentos que pudessem ser eficazes contra o vírus. Nesse contexto alguns medicamentos foram incorporados pelos médicos e pela população no geral na tentativa de reduzir a carga viral e os efeitos da doença, entre eles, hidroxiclороquina e a cloroquina, isso porque alguns estudos *in vitro* mostraram que a cloroquina foi eficaz contra alguns vírus, entre eles o corona-vírus, por inibir o estágio inicial da replicação. (Savarino, *et al.*, 2003; Al-Bari, 2017; Cortegiani, *et al.*, 2020; Yao, *et al.*, 2020; Principi; Esposito, 2020; Risch, 2020). Sendo assim, um dos primeiros medicamentos recomendados pelas autoridades chinesas para tratar a infecção por corona-vírus (Cortegiani, *et al.*, 2020; Gao; Hu, 2020 e Wong, *et al.*, 2020).

A hidroxiclороquina, sintetizada a partir da cloroquina (Yao, *et al.*, 2020), quando usada como profilaxia reduziu significativa de cerca de 24% de hospitalização ou morte (Risch, *et al.*, 2020).

Levando-se em conta a pandemia do Corona-vírus, a urgência em encontrar medicamentos, que além de eficazes contra o vírus, sejam também seguros para a população, e vendo que, até onde sabemos, não há nenhum trabalho que avaliou o efeito da hidroxiclороquina no metabolismo hepático, o presente estudo buscou investigar os efeitos da hidroxiclороquina no metabolismo hepático de ratos saudáveis, afim gerar dados que possam contribuir para atestar a segurança da mesma para o tratamento *in vivo*, já que

o fígado é um órgão responsável pelo metabolismo de várias substâncias sendo crucial para manter a homeostasia do corpo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O aparelho de perfusão hepática foi construído nas oficinas da Universidade de Maringá. A hidroxicloroquina foi obtidas em uma farmácia de manipulação. Todos os outros produtos químicos foram do melhor grau disponível (98-99,8% de pureza).

Ratos Wistar machos pesando 220–280g foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta padrão de laboratório (Nuvilab®, Colombo, Brasil) e mantidos em um ciclo claro-escuro regulado. Para o preparo do fígado para perfusão os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina (120 mg.kg⁻¹) + xilazina (10 mg.Kg⁻¹). Todos os experimentos foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Maringá (2226120619).

Foi realizada perfusão sem hemoglobina, não recirculante (Scholz e Bücher, 1965; Kelmer-Bracht *et al.*, 1984). As veias porta e cava foram canuladas, foi fornecido um fluxo constante por uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, França), sendo que o fluido de perfusão foi Krebs/Henseleit-tampão bicarbonato (pH 7,4) contendo 25 mg% de albumina de soro bovino, saturado com uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono (95: 5), com ajuste simultâneo de temperatura (37 °C). Amostras do fluido de perfusão do efluente foram coletadas e analisadas quanto ao conteúdo de seus metabólitos. O substrato (lactato) e a droga testada (hidroxicloroquina) foram adicionados ao fluido de perfusão de acordo com os protocolos experimentais. A concentração de 200 µM foi a concentração testada nesse estudo.

De acordo com o protocolo, os ratos foram submetidos à jejum por 12 h antes dos experimentos, para que a gliconeogênese fosse medida (Comar *et al.*, 2016).

Amostras do fluido de perfusão do efluente foram coletadas de acordo com o protocolo experimental e analisadas quanto ao conteúdo de seus metabólitos. O conteúdo de glicose foi analisado por meio de procedimentos enzimáticos padrão (LaborLab). A concentração de oxigênio no perfusado, foi monitorada continuamente, através de um eletrodo de platina blindado com teflon (Kelmer-Bracht *et al.*, 1984). As taxas metabólicas foram calculadas a partir das diferenças de entrada e saída e as taxas de fluxo total e se referem ao peso úmido do fígado.

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPadPrism (versão 5.0). A análise de variância foi feita com teste post-hoc de acordo com Student-Newman-Keuls (p < 0,05). O teste t de Student foi aplicado ao comparar duas médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fígado do animal normal, em jejum, não tem mais estoque de glicogênio (Comar *et al.*, 2016). Assim, quando infundimos lactato, nós fornecemos substrato para que o fígado realize a gliconeogênese, que é a produção de glicose, nesse caso, a partir do lactato. Esse experimento permite então que avaliemos o efeito da droga estudada, a hidroxicloroquina, em uma via metabólica específica, nesse caso, a gliconeogênese.

Nossos experimentos mostraram que a hidroxicloroquina na dose de 200µM inibiu a gliconeogênese em fígado de animais normais infundidos com a mesma. Isso pode ser visto pela inibição do consumo de oxigênio e a inibição da produção de glicose a partir do lactato, essa inibição permaneceu, mesmo nos minutos finais, após cessar a infusão da droga, como pode ser visto na figura 1. O que pode explicar a recomendação vista na bula comercial dessa droga, alertando os pacientes sobre o risco de hipoglicemia. Já que essa

droga inibe a produção de glicose, a hipoglicemia pode ser um dos efeitos colaterais desse medicamento (Concordia Pharmaceuticals Inc.,2018).

Essa inibição pode se dar por diversos motivos, sendo que algumas hipóteses são: a inibição das enzimas da cadeia transportadora de elétrons, já que a conversão de lactato em glicose, nessa via glicolítica, depende da energia fornecida pelo ATP produzido nas mitocôndrias (Simões, *et al.*, 2017). A hidroxicloroquina poderia também estar impedindo que o lactato de alguma forma entre na célula, assim, sem o lactato, que é o substrato para a via em questão, não haveria como produzir glicose. Outra opção ainda, é que a hidroxicloroquina esteja inibindo as enzimas responsáveis pela gliconeogênese, o que explica a inibição na produção de glicose e por sua vez a inibição no consumo de oxigênio. Essas são algumas hipóteses que estão sendo investigadas pelo nosso grupo de pesquisa para explicar a inibição vista na via da gliconeogênese.

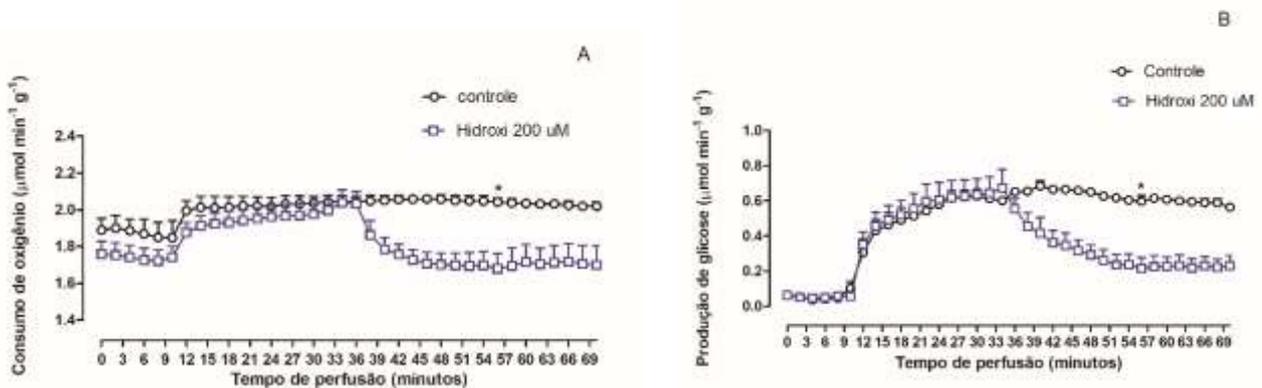


Figura 1: decurso temporal das mudanças causada pela hidroxicloroquina na dose de 200µM na gliconeogênese, no consumo de oxigênio (A) e na produção de glicose (B). O fígado de animais em jejum foram perfundidos, como citado na sessão materiais e métodos, com tampão puro, até os dez minutos e a partir dos dez minutos com tampão e lactato. Os animais “hidroxi 200 µM”, a partir do tempo 36, além do tampão com lactato, também foi infundida a droga, hidroxicloroquina, na dose de 200µM, a infusão da droga foi interrompida no minuto 56, sendo assim, a partir desse tempo, voltou a infusão do tampão contendo apenas lactato. O consumo de oxigênio foi medido por polarografia (A) e o efluente foi coletado em intervalos de 2 minutos e dosado a concentração de glicose (B). As barras são o erro padrão da média e os asteriscos indicam a diferença significativa entre o fígado de animais controle e os fígados de animais perfundidos com a droga. O teste t de Student ($p < 0,05$) foi usado para comparar a média do ponto 56 dos animais controles com os animais perfundidos com a droga.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fígado é o órgão responsável por manter a homeostasia de glicose no sangue, assim é de suma importância que suas vias metabólicas funcionem de forma adequada. A hidroxicloroquina, na dose de 200 µM, alterou o funcionamento da gliconeogênese, inibindo o consumo de oxigênio e a produção de glicose, para saber o motivo exato pelo qual isso ocorre serão necessários mais estudos.

REFERÊNCIAS

AL-BARI, M. A. A. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. **Pharmacol Res Perspect.** 2017.

BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. **Academic Press.** 1974.

COMAR, J. F.; OLIVEIRA, D. S.; BRACHT, L.; KEMMELMEIER, F. S.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. The metabolic responses to L-glutamine of livers from rats with diabetes types 1 and 2. **PLoS ONE** 11(8).2016.

CONCORDIA PHARMACEUTICALS INC. PLAQUENIL - Hydroxychloroquine sulfate tablets, USP. St. Michael, Barbados BB11005. 2015/ Revised 06/2018.

CORTEGIANI, A.; INGOGLIA, G.; IPPOLITO, M.; GIARRATANO, A. E.; EINAV, S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. **J Crit Care**. 57: 279–283. 2020.

GAO, J. E.; HU, S. Update on use of chloroquine/hydroxychloroquine to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Biosci Trends**. 14: 156–158. 2020.

KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V. M.; BRACHT, A. Construction of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanisms of drug action. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 27, 419–438. 1984.

PRINCIPI, N. E.; ESPOSITO, S. Chloroquine or hydroxychloroquine for prophylaxis of COVID-19. **Lancet Infect Dis**. 20(10): 1118. 2020.

RISCH, H. A. Early outpatient treatment of symptomatic, high-risk COVID-19 patients that should be ramped up immediately as key to the pandemic crisis *Am. J. Epidemiol.*, 189 (11), pp. 1218-1226. 2020.

SAVARINO, A.; BOELAERT, J. R.; CASSONE, A.; MAJORI, G. E.; CAUDA, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. **Lancet Infect Dis**. 3:722–727. 2003.

SCHOLZ, R., BÜCHER, T. Hemoglobin-free perfusion of rat liver, in: Chance, B., Estabrook, R.W., Williamson, J.R., (eds.), *Control of energy metabolism*. **Academic Press**, New York, pp. 393–414. 1965.

SIMÕES, M. S.; BRACHT, L.; PARIZOTTO, A. V.; COMAR, J. F.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. The metabolic effects of diuron in the rat liver. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 53-61. 2017.

WONG, Y.K., YANG, J. E HE, Y. Caution and clarity required in the use of chloroquine for COVID-19. **Lancet Rheumatol**. 2: e255. 2020.

YAO, X.; YE, F. E.; ZHANG, M. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clin Infect Dis**. 2020.