

AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO DA ADMINISTRAÇÃO I.P. DE β -CICLODEXTRINAS SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E RENAIIS DE RATOS¹

EVALUATION OF THE CHRONIC EFFECT OF IP ADMINISTRATION OF β -CYCLODEXTRIN ON LIVER AND RENAL PARAMETERS OF RATS

**Amanda Lima de Oliveira², Nathana Jamille Mezzomo³, Guilherme Machado Do Carmo³,
Matheus Dellaméa Baldissera⁴, Camila Rubenich Cremonese⁴, Jenifer Kolling⁴,
Jenifer Pase Zanon⁵, Rodrigo de Almeida Vaucher⁶,
Ivana Zanella da Silva⁷ e Virginia Cielo Rech⁸**

RESUMO

O interesse pelas ciclodextrinas (CDs) decorre das suas propriedades como, por exemplo, melhor absorção de fármacos através das barreiras biológicas e tempo de liberação. Entre as CDs naturais, a beta ciclodextrina parece ser a mais vantajosa para utilização farmacêutica pela sua disponibilidade, tamanho da cavidade molecular para receber fármacos de aproximadamente 0,6nm e baixo custo, porém algumas variações ainda não podem ser consideradas inertes no meio biológico, pois ainda há a necessidade de pesquisas *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito crônico da administração i.p de cada uma das CDs testadas: β CD, M- β CD e HP- β CD sobre parâmetros bioquímicos relacionados à função hepática e renal de ratos Wistar. Após 60 dias de aplicações, a avaliação hepática foi realizada através das atividades das enzimas séricas AST, ALT e FA e função renal pelas medidas de creatinina e ureia, através do método de química seca. O aumento nos níveis séricos de ureia e creatinina indica alteração na função renal dos ratos tratados com β CD. A administração i.p. de M- β CD aumentou a atividade da AST e FA, o que sugere alteração hepática, apesar de nenhuma das 3 ciclodextrinas testadas alterar a atividade da ALT, um marcador de lesão hepática. Alguns dos dados observados estão de acordo com relatos de outros autores, porém os mesmos utilizaram vias de administração diferentes da realizada neste trabalho. Outros parâmetros ainda serão avaliados neste modelo para melhor compreensão das alterações apresentadas.

Palavras-chave: nanotecnologia, sangue, intraperitoneal, marcadores bioquímicos.

ABSTRACT

The interest for cyclodextrin (CD) is due to its properties as better drug absorption through biological barriers and the release time. Among the natural CDs, the beta-cyclodextrin (β CD) seems to be the most advantageous for pharmaceutical use for its availability, cavity size to receive drugs that are around 0.6nm, and low cost, however some types cannot yet be considered inert to the biological environment, because there is still the

¹ Pesquisa de Mestrado - Centro Universitário Franciscano.

² Mestre em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: amandalimafm@gmail.com

³ Alunos do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Acadêmicos do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Acadêmica do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁶ Docente - Centro Universitário Franciscano.

⁷ Coorientadora - Centro Universitário Franciscano.

⁸ Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: vga.cielo@gmail.com

need for in vivo researches. The aim of this study is to evaluate the chronic effect of chronic intraperitoneal administration of the following CDs: β CD, M- β CD and HP- β CD on biochemical parameters related to liver and renal functions of rats. After 60 days of application, an evaluation was performed through liver enzymes AST, ALT and alkaline phosphatase and renal measures through creatinine and urea, all analyzed by dry chemistry. The increase in serum urea and creatinine indicates change in renal function of the rats treated with β CD. The intraperitoneal administration of M- β CD increased the activity of AST and alkaline phosphatase, which suggests liver disorders, although none of the three tested cyclodextrins have altered the activity of ALT, a marker of liver injury. Some of the observed data are consistent with reports of other authors who tested the CDs by other routes of administration. Other parameters are yet to be evaluated in this model to better understand the changes initially found.

Keywords: *nanotechnology, blood, intraperitoneal, biochemical markers.*

INTRODUÇÃO

A aplicação da nanotecnologia está crescendo cada vez mais em diversas áreas. Um exemplo é a indústria farmacêutica que utiliza nanopartículas com ação carreadora devido à capacidade destas em melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação dos fármacos transportados (BERGMANN, 2008). O controle das propriedades físico-químicas das nanopartículas permite o transporte da substância desejada a novos sítios, além de realizarem a entrega seletiva de um quimioterápico no tecido canceroso ou a proteção de um medicamento até seu alvo (BOURZAC, 2012).

Entre os nano-transportadores estão as beta-ciclodextrinas (β CDs) que são oligossacarídeos cíclicos formados por 7 unidades de glicose, cuja cavidade interna é hidrofóbica e a externa, hidrofílica (PAULA et al., 2012; RATNASOORIYA; RUPASINGHE, 2012), desta forma, elas aumentam a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos em meio aquoso (GLISONI et al., 2012). Apesar de muito utilizadas, algumas CDs não podem ser consideradas atóxicas. Um estudo com a β CD e seus derivados em modelo animal mostrou alterações nos túbulos renais proximais acompanhadas de vacuolização e desintegração celular, indicando a nefrotoxicidade como um importante efeito tóxico (FRANK; GRAY; WEAVER, 1976), assim como os mecanismos que levam à hepatotoxicidade relatada pelo grupo de Bellringer et al. (1995) pela β CD.

Neste trabalho, foram utilizadas a β CD e derivados como a metil-beta-ciclodextrina (M- β CD) e a hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β CD). As duas últimas apresentam maior solubilidade em água que a respectiva β CD natural (TSUCHIYAMA et al., 1988; OU et al., 1994; MOSHER; THOMPSON, 2002) e a HP- β CD, a menor toxicidade (GRILLO et al., 2008 apud LIU, 2000).

Com base nas doses de β CD administradas em ratos, por via oral, pelo grupo de Bellringer et al. (1995) e no percentual (próximo a 5 %) de CDs que atravessam o epitélio intestinal (RAMA et al., 2005), o objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o efeito da administração intraperitoneal de β CDs e derivados sobre alguns parâmetros bioquímicos séricos de toxicidade hepática e renal.

METODOLOGIA

Animais e Reagentes: foram utilizados no experimento 32 ratos machos Wistar de aproximadamente três (3) meses de idade, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Durante o período de ambientação e tratamento, os animais foram mantidos no biotério do Centro Universitário Franciscano sob um ciclo de 12 h claro/escuro, com temperatura mantida em 23 ± 1 °C e livre acesso à água e ração comercial padrão (Germania, Porto Alegre, RS, Brasil) contendo 20,5 % de proteína, 54 % de carboidratos, 4,5 % de fibras, 4 % de lipídeos, 7 % de cinzas e 10 % de umidade). Os procedimentos utilizados nos ensaios foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Franciscano (CEUA/UNIFRA), Santa Maria, RS, Brasil, sob o número 010/2011. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados, assim como sofrimento deles. Os reagentes químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Tratamento: os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos. Todos receberam, 2 vezes ao dia, 0,01 mL de solução salina com ou sem CD/g de rato durante 60 dias, as soluções foram preparadas antes de cada aplicação. A dose diária foi de 65 mg de CDs/kg rato/dia. Os animais foram pesados diariamente e o consumo de água e ração foi registrado semanalmente. Após 60 dias de tratamento, os animais foram mortos, em jejum, por decapitação sem anestesia e o sangue imediatamente retirado e preparado para as determinações posteriores. A via de administração intraperitoneal foi escolhida para desconsiderar os resultados decorrentes de possíveis efeitos sobre o epitélio intestinal de má absorção de nutrientes como relatado pelo grupo de Trautwein et al. (1999) e assim avaliar efeitos mais diretos das ciclodextrinas sobre os parâmetros avaliados neste trabalho.

Preparação do sangue para análises laboratoriais: o sangue total foi coletado, após a decapitação, em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético, EDTA, (Vacuplast[®]) para o hemograma (dados ainda não relatados) e para a determinação dos parâmetros bioquímicos, foi coletado em tubos com gel separador. Após os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm durante 15 minutos e os sobrenadantes, que correspondem ao soro, foram fracionados em microtubos e armazenados a -20 °C para posterior análise. Os níveis séricos de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatinina e ureia foram determinados em um analisador automatizado Vitros 250 (Ortho-Clinical Diagnostics), usando kits Johnson & Johnson pelo método de química seca.

Análise Estatística: os dados foram analisados por ANOVA de uma via. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey quando os valores de F foram significativos. Todos os dados foram analisados pelo SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences software 15 for Windows*). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

Após dois meses de tratamento, a função renal foi avaliada através da concentração de ureia sérica, que aumentou para o grupo β CD ($46 \pm 4,3$ mg/dL) quando comparada ao grupo controle ($37 \pm 2,8$ mg/dL) sem sofrer alteração pela administração de M- β CD ($40 \pm 3,6$ mg/dL) e HP- β CD ($40 \pm 1,7$ mg/dL) (Figura 1A). A medida de creatinina sérica aumentou significativamente para o grupo β CD ($0,62 \pm 0,06$ mg/dL) quando comparada ao grupo controle ($0,49 \pm 0,08$ mg/dL), porém as administrações de M- β CD ($0,56 \pm 0,05$ mg/dL) e HP- β CD ($0,56 \pm 0,1$ mg/dL) não diferiram estatisticamente (Figura 1B).

Para avaliação da função hepática, as atividades de AST sérica aumentaram expressivamente para os grupos M- β CD (518 ± 248 U/L) e HP- β CD (549 ± 122 U/L) quando comparadas ao grupo controle (247 ± 58 U/L) e não foi alterada pela administração de β CD (267 ± 29 U/L) (Figura 2A). Enquanto, a FA apresentou atividade aumentada somente pela administração i.p. da M- β CD (197 ± 47 U/L) quando comparada ao grupo controle (137 ± 35 U/L) e os grupos β CD (124 ± 17 U/L) e HP- β CD (165 ± 19 U/L) não apresentaram diferença significativa (Figura 2B). Porém, a enzima ALT, presente nos hepatócitos e cuja elevação no sangue indica lesão celular, ou seja, lesão hepática, não teve seus níveis séricos alterados para nenhuma das três β CDs administradas i.p. quando estes valores foram comparados ao do grupo controle ($p=0,611$).

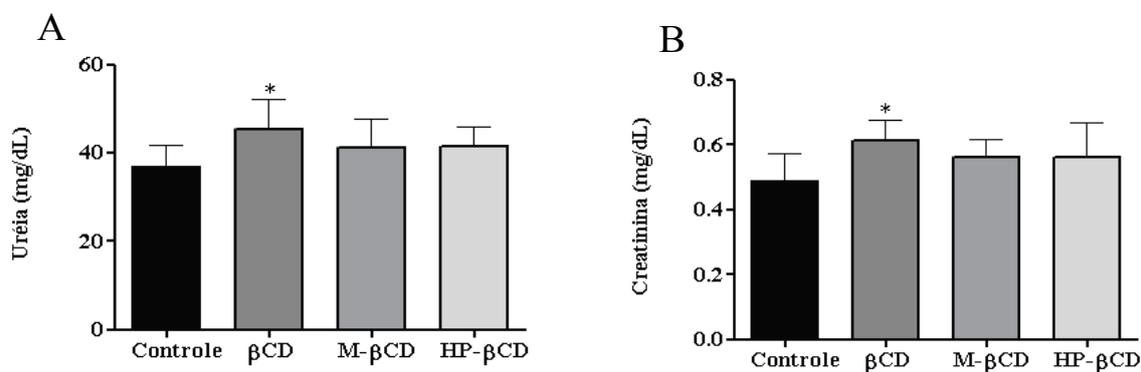


Figura 1 - Efeito da administração intraperitoneal de β CD, M- β CD e HP- β CD sobre os níveis séricos de ureia (A) e creatinina (B). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão para 6-8 experimentos (animais) realizados em duplicata.

* $p < 0,05$, comparados aos respectivos controles (teste de Tukey).

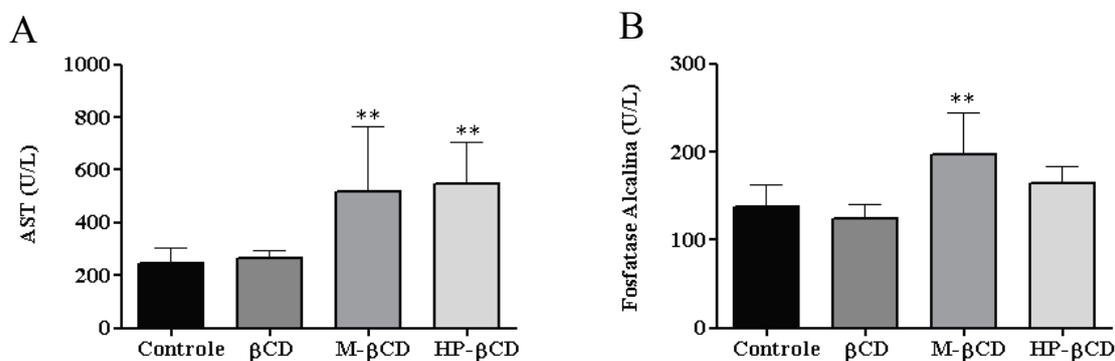


Figura 2 - Efeito da administração intraperitoneal de β CD, M- β CD e HP- β CD sobre as atividades das enzimas séricas AST (A) e FA (B). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão para 6-8 experimentos (animais) realizados em duplicata.

** $p < 0,01$, comparados aos respectivos controles (teste de Tukey).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os primeiros dados avaliados mostram que a administração intraperitoneal de β CD aumentou significativamente os níveis séricos de ureia e creatinina, parâmetros indicativos de lesão renal (DRACZEWSKI; TEIXEIRA, 2011). Bellringer et al. (1995) também relataram lesão renal, porém eles administraram a β CD por via oral e durante 54 meses. Estes autores através da análise histopatológica associaram os resultados obtidos à idade dos animais que no final do tratamento tinham aproximadamente um (1) ano e um (1) mês. Neste estudo, os animais foram mortos com cinco (5) meses, sendo considerados ratos adultos ainda jovens, portanto o resultado encontrado está mais associado à administração de β CD do que a idade dos mesmos. O indicativo de lesão renal não ocorreu com as administrações de M- β CD e HP- β CD.

Bellringer et al. (1995) assim como Mosher e Thompson (2002) relataram aumentos de ALT e AST pela β CD, o que diverge dos resultados deste delineamento experimental, pois esta ciclodextrina não induziu significativamente à lesão hepática. Porém, a administração de M- β CD aumentou os níveis séricos das enzimas AST e FA, o que pode indicar uma lesão hepática inicial, sem alteração significativa para ALT neste período de tratamento. Das três β CDs testadas, a HP- β CD foi a que, em menor grau, causou alguma lesão tecidual, pois houve aumento dos níveis séricos de AST.

Um fator interessante da administração intraperitoneal é que os dados obtidos são independentes de uma possível má absorção de nutrientes na presença de CDs. Outro fator importante é que apesar de nenhum animal ter morrido durante o tratamento, os dados apresentados por nosso grupo sugerem cautela à utilização destas nanoestruturas e mais estudos, uma vez que ainda existem poucos estudos *in vivo* (WANG et al., 2002) sobre a ação destas nanoestruturas. Outros parâmetros já estão sendo estudados para melhor esclarecer os mecanismos que levam aos resultados aqui apresentados.

Assim as primeiras observações são de que a administração i.p. de β CD altera a função renal enquanto a administração de M- β CD indica uma possível lesão hepática.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Renata Raffin pela colaboração prestada e ao apoio financeiro do PPG em Nanociências do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA).

REFERÊNCIAS

BERGMANN, B. R. A Nanotecnologia: da Saúde para Além do Determinismo Tecnológico. *Ciência e Cultura*, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

BELLRINGER, M. E. et al. b-Cyclodextrin: 52-Week Toxicity Studies in the Rat and Dog. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995.

BOURZAC, K. Nanotechnology: Carrying drugs. **Nature**, v. 491(7425), p. S58-60, 2012.

DRACZEWSKI, L.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do perfil bioquímico e parâmetros hematológicos em pacientes submetidos à hemodiálise. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, p. 15-22, 2011.

FRANK, D. W.; GRAY, J. E.; WEAVER, R. N. Cyclodextrin nephrosis in the rat. **American Journal of Pathology**, v. 83, p. 367-382, 1976.

GLISONI, R. J. et al. β -Cyclodextrin hydrogels for the ocular release of antibacterial thiosemicarbazones. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 1-41, 2012.

LIU, R. Water Insoluble Drug Formulation. **Interpharm/CRC**. New York: Press, 2000.

MOSHER, G.; THOMPSON, D. O. Complexation and Cyclodextrins. In SWAEBRICK, J.; BOYLAN, J. C. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 2 ed. v. 1, p. 531-558, New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002.

OU, D. et al. Some Pharmaceutical Properties of 2,3,6-Partially Methylated- β -Cyclodextrin and its Solubilizing and Stabilizing Abilities. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p. 2005-2016, 1994.

PAULA, E. E. B. de et al. Insights into the multi-equilibrium, superstructure system based on β -cyclodextrin and a highly water soluble guest. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 207-215, 2012.

RAMA, A. C. R. et al. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 281-299, 2005.

RATNASOORIYA, C. C.; RUPASINGHE, H. P. V. Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 134, p. 625-631, 2012.

TRAUTWEIN, E. A. et al. Impact of L-cyclodextrin and resistant starch on bile acid metabolism and fecal steroid excretion in regard to their hypolipidemic action in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1437, p. 1-12, 1999.

TSUCHIYAMA Y. et al. Partially Methylated Cyclodextrins and Process for the Producing the Same. **US Patent**, v. 4, p. 734-746, 1988.

WANG, H. et al. Liver Pyruvate Kinase Polymorphisms Are Associated With Type 2 Diabetes in Northern European Caucasians. **American Diabetes Association**, v. 51, p. 2861-2865, 2002.