

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E TOXICOLÓGICO DE DIMETIL((2-CLOROFENIL)((1-(FENILSELANIL)PROPAN-2- IL)AMINO)METIL)FOSFONATO.

ANE GABRIELA VOGT¹; JAINI JANKE PALTIAN²; PATRÍCIA CECÍLIA DA SILVA³
MÁRCIO SANTOS SILVA⁴; ETHEL ANTUNES WILHELM⁵, CRISTIANE
LUCHESE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – aneg.vogt@gmail.com- ² Universidade Federal de Pelotas –
jaini_paltian@hotmail.com- ³Universidade Federal do ABC – paticsilva@hotmail.com-
⁴Universidade Federal do ABC- s.marcio@ufabc.edu.br -⁵Universidade Federal de Pelotas -
ethelwilhelm@yahoo.com.br (coorientadora)-⁶Universidade Federal de Pelotas -
cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A dor é descrita pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (1994), como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, definida como a sensação determinada pelo estímulo das fibras aferentes primárias, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam a percepção final do processo doloroso (BALIKI e APKARIAN, 2015). Tendo em vista que a dor diminui drasticamente a qualidade de vida de seus portadores e que as terapias disponíveis atualmente, como os fármacos analgésicos, possuem importantes efeitos adversos, dificultando assim o uso contínuo, a busca de novos compostos que visam o tratamento da dor têm aumentado expressivamente nos últimos anos (PINZ et al., 2016; WILHELM et al., 2017).

Nesse sentido, destacam-se os compostos orgânicos de selênio, pelo fato dos mesmos possuírem importantes atividades biológicas (PINZ et al., 2016; WILHELM et al., 2017). Paralelamente, aos compostos orgânicos de selênio estão os compostos derivados de α -aminofosfônicos. Estes apresentam várias propriedades, tais como agentes anti-cancerígenos, antibacterianos, antibióticos (MULLA et al., 2014). Desta forma, a combinação entre o elemento selênio com derivados de α -aminofosfônicos poderia melhorar o potencial farmacológico destes compostos, podendo vir a ser uma alternativa terapêutica no tratamento da dor.

Além disso, vários esforços estão sendo direcionados para o estudo dos mecanismos envolvidos na toxicidade de compostos de selênio (NOGUEIRA et al., 2010), e também de compostos derivados de α -aminofosfônicos, tendo em vista que estes são utilizados como herbicidas e fungicidas, podendo apresentar certa toxicidade. Desta forma, considerando, a necessidade da descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor e as promissoras atividades biológicas de compostos orgânicos de selênio, bem como dos derivados α -aminofosfônicos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo e os possíveis efeitos toxicológicos de dimetil((2-clorofenil)((1-(fenilselanil)propan-2-il)amino)metil)fosfonato (Composto **A**), um novo composto derivado de α -aminofosfônicos contendo selênio em camundongos.

2. METODOLOGIA

O Composto **A** (Figura 1) foi sintetizado e caracterizado na Universidade

Federal do ABC. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº CEEA 1289-2016).

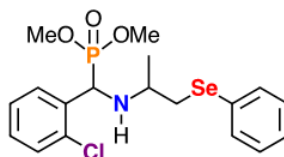


Figura 1. Estrutura do Composto A

2.1. Testes comportamentais

Afim de avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais foi realizado o teste do campo aberto, e para avaliação da ação antinociceptiva do composto **A**, realizou-se o teste da placa quente e o teste de nocicepção induzida por glutamato em camundongos.

Os comportamentos locomotor e exploratório foram avaliados no teste do campo aberto (WALSH E CUMMINS, 1976). No teste do glutamato, 30 minutos após o tratamento com o composto **A** (50 mg/kg p.o.), os camundongos receberam uma injeção de glutamato (20 µmol, 20 µl/pata, intraplantar (i.pl.)) na pata posterior direita e solução salina (0,9%, 20 µl/pata, i.pl.) na pata posterior esquerda. Posteriormente os camundongos foram observados individualmente durante 15 minutos e o tempo gasto em lambar e ou morder a pata injetada com glutamato foi registrada e considerada como comportamento de resposta nociceptiva (BEIRITH et al., 2002).

O teste da placa quente foi realizado conforme descrito por Woolfre e MacDonald (1944). Neste teste, os animais foram colocados sobre uma chapa de metal previamente aquecida a 55 ± 1 °C. A latência das respostas nociceptivas como lambar, sacudir as patas ou saltar foi cronometrada e considerada como indicativo do efeito antinociceptivo. Para a realização deste ensaio, cada animal antes do tratamento foi submetido a um pré-teste para avaliar a nocicepção basal. Vinte e quatro horas após os camundongos foram tratados com o composto **A** (50 mg/kg, p.o.) ou veículo (óleo de canola, 10 ml/kg, p.o). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram colocados sobre a chapa quente. A latência da resposta nociceptiva foi calculada de acordo com a fórmula: Δt (s) = latência pós-tratamento - latência de pré-tratamento.

2.2. Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade foi realizada de acordo com o Guia 423 da OCDE (2001) com algumas modificações. Os camundongos receberam uma única dose oral do composto **A** (300 mg/kg) ou veículo (10ml/kg) e foram observados por até 72 h para determinar o potencial letal deste composto.

Após 72 horas, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando isoflurano, o sangue foi coletado por punção cardíaca, e também foram retirados os tecidos fígado, rim e cérebro. As determinações das atividades da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram utilizadas como marcadores de lesão hepática aguda, e foram determinadas colorimetricamente de acordo com Reitman e Frankel (1957). Adicionalmente, determinou-se os níveis de ureia plasmática, segundo Mackay e Mackay (1927), como parâmetro de lesão renal. Além disso, foi realizada a determinação da atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), em amostras de fígado, cérebro e rim. A atividade de δ -ALA-D foi realizada de acordo com o método de Sassa (1982). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

2.3. Análise estatística

Os dados deste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados usando um teste *t* pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Figura 2a, o composto **A** (50 mg/kg, p.o) reduziu em 86% o tempo de lambida/mordida da pata após a administração de glutamato, quando comparado ao grupo controle. Os resultados sugerem que o composto **A** apresenta ação antinociceptiva e que a modulação do sistema glutamatérgico pode estar envolvida no seu mecanismo de ação. Também foi demonstrado que o pré-tratamento com composto **A** aumentou a latência de resposta ao estímulo térmico, aumentando o tempo de latência em 22%, quando comparado ao grupo controle (Figura 2b). Estes achados sugerem que o composto **A** exerce ação central e está de acordo com o resultado obtido no teste de glutamato. Outra observação importante foi que o composto **A** não alterou as atividades locomotoras e exploratórias no teste de campo aberto (dados não mostrados).

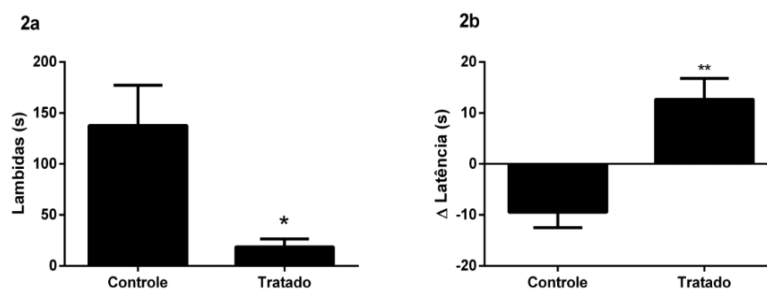


Figura 2. Efeito antinociceptivo do composto **A** (50 mg/kg p.o.) no teste do glutamato (a); e no teste da placa quente (b). ANOVA unidirecional seguido de teste *t* pareado. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

Além disso, demonstrou-se que uma única administração oral do composto **A** não causou nenhum sinal de toxicidade aguda. Além disso, o tratamento com a dose de 300 mg/kg não provocou a morte dos camundongos expostos. Os níveis de ureia e a atividade das enzimas ALT e AST não foram modificados pela administração de composto **A**, bem como não houve alteração na atividade da enzima δ -ALA-D no cérebro, nos rins e no fígado dos camundongos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de uma única administração oral do composto **A** (300 mg/kg) em parâmetros bioquímicos em camundongos.

	Controle	Composto A (300 mg/kg)
AST (U/l)	55,1 \pm 2,6	55,6 \pm 0,1
ALT (U/l)	35,7 \pm 4,1	41,6 \pm 14,2
Ureia (mg/dl)	69,6 \pm 9,3	44,5 \pm 6,5
δ - ALA D cérebro (nmol PBG/mg proteína/h)	3,2 \pm 0,4	2,4 \pm 0,2
δ - ALA D fígado (nmol PBG/mg proteína/h)	39,4 \pm 3,9	32,0 \pm 0,3
δ - ALA D rim (nmol PBG/mg proteína/h)	4,1 \pm 0,2	3,9 \pm 0,3

Os dados são relatados como média \pm E.P.M. de 3 camundongos em cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* pareado.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o composto **A** exerce ação antinociceptiva aguda sem alterar as atividades locomotoras e exploratórias ou induzir toxicidade. Esses dados sugerem que o composto **A** tem um potencial terapêutico para o tratamento de condições clínicas dolorosas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron Perspective**. n. 87, 2015.
- BEIRITH, A., SANTOS, A. R., CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw o edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain. Research**. v. 924: 219, p. 228, 2002.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248–254, 1976.
- IASP. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Task Force on Taxonomy**. 2a ed. Seattle, WA: IASP Press, 1994. p. 209-214.
- MACKAY, E. M., MACKAY, L. L. The concentration of urea in the blood of normal individuals. **Journal Clinical Investigation**. v. 4, p.295–306, 1927.
- MULLA, S. A. R.; PATHAN, M. Y.; CHAVAN, S.S.; S. P. GAMPLE, S. P.; SARKAR, D. Highly efficient one-pot multi-component synthesis of α -aminophosphonates and bis- α -aminophosphonates catalyzed by heterogeneous reusable silica supported dodecatungstophosphoric acid (DTP/SiO₂) at ambient temperature and their antitubercular evaluation against *Mycobacterium Tuberculosis*. **RSC Advances**, v. 4, p. 7666-7672, 2014.
- NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**. 104, 6255- 6285, 2004.
- PINZ, M. PINZ, M.; REIS, A.; DUARTE, V.; ROCHA, M. J.; GOLDANI, B.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselanyl-7 chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**. v. 780, p. 122-128, 2016.
- REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 28, p. 56–63, 1957.
- SASSA, S. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**. v. 28, p. 133–145, 1982.
- WALSH, R. N., CUMMINS, R. A. Open-Field Test critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83, p. 482 – 504, 1976.
- WILHELM, E. A.; FERREIRA, A. T.; PINZ M. P.; DOS REIS, A.; VOGT A. G.; STEIN, A. L.; ZENI, G.; LUCHESE, C. Antioxidant effect of quinoline derivatives containing or not selenium: Relationship with antinociceptive action quinolines are antioxidant and antinociceptive. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 89, p. 457-467, 2017.
- WOOLFRE, H. G., MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 80, p. 300–307, 1944.