

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E TOXICOLÓGICO DO DISSELENETO DE BIS-(3-AMINO-2-PIRIDINA) EM CAMUNDONGOS

**JAINI JANKE PALTIAN¹; ANE GABRIELA VOGT²; ANGÉLICA SCHIAVOM REIS³;
THIAGO JACOBSEN PEGLOW⁴; RICARDO FREDERICO SCHUMACHER⁵;
ETHEL ANTUNES WILHELM⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – jaini_paltian@hotmail.com ²Universidade Federal de Pelotas – aneg.vogt@gmail.com ³Universidade Federal de Pelotas – ge_schiavon@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – thiago_lasol@yahoo.com.br ⁵Universidade Federal de Pelotas – ricardo.schumacher@ufpel.edu.br ⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos. Além disso, a dor exerce um importante papel, atuando como mecanismo de defesa e deixando o organismo em estado de alerta. Essa percepção sensorial é denominada nocicepção, um processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOESER e TREEDE, 2008). A dor causa reações emocionais negativas e, quando persistente, torna-se debilitante e causadora de sofrimento (MILLAN, 1999). Diante disso, o interesse em identificar novos alvos para o tratamento da dor e inflamação tem aumentado expressivamente nos últimos anos.

Nesse sentido, as piridinas têm atraído atenção na busca e desenvolvimento de novos fármacos (UMEI et al., 2017). De fato, vários estudos têm abordado os potenciais efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios dos derivados de piridina (HA et al., 2013; HELAL et al., 2015). Em paralelo, destacam-se os compostos orgânicos de selênio, os quais possuem síntese simples e atividades farmacológicas relevantes (NOGUEIRA e ROCHA, 2011). Desta forma, o estudo de derivados de piridinas contendo selênio pode ser uma alternativa na busca de novos compostos com propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do disseleneto de bis-(3-amino-2-piridina) (BAPD) - um novo derivado de piridina contendo selênio - induzido por glutamato, bem como o envolvimento do sistema glutamatérgico nesta ação. Além disso, investigou-se os possíveis efeitos toxicológicos causados pelo BAPD em camundongos.

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (nº CEEA 1289 -2016). Nos experimentos realizados foram utilizados camundongos machos adultos Swiss (20-25 g).

O BAPD (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da UFPel de acordo com PEGLOW e colaboradores (2017).

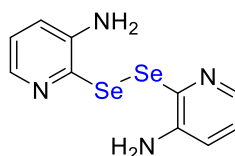


Figura 1. Estrutura química do BAPD.

O efeito antinociceptivo do BAPD foi avaliado através do teste do glutamato seguindo a metodologia descrita por BEIRITH e colaboradores (2002). Os camundongos foram tratados por via oral com BAPD (0,1 - 50 mg/kg v.o.) ou veículo (óleo de canola, 10 ml/kg, v.o.) 30 minutos antes da injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato (20 μ mol/pata, 20 μ l) na pata posterior direita e salina (0.9 %, 20 μ l) na pata posterior esquerda. Após a administração i.pl. do glutamato os camundongos foram observados individualmente durante 15 minutos e o tempo de lambida na pata injetada com glutamato foi cronometrado. Transcorrido o período de observação, os animais foram submetidos a eutanásia e as patas foram removidas e pesadas para determinar o edema formado.

Adicionalmente, foi avaliado o possível envolvimento do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) na atividade antinociceptiva demonstrada pelo composto BAPD. Este envolvimento foi avaliado utilizando MK - 801 (0,02 mg/kg intraperitoneal, i.p.), um antagonista não competitivo do receptor de NMDA. Quinze minutos após a administração do MK - 801 ou do veículo (salina 10 ml/kg, i.p.), os animais receberam BAPD (50 mg/kg, v.o.) e após 30 min, a injeção de glutamato na pata. Além disso, todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliação das atividades locomotora e exploratória (WALSH e CUMMINS, 1976).

Com intuito de avaliar o efeito toxicológico do BAPD, os camundongos receberam uma única dose oral de BAPD (50 ou 300 mg/kg) ou seu veículo e, logo após, foram observados por 72h. Foram realizados ensaios bioquímicos no plasma para determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de acordo com REITMAN e FRANKEL (1957). Paralelamente, determinaram-se os níveis de ureia plasmática, segundo MACKAY e MACKAY (1927).

Ademais, foram determinados parâmetros de estresse oxidativo como os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tióis não proteicos (NPSH), assim como a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), em amostras de cérebro, fígado e rim. Os níveis de TBARS foram determinados de acordo com o método descrito por OHKAWA e colaboradores (1976). Os níveis de NPSH foram determinados conforme metodologia descrita por ELLMAN (1959). Além disso, a atividade da enzima δ -ALA-D foi determinada conforme método descrito por SASSA (1982).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstrados na Figura 2 revelam que o tratamento com BAPD inibiu a resposta nociceptiva causado pela injeção de glutamato a partir da dose de 0,1 mg/kg. Além disso, foi demonstrado que o composto BAPD (50 mg/kg) reduziu em 100% o tempo de lambida após a administração do glutamato

(Figura 2A), quando comparado em grupo controle. Paralelamente, o pré-tratamento com o composto foi efetivo em reduzir 58%, 50% e 36% o edema (Figura 2B) nas doses de 5, 25 e 50 mg/kg, respectivamente; sugerindo potenciais ações antinociceptivas e anti-inflamatórias. Além disso, o BAPD não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos camundongos (dados não demonstrados).

O pré-tratamento com MK-801 não foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo demonstrado pelo BAPD. Em linha com esses resultados, esses dados sugerem que a modulação do receptor NMDA não contribuiu para o efeito antinociceptivo do BAPD. No entanto, não podemos descartar o envolvimento de outros receptores glutamatérgicos nesta ação farmacológica do BAPD (Figura 2C).

Por outro lado, uma única administração por via oral de BAPD (50 ou 300 mg/kg) não causou a morte dos animais. Além disso, as atividades de ALT e AST, e os níveis de ureia permaneceram inalterados após tratamento com o BAPD, quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Os níveis de NPSH e TBARS, assim como, a atividade da δ -ALA-D mantiveram-se inalteradas após o tratamento com BAPD (50 ou 300 mg/kg) (Tabela 2).

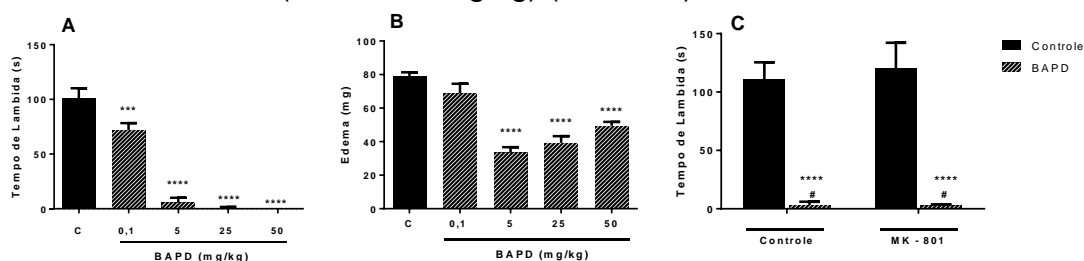


Figura 2. Efeito antinociceptivo do BAPD no teste do glutamato (A) tempo de lambida, (B) edema e (C) o envolvimento do receptor NMDA na sua ação. Os asteriscos indicam níveis de significância quando comparados com o grupo controle (***) $P < 0,001$; (****) $P < 0,0001$ e (#) $P < 0,0001$ indica níveis de significância quando comparados ao grupo MK-801. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 1. Efeito de uma única administração oral de BAPD (50 ou 300 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos em camundongos.

	Controle	BAPD (50 mg/kg)	BAPD (300 mg/kg)
AST (U/l)	77,2 ± 10,4	66,6 ± 9,4	49,7 ± 5,5
ALT (U/l)	104,5 ± 27,2	57,3 ± 3,4	90,5 ± 37,7
Ureia (mg/dl)	70,2 ± 9,5	61,9 ± 1,6	68,8 ± 13,4

Os dados são expressos como média ± E.P.M. de 3 camundongos por grupo. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Tabela 2. Efeito de uma única administração oral de BAPD (50 ou 300 mg/kg) nos parâmetros de estresse oxidativo no cérebro, rim e fígado de camundongos.

	NPSH ($\mu\text{mol NPSH/g tecido}$)			TBARS (nmol MDA/mg proteína)			δ -ALA-D (nmol PBG/mg proteína/h)		
	Cérebro	Rim	Fígado	Cérebro	Rim	Fígado	Cérebro	Rim	Fígado
Controle	1,73±0,06	2,29±0,09	6,55±0,19	0,62±0,04	1,70±0,08	2,16±0,16	1,09±0,02	0,79±0,10	8,83±0,29
BAPD									
50 mg/kg	1,73±0,01	2,18±0,27	5,57±0,63	0,61±0,02	2,21±0,31	2,02±0,01	1,12±0,04	0,78±0,02	8,32±0,53
300 mg/kg	1,73±0,03	2,36±0,13	6,26±0,43	0,50±0,07	1,69±0,23	2,02±0,12	1,07±0,03	0,70±0,07	8,09±0,44

Os dados são expressos como média \pm E.P.M. de 3 camundongos por grupo. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4. CONCLUSÕES

Portanto, com base nos resultados demonstrados, o BAPD produziu efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em camundongos sem causar toxicidade. Contudo, não parece exercer seu efeito através da modulação do receptor de NMDA. Dessa forma, mais estudos são necessários para averiguar o envolvimento de outras vias no efeito demonstrado pelo BAPD.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIRITH, A., SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v.924, p.219-228, 2002.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p.70-77, 1959.
- HA, T.H., RYU, H., KIM, S.E., KIM, H.S., ANN, J., TRAN, P.T., HOANG, V.H., SON, K., CUI, M., CHOI, S., FRANK, R. TRPV1 antagonist with high analgesic efficacy: 2-Thio pyridine C-region analogues of 2-(3-fluoro-4-methylsulfonylaminophenyl) propanamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.6657-6664, 2013.
- HELAL, M.H., EL-AWDAN, S.A., SALEM, M.A., ABD-ELAZIZ, T.A., MOAHAMED, Y.A., EL-SHERIF, A.A., MOHAMED, G.A.M. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel series of pyridine derivatives as anticancer, anti-inflammatory and analgesic agents. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.135, p.764-773, 2015.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The kyoto protocol of iasp basic pain terminology. **Pain**, v.137, p.473-477, 2008.
- MACKAY, E. M., & MACKAY, L. L. The concentration of urea in the blood of normal individuals. **The Journal of Clinical Investigation**, v.4, p.295, 1927.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.
- NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v.85, p.1313-1359, 2011.
- 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.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1976.
- UMEI, K., NISHIGAYA, Y., KONDO, A., TATANI, K., TANAKA, N., KOHNO, Y., SETO, S. Novel pyrazolo [1, 5-a] pyridines as orally active EP 1 receptor antagonists: Synthesis, structure-activity relationship studies, and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, p.2635-2642, 2017.
- PEGLOW, T.J., SCHUMACHER, R.F., CARGNELUTTI, R., REIS, A.S., LUCHESE, C., WILHELM, E.A., PERIN, G. Preparation of Bis(2-pyridyl) diselenide Derivatives: Synthesis of Selenazolo[5,4-b]pyridines and Unsymmetrical Diorganyl Selenides, and Evaluation of Antioxidant and Anticholinesterasic Activities. **Tetrahedron Letters**, v.58, p.3734-3738, 2017.
- WALSH, R. N., CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.