

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE 3-FENIL-5 - ((FENILMEANIL) METIL) -4,5-DI-HIDROISOXAZOLE EM CAMUNDONGOS

PAOLA DOS SANTOS SOARES¹; MIKAELA PEGLOW PINZ²; EDER JOÃO
LENARDÃO³; ERIC FRANCIS LOPES⁴; CRISTIANE LUCHESE⁵; ETHEL
ANTUNES WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – p-soaress@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mikaelappinz@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – elenardao@uol.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – eric.francislopes@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é uma defesa do organismo a um dano tecidual e consiste em um complexo processo biológico que envolve componentes celulares, vasculares (CRUVINEL et al., 2010), além da síntese e liberação de vários mediadores como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e interferon gama (INF- γ) (ZHAO et al., 2007). A inflamação apresenta calor, edema, rubor, dor e prejuízo funcional como sinais clínicos característicos. Esse processo tem como intenção retirar o estímulo indutor da resposta inflamatória e iniciar a recuperação tecidual local (CRUVINEL et al., 2010).

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) são os fármacos geralmente utilizados para o tratamento da dor e inflamação. Os AINES apresentam como mecanismo de ação a inibição das enzimas ciclooxigenases (COXs), reduzindo a síntese de prostaglandinas e diminuindo assim a intensidade do processo inflamatório. Porém, a principal limitação do uso de AINES são os seus efeitos colaterais, dentre eles, efeitos gastrointestinais, renais e cardíacos (MURI et al., 2009). Os coxibes (celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe), são fármacos inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2), e apresentam menor incidência de reações adversas gastrointestinais, no entanto apresentam maior risco cardiovascular (SARAIVA, 2007).

Neste contexto, há um crescente interesse na busca de novos compostos que exerçam atividade anti-inflamatória com ausência de efeitos adversos. Os compostos orgânicos de selênio, apresentam atividades farmacológicas bastante relevantes, dentre elas cabe-se destacar a atividade anti-inflamatória, (LUCHESE et al., 2012; PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017), podendo ser uma terapia promissora. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória de um novo composto orgânico de selênio, com componentes estruturais do fármaco valdecoxibe.

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (CEEa 1987). Foram utilizados camundongos machos adultos da raça *Swiss* (25-35 g) provenientes do Biotério da UFPEL.

O composto 3-fenil-5 - ((fenilmeanil) metil) -4,5-di-hidroisoxazole (PPSEI45) (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPEL.

Para avaliação da atividade anti-inflamatória, os animais foram divididos em cinco grupos de 6 animais. Os animais foram pré-tratados com PPSEI45 (50 mg/kg; por via *per oral* (p.o.)), veículo (óleo de canola, 10 ml/kg, p.o.) ou celecoxibe (fármaco de referência; 50 e 100 mg/kg, p.o.), trinta minutos antes da indução da resposta inflamatória.

O edema de orelha foi induzido por óleo de cróton (um agente flogístico), de acordo com Tubaro et al. (1986) e Romay et al. (1998), com algumas modificações. Os resultados obtidos foram representados em mg. Posteriormente, os animais foram submetidos a eutanásia e as orelhas foram utilizadas para determinar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de acordo com o método de Suzuki e colaboradores (1983). A atividade da MPO é considerada como um indicador de ativação de neutrófilos sob a influência de condições pró-oxidativas e pró-inflamatórias (KANDHARE et al., 2012; HONMORE et al., 2015). Os resultados foram expressos como densidade óptica (DO)/mg de proteína/min.

Para avaliar a toxicidade do composto, os camundongos foram divididos em dois grupos de 3 animais e receberam uma dose oral única de PPSEI45 (300 mg/kg) ou óleo de canola, e foram observados por 72 h. Posteriormente, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O plasma foi obtido para determinações das atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), utilizadas como marcadores de lesão hepática aguda, determinadas colorimetricamente de acordo com Reitman e Frankel (1957). Adicionalmente, determinou-se os níveis de ureia, segundo Mackay e Mackay (1927), como parâmetro de lesão renal. Os resultados das enzimas foram expressos em U/l e da ureia em mg/dl. Adicionalmente, foram coletadas amostras de fígado, rim e cérebro para verificar a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), conforme método descrito por Sassa (1982). δ -ALA-D é uma enzima marcadora de dano oxidativo (NOGUEIRA et al., 2004) e os valores obtidos foram expressos em nmol PBG/mg proteína/h.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman Keuls. Para análise da toxicidade foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste t não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

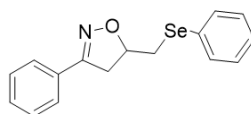


Figura 1. Estrutura química de 3-fenil-5 - ((fenilmetil) metil) -4,5-dihidroisoxazole (PPSEI45)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados demonstram que o óleo de cróton induziu o edema de orelha, quando comparado ao grupo controle, ocasionando um processo inflamatório. O composto PPSEI45 na dose de 50 mg/kg e o celecoxibe na dose de 100 mg/kg, foram capazes de reduzir o edema de orelha conforme figura 2A, demonstrando o efeito anti-edematogênico e anti-inflamatório deste composto. Cabe ressaltar que o PPSEI45 apresentou efeito em dose menor que o fármaco de referência. Os dados demonstrados na figura 2B revelam que o óleo de cróton aumentou significativamente a atividade da enzima MPO quando comparado ao grupo controle. A atividade da MPO foi reduzida pelo PPSEI45 na dose de 50 mg/kg, enquanto o celecoxibe apresentou efeito na dose de 100 mg/kg. Essa redução pode se dar devido a seu potencial anti-inflamatório, sugerindo que seja um dos

importantes mecanismos que estão envolvidos na ação desse composto, estando atrelado à diminuição da infiltração de neutrófilos e macrófagos nos tecidos da orelha (KANDHARE et al., 2012; HONMORE et al., 2015).

A administração oral de PPSEI45 (300 mg/kg) não causou toxicidade em camundongos e não ocasionou a morte dos animais. De acordo com a tabela 1 o PPSEI45 (300 mg/kg) não alterou a atividade das enzimas AST e ALT e os níveis de ureia quando comparados ao grupo controle. Além disso, as atividades da δ -ALA-D cerebral, renal ou hepática, permaneceram inalteradas após o tratamento com o PPSEI45, conforme tabela 2.

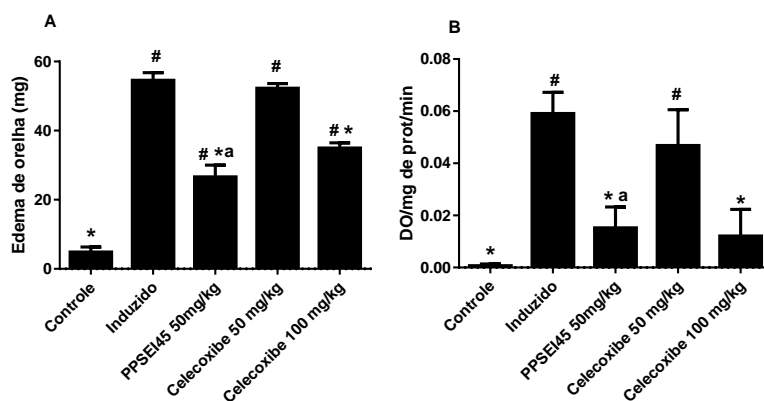


Figura 2. Efeito do composto 3-fenil-5 - ((fenilmeanil) metil) -4,5-di-hidroisoxazole (PPSEI45) (A) no tratamento de edema de orelha induzido por óleo de cróton e (B) atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo. (#) denota $p < 0,05$, em relação ao grupo controle. (*) denota $p < 0,05$, em comparação com o grupo induzido. (a) denota $p < 0,05$, em comparação ao grupo celecoxibe de 50 mg/kg (análise de variância de uma via/teste de Newman-Keuls).

Tabela 1. Efeito do 3-fenil-5 - ((fenilmeanil) metil) -4,5-di-hidroisoxazole (PPSEI45) na dose de 300 mg/kg nos marcadores bioquímicos plasmáticos em camundongos.

	Controle	PPSEI45
AST (U/l)	55 \pm 9	61 \pm 6
ALT (U/l)	62 \pm 13	49 \pm 32
Ureia (mg/dl)	70 \pm 20	49 \pm 1

Tabela 2. Efeito de PPSEI45 300 mg/kg na atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) no fígado, rim e cérebro de camundongos.

	Controle	PPSEI45
Fígado (nmol PBG/mg proteína/h)	39 \pm 4	30 \pm 3
Rim (nmol PBG/mg proteína/h)	4 \pm 1	4 \pm 1
Cérebro (nmol PBG/mg proteína/h)	3 \pm 1	1 \pm 1

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que o PPSEI45 exerce efeito anti-inflamatório em modelos experimentais relevantes e em doses mais baixas do que o celecoxibe. Esses dados sugerem que o PPSEI45 possui um potencial terapêutico para o tratamento inflamatório agudo, sem exercer toxicidade renal e hepática, e alterar a atividade da δ -ALA-D (marcador de dano oxidativo). Apesar disso, é necessário elucidar os mecanismos envolvidos na ação deste composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUVINELI W.M.; MESQUITA D.J.; ARAÚJO J.A.P. CATELANIV T.T.T.; DE SOUZA A.W.S.; SILVA N.P.I; ANDRADE L.E.C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** vol.50 no.4 São Paulo July/Aug. 2010.
- HONMORE, V.; KANDHARE, A.; ZANWAR, A. A.; ROJATKAR, S.; BODHANKAR, S.; NATU, A. Artemisia pallens alleviates acetaminophen induced toxicity via modulation of endogenous biomarkers. **Pharm. Biol.** 2015, 53, 571- 581.
- KANDHARE, A. D.; RAYGUDE, K. S.; GHOSH, P.; GHULE, A.E.; BODHANKAR, S. L. Therapeutic role of curcumin in prevention of biochemical and behavioral aberration induced by alcoholic neuropathy in laboratory animals. **Neurosci. Lett.** 2012, 511, 18- 22.
- LUCHESI, C.; PRIGOL, M.; DUARTE, M. M. M. F.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. **Inflamm. Res.** 2012, 61, 1117- 1124.
- MacKay, E. M.; MacKay, L. L. The concentration of urea in the blood of normal individuals. *J. Clin. Invest.* 1927,4, 295.
- MURI E.M.F.; SPOSITO M.M.M.; METSAVAHT L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **ACTA FISIATR** 2009; 16(4): 186 – 190.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.** 2004, 104, 6255- 6285.
- PINZ, M.; REIS, A.; DUARTE, S. V.; DA ROCHA, M. J.; GOLDANI, B. S.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-Phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **Eur. J. Pharmacol.** 2016, 780, 122-128.
- REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1957, 28, 56- 63.
- ROMAY, C.; LEDON, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of hycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* 1998, 47, 334- 338.
- SARAIVA J.F.K. COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente. **Phaenix Comunicação Integrada**, 2007.São Paulo: 1-5.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme.** 1982, 28, 133-145.
- SILVA, V. D. G.; REIS, A. S.; PINZ, M.; DA FONSECA, C. A. R.; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 2017, In Press.
- SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal. Biochem.** 1983, 132, 345- 352.
- ZHAO, L.; TAO, J. Y.; ZHANG, S. L.; PANG, R.; JIN, F.; DONG, J.H.; GUO, Y. J. Inner anti-inflammatory mechanisms of petroleum ether extract from *Melilotus suaveolens* Ledeb. **Inflammation.** 2007, 30, 213- 23.
- TUBARO, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Dellaloggia, R. The croton-oil ear test revisited. **Agents. Act.** 1986, 117, 347- 349.