

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO COMPOSTO 3-(PIRIDIN-2-IL) -2-(PIRIDIN-2-ILIMINO) TIAZOLIDIN-4-ONA (PPIT) EM CAMUNDONGOS

AMÁLIA GONÇALVES ALVES¹; JOSÉ COAN CAMPOS JUNIOR²; LUIZ ROBERTO CARRARO JUNIOR²; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH²; CÉSAR AUGUSTO BRUNING²; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO³

¹*Universidade Federal de Pelotas – amaliaavgs@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – coan.junior@ufpel.edu.br; luizrobertocarraro@hotmail.com; taisteixeira.r@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br;*

³*Universidade Federal de Pelotas – cbortolatto@gmail.com;*

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos exige a execução de testes pré-clínicos e clínicos, porém muitos compostos candidatos não alcançam a aprovação regulatória devido à toxicidade induzida em diversos órgãos, onde cerca de metade dos candidatos pré-clínicos que estão em pesquisa são descontinuados devido os efeitos hepatotóxicos que apresentam (OZER, et al., 2007).

Para a realização dos testes pré-clínicos que mensuram os padrões de toxicidade, geralmente são usados modelos animais, sendo os roedores um dos mais empregados. Através deles é possível compreender as causas mecanísticas de doenças humanas, desenvolver tratamentos eficazes e direcionados, testar produtos verificando a segurança e eficácia dos mesmos para aplicação humana, biologia do desenvolvimento, envelhecimento, dentre outros (VANDAMME, 2014).

Os biomarcadores são indicadores mensuráveis de uma determinada função patológica ou normal de um organismo ou uma resposta a um agente farmacológico (THATCHER, B. J. e CAPUTO, 2008). A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), são enzimas que catalisam a transferência redutiva de um grupo amino de alanina ou aspartato, para alfa-cetoglutarato produzindo glutamato e piruvato ou oxaloacetato, respectivamente. (MCGILL M., 2016; OZER, et al., 2007).

Os hepatócitos quando danificados extravasam seu conteúdo, incluindo AST e ALT, para o espaço extracelular e estas enzimas entram na circulação tendo, como consequência, o aumento dos níveis séricos de ALT e AST. A AST está localizada no coração, cérebro, músculo esquelético e tecido hepático, a atividade sérica da mesma tem relação com a toxicidade hepática, lesão cardíaca e muscular esquelética (MCGILL M., 2016; OZER, et al., 2007). A ALT está localizada principalmente no fígado, com atividades enzimáticas mais baixas encontradas no músculo esquelético e no tecido cardíaco e o aumento dos níveis séricos reflete a danos causados nos hepatócitos (WASHINGTON I. M., e VAN HOOSIER G., 2012). Esta enzima é um biomarcador sensível e específico de hepatotoxicidade servindo de parâmetro para a continuidade ou descontinuidade de uma pesquisa (OZER, et al., 2007).

O rim apresenta diversas funções importantes para a homeostase do organismo como a eliminação de drogas e toxinas. A ureia é o principal metabólito de nitrogênio encontrado no soro e é derivado da degradação de proteínas (DE ALMEIDA et al., 2016). A ureia sérica é amplamente usada como um parâmetro para avaliar a função renal, i.e., concentrações anormais deste biomarcador são indicativos de processos patológicos, como a insuficiência renal (ALMEIDA et al., 2016).

Os compostos de 2-imino-tiazolidin-4-ona têm demonstrado propriedades farmacológicas de amplo espectro como antifúngicas, antimicrobianas, antitumorais, anti-HIV, antiinflamatórias e antioxidantes (RIDA et al., 2007; ALI et al., 2015; SECCI et al., 2016; METWALLY et al., 2019;). O composto 3-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilimino) tiazolidin-4-ona (PPIT) foi projetado pela estratégia de hibridização molecular ligando a 2-imino-tiazolidin-4-ona e as estruturas de piridina. Este composto exibe potencial farmacológico comprovado através da execução de testes *in vitro*, atuando como uma molécula antioxidante e inibidora da monoamina oxidase B cerebral.

Para a progressão da pesquisa na busca de um candidato terapêutico é necessário conduzir testes pré-clínicos que avaliem parâmetros de toxicidade. Diante do exposto, este estudo objetiva avaliar a toxicidade oral aguda do composto PPIT através da utilização de camundongos.

2. METODOLOGIA

O composto PPIT (Figura 1) foi sintetizado pelo Laboratório de Química Aplicada a Bioativos e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), ambos localizados na UFPEL. Este projeto está cadastrado no COCEPE sob o código 3138. Os estudos foram realizados seguindo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel, Brasil (51340-2019). Os animais foram obtidos do Biotério Central da UFPel.

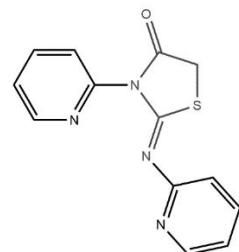


Figura 1. Estrutura molecular do PPIT.

2.1 Toxicidade Oral Aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada conforme o protocolo 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) utilizando camundongos Swiss fêmeas. O PPIT foi administrado na dose de 300 mg/kg pela via intragástrica (i.g.). Os animais controle receberam óleo de canola (veículo, 10 ml/kg). Após esses procedimentos, os animais foram diariamente monitorados durante o período de 14 dias para a avaliação de consumo alimentar,

peso corporal e alterações comportamentais como letargia, piloereção, diarreia, dentre outras.

Após o período de 14 dias, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (TCA) (Walsh e Cummins, 1976), para a avaliação da atividade locomotora e exploratória. Posteriormente, os animais foram eutanasiados sob a utilização de um anestésico.

Foi realizada a coleta do sangue heparinizado através da punção cardíaca. As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 700 ×g e o plasma obtido foi utilizado para determinar a atividade das enzimas AST e ALT e os níveis de ureia. As medições de AST e ALT foram realizadas usando um kit Labtest®. Os níveis de ureia foram avaliados por meio de um kit Bioclin®.

2.2 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 8.02 e os resultados representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As comparações entre os grupos foram realizadas através de teste T não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 2 demonstra os parâmetros de toxicidade em animais expostos ao PPIT.

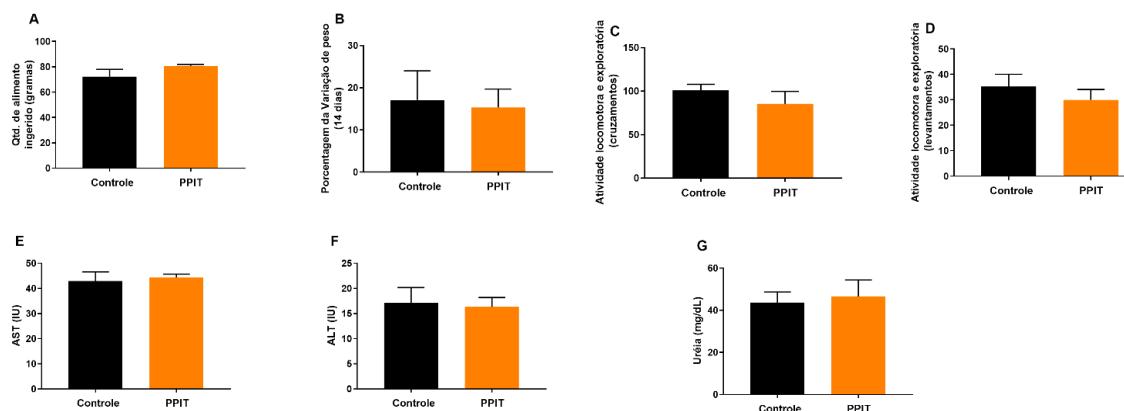


Figura 2. Efeito do tratamento com PPIT (300 mg/kg, i.g.) nos parâmetros de toxicidade sistêmica em camundongos fêmeas. Quantidade de alimento ingerido (A); porcentagem de variação do peso (B) durante 14 dias; atividade locomotora (C) e exploratória (D) no TCA; atividades plasmáticas de AST (E), ALT (F) e níveis de ureia (G). Teste T não pareado, $n = 6$ animais/grupo.

Como pode ser observado, não houve diferenças estatísticas na ingestão alimentar ($p=0,2237$) e no peso corporal ($p=0,8314$) entre os animais tratados com o PPIT e o veículo (Fig. 2A e 2B, respectivamente), sugerindo uma baixa toxicidade deste composto. Corroborando com esta hipótese, não foram detectadas alterações na atividade locomotora ($p=0,1209$) e exploratória ($p=0,07761$) dos camundongos no TCA (Fig. 2C e D). Não foram encontradas diferenças significativas na atividade plasmática das enzimas AST ($p= 0,0487$) e

ALT ($p=0,2993$), bem como nos níveis de ureia ($p=0,3756$) entre os grupos experimentais. Infere-se, pelos achados bioquímicos, que o tratamento com uma alta dose de PPIT não causa hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

4. CONCLUSÕES

O conjunto de dados apresentados sugere que o tratamento oral com o composto PPIT não produz sinais de toxicidade em camundongos Swiss fêmeas. Estes dados impulsionam futuros estudos pré-clínicos sobre as ações farmacológicas do PPIT, a exemplo de modelos de doenças do sistema nervoso, linha de pesquisa do nosso laboratório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OZER, J., et al., The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, 245(3), 194–205, 2008.
- VANDAMME, T. Use of rodents as models of human diseases. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, 6(1), 2, 2014.
- THATCHER, B. J., & CAPUTO, E., Biomarker discovery. **Medical Applications of Mass Spectrometry**, 505–532, (2008)
- MCGILL M., THE PAST AND PRESENT OF SERUM AMINOTRANSFERASES AND THE FUTURE OF LIVER INJURY BIOMARKERS, **Experimental and Clinical Sciences Journal**, 15:817-828 , 2016.
- WASHINGTON I. M., e VAN HOOSIER G., Clinical Biochemistry and Hematology. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**, 57–116, 2012
- DE ALMEIDA et al., Estimating the concentration of urea and creatinine in the human serum of normal and dialysis patients through Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, 31(7), 1415–1423, 2016.
- METWALLY, N.H., et al., Design, synthesis, DNA assessment and molecular docking study of novel 2-(pyridin-2-ylimino) thiazolidin-4-one derivatives as potent antifungal agents. **Bioorg Chem**, 84: p. 456-467, 2019.
- RIDA, S.M., et al., Synthesis of some novel substituted purine derivatives as potential anticancer, anti-HIV-1 and antimicrobial agents. **Arch Pharm (Weinheim)**, 340(4): p.185-94, 2007.
- ALI, Y., et al., Molecular modeling and synthesis of some new 2-imino-4-thiazolidinone derivatives with promising TNF- α inhibitory activity. **New J. Chem**, 2015.
- SECCI, D., et al., Novel 1,3-thiazolidin-4-one derivatives as promising anti-Candida agents endowed with anti-oxidant and chelating properties. **Eur J Med Chem**, 117: p. 144-56, 2016.
- OECD, O.f.E.C.a.D., OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method Test No. 423. 2001: p. 1-14.
- WALSH R.N. e Cummins R.A., The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, 1976. 83(3): p. 482-504.