

ANÁLISES REFERENTES AO PROTOCOLO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL DO COMPOSTO BROMETO DE 1-(2-OXO-2 FENILETIL)-2-((FENILSELANI)METIL)PIRIDIN-1-IO EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS

Marília Bastos Capua¹; Mariana Parron Paim², Taís da Silva Teixeira Rech³, Caroline Signorini Gomes⁴, Eder João Lenardão⁵, Cristiani Folharini Bortolatto⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – mariliabastoscapua@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – maa_paim@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - taisteixeira.r@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - carosigomes@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - elenardao@uol.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Para novas moléculas, os ensaios pré-clínicos são definidos como pesquisas que possuem a finalidade de analisar a sua atividade biológica em experimentação, sendo um estágio que ocorre antes dos ensaios clínicos (BORGES, 2013; BRASIL, 2011). As fases de desenvolvimento de um novo fármaco são baseadas em processos longos, e para o seu desenvolvimento, a primeira fase geralmente envolve a triagem de compostos através de ensaios *in silico* e *in vitro*. Em seguida, são realizados testes *in vivo* e *ex vivo* em animais de laboratório para averiguar sua eficácia terapêutica e sua toxicidade. Só após isso, serão introduzidos estudos clínicos em humanos (NASCIUTTI, 2012).

Os estudos toxicológicos em animais diminuem os possíveis efeitos deletérios em humanos, fornecendo indícios importantes sobre a segurança de novos compostos (AMARAL et al. 2021). Índices de mortalidade, consumo de água e comida, sinais comportamentais e aspectos físicos são comumente empregados para este fim na pesquisa básica. Além disso, as análises das enzimas aminotransferases séricas, como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são bastante comuns para avaliar a toxicidade em estudos pré-clínicos, indicando lesões em células do fígado (BIASI, 2013). Ademais, a dosagem de concentração da ureia sérica avalia o nível de filtração glomerular, servindo como um marcador de função renal (LIMA, 2014).

Muitas doenças e condições adversas estão relacionadas ao estresse oxidativo que acontece pela existência de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, através do excesso de espécies reativas ou em função da velocidade de sua eliminação. Esse processo induz à oxidação de biomoléculas, perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al, 2010). Por outro lado, substâncias antioxidantes podem ter ação protetora. Neste sentido, o sal brometo de 1-(2-oxo-2-feniletil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-io (nomeado de 3A, Fig. 1) apresenta efeitos antioxidantes *in vitro* já reportados (CASTRO et al. 2023) podendo, assim, ser um candidato para tratamento de condições relacionadas ao estresse oxidativo. Porém, a literatura ainda não traz dados a respeito de sua toxicidade, etapa essencial para prever doses seguras para futuros estudos.

Desta forma, através deste trabalho, buscou-se analisar a toxicidade oral aguda do composto 3A em camundongos Swiss fêmeas a fim de prever a sua segurança.

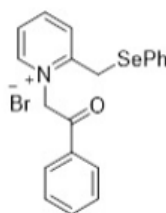


Figura 1 - Estrutura química do composto 3A

2. METODOLOGIA

O sal 3A foi desenvolvido Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da UFPel (PENTEADO *et al.*, 2019). Esse composto é solúvel em água destilada e foi administrado com volume fixo de 10 mg/kg por gavagem (via intragástrica, i.g.). O experimento foi baseado no protocolo “Diretrizes da OCDE para Teste de Produtos Químicos 423: Toxicidade Oral Aguda - Método de Classe Tóxica Aguda”. O método desta diretriz é um procedimento gradual com o uso de 3 animais do mesmo sexo (preferencialmente fêmeas) por etapa (2), totalizando 6 animais por grupo. Foram, portanto, utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35g), obtidos do Biotério Central, e os ensaios aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPel (Nº 001363/2022-34).

Durante a primeira etapa, os camundongos receberam uma dose de 50 mg/kg do composto A ou seu veículo. Os animais foram acompanhados por 14 dias para a avaliação de sinais comportamentais, aspectos físicos e índice de mortalidade e, após, realizou-se o teste do campo aberto para acessar a função motora dos animais, e a eutanásia com coleta de material biológico para a realização dos ensaios bioquímicos: dosagem de ALT, AST e ureia no plasma por kits Labtest®. Após, ocorreu a segunda etapa, em que grupos separados de animais passaram pelos mesmos procedimentos, porém receberam uma dosagem mais elevada do composto A (300 mg/kg) ou seu veículo.

Todos os experimentos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software* GraphPad Prism v.8.0.2. Foi realizado teste T não pareado e considerado o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais não apresentaram sintomas físicos e comportamentais de toxicidade como cianose, pilo-ereção, contorções, tremores, convulsões e outras alterações motoras ou óbitos. Referente aos resultados da atividade da ALT, o teste T não demonstrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com composto 3A nas doses de 50 mg/kg ($t=0,9243$, $df=10$) ou 300mg/kg ($t=0,3345$, $df=10$), como pode-se averiguar nas Figuras 1A e 1B. Já em relação aos resultados da AST (Figuras 1C e 1D), o teste T demonstrou diferença significativa entre os animais controle e os animais expostos à dose de 300 mg/kg ($t=2,719$, $df=10$), porém não à dose de 50 mg/kg ($t=0,4967$, $df=10$). Desse modo, não houve riscos de lesão hepática pela administração do composto 3A na dose de 50 mg/kg; no entanto, em 300 mg/kg, mostrou potencial de toxicidade hepática.

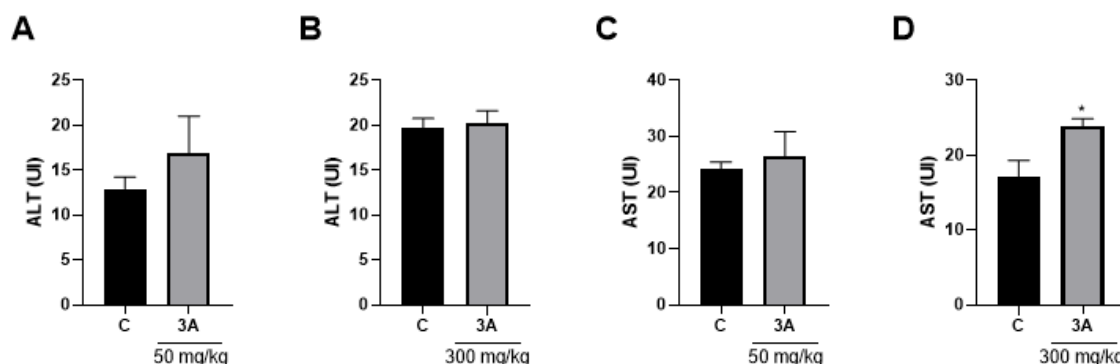


Figura 1 – Efeitos da administração oral aguda do composto 3A sobre a atividade de transaminases (marcadores de função hepática). (A) Alanina aminotransferase (ALT) - Sal 50 mg/kg, (B) ALT - Sal 300 mg/kg, (C) Aspartato aminotransferase (AST) - Sal 50 mg/kg, e (D) AST - Sal 300 mg/kg. Valores expressos como média \pm E.P.M. (n=6 animais/grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo controle. Teste T não pareado.

Em relação ao estudo para a análise de toxicidade renal, o teste T não demonstrou diferença na dosagem de ureia plasmática em animais tratados com a dose de 50 mg/kg ($t=0,2548$, $df=10$), porém houve um aumento com o emprego da dosagem de 300 mg/kg ($t=2,709$, $df=10$) (Figura 2A e 2B). Logo, a dose de 50 mg/kg não apresentou indicativo de lesões renal, diferente da dose de 300 mg/kg, em que houve uma alteração relevante.

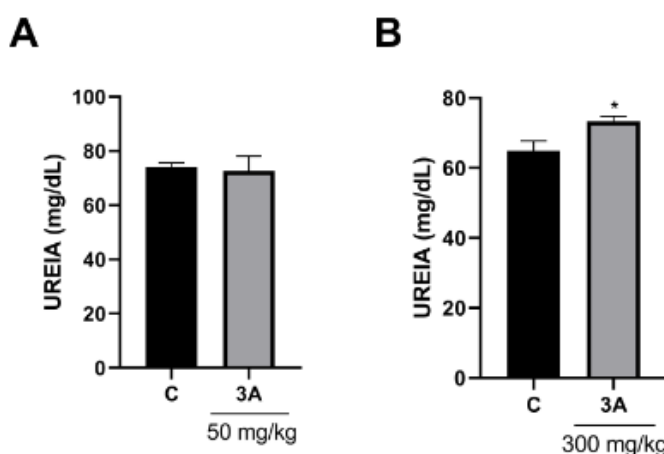


Figura 2 – Efeitos da administração oral aguda do composto 3A sobre os níveis de ureia (marcador de função renal). (A) 50 mg/kg e (B) 300 mg/kg do sal. Valores expressos como média \pm E.P.M. (n=6 animais/grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo controle. Teste T não pareado.

Os presentes achados mostram que a dose de 300 mg/kg altera marcadores bioquímicos de função hepática e renal, o que não ocorre com a dose de 50 mg/kg. Torna-se viável, então, o uso de uma dose menor ou igual a 50 mg/kg como dose efetiva aguda para fins terapêuticos contra o estresse oxidativo em futuros estudos por apresentar-se como relativamente segura no presente protocolo experimental.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a dose de 300 mg/kg do sal 3A, embora não cause óbitos tampouco altere os parâmetros físicos e comportamentais, causa alterações nos marcadores bioquímicos de função hepática e renal, o que sugere uma certa toxicidade aguda e reais riscos de efeitos adversos. Porém, quando administrado na dose de 50 mg/kg, o composto em questão parece ser um bom candidato para estudos futuros contra o estresse oxidativo, pois não apresentou riscos ao bem-estar dos animais ou alterações bioquímicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, K.B. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição. 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

BIASI, B.R. et al. **Avaliação das concentrações de ALT e AST na administração oral do extrato de *Byrsonima crassifolia***, 2013. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:222530827>

BORGES, M. **Ensaios Clínicos em Medicamentos**. Revista Portuguesa de Cirurgia. n. 24. 1-10, 2013.

LIMA, C.L. **Estudo de toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleoresina de *Copaifera duckei* Dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. 2014. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical – PPGBIO Mestrado e Doutorado.

Ministério da Saúde, Brasil. Texto de Difusão Técnico Científico. **Fortalecendo a pesquisa clínica no Brasil: a importância de registrar os ensaios clínicos**. (2011). *Revista De Saúde Pública*, 45(2), 436–439.

NASCIUTTI, P.R. **Desenvolvimento de Novos Fármacos**. 2012. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Seminários Aplicados. Universidade Federal de Goiás.

OECD (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.

PENTEADO, Filipe et al. **Regioselective Synthesis of 1-Sulfanyl- and 1-Selanylindolizines**. The Journal of Organic Chemistry, [S.L.], v. 84, n. 11, p. 7189-7198, 3 Maio 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.9b00871>.

SILVA, M. et al. **A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil**. Research, Society and Development, v.10, n.12. 1-10, 2021.

CASTRO et al. **Bioactivity of selenium-containing pyridinium salts: Prospecting future pharmaceutical constituents to treat liver diseases involving oxidative stress**. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2023 15: e23535.