

2.11.99 - Imunologia.

## **EFEITO IMUNOMODULADOR DA N-ACILHIDRAZONA TSD1386 EM MACRÓFAGOS ATIVADOS *IN VITRO* E EM MODELO DE CHOQUE ENDOTÓXICO *IN VIVO*.**

Tatiana B. dos Santos<sup>1\*</sup>, Dahara K. C. Silva<sup>1</sup>, Cássio S. Meira<sup>2</sup>, Tiago F. Silva<sup>3</sup>, Diogo R. M. Moreira<sup>4</sup>, Eliezer J. Barreiro<sup>5</sup>, Milena B. P. Soares<sup>6</sup>, Elisalva T. Guimaraes<sup>7</sup>

1. Estudante de IC do Departamento de Ciências da Vida da UNEB e do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA
2. Doutorando do Programa de Pós- Graduação em Medicina Investigativa e Biotecnologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA
3. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ
4. Pesquisador em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA
5. Pesquisador Coordenador do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), UFRJ, Rio de Janeiro
6. Pesquisadora Chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital (CBTC) São Rafael
7. Professora e Pesquisadora do Departamento de Ciências da Vida da UNEB e do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA/ Orientadora

### **Resumo:**

Anormalidades na função de linfócitos e macrófagos são os principais fatores que desencadeiam o surgimento e manutenção de respostas imunes indesejáveis. O tratamento com medicamentos imunossupressores para inibir estas respostas é usado na clínica. Contudo, estes fármacos apresentam efeitos adversos devido ao seu uso prolongado e ineficácia dos tratamentos convencionais, sendo necessária a busca por novos compostos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da *N*-acilhidrazona TSD1386 em modular a resposta de macrófagos ativados *in vitro* e em modelo experimental *in vivo*. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade do composto TSD1386, derivado das *N*-acilhidrazonas. Dosagens de citocinas foram realizadas pelo método ELISA e a via de ativação NFκB foi estudada pela ação da luciferase. Por fim, foi avaliada a sobrevivência de animais desafiados com LPS no ensaio de choque endotóxico. O composto modulou a resposta, aumentou a sobrevivência dos animais e ativou a via do NFκB.

**Autorização legal:** Protocolo de procedimento CEUA 016/2013 aprovado e licenciado pela Comissão de Ética no uso de Animais pelo CPqGM.

**Palavras-chave:** Imunomodulação; macrófagos; *N*-acilhidrazona.

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPESB, UNEB,

CPqGM.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UNEB.

### **Introdução:**

Respostas imunes indesejáveis são responsáveis por um grande número de doenças. Anormalidades na função dos linfócitos e macrófagos são os principais fatores que desencadeiam o desenvolvimento e manutenção destas doenças (CRUVINEL *et al.*, 2010). Macrófagos são células efetoras da imunidade inata, cujos principais mecanismos de ação são a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e síntese de proteínas de fase aguda. Na inflamação, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno, potencializando a ativação de linfócitos pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas proinflamatórias como IL-6, TNF-α, quimiocinas, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como óxido nítrico. A aplicação clínica de substâncias imunossupressoras para inibir respostas inflamatórias indesejadas é amplamente empregada. Entretanto, estes fármacos apresentam efeitos secundários associados ao uso prolongado dos medicamentos e ineficácia dos tratamentos convencionais (CASTRO, 2005). Assim, a procura por medicamentos mais adequados é ainda necessária. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da *N*-acilhidrazona TSD1386 em modular a resposta de

macrófagos ativados *in vitro* e em modelo experimental *in vivo*.

### Metodologia:

A citotoxicidade da N-acilhidrazona foi avaliada em macrófagos da linhagem J774, incubados em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O composto foi testado em triplicatas, incubado por 72 horas. Posteriormente, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue durante 6 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. O resultado foi analisado a partir do cálculo de Concentração Citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>), utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado a violeta de genciana.

Em seguida, partir de concentrações atóxicas, foi avaliada a produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  através do método ELISA sanduíche utilizando o protocolo, anticorpos e citocinas recombinante do kit Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450 nm. A produção de óxido nítrico foi determinada através de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 570 nm. Por fim, a indução de choque endotóxico foi realizada através da administração em grupos de camundongos diferentes doses de lipopolissacarídeo (LPS) por via intraperitoneal, a fim de obter a dose que causa a morte de 100% dos animais (DL<sub>100</sub>). Os grupos de animais estimulados pela dose estabelecida foram tratados com o composto TSD1386 e Dexametasona ou não por via intraperitoneal em diferentes tempos. A mortalidade dos animais foi acompanhada durante cinco dias. Todas as análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1.

### Resultados e Discussão:

O composto TSD1386 apresentou baixa citotoxicidade, CC<sub>50</sub>= 55 ( $\pm$  4) µM, quando comparado com a violeta de genciana (CC<sub>50</sub>= 0,8  $\pm$  0,1) e concentrações atóxicas foram usadas nos demais experimentos (30, 20, 15, 10, 7,5 e 5 µM). Uma redução da síntese de óxido nítrico, do TNF- $\alpha$  e da IL-10 e um aumento da produção de IL-6 foram

observados em macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com o composto em estudo. Além disso, o TSD1386 inibiu a via do NFkB, a qual está associada a uma resposta próinflamatória. Um aumento da sobrevivência em cerca de 80% dos camundongos tratados com TSD1386 foi observada após a indução de choque endotóxico.

### Conclusões:

O composto TSD1386 apresentou importante atividade imunomoduladora, inibindo a produção de óxido nítrico e de citocinas próinflamatórias. Além disso, o tratamento com este composto aumentou a sobrevivência de camundongos após indução de choque endotóxico. Portanto, o composto derivado da N-acilhidrazona é uma molécula promissora para desenvolvimento de novas terapêuticas com ação imunomoduladora e anti-inflamatória.

### Referências bibliográficas

APOTROSOAEI, M.; VASINCU, I.; LUPASCU, F.; CONSTANTIN, S.; LUPASCU, D.; PROFIRE, L. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.**, Apr-Jun, 117(2): 538-44, 2013.

ALAM, M. M.; AKHTER, M.; HUSAIN, A.; MARELLA, A.; TANWAR, O. P.; ALI, R.; HASAN, S. M.; KUMAR, H.; HAIDER, R.; SHAQUIQUZZAMAN, M. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of 4,5-dihydropyrimidine-5-carbonitrile derivatives: their synthesis and spectral elucidation. **Acta Pol Pharm.** 2012 Nov-Dez;69(6):1077-85.

CASTRO, M. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticóides: concordância ou discordância?. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 334-336, June 2005.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol** 2010;50(4):434-61.

DOS SANTOS FILHO, J. M. ; de Lima, J. G. ; LEITE, L. F. C. C. . Synthesis, characterization, and antiinflammatory evaluation of 1,2,4-oxadiazoles combined with thiosemicarbazide and 1,3,4-oxadiazole moieties. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 46, p. 722-727, 2009.

DOS SANTOS FILHO, J. M. ; de Lima, J. G. ; LEITE, L. F. C. C. ; XIMENES, E. A. ; SILVA, J. B. P. ; LIMA, P. C. ; PITTA, I. R. . Synthesis, biological evaluation, and structural studies of 3phenyl[1,2,4]oxadiazole-5-carboxylic acid benzo[1,3]dioxolol-5-ylmethylene-hydrazide. **Heterocyclic Communications**, v. 11, p. 29-36, 2005.

HAMDY, N. A.; ABDEL- AZIZ, H. A.; KAMEL, G. M.; FAKHR, I. M. Convenient synthesis, antiinflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. **Acta Pol Pharm.**, May-Jun, 70(3): 469-80, 2013.

LUPASCU, D.; PROFIRE, L. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.**, Apr-Jun, 117(2): 538-44, 2013.