

2.11.99 - Imunologia.

## INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DA *N*-ACILHIDRAZONA TSD1386 EM CULTURA DE LINFÓCITOS ATIVADOS.

Dahara K. C. Silva<sup>1\*</sup>, Tatiana B. dos Santos<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. Guimarães<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 Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia 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 (CBTC) do Hospital 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:

O principal tratamento de doenças autoimunes e alergias consiste na utilização de glicocorticoides. Devido aos efeitos adversos e a carência de drogas alternativas, faz-se necessário a investigação de novos compostos com potencial imunossupressor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade do composto sintético da classe da *N*-acilhidrazona em inibir a proliferação e a resposta imune de linfócitos. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade do composto em macrófagos. A produção de citocinas por esplenócitos tratados ou não com o composto foi quantificada por ELISA. Também foi realizada a terapia combinada do composto TSD1386 com a dexametasona, através de isobogramas. O composto testado apresentou baixa citotoxicidade. Além disso, o TSD1386 foi capaz de inibir de forma concentração dependente a proliferação de linfócitos por uma via diferente dos glicocorticoides, inibiu a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, e em combinação com a dexametasona, promoveu efeito sinérgico.

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

**Palavras-chave:** *N*-acilhidrazona; imunossupressão; linfócitos.

**Apoio financeiro:** CNPq, Fapesb, CPqGM,

UNEB.

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

### Introdução:

A utilização de glicocorticoides consiste no principal tratamento de doenças autoimunes e alergias, entretanto, apresenta sérios efeitos adversos, como o desenvolvimento de diabetes *mellitus*, úlcera péptica, síndrome de Cushing com supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outras (SCHACKE et al., 2002). Estes graves efeitos limitam o uso dos glicocorticoides (CASTRO, 2005). Tendo em vista a carência de drogas alternativas com potencial imunomodulador, compostos sintéticos vêm apresentando resultados promissores. As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos sintéticos, cujo grupo funcional apresenta em sua estrutura dois átomos de nitrogênio e um carbono conferindo a possibilidade de substituições. Muitos desses compostos já foram relatados como agentes bioativos úteis (HAMDY et al., 2013). Além disso, as hidrazonas e seus derivados apresentam descrições na literatura por suas atividades antimicrobiana e antifúngica (APOTROSOAEI et al., 2013), anti-inflamatória e analgésica (ALAM et al., 2012; HAMDY et al., 2013). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade do composto sintético TSD1386 da classe das *N*-

acilhidrazonas em inibir a proliferação e a resposta imune de linfócitos.

### Metodologia:

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizados macrófagos imortalizados 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 triplicata e 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. Os valores de CC<sub>50</sub> foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado à violeta de genciana. Em concentrações atóxicas, foi avaliado o efeito do composto sobre a proliferação de linfócitos estimulados tanto por concanavalina A quanto por antiCD3/anti-CD28. A taxa de proliferação de linfócitos foi avaliada pela incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. O percentual de inibição foi determinado relacionando a incorporação de timidina das culturas tratadas com a substância avaliada e a incorporação das culturas somente estimuladas. Em alguns experimentos, a dexametasona, um glicocorticoide sintético, e o RU486, o antagonista do receptor de glicocorticoide, foram adicionados na cultura para investigar o mecanismo de ação do composto em estudo. Posteriormente, as dosagens de IFN-γ e IL-2 foram realizadas a partir do sobrenadante das culturas de células, pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando o protocolo, anticorpos e citocinas recombinante do kit Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Também foi realizada a terapia combinada do composto TSD1386 com a dexametasona, através de isobologramas. Isobologramas foram construídos utilizando o método de razão fixa. Diluições seriadas duplas foram realizadas em triplicata nas razões de 1:1 e de 10:1 do composto TSD1386 e dexametasona, respectivamente.

### Resultados e Discussão:

O composto testado apresentou baixa citotoxicidade (CC<sub>50</sub> =  $55 \pm 4$  µM) quando comparado com a violeta de genciana (CC<sub>50</sub> =  $0,8 \pm 0,1$  µM). O TSD1386 foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos estimulada por

concanavalina A ou por anti-CD3/antiCD28, com valor de IC<sub>50</sub> = 0,9 µM. A adição do antagonista de receptores de glicocorticoides (RU486) não foi capaz de inibir o efeito do composto, indicando que o TSD1386 age por via diferente dos glicocorticoides. Além disso, o composto reduziu a produção de IL-2 e IFN-γ, confirmando os resultados anteriores que mostraram redução da linfoproliferação. A construção de isobologramas indicou uma interação sinérgica entre dexametasona e o TSD1386.

### Conclusões:

Os resultados indicam que o composto TSD1386 tem a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos através de uma via diferente dos glicocorticoides e de reduzir a produção das citocinas IL-2 e IFN-γ. Além disso, há um efeito sinérgico quando o composto é combinado com a dexametasona. Portanto, a utilização do composto sintético TSD1386 derivado das *N*-acilhidrazonas sugere um potencial imunossupressor para o tratamento de doenças autoimunes e alergias.

### Referências bibliográficas

- 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.
- 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.**, Abr-Jun, 117(2): 538-44, 2013.
- 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.
- 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.**, Mai-Jun, 70(3): 469-80, 2013.
- SCHACKE H, Docke WD, Asadullah K.

Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther** 2002;96:23-43.