

2.11.99 - Imunologia.

AÇÃO IMUNOMODULADORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE UM COMPOSTO SINTÉTICO DA CLASSE DAS N- ACILHIDRAZONAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*.

Tatiana B. dos Santos^{1,2*}, Dahara K. C. Silva^{1,2}, Cássio S. Meira³, Tiago F. Silva⁴, Diogo R. M. Moreira⁵, Eliezer J. Barreiro⁶, Milena B. P. Soares⁷, Elisalva T. Guimarães⁸

1. Estudante de IC do Departamento de Ciências da Vida, UNEB

2. Estudante de IC do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

3. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Investigativa e Biotecnologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

4. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

5. Pesquisador em Saúde Pública do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

6. Pesquisador Coordenador do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), UFRJ, Rio de Janeiro

7. Pesquisadora Chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael.

8. Professora e Pesquisadora do Departamento de Ciências da Vida, UNEB e do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA/ Orientadora

Resumo:

Os imunossuppressores são medicamentos largamente utilizados no tratamento de doenças imunomediadas. Diante da necessidade de fármacos menos tóxicos que os disponíveis na clínica, avaliou-se a ação imunomoduladora e anti-inflamatória do (E)- N'-(3,4-dimetiloxibenzilideno)-4-metoxibenzohidrazida (LASSBio-1386) em modelos murinos de doenças inflamatórias. O ensaio de choque endotóxico foi realizado para avaliar a ação do LASSBio-1386 na sobrevivência de camundongos e na modulação das citocinas envolvidas neste processo. Em seguida, avaliou-se o efeito do composto na migração leucocitária e na redução do edema de pata induzidos por carragenina. O LASSBio-1386 aumentou a taxa de sobrevivência dos animais, reduziu a produção de TNF- α , IL-1 β e aumentou a produção de IL-10 circulantes. Além disso, o composto reduziu a formação de edema na pata e não foi capaz de inibir a migração de neutrófilos em modelo de peritonite, sugerindo que o LASSBio-1386 apresenta uma ação anti-inflamatória promissora.

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

Palavras-chave: Inflamação; Camundongo; tratamento.

Apoio financeiro: CNPq, Fapesb, IGM, UNEB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNEB

Introdução:

O sistema imune requer a interação dos vários tipos celulares que compõem a defesa do organismo para manter a homeostasia. Diferentes estímulos podem alterar esse equilíbrio, como infecções por bactérias e as suas endotoxinas. A inflamação é uma reação imune, desencadeada por uma cascata de mediadores químicos em resposta a essas substâncias (CRUVINEL et al., 2010). Quando um processo inflamatório ocorre, leucócitos sanguíneos circulantes migram a fim de eliminar o gatilho inflamatório primário e contribuir com a reparação tecidual. Se esta resposta imune/inflamatória é ativada de forma incorreta, um dano tecidual torna-se iminente. A atividade biológica das endotoxinas é decorrente da ativação de sistemas séricos, de células residentes, do endotélio e dos leucócitos (PEREZ-SEPULVEDA et al., 2014). Em consequência disto, ocorrem síntese e liberação de mediadores endógenos, como citocinas, radicais reativos do oxigênio e do nitrogênio e mediadores lipídicos. E neste contexto, a ativação das células inflamatórias se torna o fator predominante para o desenvolvimento da síndrome da inflamação sistêmica presente na sepse (BENJAMIN, 2001). Dentre os mediadores endógenos, liberados, primeiramente, pelas células residentes e, posteriormente, pelas células recrutadas para o foco infeccioso, as citocinas desempenham um papel primordial na resposta do hospedeiro. Citocinas como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e outras moléculas promovem o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ativação e aumento da atividade microbicida, sendo a resposta no local fundamental para o controle da infecção (GUHA; MACKMAN, 2001). A aplicação clínica de fármacos imunossuppressores é amplamente empregada para inibir estas respostas inflamatórias indesejadas (ARMSTRONG; KLICKSTEIN, 2009). Devido aos efeitos secundários associados ao

uso prolongado dos medicamentos e a ineficácia de alguns tratamentos convencionais, a procura por medicamentos mais seguros, eficazes e menos tóxicos torna-se necessária. Neste contexto, a ação imunomoduladora e anti-inflamatória do derivado das hidrazonas, o LASSBio-1386, foi avaliada em modelo murino de doenças inflamatórias.

Metodologia:

O efeito do LASSBio-1386 foi avaliado na sobrevivência de camundongos BALB/c e na produção de citocinas no soro destes animais após a indução de endotoxemia. A dose letal de 600 µg de LPS foi administrada após 90 minutos de tratamento com 50 e 100 mg/kg de LASSBio-1386, por via intraperitoneal. A dexametasona, a droga de referência no tratamento das doenças do sistema imunológico, foi utilizada como controle positivo (25 mg/kg). A mortalidade dos animais foi acompanhada durante cinco dias e a análise estatística das diferenças nas curvas de sobrevivência foi feita usando o teste de Logrank. O programa utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.01. A dosagem de citocinas foi realizada pelo método do ELISA sanduíche, após coleta do sangue a partir da artéria braquial, centrifugação e separação do soro. A ação do composto sobre a migração leucocitária foi avaliada em modelo de peritonite induzido por carragenina (1%, por via intraperitoneal, 0,25 mL) em camundongos BALB/c, uma hora após a administração da indometacina (50 mg/kg), utilizada como droga de referência, e do LASSBio-1386, nas doses de 50 e 100 mg/kg. Após quatro horas, os animais foram eutanasiados para realização de lavagem peritoneal. As células coletadas foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos em número de neutrófilos/100 células. O modelo de edema de pata foi induzido através da administração de 2% de carragenina na região subplantar da pata traseira de camundongos BALB/c (volume final de 20 µl/animal). Os grupos foram pré-tratados por via oral com salina, indometacina ou com o LASSBio-1386 uma hora antes da administração da carragenina por via intraperitoneal. O acompanhamento da espessura da pata foi realizado com auxílio de um paquímetro digital antes e nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas seguintes.

Resultados e Discussão:

Todos os camundongos apresentaram sinais de choque após a administração de LPS, como piloereção, tremores e letargia. Quando tratados com a dose mais baixa do LASSBio-1386 (50 mg/kg), a taxa de sobrevivência dos animais foi de cerca de 50%. Ao se utilizar a dose de 100 mg/kg do composto, mais de 80% dos animais sobreviveram até o final do período observado. Quando tratados com a dexametasona (25 mg/kg), 100% dos animais sobreviveram e o grupo não tratado foi a óbito ao final de 24h após indução do choque. Além disso, o composto foi capaz de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β. O composto também aumentou a produção de IL-10, citocina com importante atividade imunossupressora. O LASSBio-1386 não foi capaz de inibir a migração de neutrófilos em modelo de peritonite e reduziu a formação de edema de pata induzido por carragenina, demonstrando que sua ação protetora ocorre provavelmente numa inflamação já estabelecida.

Conclusões:

O LASSBio-1386 aumentou a taxa de sobrevivência, reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a produção da IL-10, a principal citocina associada a imunossupressão. Além disso, o LASSBio-1386 não foi capaz de inibir a migração de células inflamatórias para o local de lesão, mas reduziu a formação de edema de pata induzido por carragenina, demonstrando que sua ação protetora ocorre provavelmente numa inflamação já estabelecida. Estes dados sugerem que o LASSBio-1386 é uma alternativa promissora para desenvolvimento de novas terapêuticas com ação imunomoduladora e anti-inflamatória.

Referências bibliográficas

- ARMSTRONG, E. J.; KLICKSTEIN, L. B. Farmacologia da imunossupressão. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J. **Princípios de Farmacologia - a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia** – 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BENJAMIN, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 18-26, 2001.
- 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.**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signaling**, v. 13, p. 85-94, 2001.
- PEREZ-SEPULVEDA, A.; KHOURY, M.; ILLANES, S. E. Innate Immune System and Preeclampsia. **Frontiers**

in **Immunology**, v. 5 , p. 244, 2014.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 23–43, 2002.

VIANNA, H. R.; SOARES, C. M. B. M.; TAVARES, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, A. C. S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. Bras. Nefrol.**, v. 33, n. 3, p. 351-364, 2011.