



AValiação da Toxicidade Oral Aguda em Camundongos de um Sal de Piridínio Contendo Selênio (3B): Estudos *in vivo* e *ex vivo*

**PÂMELLA DA COSTA; MARIANA PARRON PAIM; CAROLINE SIGNORINI GOMES;
EDÉR JOÃO LENARDÃO; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO**

RESUMO

O desenvolvimento de novos medicamentos requer uma avaliação minuciosa de sua segurança e eficácia antes da administração em seres humanos. Os testes pré-clínicos fornecem dados cruciais sobre a ação de novas moléculas e seus possíveis efeitos adversos. O nosso grupo de pesquisa tem estudado o perfil toxicológico e farmacológico de diferentes compostos, especialmente os compostos orgânicos contendo o microelemento selênio, que em sua maioria são lipossolúveis. Entretanto, recentemente estudamos a atividade biológica de sais de piridínio contendo o selênio, os quais se destacam na área de organocalcogênicos por serem compostos relativamente hidrossolúveis. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade oral aguda de um sal de piridínio contendo selênio, o brometo de 1-(2-oxo-2-(p-tolil)etil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-íio (denominado composto **3B**), em camundongos Swiss fêmeas. Os experimentos foram baseados nas Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para o Teste de Produtos Químicos (No. 423). O composto **3B** foi dissolvido em água e administrado por via oral nas doses de 50 e 300 mg/kg. Foram avaliados parâmetros como o potencial de letalidade, a incidência de efeitos adversos comportamentais e marcadores plasmáticos de dano hepático (atividade das transaminases) e renal (níveis de ureia). Os resultados obtidos demonstraram que o composto **3B** não causou letalidade, tampouco alterou significativamente o peso corporal, consumo hídrico ou alimentar e atividade locomotora. Além disso, os ensaios *ex vivo* revelaram que a dose de 50 mg/kg não afetou a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e os níveis de ureia em comparação ao grupo controle. No entanto, na dose de 300 mg/kg, observou-se um aumento significativo na atividade da AST, apesar de não afetar a atividade da ALT e níveis ureia. Concluiu-se que a dose de 50 mg/kg parece segura para estudos posteriores em camundongos, enquanto a dose de 300 mg/kg apresenta uma aparente toxicidade tecidual, a ser mais bem investigada em estudos futuros. Esses resultados também mostram a importância dos estudos toxicológicos prévios para identificar potenciais riscos à saúde antes da administração em humanos.

Palavras-chave: toxicologia; ensaio pré-clínico; piridínio; selênio; hidrossolubilidade.

1 INTRODUÇÃO

Os estudos prévios à fase clínica são conduzidos em modelos *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* para obter dados fundamentais sobre a segurança e eficácia de um potencial medicamento antes de sua administração em seres humanos. Esses testes podem ser divididos em duas categorias: a farmacologia básica, que aborda os aspectos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do medicamento, e a toxicologia, que avalia os possíveis efeitos adversos do composto (RODA, 2022). A toxicologia é uma disciplina que investiga as características físico-químicas de substâncias, fornecendo diretrizes para garantir a segurança

de sua utilização (PIRES *et al.*, 2021). Os testes de toxicidade são procedimentos realizados em laboratório nos quais os organismos de teste são expostos a diversas concentrações ou doses da substância em estudo, a fim de se observar e medir os efeitos nocivos (LUSTOSA *et al.*, 2023). Estes ensaios podem examinar uma variedade de fatores, incluindo mudanças no peso corporal, ingestão de alimentos e líquidos, e condição física dos órgãos através de análises anatômicas, bioquímicas e hematológicas, por exemplo (SILVA, 2023).

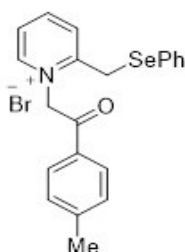
Os estudos de toxicologia são realizados em duas etapas: a pré-clínica, conduzida em animais de laboratório, e a clínica, na qual produtos considerados não tóxicos nos estudos pré-clínicos são avaliados em voluntários humanos, seguindo padrões técnicos e éticos rigorosos. As etapas pré-clínicas abrangem testes de toxicidade aguda, de doses repetidas, subcrônica e crônica. O teste de toxicidade aguda é uma avaliação inicial para identificar os efeitos tóxicos de uma substância em organismos, possibilitando a inferência de riscos à saúde decorrentes de exposição breve, sendo obrigatório para todas as substâncias em avaliação (PIRES *et al.*, 2021). Esse teste possibilita aos cientistas estabelecerem as doses ótimas para investigações de longa duração e identificar quais regiões do organismo podem ser impactadas por determinadas substâncias químicas (SILVA, 2023). A atividade sérica ou plasmática das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) é um importante marcador bioquímico de lesão hepática enquanto os níveis de ureia e creatinina estão associados a lesões renais (NASCIMENTO, 2023).

O selênio (Se) é considerado um elemento vital para a manutenção da saúde humana, uma vez que desempenha múltiplas funções fisiológicas (LEME, 2020). O seu déficit pode desencadear um quadro agudo de distúrbios, mas uma superdose também pode resultar em consequências graves. As funções do Se no corpo são principalmente devido às suas propriedades antioxidantes, pois é parte essencial de importantes enzimas antioxidantes, porém também destaca-se quanto à modulação do sistema imune e produção de hormônios tireoidianos, por exemplo. A administração de Se tem mostrado-se eficaz contra a toxicidade de muitos agentes e efeitos colaterais de medicamentos (KIEŁCZYKOWSKA *et al.*, 2018). Em razão disso, muitos pesquisadores tem dedicado-se a estudar as ações farmacológicas e toxicológicas de compostos à base de selênio (orgânicos e inorgânicos).

O nosso grupo de pesquisa tem estudado diferentes classes de compostos orgânicos de selênio, que em sua maioria são moléculas lipossolúveis. Entretanto, recentemente foi demonstrado o potencial antioxidante *in vitro* de sais de piridínio contendo o selênio, os quais se destacam na área de organocalcogênicos por serem compostos relativamente hidrossolúveis (CASTRO *et al.*, 2023). Para acrescentar os benefícios, a característica de solubilidade em água dos sais auxiliam na absorção e excreção de compostos pelo organismo, o que pode resultar em um uso terapêutico mais eficaz ou na exclusão como candidatos a medicamentos (PAULI *et al.*, 2019).

Nessa perspectiva, o propósito deste estudo consistiu em avaliar a toxicidade oral aguda de um sal de piridínio contendo Se, o brometo de 1-(2-oxo-2-(p-tolil)etil)-2-((fenilselanil)metil)piridín-1-io (composto **3B**), em camundongos Swiss fêmeas.

Figura 1. Estrutura química do composto **3B**



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Composto e Animais

O composto **3B** foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (PENTEADO et al., 2019). Esse composto foi posteriormente dissolvido em água destilada e administrado em camundongos fêmeas da linhagem Swiss (25-35g) por gavagem (via intragástrica, i.g.) em volume fixo de 10 ml/kg. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPel (Nº 001363/2022-34) e foi conduzido utilizando as condições padrão do Biotério Central da UFPel.

2.2 Protocolo de toxicidade oral aguda

A avaliação foi realizada de acordo com as Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para Teste de Produtos Químicos: Toxicidade Oral Aguda - Método de Classe Tóxica Aguda” (Teste No. 423) (OECD, 2001). A abordagem desta orientação é um processo progressivo com a utilização de 3 roedores do mesmo sexo (preferencialmente fêmeas) por etapa. Aqui foram utilizadas 2 etapas para cada dose testada do composto **3B** (50 e 300 mg/kg), resultando em n = 6 animais/grupo. A dose inicial fixada foi a de 50 mg/kg sucedida pela dose de 300 mg/kg. Os controles de cada experimento receberam apenas o veículo (água). Os animais foram sempre acondicionados em 3 animais por caixa, dentro do seu respectivo grupo experimental. Para cada dose e para cada passo experimental existiu um grupo controle para fins de comparação.

2.3 Letalidade, peso corporal, sinais clínicos e parâmetros comportamentais de toxicidade

Os animais foram acompanhados durante 14 dias para a observação de incidência de morte e sinais comportamentais de toxicidade tais como piloereção, aptose, convulsão etc. Além disso, o peso corporal, e o consumo alimentar e hídrico foram acompanhados durante este período. A variação de peso corporal foi obtida pela diferença entre o peso corporal final e inicial. O consumo alimentar e hídrico foi representado pela média de consumo diário na caixa contendo 3 animais. A atividade locomotora (cruzamentos) e de bipedia exploratória foi avaliada pelo teste de campo aberto (TCA) durante 5 minutos em uma arena (WALSH e CUMMINS, 1976), previamente à eutanásia. A seguir, os animais foram anestesiados com isoflurano para a coleta de sangue heparinizado por punção cardíaca, seguida deslocamento cervical para confirmação de morte. O sangue foi centrifugado (2.500 r.p.m. por 10 minutos) para a obtenção de plasma para as análises *ex vivo*.

2.4 Marcadores bioquímicos de toxicidade hepática e renal

A enzima ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato, formando glutamato e piruvato. O piruvato é convertido pela lactato desidrogenase em lactato, enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A redução da absorbância a 340 nm como consequência da oxidação do NADH, que ocorre de forma proporcional à atividade da ALT na amostra, é utilizada como uma forma indireta de se obter a atividade enzimática, que foi dosada por meio de kit comercial.

A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o α -cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. Por meio da ação da malato desidrogenase, o oxalacetato é reduzido a malato, enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . Da mesma forma, a atividade da AST foi dosada indiretamente, através de kit comercial, utilizando o monitoramento da absorbância a 340 nm.

A dosagem de ureia, frequentemente usada como marcador de função renal, foi realizada por kit comercial por método enzimático-colorimétrico de ponto final. A ureia é

hidrolisada pela urease a íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

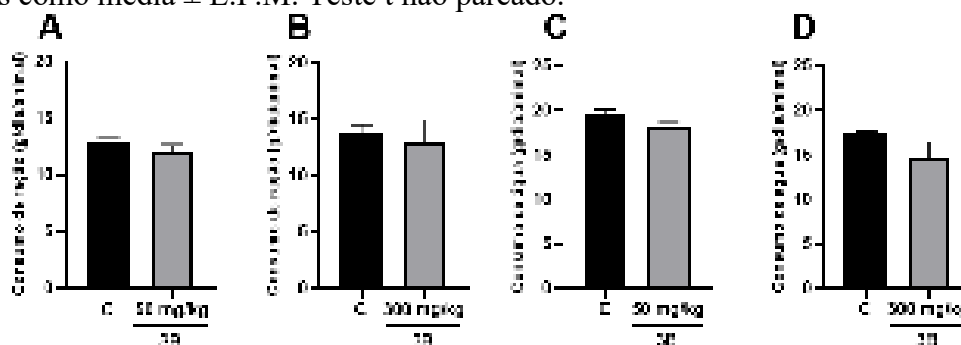
2.5 Análise estatística

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

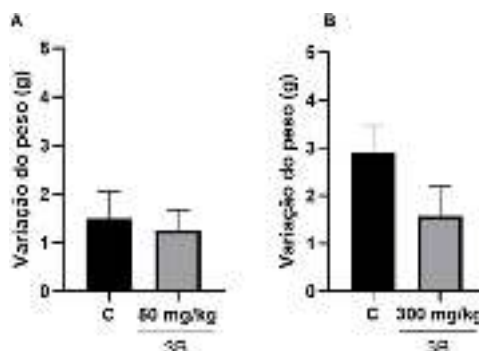
A taxa de sobrevivência dos organismos expostos a uma dada substância é um dos parâmetros mais fundamentais para a avaliação de sua toxicidade. Ainda, o aparecimento de anomalias físicas, alterações na aparência dos animais e redução do consumo alimentar e hídrico podem fornecer pistas sobre os efeitos da substância (OECD, 2001). Neste sentido, nenhuma das doses do composto **3B** utilizadas no presente estudo causaram letalidade ou sinais clínicos aparentes de toxicidade (alterações na aparência da pele, pelos, olhos, comportamento anormal, convulsões, tremores etc.). Além disso, como observado na Figura 2, não houve diferenças significativas no consumo de ração (Fig. 2A e 2B) (50 mg/kg: $t=1,207$, $df=8$ | 300 mg/kg: $t=0,3476$, $df=8$) e de água (50 mg/kg: $t=2,057$, $df=8$ | 300 mg/kg: $t=1,525$, $df=8$) (Fig. 2C e 2D) em animais tratados com as doses de 50 mg/kg e 300 mg/kg. Estes dados mostram uma relativa segurança da molécula testada em camundongos.

Figura 2. Consumo alimentar e hídrico de camundongos agudamente expostos ao composto **3B** (50 e 300 mg/kg, i.g.). (A) Consumo de ração – 50 mg/kg, (B) Consumo de ração – 300 mg/kg, (C) Consumo de água - 50 mg/kg, (D) Consumo de água – 300 mg/kg. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. Teste t não pareado.



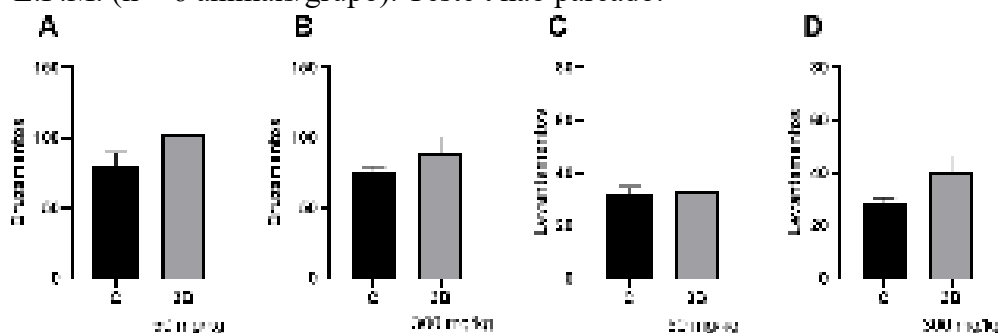
Alterações no peso corporal dos organismos expostos, especialmente reduções significativas, podem indicar a presença de toxicidade, seja aguda ou crônica. Neste sentido, como demonstrado pela Figura 3, não houve diferença estatística no ganho de peso corporal entre o grupo controle e aquele tratado agudamente com o composto **3B** nas doses de 50 mg/kg (Fig. 3A, $t = 0,3550$, $df = 10$) e de 300 mg/kg (Fig. 3B, $t = 1,616$, $df = 10$).

Figura 3. Variação de peso corporal de camundongos agudamente expostos ao composto **3B** (50 e 300 mg/kg, i.g.). (A) 50 mg/kg, (B) 300 mg/kg. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. Teste t não pareado.



A análise da função motora dos animais também proporciona *insights* sobre a possível toxicidade de substâncias. Os resultados referentes ao TCA, teste destinado a este fim, estão apresentados na Figura 4. O teste t aplicado não revelou diferenças significativas entre os grupos, indicando a dose de 50 e 300 mg/kg do composto **3B** não alterou a atividade locomotora (50 mg/kg: $t = 1,586$, $df = 10$ | 300 mg/kg: $t = 1,441$, $df = 10$) e exploratória dos animais (50 mg/kg: $t = 0,3948$, $df = 10$ | 300 mg/kg: $t = 2,0$, $df = 10$).

Figura 4. Atividade locomotora e exploratória no TCA de camundongos agudamente expostos ao composto **3B** (50 e 300 mg/kg, i.g.). (A) Número de cruzamentos – 50 mg/kg, (B) Número de cruzamentos – 300 mg/kg, (C) Número de levantamentos sobre as patas traseiras – 50 mg/kg, (D) Número de levantamentos sobre as patas traseiras – 300 mg/kg. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$ animais/grupo). Teste t não pareado.

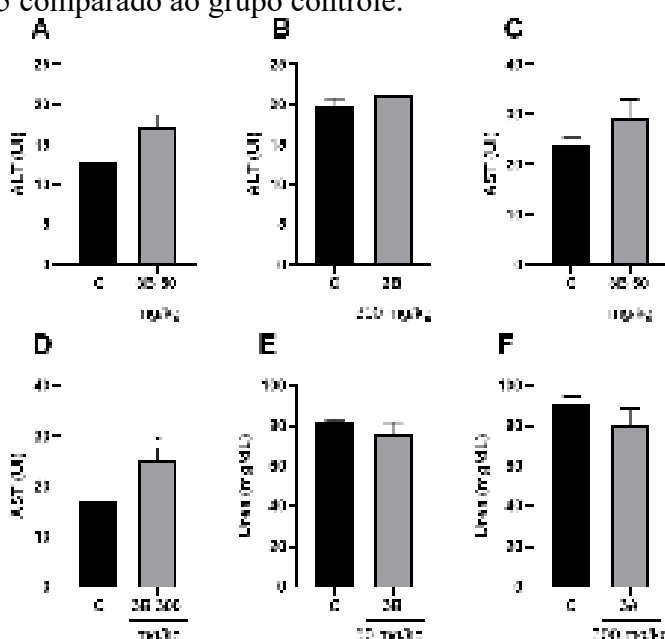


Os resultados ilustrados na Figura 5 representam os parâmetros bioquímicos de função hepática e renal de animais expostos ao composto **3B**. As enzimas AST e ALT são liberadas no sangue quando as células hepáticas são danificadas. Desta forma, um aumento de sua atividade plasmática é um parâmetro comumente empregado para indício de toxicidade hepática.

Nossos resultados demonstram que a atividade da ALT (Fig. 5A e B) não foi afetada por nenhuma das doses testadas (50 mg/kg: $t = 2,210$, $df = 10$ | 300 mg/kg: $t = 0,765$, $df = 10$). Sobre a AST, embora animais expostos à dose de 50 mg/kg tiveram resultados comparáveis aos controles ($t = 1,105$, $df = 10$), observou-se um aumento na sua atividade pela dose 300 mg/kg ($t = 2,499$, $df = 10$). Este resultado deve ser interpretado com cautela, pois embora um aumento da AST seja clinicamente utilizado como marcador de dano hepático e esta hipótese não esteja excluída no presente estudo, sabe-se que a AST está presente em grandes quantidades em outros tecidos que também podem sofrer ação tóxica. Além disso, a enzima mais específica para a lesão hepatocelular é a ALT (SCHLÜTER *et al.*, 2018), que não foi alterada nesta mesma dosagem.

A ureia é uma substância produzida no fígado durante o metabolismo das proteínas e é excretada pelos rins na urina. Portanto, os níveis de ureia no sangue são frequentemente utilizados como um indicador da função renal (LAU; VAZIRI, 2016). Em relação aos níveis plasmáticos de ureia dosados no presente estudo, não houve diferenças entre os grupos controles e tratados com o composto **3B** em ambas as doses (50 mg/kg: $t = 1,037$, $df = 10$ | 300 mg/kg: $t = 1,103$, $df = 10$), indicando que este composto possivelmente não exerça efeitos tóxicos sobre os rins em camundongos.

Figura 5. Parâmetros bioquímicos de função hepática e renal em camundongos agudamente expostos ao composto **3B** (50 e 300 mg/kg, i.g.). (A) Alanina aminotransferase (ALT) – 50 mg/kg, (B) Alanina aminotransferase (ALT) – 300 mg/kg, (C) Aspartato aminotransferase (AST) – 50 mg/kg, (D) Aspartato aminotransferase (AST) – 300 mg/kg, (E) Ureia – 50mg/kg, (F) Ureia – 300 mg/kg. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n = 6$ animais/grupo). Teste t não pareado. $*p < 0,05$ comparado ao grupo controle.



4 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados deste estudo indicam que o composto **3B** possui um baixo potencial de toxicidade quando administrado de forma aguda (50 e 300 mg/kg) em camundongos fêmeas. Esses achados sugerem que esta molécula é relativamente segura para essa espécie animal. Além disso, ressaltam a importância de realizar estudos toxicológicos prévios para avaliar os potenciais riscos à saúde antes da administração em humanos, visando garantir a eficácia terapêutica e a segurança de novos medicamentos. Por fim, recomenda-se que a dose de 50 mg/kg seja considerada a mais segura para investigações futuras.

REFERÊNCIAS

CASTRO, Ediandra T. *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**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 1-15, 15 set. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.23535>.

OECD. **Guideline for Testing of Chemicals – Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**, 2001.

KIEŁCZYKOWSKA, Małgorzata et al. Selenium – a fascinating antioxidant of protective properties. **Advances In Clinical And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 245-255, 28 fev. 2018. Wrocław Medical University. <http://dx.doi.org/10.17219/acem/67222>.

LAU, Wei Ling; VAZIRI, Nosratola D.. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. **Clinical Science**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 3-12, 21 nov. 2016. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20160203>.

LEME, Adriana Gisele Hertzog da Silva. **Estado nutricional de indivíduos com Comprometimento Cognitivo Leve e Doença de Alzheimer em relação ao Selênio e sua associação com parâmetros que predisõem ao declínio cognitivo**. 2020. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

LUSTOSA, Eliane Alves et al. Toxicidade de inseticida agrícola em bioensaio com *Artemia salina*. **Scientia Plena**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 1-8, 15 jun. 2023. Associação Sergipana de Ciência. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2023.055201>.

NASCIMENTO, Ana Carla Silva. **Efeito da Biochanina a na intoxicação induzida por Diquat em camundongos**. 2023. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2023. Disponível em: <http://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/17607>. Acesso em: 14 fev. 2024.

PAULI, Griffin et al. Development and Characterization of the Solvent-Assisted Active Loading Technology (SALT) for Liposomal Loading of Poorly Water-Soluble Compounds. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 465, 9 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics11090465>.

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>.

RODA, Celina Isabel Neto. **A inteligência artificial na descoberta de novos medicamentos**. 2022. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/57883>. Acesso em: 14 fev. 2024.

SCHLÜTER, U. *et al.* The role of alanine and aspartate aminotransferases in C4 photosynthesis. **Plant Biology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 64-76, 24 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12904>.

SILVA, Bruno Vinicius Souza da. **Perfil fitoquímico e avaliação da citotoxicidade, toxicidade aguda e genotoxicidade de extrato aquoso folhas de *Psidium guineense* Sw.** 2023. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/51637>. Acesso em: 14 fev. 2024.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.