AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA CAPACIDADE DE IMUNOMODULAÇÃO DE IL-1 β DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLÍDINICOS EM PBMCS DE VOLUNTÁRIOS SADIOS E PACIENTES GOTOSOS

T. U. L. LINS¹, J. F. BRANCO-JÚNIOR², M. A. B. CORREIA¹, K. M. VILAR¹, V. A. S. SILVA¹, N. G. CAVALCANTI³, C. D. L. MARQUES³, A. L. B. P. DUARTE³, M. J. B. M. RÊGO¹, I. R. PITTA², M. R. GALDINO-PITTA², M. G. R. PITTA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino,

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

² Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos

³ Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Serviço de Reumatologia

E-mail para contato: thiago.ubiratan.lins@gmail.com

RESUMO – *A gota é uma doença onde a hiperuricemia sustentada leva a deposição de cristais de monourato de sódio (MSU) nos tecidos articulares seguido de um processo inflamatório local desencadeando ataques agudos tratados com anti-inflamatórios. Por sua vez, o Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos- γ (PPAR- γ) está relacionado com o controle do processo inflamatório nesses pacientes, atuando como modulador negativo, contribuindo para o desenvolvimento de agonistas do PPAR- γ , como as tiazolidinas. Dentre elas, as moléculas LPSF/JB-6 e LPSF/JB-12 (10 e 50 μ M) tiveram sua citotoxicidade avaliada em células mononucleares de voluntários sadios (PBMCS) pelo ensaio de MTT não sendo consideradas tóxicas. Foi realizada cultura de PBMCS de pacientes gotosos e voluntários sadios por 24h à 37°C e 5% de CO₂ na presença dos LPSF/JBs (25, 50 e 75 μ M) a fim de, medir a secreção da citocina IL-1 β (pg/mL) pelo ensaio de ELISA. As condições tratadas foram comparadas ao estímulo com monourato de sódio. Nas células dos voluntários, a citocina foi inibida de maneira satisfatória pelo JB-6 25 (37,60 $\pm$ 134,9); 50 (41,43 $\pm$ 141,7); 75 μ M (38,84 $\pm$ 191,8) e JB-12 25 (38,22 $\pm$ 176,5); 50 (23,41 $\pm$ 228,7); 75 μ M (24,77 $\pm$ 157,2 e nas células dos pacientes pelo JB-6 25 (217,70 $\pm$ 170,5); 50 (210,40 $\pm$ 178,3); 75 μ M (209,80 $\pm$ 273,0) e JB-12 25 (76,0 $\pm$ 260,6); 50 (69,14 $\pm$ 174,0); 75 μ M (54,43 $\pm$ 253,0) sendo considerados candidatos a anti-inflamatórios promissores para o tratamento das crises agudas de gota.*

PALAVRAS-CHAVE: *Tiazolidinas; Gota; MTT, atividade anti-inflamatória, Citocinas*

ABSTRACT – *Gout is a disease where sustained hyperuricemia leads to monourate sodium crystals (MSU deposition in the joint tissues followed by a local inflammatory process triggering acute attacks treated with anti-*

inflammatories. In turn, the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR- γ) is related to the inflammatory process control in these patients, acting as a negative modulator, contributing to PPAR- γ agonists development such as thiazolidines. Among them, LPSF/JB-6 and 12 (10 and 50 μ M) molecules had their cytotoxicity evaluated in mononuclear cells (PBMCs) of healthy volunteers by the MTT assay not being considered toxic. Gout patients and healthy volunteers PBMCs were cultured for 24 h at 37 °C and CO₂ 5% in the presence of LPSF/JBs (25, 50 and 75 μ M) in order to measure the cytokine IL-1 β secretion (pg/mL) by ELISA assay. The treated conditions were compared to sodium monourate stimulation. The cytokine was satisfactorily inhibited in volunteers cells by JB-6 25 (37.60 $\pm$ 134.9); 50 (41.43 $\pm$ 141.7); 75 μ M (38.84 $\pm$ 191.8) and JB-12 25 (38.22 $\pm$ 176.5); 50 (23.41 $\pm$ 228.7); 75 μ M (24.77 $\pm$ 157.2) and in patients cells by JB-6 25 (217.70 $\pm$ 170.5); 50 (210.40 $\pm$ 178.3); 75 μ M (209.80 $\pm$ 273.0) and JB-12 25 (76.0 $\pm$ 260.6); 50 (69.14 $\pm$ 174.0); 75 μ M (54.43 $\pm$ 253.0) being considered promising anti-inflammatory drugs candidates for the treatment of gout acute attacks.

KEYWORDS: Thiazolidines; Gout; MTT, anti-inflammatory activity, Cytokines

1. INTRODUÇÃO

A gota é uma doença inflamatória sistêmica ocasionada pela deposição de cristais de Monourato de Sódio nos tecidos articular e periarticular, sendo reflexo de períodos prolongados de hiperuricemia (AUS $\geq$ 6,8 mg/dL), desencadeando um processo inflamatório agudo nas articulações devido ao englobamento dos cristais por células fagocíticas, proporcionando edema local, rubor e dor intensa. (SANTOS, 2016). Alguns estudos vêm mostrando que as crises agudas de gota são auto-limitadas, tendendo a chegar ao fim entre 7-10 dias, estando relacionado ao aumento da expressão do mRNA do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos Gama (PPAR- γ) (AKAHOSHI et al., 2003; CHANG et al., 2016). Desta forma, o desenvolvimento de moléculas agonistas do receptor PPAR- γ poderia minimizar os sintomas da gota atuando na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Assim este trabalho visou testar novos derivados tiazolidínicos buscando atividade anti-inflamatória, avaliando a citotoxicidade em células saudáveis e a imunomodulação da citocina IL-1 β em PBMCs de voluntários sadios e pacientes gotosos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética (CEP/CCS/UFPE), sob o registro 19646913.0.0000.5208. Foram coletados 27 mL de sangue em tubos de heparina de cada um dos 9 pacientes e 4 voluntários saudáveis. As Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) foram centrifugadas em gradiente de Ficoll-Paque PLUS. Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas PBMCs de três voluntários saudáveis em triplicata sendo plaqueadas em placas de 96 poços (5x10⁵ células/poço) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48h com os compostos LPSF/JB-6 e 12 (10 e 75 μ M) tendo sua viabilidade avaliada através do ensaio de MTT. Paralelamente, foram preparados os cristais de monourato de sódio (MSU). As PBMCs coletadas foram cultivadas por 24h em placas de 24 poços (1x10⁶ cel/mL), com os cristais de MSU sintetizados (0,5 mg/mL), os fármacos de referência Colchicina (2,5 μ M) e Metilprednisolona (100 μ M) e compostos LPSF/JB-6 e 12 (25, 50 e

75µM). Após a cultura, o sobrenadante foi coletado e realizado ELISA para a dosagem da citocina IL-1 β (BD Bioscience - limites de detecção 3,90-500 pg/mL) seguindo as instruções do fabricante. O software GraphPad Prism 6 foi utilizado para confecção dos gráficos e análise estatística (testes de Kolmogorov-Smirnov e Wilcoxon; valor de $p > 0,05$ como estatisticamente significativo).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de Citotoxicidade

Nas doses testadas, os compostos não se apresentaram tóxicos frente às PBMCs, não interferindo na viabilidade celular (Tabela 1).

Tabela 1 – Viabilidade celular de PBMCs de voluntários sadios (n=3) após exposição aos derivados tiazolidínicos LPSF/JBs 6 e 12 nas doses de 10 e 75µM

Compostos / Doses(µM)	10		75	
	Viabilidade (%)	Desvio padrão (%)	Viabilidade (%)	Desvio padrão (%)
LPSF/JB-6	93,62	11,04	95,56	7,7
LPSF/JB-12	95,48	7,83	97,82	1,94

3.2. Dosagem de IL-1B por ELISA

Os resultados estão expressos em valores de medianas com seus respectivos desvios-padrão. As comparações foram feitas entre as condições tratadas com a condição do estímulo C + MSU. Para os voluntários sadios, o grupo C + MSU ($41,64 \pm 75,32$ pg/mL) mostrou diferença significativa comparado com o grupo não tratado ($3,9060 \pm 15,93$ pg/mL; $p = 0,1250$) (Figura 1 - A e B). Destacaram-se a Metilprednisolona ($43,69 \pm 67,97$ pg/mL; $p = 0,6250$), o LPSF/JB-6 nas doses de 25 ($37,60 \pm 134,9$ pg/mL; $p > 0,99$), 50 ($41,43 \pm 141,7$ pg/mL; $p = 0,8750$) e 75 µM ($38,84 \pm 191,8$ pg/mL; $p > 0,99$) e o LPSF/JB-12 nas doses de 25 ($38,22 \pm 176,5$ pg/mL; $p = 0,8750$), 50 ($23,41 \pm 228,7$ pg/mL; $p = 0,8750$) e 75 µM ($24,77 \pm 157,2$ pg/mL; $p = 0,8750$). (Figura 1 - A e B).

Para os pacientes, o grupo C + MSU ($165,0 \pm 192,0$ pg/mL) mostrou diferença significativa comparado com o grupo não tratado ($3,91 \pm 2,01$ pg/mL; $p = 0,0039$) (Figura 1 - C e D). Destacaram-se a Metilprednisolona ($87,82 \pm 51,80$ pg/mL; $p = 0,0078$), o LPSF/JB-6 nas doses de 25 ($217,70 \pm 170,5$ pg/mL; $p = 0,91$), 50 ($210,40 \pm 178,3$ pg/mL; $p = 0,9102$) e 75 µM ($209,80 \pm 273,0$ pg/mL; $p = 0,9102$) e o LPSF/JB-12 nas doses de 25 ($76,0 \pm 260,6$ pg/mL; $p = 0,4258$), 50 ($69,14 \pm 174,0$ pg/mL; $p = 0,0742$) e 75 µM ($54,43 \pm 253,0$ pg/mL; $p = 0,6523$). (Figura 1 – C e D). O LPSF/JB-12 se destacou quanto a sua atividade anti-inflamatória. Assim foi possível demonstrar que derivados tiazolidínicos com substituintes mais volumosos podem ser bastante úteis no desenvolvimento de moléculas anti-inflamatórias (BARROS et al., 2010; CHADHA et al., 2015).

Figura 1 – Secreção de IL-1 β produzida por PBMCs de voluntários saudáveis (A e B) e pacientes portadores de gota (C e D). Significância estatística MSU e demais grupos (* ou **); significância estatística entre MSU + Colchicina e demais grupos (# ou ##).

4. CONCLUSÃO

Os derivados tiazolidínicos podem ser considerados promissores principalmente aqueles substituídos na posição 3,5-dimetil por grupos volumosos ou básicos podendo ser uma boa alternativa para o tratamento das crises agudas, atuando como bons candidatos a fármacos anti-inflamatórios para o tratamento da gota, uma vez que inibe citocinas pró-inflamatórias importantes para fisiopatologia da doença. Contudo, ainda se faz necessário a dosagem de outras citocinas e proteínas envolvidas na formação do inflamossomo para entender melhor o seu mecanismo de ação, tais como: NLRP3, caspase 1, IL-6, IL-22, IL-18 e IL-10.

5. REFERÊNCIAS

- AKAHOSHI, T. et al. Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 231–239, jan. 2003.
- BARROS, C. D. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 11, p. 3805–3811, 2010.
- CHADHA, N. et al. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 2953–2974, 1 jul. 2015.
- CHANG, W.-C. et al. Genetic variants of PPAR-gamma coactivator 1B augment NLRP3-mediated inflammation in gouty arthritis. **Rheumatology**, v. 56, n. 3, p. kew337, 25 out. 2016.
- SANTOS, F. Gota: uma revisão. **Revista Médica da UFPR**, v. 3, n. 1, p. 25–31, 2 maio 2016.

6. AGRADECIMENTOS

UFPE, FACEPE, CNPq, CAPES e INCT-IF