

Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu”

EVALUACION *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE NUEVAS 5-NITROINDAZOLINONAS

ASSESSMENT OF THE *IN VIVO* ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF NOVEL 5-NITROINDAZOLINONES

Autores: Dany Siverio-Mota^I, Liliana Vicet-Muro^{II}, Yankier Rivero-Guerra^{III}, Mario Luis Sueiro-Oyarzun^{IV}, Yovani Marrero-Ponce^V, Vicente J. Arán^{VI}.

^I Máster en Ciencias, Profesor Asistente. Departamento de Farmacia. Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias. Profesora Auxiliar. Departamento de Farmacia. Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^{III} Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Oficina Territorial de Normalización, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^{IV} Máster en Ciencias. Profesor Auxiliar. Departamento de Farmacia. Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^V Doctor en Ciencias. Profesor Auxiliar. CAMD-BIR Unit. Departamento de Farmacia. Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

^{VI} Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid, España.

Resumen

Introducción: En el presente trabajo se realizó el estudio experimental en ratas, de un grupo de nuevos derivados de 5-nitroindazolinona con actividad antiinflamatoria identificada mediante estudios *in silico* e *in vivo*, precedentes. Método: La actividad farmacológica fue evaluada a través del ensayo del edema plantar inducido por carragenina. Los compuestos VA5-15c, VA5-13h, VA5-13l, VATR-4 y VATR-5 fueron administrados oralmente a las dosis de 10 y 20 mg/kg de peso vivo. Resultados: Todos los compuestos evaluados inhibieron el edema, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para VA5-13h, VA5-13l, VATR-4 y VATR-5 ($p < 0,05$). Las sustancias VA5-13l y VATR-4, a 20 mg/kg de peso vivo, mostraron los mejores resultados con 46,08% y 49,29% de inhibición respectivamente. Actividad comparable significativamente ($p > 0,05$) al control positivo (indometacina). Conclusiones: Se puede concluir que las 5-nitroindazolinonas constituyen un nuevo núcleo estructural para la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios.

Palabras clave: Actividad antiinflamatoria, 5-nitroindazolinonas, 5-nitroindazol.

Abstract

Introduction: In the present work, the experimental study in rats of a group of 5-nitroindazolinone derivatives with anti-inflammatory activity identified by precedent *in silico* and *in vivo* studies, was carried out. Methods: The pharmacological activity was evaluated through of carrageenan induced paw edema assay. The compounds VA5-15c, VA5-13h, VA5-13l, VATR-4 and VATR-5 were administered orally to the doses of 10 and 20 mg/kg of weight. Results: All the tested compounds inhibited the edema, existing differences statistically significant respect to the negative control for

the substances VA5-13h, VA5-13l, VATR-4 and VATR-5 ($p < 0,05$). The substances VA5-13l and VATR-4, to 20 mg/kg of weight, showed the best results with 46,08% and 49,29% of inhibition respectively. This activity was significantly comparable ($p > 0,05$) to the positive control (indometacina). Conclusion: It is possible to conclude that the 5-nitroindazolinones constitute a new structural support for the search of new anti-inflammatory drugs.

Keywords: Antiinflammatory activity, 5-nitroindazolinones, 5-nitroindazole.

Introducción

La inflamación es considerada el primer mecanismo fisiológico de defensa del organismo ante infecciones, alérgenos y daños por agentes físicos y químicos. Esta respuesta protectora, puede en ocasiones resultar persistente e inducir o agravar otras enfermedades conduciendo a procesos inflamatorios agudos o crónicos y la consecuente necesidad de utilización de terapias medicamentosas ^[1].

Dentro de los medicamentos que se utilizan para el control de los procesos inflamatorios, los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen los más utilizados a nivel mundial ^[2]. Estos fármacos, al ser utilizados por largos períodos de tiempo provocan severas reacciones adversas de las cuales no siempre son conscientes los pacientes, constituyendo ello un motivo de preocupación en la actualidad ^[3, 4].

Debido al amplio uso de estos fármacos y la alta incidencia de reacciones adversas que presentan resulta apropiada la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiinflamatoria que puedan constituir punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios eficaces y más seguros desde el punto de vista terapéutico. En este sentido algunos compuestos derivados del indazol pueden constituir una alternativa ^[5].

Recientemente, estudios *in silico* utilizando los descriptores TOMOCOMD-CARDD y estudios *in vivo* utilizando peces zebra y ratones como material biológico, mostraron que derivados de la 5-nitro-3-indazolinona, presentan actividad antiinflamatoria comparable con la indometacina ^[6]. Continuar el estudio estos compuestos, utilizando otros métodos experimentales, resulta de gran interés. Por ello se propone, evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de un grupo de estos derivados

de 5-nitroindazolinona y compuestos químicos relacionados administrados por vía oral, en ratas.

Métodos

El efecto antiinflamatorio de las sustancias se evaluó a través del ensayo de edema plantar inducido por carragenina ^[7]. Los compuestos evaluados fueron obtenidos por vía sintética a partir de la 3-indazolinona ^[8-10]. Las estructuras químicas de éstos se muestran en la Fig. 1.

-Material biológico: se utilizaron ratas machos *Wistar* de 180 ± 20 g de peso vivo (p.v.) procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana. Una vez recibidos, se estabularon bajo condiciones perfectamente estandarizadas: temperatura 23°C, humedad relativa 40-70%, fotoperíodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial estándar y agua *ad libitum*, la alimentación fue retirada 18 horas antes de comenzar el experimento. Los animales se distribuyeron a razón de 6 por grupo de estudio. Durante el experimento se cumplieron con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas para este tipo de estudio ^[11].

-Descripción de la técnica: inicialmente se midió el de la pata posterior derecha de las ratas con el empleo del pletismómetro (7140, Ugo Basile, Italia), se realizaron tres réplicas con un coeficiente de variación menor del 4% para la determinación del valor basal. Posteriormente, los compuestos de prueba fueron suspendidos en carboximetilcelulosa al 0.5% y administrados en dosis de 10 y 20 mg/kg p.v. Se utilizó un grupo control positivo que recibió indometacina (Sigma Aldrich) a razón de 10mg/kg p.v. y un grupo control negativo que recibió carboximetilcelulosa al 0.5% (10mL/kg p.v.). Todas las sustancias se administraron por vía oral utilizando cánulas intragástricas 16 G y los volúmenes recomendados según la vía de administración

utilizada ^[12]. Transcurrida media hora, se administró 0,1 mL de una suspensión de λ -carragenina 1% en la aponeurosis plantar derecha de todos los animales. Los volúmenes de la pata inflamada se midieron a las 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la administración de la carragenina. La diferencia entre el valor inicial y subsecuentes lecturas para cada tiempo de estudio arrojó el volumen de edema. Los porcentajes de inflamación se calcularon mediante la expresión matemática:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{X_{\text{control}} - X_{\text{problema}}}{X_{\text{control}}} \times 100$$

Donde:

X_{control} – es el valor medio de edema de los animales del grupo control negativo.

X_{problema} – es el valor medio de edema de los animales del grupo problema.

-*Análisis estadístico.* Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de un análisis de comparaciones de las medias de grupos individuales. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar (D.E.). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows.

Resultados

Los valores de edema, expresado como la media \pm D.E. y el porcentaje de inhibición de cada sustancia con respecto al grupo control negativo, se muestran en la tabla 1. Todos los grupos mostraron los mayores valores de edema a las tres y cuatro horas de administrada la carragenina.

Para las sustancias en estudio y la indometacina, estos valores resultaron inferiores al del grupo control negativo existiendo diferencias estadísticamente significativas para las sustancias (VA5-13l, VATR-4) y (VA5-13h, VA5-13l, VATR-4 y VATR-5) a las dosis de 10 y 20mg/kg p.v., respectivamente ($p < 0,05$). En todos los casos la dosis de 20mg/kg p.v. mostró valores de inhibición superiores a los obtenidos para

la dosis de 10mg/kg p.v. Los mayores porcentajes de inhibición del edema a las 5 horas de estudio se reportan para la indometacina (10mg/kg p.v.) y los compuestos VA5-13I y VATR-4 a la dosis de 20mg/kg p.v., con valores de 60,75, 46,08 y 49,29% respectivamente, siendo estos valores significativamente comparables ($p > 0,05$).

Discusión

El efecto antiinflamatorio de las sustancias se evaluó a través del edema inducido por carragenina. La administración de una solución de este mucopolisacárido sulfatado, extraído del alga marina *Chondrus crispus*, en el nivel de la aponeurosis plantar de la rata provoca una reacción de carácter inflamatorio agudo no específica y de tipo bifásica ^[13]. La fase inicial es atribuida a la liberación de histamina y serotonina mientras que en la segunda fase, predominan las prostaglandinas PGE₁, PGE₂ y PGF₂ ^[14, 15]. El edema mantenido entre la primera y segunda fase es debido a la bradiginina y diversos factores del complemento implicados en la inflamación que actúan como amplificadores de la respuesta ^[16]. Otro importante mediador en este proceso es el óxido nítrico producido por la enzima óxido nítrico sintetasa constitutiva e inducible, en la primera y segunda fase de la inflamación, respectivamente ^[17, 18].

Estos mediadores químicos producen un incremento de la permeabilidad vascular, promoviendo la acumulación de fluidos en los tejidos y como consecuencia el desarrollo del edema ^[19], el cual es empleado como variable para la evaluación de la actividad antiinflamatoria en este modelo experimental ^[7].

La indometacina es utilizada con frecuencia como control positivo en este método experimental, pues inhibe las ciclooxigenasas (COX) y por tanto, inhibe la formación y liberación de las prostaglandinas que en la segunda fase (entre las 3 y 4 horas) adquieren su máxima manifestación, principalmente la PGE₂ ^[14]. Los porcentajes de

inhibición de la inflamación a estos tiempos de estudio, 54,99% y 60,31% respectivamente, se encuentran en correspondencia con los resultados de estudios similares [20, 21].

Los derivados de la 5-nitroindazolinona mostraron efectos antiinflamatorios por otras técnicas experimentales *in silico* e *in vivo* [6]. Se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de algunos derivados del imidazol por lo que el estudio de nuevos derivados de este compuesto heterocíclico resulta de interés para la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos [5]. Los compuestos 5-nitroindazol y 7-nitroindazol por ejemplo, han mostrado efectos antiinflamatorios en el edema plantar inducido por carragenina. Estos efectos han sido atribuidos a la inhibición de la producción de óxido nítrico [22-24], mediador importante para la amplificación de la respuesta inflamatoria [25]. Las indazolinonas, específicamente las 2-*N*-sustituidas, presentan actividad antiinflamatoria presentando inhibición en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Es conocido que tanto la COX como la 5-Lipoxigenasa son susceptibles a inhibición por compuestos con bajo potencial redox como las indazolinonas, si bien no existe una relación directa entre la inhibición de las enzimas y el potencial redox. Las 2-*N*-bencil y las 2-*N*-metil indazolinonas han mostrado efectos antiinflamatorios al inhibir tanto la síntesis de Leucotrieno B₄ *in vitro* y *ex vivo*, como de PGE₂ *in vitro* [26, 27].

Se puede concluir que el núcleo de las 5-nitroindazolinonas constituye un nuevo soporte estructural para la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al proyecto VLIR (*Vlaamse Inter Universitaire Raad, Flemish Interuniversity Council*), Bélgica (Programa VLIR-UCLV) y al Ministerio de

Ciencia e Innovación de España (MICINN, proyecto: SAF2009-10399) por el financiamiento parcial para la realización de este trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. Rang, H.P., et al., *Local hormones inflammation and immune reactions*, in *Rang and Dale's Pharmacology*. 2008, Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia. p. 205-225.
2. Flórez, J., *Farmacología Humana*, ed. J. Flórez, J.A. Armijo, and A. Mediavilla. 2008, Barcelona (España): Masson. S.A.
3. Lanas, A., *Efectos secundarios gastrointestinales por antiinflamatorios no esteroideos y costes en el Sistema Nacional de Salud*. *An. Med. Interna*, 2001. 18: p. 561-563.
4. Gambero, A., et al., *Comparative study of anti-inflammatory and ulcerogenic activities of different cyclo-oxygenase inhibitors*. *Inflammopharmacology*, 2005. 13(5-6): p. 441-454
5. Thangadurai, A., et al., *Indazole: a medicinally important heterocyclic moiety*. *Med. Chem. Res.*, 2011.
6. Marrero-Ponce, Y., et al., *Discovery of novel anti-inflammatory drug-like compounds by aligning in silico and in vivo screening: The nitroindazolinone chemotype*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011. 46: p. 5736-5753.
7. Winter, C.A., E.A. Risley, and N.W. Nuss, *Carrageenin induced oedema in hind paw of the rats an assay for antiinflammatory drug*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962. 111: p. 544– 547.

8. Arán, V.J., et al., *Reactivity of 1,1-disubstituted Indazol-3-ylidioxides: Synthesis of Some Substituted Indazolols and Indazolinones*. J. Chem. Soc., 1993. 1: p. 1119-1127.
9. Arán, V.J., et al., *Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives*. Bioorg. Med. Chem., 2005. 13: p. 3197-3207.
10. Rodríguez, J., et al., *New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth: synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies*. Bioorg. Med. Chem., 2009. 17(24): p. 8186-8196.
11. Victoria-Amador, M.C. and F.J. Morón-Rodríguez, *Bioética en experimentación animal para validar usos de plantas medicinales en el Laboratorio Central de Farmacología*. Rev. Cubana Plant. Med., 2010 15((3)): p. 157-168.
12. Diehl, K.H., et al., *A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes*. J. Appl. Toxicol., 2001. 21: p. 15-23.
13. Vinegar, R., W. Schreiber, and R. Hugo, *Biphasic development of carrageenan in rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1969. 166: p. 96-103.
14. Dirosa, M. and J. Giroud, *Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine*. J. Pathol, 1971: p. 15-29.
15. Heller, A., et al., *Lipid mediators in inflammatory disorders*. Drugs, 1998: p. 487-496.
16. Burch, R. and C. DeHaas, *A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1990: p. 189-193.

17. Salvemini, D., et al., *Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paws inflammation*. Br. J. Pharmacol., 1996. 118: p. 829-838.
18. Salvemini, D., K. Seibert, and M.H. Marino, *PG release, as a consequence of NO-driven COX activation contributes to the proinflammatory effects of NO*. Drugs News & Perspective, 1996. 4: p. 204-219.
19. Williams, T. and J. Morley, *Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation*. Nature, 1973: p. 215-217.
20. Baluprakash, T., et al., *In Vitro Anti-inflammatory Activity of Exacum wightianum Arn. (Gentianaceae)- An Endemic Medicinal Plant*. J. App. Pharm. Sci., 2011. 01(10): p. 163-166.
21. Gulcan, H.O., et al., *Synthesis of New 4-(5-Chloro-2-oxo-3H-benzoxazol-3-yl)butanamide Derivatives and Their Analgesic and Anti-Inflammatory properties*. Turk. J. Chem. 2003. 27: p. 467 - 476.
22. Ianaro, A., et al., *A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice*. Immunology, 1994. 82: p. 370-375.
23. Handy, R.L.C. and P.K. Moore, *A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity*. Brit. J. Pharmacol., 1998. 123: p. 1119 -1126.
24. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J., 2001. 357: p. 593-615.
25. Sautebin, L., et al., *Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema*. Eur. J. Pharmacol., 1995. 286: p. 219-222.

26. Foster, S.J., et al., *2-Substituted indazolinones: orally active and selective 5-lipoxygenase inhibitors with anti-inflammatory activity*. Br. J. Pharmacol., 1989. 99: p. 113-118.
27. Bruneau, P. and C. Delvare, *Indazolinones, a New Series of Redox-Active 5-Lipoxygenase Inhibitors with Built-In Selectivity and Oral Activity*. J. Med. Chem, 1991. 34: p. 1028-1036.

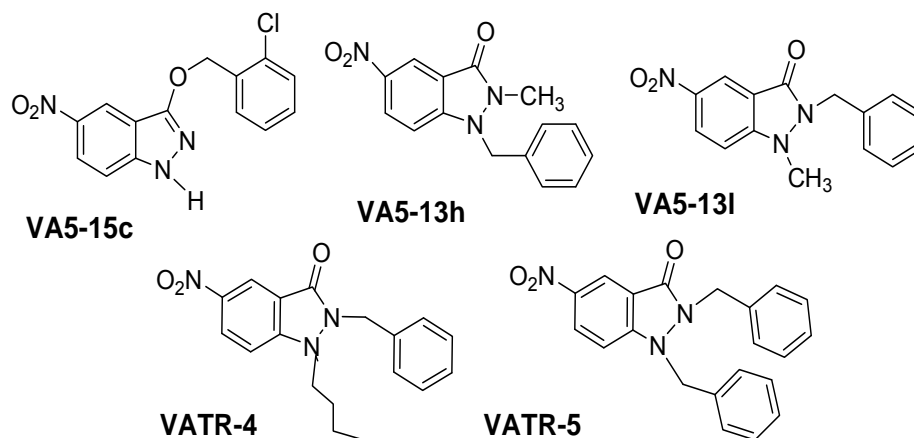


Fig. 1. Estructura química de las nitroindazolinonas identificadas como nuevos antiinflamatorios y evaluadas *in vivo* en el presente estudio.

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria de las nitroindazolinonas por el modelo de edema plantar inducido por carragenina.

Nombre o código	Dosis (mg/kg)	Edema (volumen en mL) ^a				
		1(h)	2(h)	3(h)	4(h)	5(h)
Control	-	0,27 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,72 ± 0,12	0,81 ± 0,18	0,69 ± 0,14
Indometacina	10	0,19 ± 0,08	0,28 ± 0,12	0,33 ± 0,19	0,32 ± 0,16	0,27 ± 0,13
		(30,32)	(37,78)	(54,99)**	(60,31)**	(60,75)**
VA5-15c	10	0,26 ± 0,04	0,41 ± 0,15	0,56 ± 0,19	0,62 ± 0,13	0,55 ± 0,15
		(0,72)	(7,05)	(21,96)	(23,84) ^b	(20,05) ^b
VA5-15c	20	0,27 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,53 ± 0,12	0,58 ± 0,16	0,44 ± 0,10
		-	(17,09)	(26,40)	(28,77) ^b	(35,98)
VA5-13h	10	0,23 ± 0,07	0,36 ± 0,08	0,53 ± 0,17	0,55 ± 0,22	0,46 ± 0,18
		(12,21)	(18,04)	(26,76)	(32,10)	(33,51)
VA5-13h	20	0,21 ± 0,04	0,34 ± 0,05	0,49 ± 0,14	0,52 ± 0,10	0,43 ± 0,07
		(18,95)	(23,16)	(32,17)	(35,86)*	(37,22)*
VA5-13l	10	0,24 ± 0,09	0,39 ± 0,18	0,51 ± 0,09	0,50 ± 0,10	0,41 ± 0,09
		(10,53)	(11,84)	(29,65)	(38,03)*	(40,23)*
VA5-13l	20	0,21 ± 0,05	0,36 ± 0,06	0,45 ± 0,09	0,45 ± 0,10	0,37 ± 0,07
		(19,16)	(20,16)	(37,51)	(44,60)**	(46,08)**
VATR-4	10	0,23 ± 0,07	0,38 ± 0,21	0,49 ± 0,21	0,46 ± 0,19	0,39 ± 0,13
		(14,61)	(14,84)	(31,42)	(43,52)**	(43,52)**
VATR-4	20	0,22 ± 0,08	0,35 ± 0,10	0,42 ± 0,12	0,43 ± 0,10	0,34 ± 0,11
		(15,87)	(21,44)	(40,99)*	(46,99)**	(49,29)**
VATR-5	10	0,20 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,54 ± 0,06	0,45 ± 0,09
		(23,79)	(26,84)	(31,14)	(34,02)	(34,04)
VATR-5	20	0,19 ± 0,01	0,31 ± 0,15	0,47 ± 0,17	0,50 ± 0,14	0,42 ± 0,07
		(27,49)	(29,84)	(34,94)	(38,52)*	(39,26)*

^aLos valores representan la media ± D,E, (n=6); ^bdiferencias significativas comparado con la Indometacina p<0,05; diferencias significativas comparado con el grupo control *p<0,05 y **p<0,01; (Anova de un factor, Tukey). Los valores en paréntesis representan porcentajes de inhibición del edema a cada tiempo.