

**"CITRATO DE RÓDIO II: MODELO DE AGENTE INFLAMATÓRIO"****"Rodium Citrate II: Inflammatory Agent model"**

Andrade, Alvaro F. Junior \*  
 Cabral, Myrian \*\*  
 Colla Moreira, Ronaldo de \*\*\*  
 Feder, David \*\*\*\*  
 Siguemi Sudo, Lia \*\*\*\*\*  
 Orientador: Ber Zyngier, Szulim \*\*\*\*\*

**RESUMO:** O citrato de ródio II foi sintetizado na procura de complexos de ródio com atividade anti-tumoral e baixa toxicidade. Não foram observados mortes ou outros sinais de toxicidade após injeção de 260 mg/kg de citrato de ródio II, intra-peritoneal em camundongos observados durante 14 dias. A substância provoca um quadro inflamatório que se caracteriza por edema persistente por 24 horas, quando injetada na pata de ratos. Injetada na cavidade peritoneal há aumento de neutrófilos segmentados no exudato peritoneal bem como aumento significativo no número de macrófagos espalhados.

**UNITERMOS:** Citrato de ródio II, toxicidade aguda, espalhamento, macrófagos, neutrófilos segmentados.

**SUMMARY:** The rodium citrate was sintetized in a search or rodium complex with anti-tumoral activity and low toxicity. We didn't observe deaths and others signs of toxicity after the injection of 260 mg/kg of rodium citrate II, intraperitoneal that were observed in mice for 14 days.

The substance caused an inflammatory response that was characterized by a persistent edema for 24 hours while injected in the mouse's pad.

After the injection in the peritoneal cavity of the mice, we found out that was an increase of neutrophilic segmented in the peritoneal exudate, as well as, an significative increase in the number of spread monocyte.

**KEYWORDS:** Rodium citrate II, Toxicity, spread monocyte, neutrophilic segmented.

**I — INTRODUÇÃO**

Carboxilatos de ródio II foram descritos como tendo atividade anti-tumoral em camundongos portadores do tumor de Ehrlich (BEAR et al 1975; HOWARD et al 1977). Os carboxilatos usados foram o acetato, o propionato e o butirato. Essas substâncias apresentavam alta toxicidade aguda, com valores de DL10 variando de 0,7 mg/kg para o butirato a 19 mg/kg para o acetato.

Na pesquisa de um complexo de ródio de menor toxicidade, NAJJAR em 1987, no Instituto de Química da USP, sintetizou o citrato de ródio II. Essa substância apresenta um peso molecular de 941,74 e uma solubilidade em água de 7 mg/ml ou  $7,2 \times 1/1000$  M em temperatura ambiente. Sua atividade antitumoral está sendo pesquisada.

No presente trabalho foram estudados a toxicidade aguda do citrato de ródio II, bem como, sua atividade inflamatória, tanto no que se refere ao edema que provoca quando injetado em pata de rato quanto ao tipo de exsudato celular que induz quando injetado na cavidade peritoneal de camundongos.

**II — MATERIAL E MÉTODOS**

2.1. — Toxicidade aguda: Grupos de 10 camundongos albinos receberam por via intraperitoneal citrato de ródio II nas doses de 26 mg/kg, 65 mg/kg, 130 mg/kg e 260 mg/kg. Os animais foram observados por 14 dias.

2.2. — Edema na pata dos ratos: Citrato de ródio foi dissolvido em salina estéril (6 mg/ml) e dessa suspensão 0,1 ml era injetado na região subplantar de uma das patas posteriores de animais não anestesiados. A pata contralateral foi injetada com igual volume de salina estéril. A osmolaridade da solução de citrato de ródio era equivalente à da solução salina.

O volume das patas até a articulação tibio-társica foi medida, antes e a vários intervalos de tempo após a injeção podal de citrato de ródio, com auxílio de pletismógrafo descrito por Winder et al. 1957, que consiste de uma cuba contendo solução de I-anil sulfato de sódio, na qual era imersa a pata do rato. O líquido da cuba desloca-se para um tubo de vidro graduado, permitindo a estimativa do edema.

\* Técnico de Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

\*\* Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

\*\*\* Acadêmico do Quinto ano da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

\*\*\*\* Professor Auxiliar de Ensino da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

\*\*\*\*\* Professor Assistente Doutor do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

\*\*\*\*\* Professor Titular da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores-controle (patas injetadas com salina) dos valores-teste (patas que receberam injeção local de irritante).

Tratamento com anti-histamínico (anti-H1): os animais foram tratados com 0.5 mg/kg de prometazina (Fernegan), Rhodia, por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de citrato de ródio na pata e a sequência metodológica realizada nesse grupo de animais foi idêntica descrita nos parágrafos anteriores.

2.3. — Exsudato peritoneal: O citrato de ródio foi dissolvido em solução salina estéril (6 mg/kg) e dessa suspensão, 0.1 ml foram injetados intraperitonealmente em 40 camundongos e outros 40 animais foram injetados com 0.1 ml de solução salina estéril. A osmolaridade da solução de citrato de ródio era equivalente a da solução salina.

Foram montados 4 grupos (A, B, C e D) contendo, cada, 20 animais. Em todos os grupos, 10 animais foram tratados com citrato de ródio e 10 com solução salina. Após 24 horas, para o grupo A, 48 horas para o grupo B, 72 horas para o grupo C e 96 horas para o grupo D, os animais foram sacrificados e suas cavidades peritoneais foram lavadas com 2.5 ml de solução salina tamponada (pH 7.2) e heparinizada para retirada das células. Os líquidos obtidos foram submetidos ao seguinte tratamento:

1) — Foi adicionado a 1 mililitro de exsudato 0.1 ml de uma solução de cristal violeta 0.05% e posteriormente submetido a contagem global, em câmara de Neubauer, e diferencial (segmentados, bastonetes, linfócitos e macrófagos) entre lâmina e lamínula, cujos resultados constam (polimorfonucleares segmentados) na tabela III.

2) — O restante do exsudato foi utilizado para a técnica do espraçamento.

Todo material utilizado para coleta e amostragem era de natureza plástica.

2.4. — Espraçamento de macrófagos: Foram colocados 0.2 ml de exsudatos em lamínula e decorridos 15 minutos (para aderência de macrófagos) a mesma foi esgotada e lavada com solução salina tamponada pH 7.4 (PBS), seca e escorrida em gase. Posteriormente foram colocadas, individualmente, em placas de Petri e imersas em meio de Eagle com 5% de HEPES e incubadas a 37 graus Celcius por uma hora. As lamínulas foram retiradas do meio de Cultura, lavadas com PBS (solução salina tamponada), esgotadas e fixadas com glutaraldeído (2.5%) por 10 minutos, sendo novamente lavadas e secas. Fixadas as lâminas foram coradas por H.E. e lidas no microscópio óptico comum. As células espraçadas foram contadas e constam na tabela IV.

2.5. — Métodos estatísticos: Os resultados foram analisados pelo teste t, teste t pareado e teste de Mann-Whitney (SIEGEL, 1977). Em todos os testes estatísticos utilizados, o nível de significância considerado foi  $p < 0.05$ .

### III — RESULTADOS

3.1. — Toxicidade aguda: Os camundongos foram observados por 15 dias e não se registrou morte ou alteração clínica visível.

3.2. — Edema na pata de ratos: Como se pode verificar na tabela I, o citrato de ródio II induz à formação de intenso edema. Esse edema regride após 24 horas.

A administração prévia de anti-histamínico H1, não diminui a intensidade do edema (tabela II).

3.3. — Exsudato peritoneal: Os resultados estão esquematizado na tabela III. O citrato de ródio aumentou significativamente a presença de polimorfos segmentados, decorridas 72 e 96 horas de tratamento.

Não houve aumento significativo de macrófagos e linfócitos no exsudato dos animais tratados pelo complexo de ródio II.

3.4. — Espraçamento de macrófagos: A tabela IV sintetiza os resultados obtidos.

Os macrófagos dos exsudatos obtidos após 24, 48 e 72 horas após o tratamento com citrato de ródio II (grupos Ac, Bc e Cc respectivamente) apresentaram-se espraçados em número significativamente maior que os dos controles tratados com salina.

### IV — DISCUSSÃO

O citrato de ródio II, sintetizado em nosso meio, não provocou sinais de toxicidade aguda quando injetado em camundongo na dose de 260 mg/kg por via intraperitoneal. Sob esse aspecto o citrato de ródio II é diferente de outros carboxilatos de ródio II, descritos na literatura, os quais são bastante tóxicos.

O citrato de ródio II evidenciou ser um agente inflamatório. Não há referências na literatura, sobre efeitos inflamatórios dos outros carboxilatos de ródio.

O quadro inflamatório provocado pelo citrato de ródio II caracteriza-se pelo acentuado edema que provoca quando injetado na pata de ratos e pela migração de células para a cavidade peritoneal quando injetado intraperitoneal em camundongos.

O edema na pata dos ratos regride em 24 horas. Esse edema não deve ser causado por liberação de histamina pois não foi inibido por injeção prévia intraperitoneal do anti-histamínico H1, prometazina.

A injeção intraperitoneal de citrato de ródio II em camundongos provoca um aumento da migração para cavidade peritoneal de polimorfos segmentados, assim como, maior espraiamento de macrófagos.

A ativação de macrófagos pelo citrato de ródio II pode se constituir numa pista para explicar efeitos anti-tumorais já descritos para outros carboxilatos de ródio II.

#### IV — CONCLUSÕES

5.1. — O citrato de ródio II, até a dose de

260 mg/kg, não provoca sinais de toxicidade aguda em camundongos.

5.2. — O citrato de ródio II quando injetado na pata de ratos provoca intenso edema. Esse edema não é antagonizado pela injeção prévia de anti-histamínico H1 por via intra-peritoneal.

5.3. — O citrato de ródio II injetado na cavidade peritoneal de camundongos promove acentuada migração de polimorfos segmentados bem como um aumento no espraiamento de macrófagos.

**TABELA I**

Aumento em  $\mu$ l (microlitros) do volume das patas de ratos injetados com 0.1 ml de solução salina (pata D) e com 0.1 ml de solução de citrato de ródio (6 mg/ml) (pata E).

rato	salina	citrato de ródio II
1	21	91
2	17	89
3	16	104
4	20	109
5	17	104
6	16	118
7	02	71
8	11	93
9	36	90
10	4	82
11	24	132
12	30	113
13	16	99
14	26	120
15	12	113
16	10	89
$x \pm s$	$17.4 \pm 8.6$	$101.0 \pm 15.4$

$t = 24.209$

$t_c (14 \text{ gl}) = 2.145$

$t$  pareado

**TABELA II**

Aumento em  $\mu$ l (microlitros) do volume das patas deratos injetados com 0.1 ml de solução salina (pata D) e com 0.1 ml de solução de citrato de ródio (6 mg/ml) (pata E) com injeção prévia (30 minutos antes) de prometazina 0.5 mg/kg, intra-peritonial.

rato	salina	citrato de ródio II
1	25	97
2	23	110
3	19	112
4	16	85
5	18	92
$\bar{x} \pm s$	$20.2 \pm 3.3$	$99.2 \pm 10.4$

t = 16.959  
 $t_c$  (3 gl) = 3.182  
 t pareado

**TABELA III**

Porcentagem de polimorfos nucleares segmentados

amostras animal n.	Ac	As	Bc	Bs	Cc	Cs	Dc	Ds
1	33	40	12	14	8	7	4	—
2	39	40	16	10	—	8	16	1
3	31	38	7	6	4	10	12	11
4	24	32	18	15	—	4	28	8
5	26	42	4	13	16	4	12	1
6	30	48	14	5	—	8	12	14
7	28	48	6	6	10	4	12	4
8	18	38	2	5	11	4	16	2
9	39	40	11	9	10	4	20	6
10	52	34	10	7	20	12	20	2
	Ac $\times$ As		Bc $\times$ Bs		Cc	Cs	Dc $\times$ Ds	
	U = 19 *		U = 43.5		U = 14.5 *		U = 8.5 *	
	Uc = 27		Uc = 27		Uc = 17		Uc = 24	

Porcentagens de polimorfos nucleares segmentados obtidas de exudatos peritonias de camundongos injetados com solução salina e solução de citrato de ródio, respectivamente após 24 horas amostras As e Ac; 48 horas amostras Bs e Bc; 72 horas amostras Cs e Cc e 96 horas amostras Ds e Dc.

\* Significativamente diferentes a 5% (teste Mann-Whitney).

**TABELA IV**

Porcentagem de macrófagos espreiados

amostras animal n.	Ac	As	Bc	Bs	Cc	Cs	Dc	Ds
1	37	14	63	41	54	28	22	32
2	36	20	84	29	—	18	26	20
3	46	40	83	51	69	40	40	44
4	16	8	92	81	89	48	20	12
5	42	48	90	52	68	56	24	28
6	44	16	80	60	60	44	28	24
7	60	24	95	44	48	40	20	20
8	50	28	93	40	60	60	48	24
9	20	28	88	20	64	20	32	28
10	24	16	87	56	48	24	28	24
	Ac × As		Bc × Bs		Cc Cs		Dc × Ds	
	U = 24 *		U = 2 *		U = 8 *		U = 35	
	Uc = 27		Uc = 27		Uc = 27		Uc = 27	

Porcentagens de macrófagos espreiados, obtidos de exsudatos peritoneais de camundongos injetados com solução salina e solução de citrato de ródio, respectivamente após 24 horas amostras As e Ac; 48 horas amostras Bs e Bc; 72 horas amostras Cs e Cc e 96 horas amostras Ds e Dc.

\* Significativamente diferentes a 5% (teste Mann-Whitney)

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bear, L.; Gray, H. B. Jr.; Rainen, L.; Chang, Y. M.; Howard, R.; Serio, G.; Kimball A. P.; "Interaction of rhodium (II) carboxylates with molecules of biological importance". **Cancer Chemother Rep-parti**, 59: 611-620, 1975.
- Howard, R. A.; Sherwood, E.; Erch, A.; Kimball, A. P.; Bear, L. "Hydrophobicity of several rhodium (II) carboxylates correlated with their biological activity". **J. Med. Chem** 20: 943-946, 1977.
- Najjar, R.; Santos, F. S.; Seidel, W. "Synthesis and characterization of the rhodium (II) citrale complex". **An. Acad. Brasil. Cir.** 59: 13-16, 1987.
- Siegel S. **Estatística não paramétrica**. Mac Graw-Hill do Brasil, Rio de Janeiro, 1977.
- Wuider, C. V.; Wax J.; Been M. A. "Rapid foot volume measurement of unanesthetized rats and the question of the phenylbutazone effect on anaphylactoid edema". **Arch. Int. Pharmacodyn** 112: 144-185, 1957.