

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE 4-TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DO 4-(METILTIO)BENZALDEÍDO E DO 4-(METILSULFONIL)BENZALDEÍDO NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM LINFÓCITOS DE RATOS

**DANIEL SCHUCH DA SILVA¹; CÉSAR EMILIANO HOFFMANN DA SILVA¹;
MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²; GABRIELA NOGUEIRA DEBOM²;
ROSELIA MARIA SPANEVELLO²; WILSON JOÃO CUNICO FILHO³**

¹Laboratório de Química Aplicado a Bioativos (LaQuiABio) – CCQFA - Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com

²Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (Neurocan) – CCQFA - Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

³Laboratório de Química Aplicado a Bioativos (LaQuiABio) – CCQFA - Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é o principal mecanismo de defesa do organismo em resposta a um estímulo prejudicial, sendo característica importante de várias doenças (KOEBERLE et al, 2014). De acordo com os conhecimentos sobre a fisiopatologia dos processos inflamatórios, são sugeridas diferentes estratégias de alvos terapêuticos, justificando um estímulo para o desenvolvimento de novos fármacos (VANDRESSEN et al, 2010).

As células imunes possuem um sistema colinérgico completo e os linfócitos possuem um sistema não neuronal independente. A ACh produzida nos linfócitos atua como imunomodulador e inibidores da acetilcolinesterase (AChE) aumentam sua concentração extracelular, tornando-a disponível para interagir com receptores nicotínicos expressos em linfócitos. (KAMAL et al, 2009). A ACh revelou importante papel na supressão da inflamação, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo de endotoxemia, mediada por receptores $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7nAChR$) de macrófagos (COSTA et al, 2012). Alguns trabalhos já reportaram a supressão de diversas reações inflamatórias por inibidores da AChE, como por exemplo a inibição da proliferação de linfócitos pela ativação dos receptores nicotínicos. Ainda, demonstrou-se uma significativa redução na produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de interleucina 1β (IL- 1β), sem afetar a liberação de IL-10, anti-inflamatória (KAMAL et al, 2009). Assim, a AChE possui importante papel na resposta imune e na diminuição do processo inflamatório (POLACHINI et al, 2014; RODRIGUES et al, 2014).

Os compostos tiazolidin-4-onas e seus derivados têm ocupado uma posição proeminente no campo da química medicinal devido a sua vasta atividade biológica. As tiazolidinonas têm sido reportadas por possuir potente ação anti-inflamatória e alguns derivados demonstraram ação anti-inflamatória e analgésica com melhor perfil gastrointestinal que os anti-inflamatórios não esteroidais (TRIPATHI et al, 2014). A principal rota sintética das 1,3-tiazolidin-4-onas se dá pela reação entre três componentes: uma amina primária, um aldeído ou cetona e o ácido mercaptoacético. Essa reação pode ser realizada tanto em uma como em duas etapas e ocorre pela formação inicial de um intermediário imina, seguida por uma ciclização intramolecular e eliminação de água. (TRIPATHI et al, 2014).

Assim, novas estratégias de síntese buscando maior eficiência vêm sendo desenvolvidos para a obtenção das tiazolidinonas. Levando em conta a importância biológica dessas moléculas, com destaque para a anti-inflamatória, o intuito desse estudo foi sintetizar e testar *in vitro* o potencial de quatro tiazolidinonas inéditas na atividade da enzima AChE em linfócitos de ratos.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção das tiazolidin-4-onas:

Baseando-se no trabalho de KUNZLER et al. (2013), a síntese das tiazolidinonas foram realizadas a partir de uma solução contendo 1 mmol da amina primária (**1** ou **2**), 1 mmol do arenaldeído (**3a** ou **b**) e 3 mmol do ácido mercaptoacético (**4**), em refluxo de tolueno por 5 horas, utilizando um aparelho Dean-Stark para a remoção azeotrópica da água. A reação ocorre com a adição do ácido após 2 horas de reação entre a amina e o aldeído, e é deixada por mais 3 horas, o que possibilita o consumo total dos reagentes de partida (**Figura 1**).

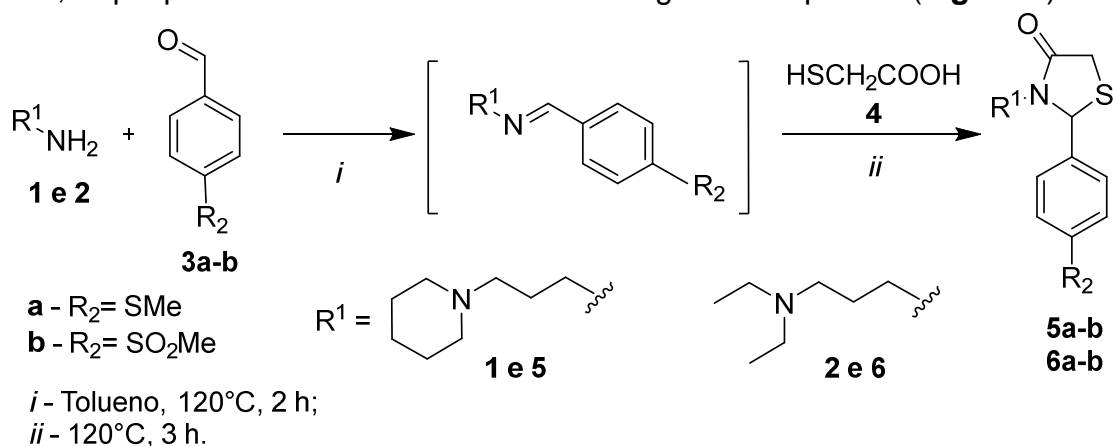


Figura 1. Esquema reacional da síntese das tiazolidinonas propostas.

Após o tempo reacional, a fase orgânica foi neutralizada com solução saturada de $NaHCO_3$, foi seca com $MgSO_4$ e concentrada para obtenção do produto. Todos os produtos foram purificados por cromatografia em coluna ou lavagem com solventes de diferentes polaridades (KUNZLER et al, 2013; MARQUES et al, 2014).

2.2. Avaliação do efeito *in vitro* dos compostos na atividade enzimática de linfócitos e soro de ratos:

Foram usados 05 ratos machos Wistar (60 dias, 250-300g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFPel (CEEA 9220).

Os animais foram submetidos a eutanásia e o sangue foi coletado. Os linfócitos foram isolados do sangue coletado com EDTA e separados sob um gradiente de densidade com Ficoll (BÖYUM, 1968). As moléculas foram solubilizadas em metanol e introduzidas no ensaio enzimático nas concentrações finais de 50, 100, 250 e 500 μM .

A atividade da AChE em linfócitos foi determinada de acordo com FITZGERALD; COSTA (1993) e expressa em $\mu moles$ de AcSch/h/mg de proteína. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, e considerado $P < 0,05$ como diferença significativa em todos os experimentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro compostos obtidos são inéditos e após purificação foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Os rendimentos das reações foram considerados de moderados a bons

e entende-se que com estudos mais detalhados de condição reacional pode-se obter melhores rendimentos (**Tabela 1**).

Código	Rendimento*	CG/EM m/z (%)
5a	64,7%	382 (M, 2); 298 (1); 182 (2); 112 (4); (4); 98 (100); 84 (6).
5b	35,4%	350 (M, 3); 225 (2); 127 (5); 112 (3,5); 98 (100); 84 (9).
6a	29%	338 (M, 3,5); 309 (1,5); 266 (3); 100 (4,5); 86 (100); 72 (10).
6b	22,3%	370 (M, 3,5); 341 (1,5); 298 (4,5); 100 (4); 86 (100); 72 (8).

Tabela 1. Dados de Rendimento e CG/EM das moléculas 5a-b e 6a-b. *produto isolado, purificado.

Analisando a **Figura 2**, em relação à AChE em linfócitos, verifica-se que as quatro tiazolidinonas testadas inibiram de forma significativa a atividade da enzima em todas as concentrações testadas. Ressalta-se que os compostos **5a** e **6a** apresentaram resultados de inibição mais pronunciados que os compostos **b**, que possuem o grupamento sulfona em sua estrutura, para a inibição da AChE.

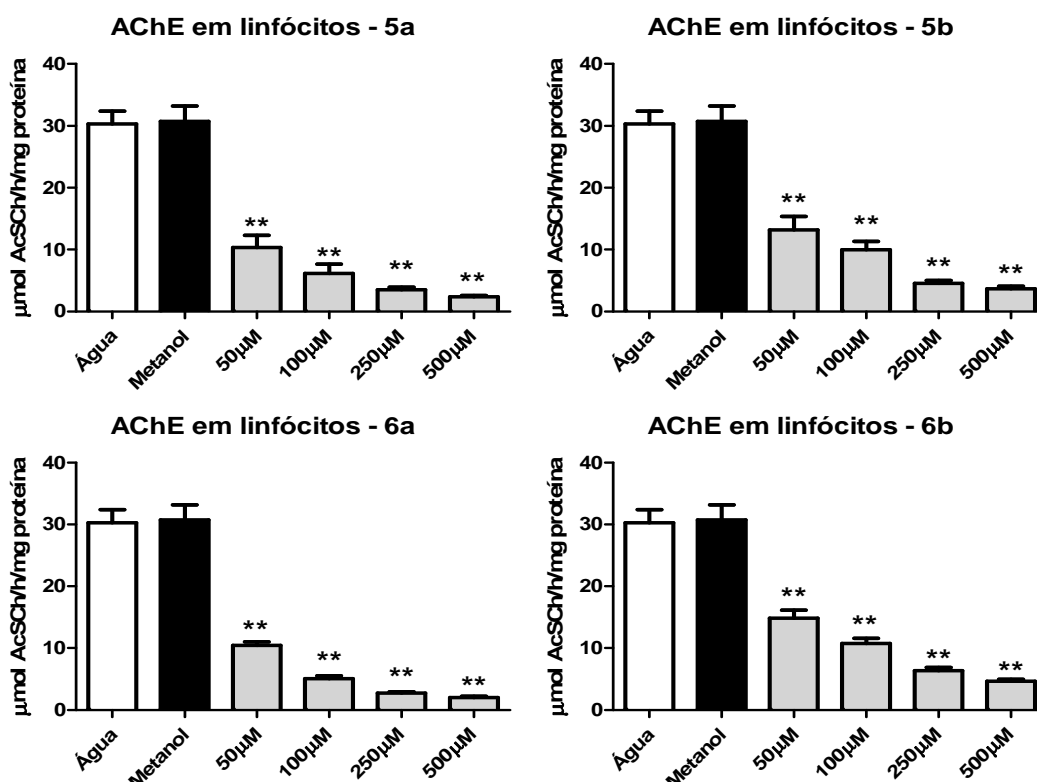


Figura 2. Efeito dos compostos **5a-b** e **6a-b** na atividade da AChE. ** $P < 0,01$ em relação ao controle água. Resultados expressos em média \pm erro padrão.

A ligação da ACh ao $\alpha 7nAChR$ em células produtoras de citocinas, resulta na ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), levando a uma sinalização anti-inflamatória que suprime a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Inibe de forma dose-dependente a liberação de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-18 ativadas por endotoxinas

em macrófagos. Portanto, a via colinérgica anti-inflamatória é mediada pela ação da ACh na inibição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e do sistema oxidativo (KAMAL et al, 2009).

Assim, dada a importância da ACh na supressão da inflamação, a investigação da AChE como regulador da concentração de ACh pode ser de grande importância (COSTA et al, 2012). Dessa forma, a AChE possui importante papel na resposta imune e sua inibição pode levar à redução do processo inflamatório (POLACHINI et al, 2014; RODRIGUES et al, 2014).

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, ressalta-se que as moléculas testadas inibiram a atividade da AChE, o que leva ao aumento dos níveis de ACh, uma molécula anti-inflamatória. Dessa forma, pode-se sugerir que as mesmas tenham um potencial anti-inflamatório atuando via sinalização colinérgica. No entanto, novos estudos deverão ser realizados com o intuito de possibilitar uma melhor análise do perfil de inibição enzimática frente à AChE.

Ainda, serão realizados diferentes estudos de perfil anti-inflamatório *in vitro* e posteriores testes *in vivo*. Entende-se que esse é um resultado preliminar e que diferentes testes devem ser realizados, possibilitando uma relação estrutural de atividade das tiazolidinonas com o sítio ativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÖYÜM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, p. 77–89, 1968.
- COSTA, M.M. et al. Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 84, n. 4, p. 1105-1113, 2012;
- FITZGERALD, B.B.; COSTA, L.G. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. **Fundam Appl Toxicol**, v. 20, p. 210–216, 1993;
- KAMAL, M.A. et al. Anti-Inflammatory Properties of Acetylcholinesterase Inhibitors Administred in Alzheimer's Disease. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 85-100, 2009;
- KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, 2014;
- KUNZLER, A. et al. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.64, p. 74-80, 2013;
- MARQUES, G.H. et al. Antifungal Activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone Derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 355-360, 2014;
- POLACHINI, C.R.N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266-274, 2014;
- RODRIGUES, R. et al. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p. 105-110, 2014;
- TRIPATHI, A.C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue... **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014;
- VANDRESEN, F. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 317-321, 2010.