

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DE TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DA 3-AMINOPROPILPIPERIDINA NA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM HIPOCAMPO DE RATOS

CAROLINA CRISTÓVÃO MARTINS¹; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES²; ROSELIA MARIA SPANEVELLO³; WILSON JOÃO CUNICO FILHO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – carol_cristovao@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – mayara_sandrielly@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – rspanevello@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – wjcunico@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa complexa e progressiva a qual é caracterizada pelo déficit de memória e disfunção cognitiva (FIGUEIREDO et al, 2012). Embora a sua etiopatogenia ainda não tenha sido completamente elucidada, dados na literatura demonstram que a deficiência do neurotransmissor acetilcolina (ACh) está associado com o desencadeamento dos sintomas clássicos desta doença (COSTA et al, 2013).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da ACh em acetato e colina interrompendo a transmissão colinérgica. Diante disso, a AChE é um dos principais alvos terapêuticos para tratar a sintomatologia da DA. A administração de inibidores da AChE impede a degradação da ACh e consequentemente, aumenta os níveis deste neurotransmissor nas sinapses colinérgicas (JUNG & PARK, 2007). Os inibidores da AChE mais utilizados para esta finalidade são a donezepila, a rivastigmina e a galantamina, entretanto esses fármacos apresentam vários efeitos colaterais.

Tendo em vista que os inibidores da AChE apenas tratam o mais relevante sintoma relacionado a DA, que é a perda de memória, e que estes fármacos apresentam inúmeros efeitos adversos, evidencia-se a necessidade do planejamento e desenvolvimento de novas moléculas com melhor perfil farmacológico.

Nesse sentido, as tiazolidinonas, importante composto heterocíclico, vêm sendo amplamente estudadas, demonstrando bons resultados para uma amplitude de atividades farmacológicas, inclusive inibindo a enzima AChE (TRIPATHI et. al., 2014). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da ação de tiazolidinonas sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de ratos.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das tiazolidinonas derivadas da 3-aminopropilpiperidina

As moléculas testadas foram sintetizadas no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio) da Universidade Federal de Pelotas. As tiazolidinonas foram obtidas através de reações multicomponentes entre a 3-aminopropilpiperidina, compostos carbonílicos (aldeídos e uma cetona) e o ácido mercaptoacético. Nomeou-se tais moléculas como CM05, R20, R27, C43, C47 e R48.

2.2 Animais

Foram utilizados 5 ratos, machos, adultos da raça *Wistar* provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas. Todos os experimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 9220).

2.3 Avaliação do efeito *in vitro* das tiazolidinonas na atividade da AChE

Os animais foram submetidos a eutanásia e o encéfalo foi retirado. Posteriormente, separou-se o hipocampo e o mesmo foi homogeneizado em tampão Tris HCl 10mM (pH 7,4) adequado para o ensaio da AChE.

As moléculas testadas foram solubilizadas em metanol e preparadas em diferentes concentrações (1, 10, 30, 50 e 100 μ M). A atividade da AChE foi determinada em microplaca segundo o método de ELMANN et al. (1961) que tem como princípio a hidrólise do substrato acetilcolina a qual é convertida em dois produtos, acetato e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com o DTNB formando um cromóforo, o 5-tio-2-nitrobenzoico o qual é quantificado espectrofotometricamente. A atividade enzimática foi expressa em μ moles de AcSCh/h/mg de proteína. As proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando o reagente Comassie Blue. A albumina bovina foi utilizada como padrão.

2.4 Análise estatística dos dados

Os dados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 1**), pode-se observar que as moléculas CM05, C47 e C43 inibiram a atividade da AChE nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 μ M quando comparado aos grupos controles (água e metanol) ($P < 0.05$). As moléculas C47 e C43 inibiram a atividade da AChE somente nas maiores concentrações testadas (30, 50 e 100 μ M) enquanto que a molécula R48 foi capaz de inibir a atividade da enzima em hipocampo em todas as concentrações avaliadas ($P < 0.05$).

Cabe ressaltar que além do controle água, também foi determinada a ação do metanol sobre a atividade da AChE, com o intuito de confirmar que o solvente não interfere na atividade enzimática. Todos os gráficos demonstraram que o metanol não alterou a atividade da AChE quando comparada ao grupo controle água, comprovando que este solvente não interfere no teste e que apenas as moléculas testadas alteraram a atividade da enzima.

A ação destas moléculas sobre a atividade da AChE foi estudada no hipocampo porque já se sabe que o mesmo desempenha um papel importante na formação da memória, em especial na memória a longo prazo. A comunicação entre o núcleo septal medial e o hipocampo, ou seja, o sistema septo-hipocampal, representa uma via importante de entrada da ACh ao hipocampo, sendo que a liberação deste neurotransmissor pode excitar, desinibir e inibir as células do hipocampo. Tais ações da acetilcolina podem provocar uma série de modificações morfológicas e estruturais nos neurônios que leva ao processo de consolidação da memória a longo prazo (DIEHL, 2010).

Diante disso, as moléculas que desempenham efeito inibitório sobre a enzima AChE impedem que a acetilcolina seja degradada, aumentando os níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica colinérgica. Essa elevação proporciona uma maior ativação do sistema colinérgico que está envolvido com o processo de consolidação da memória no hipocampo.

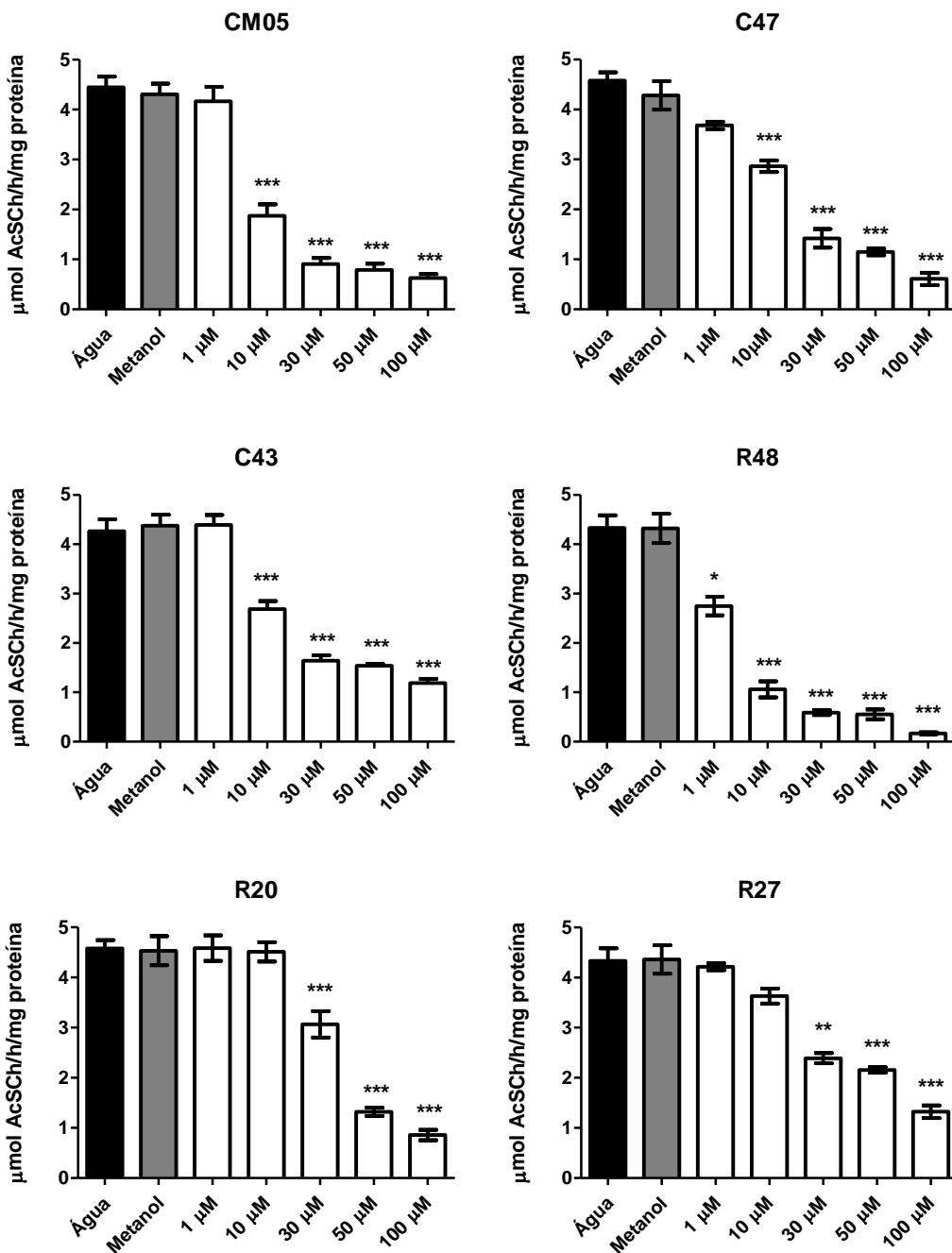


Figura 1: Efeito in vitro das moléculas CM05, C47, C43, R48, R20 e R27 na a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo de ratos. * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0.001$ em relação ao grupo controle água e metanol.

4. CONCLUSÕES

De acordo com o exposto, pode-se concluir que todas as tiazolidinonas testadas, derivadas da 3-aminopropilpiperidina, foram efetivas em inibir a

atividade da enzima AChE em hipocampo de ratos. Particularmente, a molécula R48 merece destaque por ter apresentado resultados mais expressivos de inibição da atividade desta enzima, e por inibir significativamente já na concentração de 1 μ M.

Esses resultados foram considerados importantes para a sequência do trabalho, porém sabe-se que são necessários novos estudos de cinética enzimática, de citotoxicidade, entre outros, para um conhecimento maior do potencial farmacológico dessas moléculas. Ainda, novos testes buscando maior conhecimento da relação entre a estrutura dos compostos com o sítio ativo serão de grande importância para o estudo do mecanismo de ação e da relação estrutura-atividade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 258-254, 1976.

COSTA, J.S.; LOPES, J.P.B.; RUSSOWSKY, D.; PETZHOLD, C.L.; BORGES, A.C.A.; CESCHI, M.A.; KONRATH, E.; BATASSINI, C.; LUNARD, P.S.; GONÇALVES, C.A.S. Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 62, p. 556-563, 2013.

DIEHL, F. **Plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos M4 hipocampais decorrente de uma consolidação da memória como possível marcador sináptico do engrama: Ensaios farmacológico-comportamentais.** 2010. Tese (Doutorado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FIGUEIREDO, J.A.; ISMAEL, M.I.; PINHEIRO, J.M.; SILVA, A.M.S.; JUSTINO, J.; SILVA, F.V.M.; GOULART, M.; MIRA, D.; ARAÚJO, M.E.M.; CAMPOY, R.; RAUTER, A.P. Facile synthesis of oxo-/thioxopyrimidines and tetrazoles C-C linked to sugars as novel non-toxic antioxidant acetylcholinesterase inhibitors. **Carbohydrate Research**, Lisboa, v. 347, p. 47-54, 2012.

JUNG, M.; PARK, M. Acethylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrinoma pilosa*. **Molecules**, Coreia, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

TRIPATH, A.C.; GUPTA, S.J.; FATIMA, G.N.; SONAR, P.K.; VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinones: The advances continue... **European Journal of Medicinal Chemistry**, India, v. 72, p. 52-77, 2014.