

## ATIVIDADE DO QUINOLINOTRIAZOIL CARBOXI-4-METOXIBENZILAMIDA NOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

MARIA CLARA MARTINS FERREIRA<sup>1</sup>; MARIANA GALLIO FRONZA<sup>1</sup>; BRUNA GOLDANI<sup>2</sup>; DIEGO ALVES<sup>2</sup>; LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas; Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia – [maria.c.martins07@gmail.com](mailto:maria.c.martins07@gmail.com); [luciellisavegnago@yahoo.com.br](mailto:luciellisavegnago@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas; Laboratório de Síntese Orgânica Limpa

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer se caracteriza por ser uma doença neurodegenerativa que afeta progressivamente a memória e a cognição, culminando em um estado de dependência total e demência. Segundo o World Alzheimer Report (2015), atualmente 46,8 milhões de pessoas vivem com a doença, e de acordo com as projeções esse número dobrará a cada 20 anos.

Apesar da sua etiologia não estar completamente elucidada, a doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de emaranhados neurofibrilares a partir da hiperfosforilação da proteína TAU e pela presença de placas senis compostas do peptídeo  $\beta$ -amiloide formado através da clivagem da proteína precursora amiloide pela enzima  $\beta$ -secretase. (KUMAR et al., 2015).

Vale ressaltar que, em pacientes afetados, é possível observar também transtornos na transmissão da acetilcolina, envolvendo a enzima acetilcolinesterase (AChE). A progressão dos sintomas está associada a mudanças estruturais nas sinapses colinérgicas em certas regiões do cérebro, como o córtex e o hipocampo. (CHIERRITO, 2016). Além disso, o estresse oxidativo também desempenha um importante papel nos neurônios colinérgicos, acarretando na ativação de cascatas apoptóticas, o que contribui para o processo de neurodegeneração. (WANG et al., 2014).

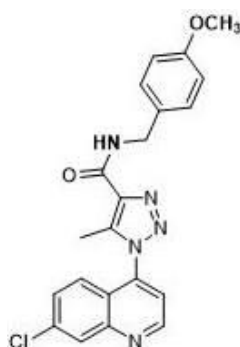
Sendo assim, o estudo de compostos que atuem em diferentes vias, como potenciais inibidores da  $\beta$ -secretase e da AChE e que se mostrem também com potencial antioxidante, apresentam-se como uma interessante estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos. (ROSINI et al., 2016). Nesse sentido, a molécula quinolinotriazol carboxi-4-metoxibenzilamida (QTC-4-MeOBnA) foi escolhida pelo nosso grupo de pesquisa através de ferramentas *in silico* de docagem molecular, devido a sua capacidade de se ligar no sítio ativo da enzima  $\beta$ -secretase. Além disso, evidências na literatura sugerem que os derivados de quinolinona possuem uma ampla gama de propriedades biologicamente interessantes, tais como: atividade anticonvulsivante, anti-inflamatória, e antidepressiva. (DENG et al., 2014).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar se o composto QTC-4-MeOBnA possui a capacidade de inibir a enzima AChE e se possui atividade antioxidante no córtex e hipocampo de camundongos.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Composto

O composto QTC-4-MeOBnA (figura 1) foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior análises.



**Figura 1:** Estrutura do QTC-4-MeOBnA

## 2.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25g-30g, acondicionados à temperatura de  $22\pm 25^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro (12/12h) e comida e água *ad libitum*. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e após o córtex e o hipocampo foram isolados. Os ensaios protocolados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, pelo projeto nº 4344-2015.

## 2.3 Ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzido com nitroprussiato de sódio no córtex e hipocampo de camundongos

Esse ensaio avalia a peroxidação lipídica baseando-se na detecção e quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com OHKAWA et al. (1979). Um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), é complexado com o TBA quando submetido a altas temperaturas e meio ácido. Esse complexo pode ser lido no espectrofotômetro a 532 nm. Nesse ensaio, o nitroprussiato de sódio (NPS) é utilizado como indutor de peroxidação lipídica e os resultados são expressos em porcentagem de oxidação em relação ao induzido.

## 2.4 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no córtex e hipocampo de camundongos

Nesse ensaio, o produto de degradação da acetilcolina, a tiocolina, quando complexada ao ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) é capaz de reduzi-lo a ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB), que possui uma cor amarelada e pode ser lida no espectrofotômetro de luz UV (SHIMADZU UV-1800) a 412nm, com intervalos de 30 segundos. (ELLMAN et al., 1961). Os resultados são expressos em atividade da AChE por  $\mu\text{g/mol/min/mg prot.}$  A galantamina foi utilizada como controle positivo, por ser um inibidor conhecido da enzima AChE. (DHANASEKARAN et al., 2015). Foi escolhida a concentração de 32  $\mu\text{M}$  a partir de uma curva padrão realizada pelo nosso grupo de pesquisa.

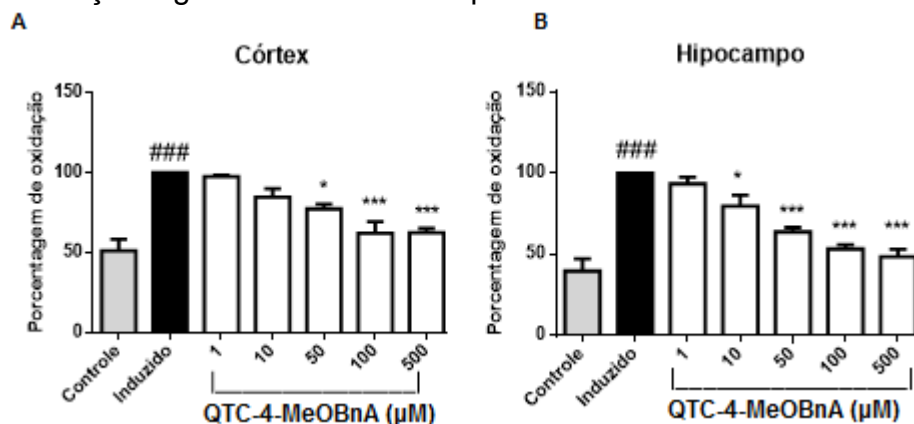
## 2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados por Análise de Variância ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls, através do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão e considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

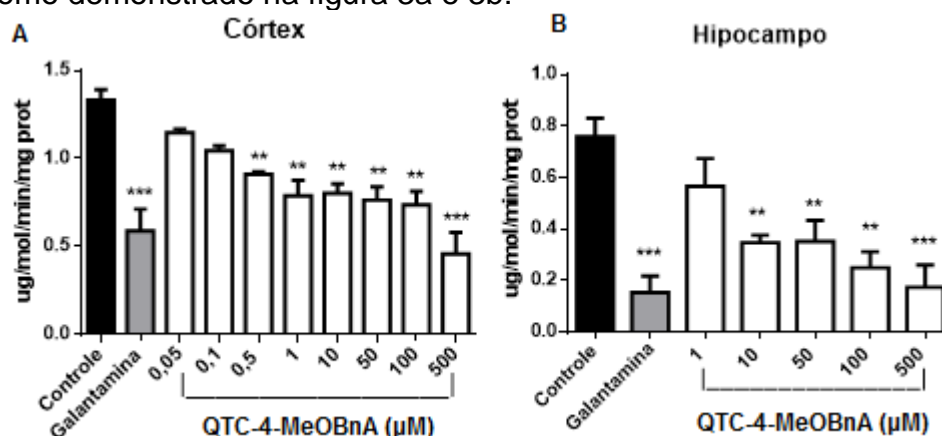
No presente trabalho, é possível observar que o composto teve a capacidade de neutralizar a geração de radicais livres induzidos por NPS, diminuindo assim a peroxidação lipídica no córtex e hipocampo. Na figura 2a (córtex), o composto teve efeito significativo nas concentrações iguais e maiores a 50 $\mu$ M. Enquanto que na figura 2b (hipocampo), o QTC-4-MeOBnA foi significativo nas concentrações iguais e maiores a 10 $\mu$ M.



**Figura 2:** Efeito do composto na peroxidação lipídica induzida por NPS no córtex e hipocampo de camundongos. As análises foram feitas por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os valores são expressos como porcentagem de oxidação em relação ao induzido, sendo (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  quando comparados com o induzido e  $p < 0,001$  (###) quando comparado ao controle.

### 3.2 Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE)

Através dos resultados obtidos, é possível observar que o QTC-4-MeOBnA apresentou excelente efeito inibitório na atividade da enzima AChE na concentração de 10  $\mu$ M no córtex e hipocampo, similar ao efeito da galantamina 32 $\mu$ M, como demonstrado na figura 3a e 3b:



**Figura 3:** Efeito do composto na capacidade inibitória da AChE no córtex e hipocampo de camundongos. As análises foram feitas por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os valores são expressos em  $\mu$ g/mol/min/mg prot., sendo (\*)  $p < 0,05$  (\*\*)  $p < 0,1$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$  quando comparados ao controle.

## 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a molécula quinolinotriazol carboxi-4-metoxibenzilamida protegeu contra a peroxidação lipídica e teve potencial de inibir a enzima AChE. Porém mais estudos são

necessários para sua avaliação como um promissor fármaco na terapia da doença de Alzheimer.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIERRITO, T.P.C. **Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer**. 2016. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

DENG, X.; SONG, M.; ZHENG, Y.; QUAN, Z.; Design, synthesis and evaluation of the antidepressant and anticonvulsant activities of triazole-containing quinolinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 217-224, 2014.

DHANASEKARAN, S.; PERUMAL, P.; PALAYAN, M. *In-vitro* Screening for acetylcholinesterase enzyme inhibition potential and antioxidant activity of extracts of *Ipomoea aquatica* Forsk: therapeutic lead for Alzheimer's disease. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 12-16, 2015.

ELLMAN, G.I.; 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.

GUNN, A.P.; WONG, B.X.; JOHANSEN, T.; GRIFFITH, J.C.; MASTERS, C.; BUSH, A. Amyloid- $\beta$  Peptide A $\beta$  3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 6134-6145, 2016.

KIM, G.H.; KIM, J.E.; RHIE, S.J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, p. 325-340, 2015.

KUMAR, A.; EKAVALI, A.S. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 195-203, 2015.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ROSINI, M.; SIMONI, E.; CAPORASO, R.; MINARINI, A. Multitarget strategies in Alzheimer's disease: benefits and challenges on the road to therapeutics. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 697-711, 2016.

SILVA, T.; REIS, J.; TEIXEIRA, J.; BORGES F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116-145, 2014.

WANG, X.; WANG, W.; LI, L.; PERRY, G.; LEE, H.; ZHU, X. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 1240-1247, 2014.

World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia. Acessado em 20 de jul. 2016. Online. Disponível em: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>