

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOLINESTERÁSICO DE TIAZOLIDINONAS EM CÓRTEX E HIPOCAMPO DE RATOS

CAROLINA CRISTÓVÃO MARTINS¹; DANIEL S. DA SILVA²; MAYARA S. P. SOARES²; JULIANA H. AZAMBUJA²; ROSELIA SPANEVELLO²; WILSON CUNICO³

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

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – danielschuch08@gmail.com

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

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – julianahazambuja@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – wjcunico@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA), uma desordem neurológica complexa e irreversível, é caracterizada pelo déficit cognitivo progressivo, pelos distúrbios neuropsiquiátricos e comportamentais e pelas restrições nas atividades diárias. Embora a etiologia da DA ainda não esteja completamente elucidada, sabe-se que o neurotransmissor acetilcolina (ACh) desempenha um importante papel na patologia desta doença (GOEDERT et al, 2004).

Diante disso, a teoria colinérgica foi postulada, sugerindo que a perda seletiva de neurônios colinérgicos na DA proporcionaria uma redução significativa nos níveis de ACh em regiões específicas do cérebro envolvidas nos processos de aprendizagem e memória (GOEDERT et al, 2006). Em consequência, moléculas inibidoras da AChE se tornaram alvo de estudo, uma vez que elas impedem a hidrólise de ACh em colina e acetato, resultando em uma elevação nos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica. Assim, os fármacos donepezil, galantamina e rivastigmina foram aprovados para uso comercial (TALESA, 2001).

A tacrina foi o primeiro fármaco aprovado para tratar os sintomas da DA, sendo logo retirada do mercado em virtude da sua hepatotoxicidade. Tendo em vista os poucos fármacos existentes, assim como a reduzida seletividade dos mesmos, a qual está diretamente associada com o aparecimento dos efeitos adversos, evidencia-se a necessidade do planejamento e desenvolvimento de novas moléculas com melhor perfil farmacológico (FRANCIS et al, 1999).

Dentro desse contexto, as tiazolidinonas, um importante núcleo heterociclo, são constantemente descritas na literatura por atuarem em diversos alvos terapêuticos, inclusive como inibidores da AChE (TRIPATH et al, 2014). Sendo assim, neste trabalho avaliou-se o efeito inibitório destas moléculas sobre a enzima AChE em córtex cerebral e hipocampo de ratos, bem como a citotoxicidade das tiazolidinonas em linhagem MRC-5 de fibroblasto humano.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das tiazolidinonas derivadas da 3-aminopropilpiperidina

As tiazolidinonas em estudo foram sintetizadas através de reações de ciclocondensação multicomponente no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio) pertencente a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). As moléculas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F foram solubilizadas em metanol e preparadas em diferentes concentrações (1, 5, 10, 30, 50 e 100 µM) para a realização do ensaio *in vitro* sobre a enzima AChE.

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

A atividade da AChE foi determinada em microplaca baseada no método de ELLMANN et al. (1961), utilizando tecidos de córtex cerebral e hipocampo de ratos. Este teste baseia-se na hidrólise do substrato acetiltiocolina em acetato e tiocolina. Este último reage com o DTNB formando o cromóforo 5-tio-2-nitrobenzóico o qual é quantificado espectrofotometricamente. A atividade enzimática foi expressa em μmols de AcSch/h/mg de proteína e os resultados encontram-se apresentados em porcentagem de inibição, considerando a atividade enzimática do grupo controle água como 100%. As proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) em que a albumina foi utilizada como padrão. Cabe ressaltar que todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFPel (CEEA 9220).

2.3 Avaliação da citotoxicidade das tiazolidinonas

O efeito citotóxico das tiazolidinonas foi avaliado através do teste da sulforrodamina B (SRB), o qual avalia a proliferação celular de linhagens MCR-5 de fibroblasto humano semeadas em placas de 96 poços durante 48h. Conforme descrito por SKEHAN et al. (1990), a sulforrodamina B se liga às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com ácido tricloroacético a qual é quantificada espectrofotometricamente. Os resultados estão expressos em porcentagem de proliferação celular, considerando a proliferação do grupo controle DMSO como 100%

2.4 Análise estatística dos dados

Os dados referentes ao efeito inibitório dos compostos sobre a AChE, bem como os dados alusivos à citotoxicidade, foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. Em ambos, a diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do ensaio enzimático (**Tabela 1**) demonstraram que todas as tiazolidinonas testadas inibem a atividade da AChE nas concentrações de 30, 50 e 100 μM em ambos os tecidos quando comparadas ao grupo controle.

As moléculas 1A e 1B inibiram a atividade enzimática da AChE a partir da concentração de 5 μM em córtex cerebral, enquanto que no hipocampo houve a necessidade de concentrações maiores para inibi-la (30 μM). A tiazolidinona 1D demonstrou efeito inibitório sobre a AChE semelhante em córtex cerebral (5 μM), entretanto uma menor concentração (10 μM) já foi suficiente para inibir a enzima no hipocampo.

As tiazolidinonas 1C, 1F e 1E inibiram a atividade enzimática da AChE em ambos os tecidos a partir da mesma concentração, ou seja, em 1, 5 e 10 μM , respectivamente. Diante desses resultados, pode-se afirmar que a molécula 1C é a mais promissora desta série, pois demonstrou ação inibitória sobre a enzima em todas as concentrações, inclusive em 1 μM nos tecidos de córtex e hipocampo.

Tabela 1: Efeito das tiazolidinonas sobre a atividade enzimática da AChE em córtex e hipocampo de ratos - Porcentagem de inibição \pm (Erro Padrão).

Composto	Tecido Biológico	1 μ M	5 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M	100 μ M
1A	Córtex Cerebral	19,68 \pm (0,13)	*43,48 \pm (0,42)	*42,73 \pm (0,36)	*67,01 \pm (0,25)	*82,36 \pm (0,10)	*89,41 \pm (0,06)
	Hipocampo	28,78 \pm (0,32)	3,15 \pm (0,17)	20,50 \pm (0,27)	*33,60 \pm (0,41)	*79,08 \pm (0,25)	*84,02 \pm (0,08)
1B	Córtex Cerebral	1,24 \pm (0,07)	*50,74 \pm (0,42)	*62,75 \pm (0,03)	*81,61 \pm (0,07)	*80,92 \pm (0,06)	*86,63 \pm (0,07)
	Hipocampo	5,49 \pm (0,16)	27,43 \pm (0,43)	15,81 \pm (0,16)	*53,65 \pm (0,23)	*50,23 \pm (0,18)	*78,15 \pm (0,20)
1C	Córtex Cerebral	*25,36 \pm (0,12)	*68,90 \pm (0,11)	*86,74 \pm (0,09)	*88,61 \pm (0,08)	*87,20 \pm (0,10)	*92,30 \pm (0,06)
	Hipocampo	*43,58 \pm (0,16)	*71,85 \pm (0,24)	*75,69 \pm (0,20)	*89,34 \pm (0,06)	*89,66 \pm (0,11)	*92,98 \pm (0,16)
1D	Córtex Cerebral	6,65 \pm (0,07)	*55,97 \pm (0,24)	*59,85 \pm (0,09)	*77,08 \pm (0,08)	*86,00 \pm (0,06)	*88,93 \pm (0,05)
	Hipocampo	18,21 \pm 90,04	16,85 \pm (0,34)	*31,25 \pm (0,20)	*73,40 \pm (0,04)	*75,87 \pm (0,15)	*87,31 \pm (0,16)
1E	Córtex Cerebral	15,10 \pm (0,17)	*53,25 \pm (0,02)	*60,94 \pm (0,16)	*75,18 \pm (0,23)	*80,71 \pm (0,16)	*85,65 \pm (0,12)
	Hipocampo	0,32 \pm (0,27)	*48,49 \pm (0,33)	*59,35 \pm (0,26)	*80,48 \pm (0,12)	*81,98 \pm (0,10)	*85,33 \pm (0,08)
1F	Córtex Cerebral	10,95 \pm (0,21)	24,50 \pm (0,44)	*34,45 \pm (0,30)	*63,04 \pm (0,06)	*62,50 \pm (0,07)	*74,18 \pm (0,14)
	Hipocampo	-3,76 \pm (0,25)	20,72 \pm (0,33)	*30,47 \pm (0,26)	*62,07 \pm (0,14)	*68,69 \pm (0,12)	*71,81 \pm (0,08)

*representa diferença estatística do grupo controle água, considerando $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ de acordo com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, $n=4$; as cores vermelha, amarela e verde representam maiores percentuais, percentuais intermediários e menores percentuais de inibição, respectivamente.

Em relação aos resultados obtidos a partir do teste da sulforrodamina B (**Tabela 2**), pode-se afirmar que as tiazolidinonas 1B, 1D, 1E e 1F não alteraram significativamente a proliferação celular de fibroblasto humano quando comparadas ao controle, ou seja, elas não apresentaram efeito citotóxico em nenhuma das três concentrações testadas. Enquanto que as moléculas 1A e 1C foram consideradas citotóxicas apenas na maior concentração testada (250 μ M).

Portanto, cabe ressaltar que todos os compostos testados demonstram-se potencialmente seguros, tendo em vista que foram eficazes na inibição enzimática em concentrações extremamente baixas, enquanto apenas a dois compostos (1A e 1C) apresentaram-se tóxicos em altas concentrações.

Tabela 2: Análise da proliferação celular de cultura de fibroblasto humano tratadas com tiazolidinonas Porcentagem de proliferação celular \pm (Erro Padrão)

Composto	50 μ M	100 μ M	250 μ M
R20	94,81 \pm (0,04)	83,16 \pm (0,02)	*74,49 \pm (0,03)
R27	115,79 \pm (0,02)	103,45 \pm (0,03)	77,83 \pm (0,06)
R48	120,19 \pm (0,03)	105,31 \pm (0,05)	***44,00 \pm (0,01)

C47	112,18 ± (0,02)	101,94 ± (0,02)	91,99 ± (0,01)
CM05	108,54 ± (0,01)	99,34 ± (0,02)	87,12 ± (0,04)
C43	96,58 ± (0,04)	95,54 ± (0,02)	87,69 ± (0,02)

*corresponde a diferença estatística do grupo controle DMSO, considerando $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ de acordo com ANOVA de uma via seguido do post-hoc de Tukey, $n=4$; as cores verde, amarela e vermelha indicam o crescimento do efeito citotóxico dos compostos em estudo.

4. CONCLUSÕES

De modo geral, pode-se concluir que as seis tiazolidinonas estudadas neste trabalho podem ser consideradas potenciais agentes para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer, uma vez que todas as moléculas inibiram a atividade enzimática da AChE em concentrações reduzidas (30 μM) em córtex e hipocampo, e apenas duas delas apresentaram efeito citotóxico na maior concentração testada. Dentre estas moléculas, a R48 demonstrou ser a mais ativa da série pois inibiu a atividade da AChE em ambos os tecidos e em todas as concentrações testadas, inclusive em 1 μM . Embora tenha apresentado um possível efeito citotóxico em cultura de fibroblasto humano, este foi observado somente na maior concentração analisada (250 μM) a qual é consideravelmente maior que a concentração ativa encontrada.

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. 254-258, 1976.

ELMANN, 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.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999,

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M, G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314, p. 777-781, 2006.

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

TALESA, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 1961-1969, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.