

Quinolinotriazol carboxi-4-metoxibenzilamida: uma promissora molécula para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Mariana Gallio Fronza¹; Angela Maria Casaril¹; Maria Clara Martins²; Bruna Goldani³; Diego Alves³; Lucielli Savegnago¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia – marianagfronza@gmail.com; angela.casaril@gmail.com; luciellisavegnago@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Biotecnologia, Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia – maria.c.martins07@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) – goldanibruna@gmail.com; diego.alves@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (AD) é caracterizada pela perda da capacidade intelectual e biológica em múltiplos domínios compreendidos pela nossa existência e cotidiano. Esse quadro sintomatológico é o produto de uma complexa etiologia, constituída pela disfunção na transmissão e plasticidade sináptica em consequência da degeneração progressiva cerebral (MA et al., 2012).

Nesse sentido, apesar da sua etiologia não estar completamente elucidada, acredita-se que a presença de placas amiloides formadas pela deposição de beta amiloide (A β) e os emaranhados neurobrillares compostos de proteína TAU hiperfosforilada são os maiores precedentes do processo neurodegenerativo (KUMAR et al., 2015). Isso acontece, pois em conjunto, desencadeiam uma cascata de eventos que culminam na morte neuronal progressiva, através de uma resposta multi-inflamatória acompanhada do desequilíbrio das vias oxidativas e metabólicas da célula (SCHELTENS et al., 2016).

Nesse sentido, os anticolinesterásicos, principais fármacos implicados na terapia da AD, são capazes de estabilizar a perda da memória e função cognitiva moderadamente. Entretanto esses benefícios tem caráter transitório (6-12 meses) uma vez que não exercem ações significativas na interrupção da neurodegeneração (ČOLOVIĆ et al., 2013).

Nessa perspectiva, o mecanismo de ação farmacológico ideal para o tratamento dessa doença é o restabelecimento do déficit cognitivo e concomitante modulação dos fatores envolvidos no processo neurogenerativo, como a deposição de A β . De modo sintético, a A β é proteoliticamente formada pela clivagem enzimática da proteína precursora amilóide (APP) primariamente através da enzima β -secretase (BACE-1). Por essa razão, inibidores da BACE-1 tem demonstrado características promissoras no interrompimento da progressão da AD (VASSAR et al., 2014).

Tendo em vista que a deposição de A β promove morte celular e consequente mudanças nos circuitos de transmissão neuronal, necessários para o aprendizado e memória. Enquanto que a inativação da enzima acetil colinesterase (AChE) tem sido eficaz na manutenção da função cognitiva. O composto quinolinotriazol carboxi-4-metoxibenzilamida (QTC-4-MeOBnA) pode ser um promissor fármaco para o tratamento da AD, uma vez que o nosso grupo de pesquisa já demonstrou sua habilidade de inibir a AChE *in vitro* e a BACE-1 através de análises *in silico*. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar o composto QTC-4-MeOBnA na prevenção do déficit cognitivo e de memória frente a indução de demência tipo Alzheimer esporádico por estreptozotocina (STZ).

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese do QTC-4-MeOBnA

O composto foi sintetizado pelo LASOL da UFPEL e diluído em óleo de canola (0,1mg/Kg e 1mg/Kg) para a administração oral (v.o) via gavagem nos camundongos.

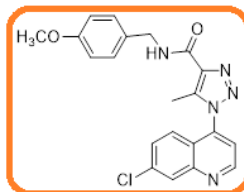


Figura 1. Estrutura do composto QTC-4-MeOBnA.

2.2 Animais:

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos suíços machos (pesando entre 25-35g) provenientes do Biotério da UFPel (CEEA 4344-2015).

2.3 Injeção intracerebro ventricular (I.C.V)

A I.C.V para administração de STZ (Sigma Aldrich Co, EUA) foi realizada através de uma agulha hipodérmica (Insight Equipamentos, Brazil) acoplada a uma seringa de Hamilton. Dessa maneira, a agulha foi inserida utilizando o bregma como ponto de referência conforme descrito por Haley e McCormick (1957) e depois alterado por Laursen e Belknap (1986).

2.4 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi baseado no trabalho previamente publicado Santos et al. (2015). Dessa maneira, os animais foram previamente tratados com o composto ou veículo durante 20 dias. No 21º dia os animais foram submetidos a i.c.v de STZ (3 mg/Kg) ou veículo (salina) e essa administração foi repetida no 23º dia. Decorridos 20 dias dessa administração, foram iniciadas as etapas previstas nos testes comportamentais.

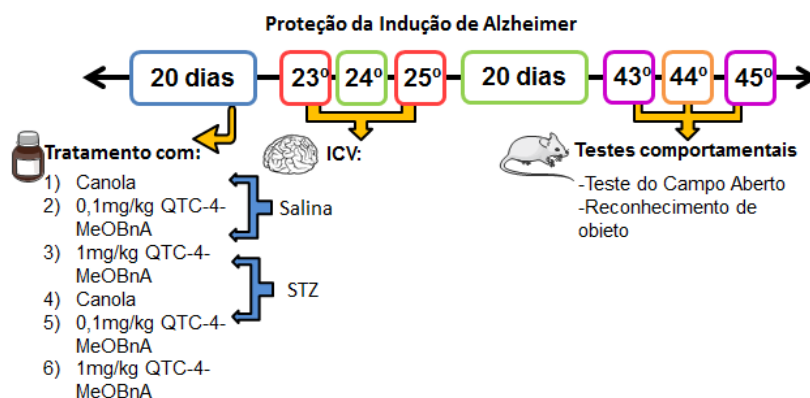


Figura 2. Esquema autoexplicativo do protocolo experimental empregado no trabalho.

2.4.1 Teste do reconhecimento de objeto (TRO)

Esse teste é dividido em quatro etapas diferentes:

A primeira etapa (43º dia) consiste na ambientação e concomitante avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais no teste do campo aberto, durante 5 minutos. Na segunda etapa 24 horas após a ambientação, os animais foram apresentados a dois objetos idênticos durante 5 minutos. A terceira etapa compõe a substituição de um dos objetos já conhecidos por um novo (cor e forma diferente) exatamente 1 hora e 30 minutos após a apresentação dos objetos. Nessa etapa foi cronometrado o tempo que o animal explorou cada um dos objetos durante 5 minutos, caracterizando a memória de curta duração (MCD).

A quarta etapa aconteceu 24 horas após a apresentação dos dois objetos idênticos e caracteriza a memória de longa duração (MLD). Nessa etapa, o primeiro objeto continuou inalterado e um segundo novo objeto foi colocado na caixa e então cronometrado a exploração de cada objeto durante 5 minutos.

Vale ressaltar que o tempo de exploração foi definido quando o animal tocava diretamente um dos objetos, com o nariz ou as patas. Sendo assim, os resultados da preferência exploratória foram expressos através do índice de reconhecimento de objetos (IRB) utilizando a fórmula: $[\text{tempo gasto no objeto novo} / (\text{tempo gasto no objeto familiar} + \text{o tempo gasto no objeto novo})]$.

Tanto o aparato quanto os objetos foram higienizados com álcool 50%, a fim de retirar qualquer vestígio que represente a passagem de outro camundongo.

2.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0, constituída de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste post hoc Neuman Keuls.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3 mostra os resultados dos parâmetros de MCP e MLP do TRO. Os animais foram previamente tratados com o composto ou óleo de canola e depois submetidos a I.C.V de STZ ou veículo, para a indução da demência de Alzheimer tipo esporádica. Nesse sentido, na figura 3 (A) possível observar que os animais tratados com veículo + STZ tiveram diminuição no IRB em comparação ao veículo. Por outro lado, o pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA foi capaz de proteger contra a perda da memória a curto prazo induzida pela STZ.

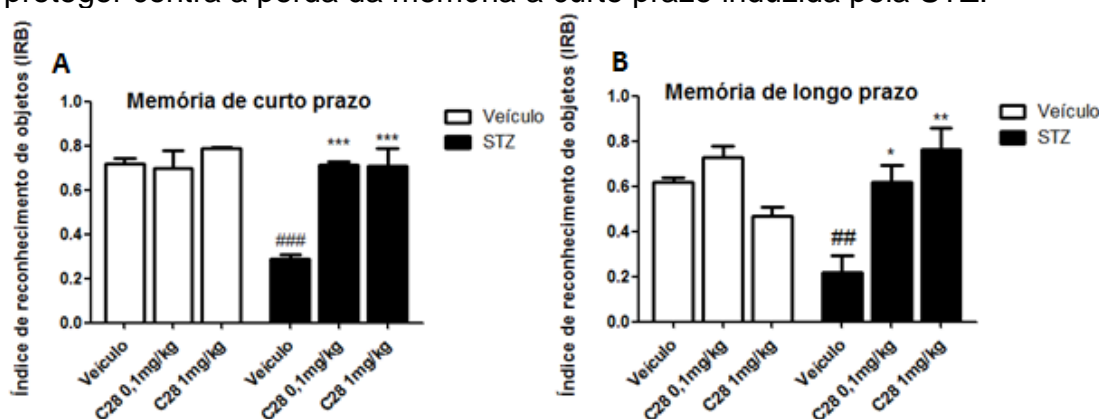


Figura 3. Efeito do QTC-4-MeOBnA no dano cognitivo causado pela STZ nos parâmetros de (A) memória de curto prazo (MCP) e (B) memória de longo prazo (MLP). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Sendo (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo veículo e STZ e ## $p < 0,01$ quando comparado ao veículo salina.

No parâmetro de MLP, demonstrado na figura 3(B) é possível observar que o QTC-4-MeOBnA a 0,1mg/kg foi capaz de proteger parcialmente do dano causado pela STZ, já a dose de 1mg/kg de QTC-4-MeOBnA foi capaz de proteger completamente. Enquanto que os animais tratados apenas com canola e STZ tiveram uma redução da memória quando comparados ao veículo salina, demonstrando que essa dose de STZ está sendo efetiva na indução de Alzheimer.

A partir dos resultados demonstrados, a memória é um conjunto de habilidades mentais que pode ser formada através de diferentes sistemas e componentes do cérebro, podendo assim se diferir em características como duração e função (GOLD e BUDSON et al., 2008). Nesse sentido, MCD é a que nos permite armazenar temporariamente uma informação através da percepção

das características ao nosso redor, como cores, formas e objetos. Por essa razão, múltiplas e repetidas associações levam ao aprendizado que é o mecanismo fundamental para a formação do complexo evento de MLD, caracterizada pela memória declarativa e procedural (KANDAL et al., 2014).

A AD interfere nesses processos a partir do nível molecular se estendendo progressivamente até as redes neurais, por alterar a integridade funcional e estrutural do cérebro. Neste contexto, os déficits individuais nos padrões de memória são correlacionados com o grau de progressão da AD, sendo observado maiores impactos inicialmente na MCD (JAHN et al., 2013). Por essa razão, a proteção superior da MCD pelo QTC-4-MeOBnA pode ser uma promissora característica para o tratamento inicial da AD. Ainda sim, pode representar um mecanismo homólogo para a posterior proteção também observada na MLD.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstrados no presente trabalho são de importante contribuição para a caracterização do QTC-4-MeOBnA como um promissor composto para o tratamento da AD. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de comprovar os mecanismos de ação exercidos pelo mesmo, além da avaliação de outros tipos de memória envolvidos nessa doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ma, T.; Klann, E. Amyloid β : Linking Synaptic Plasticity Failure to Memory Disruption in Alzheimer's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v.120, n.1, p. 140-148, 2012.

Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015.

Scheltens, P.; Blennow, K.; Breteler, M. M. B.; de Strooper, B.; Frisoni, G. B.; Salloway, S.; Van der Flier, W. M. Alzheimer's disease, **The Lancet**, v.1, p.1-12, 2016.

Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropsychopharmacology**, v.11, n.3, p.315-335, 2013.

Vassar, R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v.6, n.89, p.1-50, 2015.

Haley, T.; McCormick, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse, **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**, v.12, p 12-15, 1957.

Laursen, S.; Belknap, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements, **Journal of Pharmacological Methods**, v.16, n.4, p.355-357, 1986.

Santos, D. B.; Colle, D.; Moreira, E. L. G.; Peres, K. C.; Ribeiro, R. P.; dos Santos, A. A.; Farina, M. Probucol mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. **Neuroscience**, v. 284, p.590-600, 2015.

Gold, C. A.; Budson, A. E. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v.8, n.12, p.1879-1891, 2008.

Kandel, E.; Dudai, Y.; Mayford, M, R. The Molecular and Systems Biology of Memory, **Cell Press**, v.157, n.1, p.163-186, 2014. Jahn, H. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.15, n.4, p. 445-454, 2013.