

## Potencial neuroprotetor da 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida em modelo de Alzheimer esporádico

MARIANA FRONZA<sup>1</sup>; RODOLFO BALDINOTTI<sup>1</sup>; MARIA CLARA MARTINS<sup>1</sup>;  
KARINE BEGNINI<sup>2</sup> DIEGO ALVES<sup>3</sup>; LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia:  
marianagronza@gmail.com; rodolfotga@gmail.com; maria.c.martins07@gmail.com;  
lucellisavegnago@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Grupo de Pesquisa em Oncologia: karibegnini@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade de Federal de Pelotas – Laboratório de Síntese Orgânica Limpa:  
diego.alves@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa de cunho progressivo, considerada a forma mais prevalente de demência atualmente (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2015). Uma das principais características fisiopatológicas da DA é a deposição de placas de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), que acontece pela clivagem da proteína precursora amiloide (APP), inicialmente pela  $\beta$ -secretase (BACE-1) em sequência a  $\gamma$ -secretase (KUMAR et al., 2015).

O acúmulo desse peptídeo no microambiente neuronal desencadeia processos inflamatórios e desequilíbrios metabólicos e oxidativos conduzindo a morte celular (SCHELTENS et al., 2017). A principal consequência desse quadro patológico é a disfunção na transmissão sináptica, o que reflete na perda da memória e função cognitiva do paciente (CANTER et al., 2016). Vale ressaltar que o aumento na formação  $A\beta$  pode preceder de 15-25 anos os primeiros sintomas cognitivos, o qual define a modulação da cascata amiloidogênica como um importante alvo terapêutico precoce na DA (FAGAN et al., 2014).

Nesse sentido, em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a molécula 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA) foi formulada a partir do desenho racional de fármacos, tendo como alvo molecular principal, a BACE-1. A BACE-1 é um passo limitante na produção de  $A\beta$ , e ainda, a inibição dessa enzima é o mecanismo de ação majoritário de fármacos em teste clínicos na DA (CUMMINGS et al., 2017). A partir disso, o objetivo do presente estudo consistiu na avaliação do pré-tratamento com a QTC-4-MeOBnA frente ao dano cognitivo e modulação da cascata amiloidogênica em camundongos submetidos a indução de demência tipo Alzheimer esporádico por estreptozotocina (STZ).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Drogas

A síntese da QTC-4-MeOBnA foi realizada pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel (LASOL) e dissolvido em óleo de canola na dose de 1mg/Kg e administrado pela via intragástrica (i.g) em camundongos.

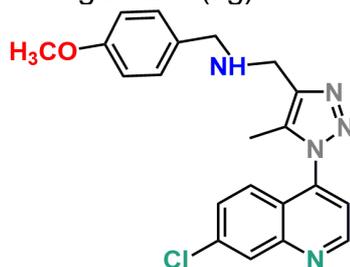


Figura 1. Estrutura química da 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA).

A STZ (Sigma Aldrich Co, EUA) foi diluída em salina na dose de 3mg/Kg, mantida no gelo e protegida da incidência de luz durante todas as manipulações.

## 2.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (25-35g) machos, mantidos sob condições controladas no Biotério da UFPel (CEEA 4344-2015).

## 2.3 Injeção intracerebroventricular (ICV)

A ICV para administração de STZ 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

Os camundongos foram previamente submetidos ao tratamento com óleo de canola ou QTC-4-MeOBnA (1 mg/Kg), conforme demonstrado na Figura 2. Ao fim do tratamento, receberam duas administrações de STZ (3 mg/Kg) ou salina, pela via ICV com um dia de intervalo entre as duas injeções. Decorridos 21 dias destinados a formação das características da doença, os camundongos foram avaliados no teste da esquiva passiva e no dia 46 sacrificados para as análises de expressão gênica.

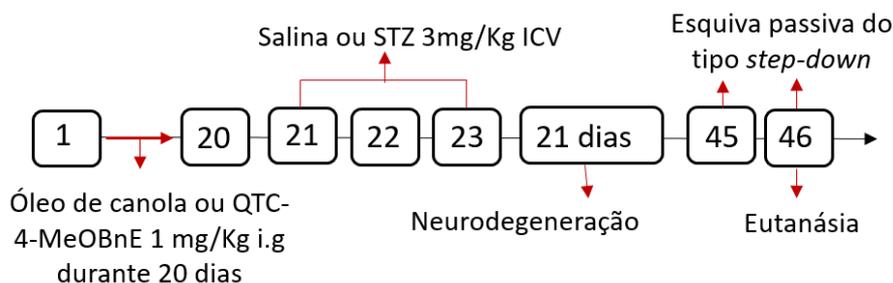


Figura 2. Ilustração do delineamento experimental.

## 2.5 Esquiva passiva do tipo *step-down*

A esquiva passiva foi realizada para avaliar a consolidação da memória e a capacidade de aprendizado, de acordo com Sakagushi et al. (2006). Esse teste consiste em uma caixa de vidro, com uma plataforma segura, com o piso gradeado e conectado a um gerador de choque (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). No dia de treino, os animais foram colocados na plataforma e ao descerem, receberam um estímulo elétrico (0,5mA-2s). Após 24h, no dia do teste, foi avaliado o tempo de latência dos animais para descerem a plataforma, sem o estímulo elétrico. Foi estabelecido um tempo de aquisição de 1 min em cima da plataforma no treino, e um limite de 600s para a execução da tarefa no dia do teste.

## 2.6 Expressão gênica através de Real-time PCR (RT-PCR)

A região cerebral de hipocampo (HP) direito foi dissecada sobre gelo e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) e tratado com o kit DNA-free® (Ambion™, USA). A síntese de cDNA foi realizada com 2g de RNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, UK). A RT-PCR foi realizada com 1  $\mu\text{L}$  de cDNA em sistema de tempo real (Analytik Jena,AG, Alemanha), utilizando a mistura reacional UltraSYBR (COWIN Bioscience Co., Pequim, China) e normalizado com  $\beta$ -microglobulina para BACE-1 e  $\beta$ -actina para os genes APP e  $\gamma$ -secretase. As condições para a reação incluíram os ciclos:  $95^{\circ}\text{C}$  por 15s,  $60^{\circ}\text{C}$  por 60s e  $72^{\circ}\text{C}$  por 3s.

## 2.7 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* Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira vez que os camundongos foram apresentados ao aparato da esQUIVA passiva, nenhum dos grupos demonstrou diferenças estatísticas no comportamento exploratório (Figura 3). A indução de Alzheimer esporádico por STZ foi capaz de reduzir o tempo de latência significativamente quando comparado ao grupo controle, demonstrando o déficit cognitivo dos animais (Figura 3B). O pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA foi capaz de proteger do dano induzido pela STZ, sugerindo o potencial da molécula em proteger da perda de memória e disfunção no aprendizado.

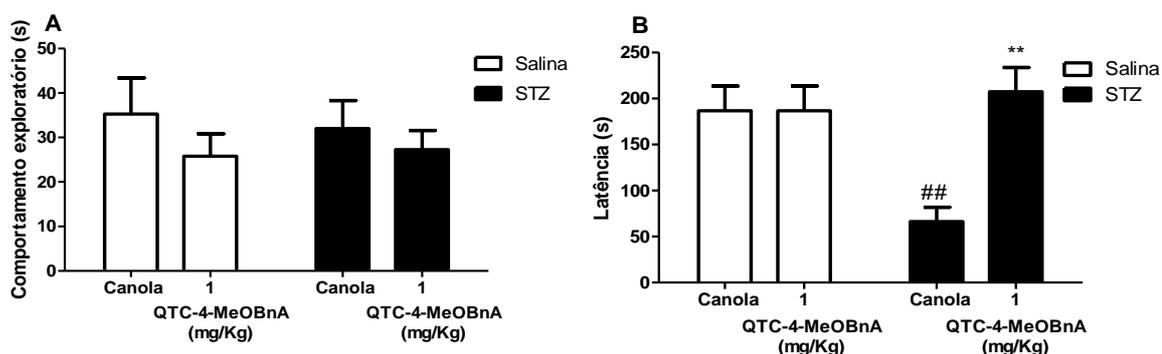


Figura 3. Efeito do pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA no dano cognitivo causado por injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) nos parâmetros de (A) comportamento exploratório no treino e (B) teste. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n: 6-8). As análises foram feitas por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls. (\*\*)  $p < 0,01$ , quando comparado ao veículo e STZ e (##)  $p < 0,01$  quando comparado ao veículo salina.

Os resultados referentes a expressão gênica relativa, demonstraram que a injeção de STZ foi capaz de aumentar os níveis da BACE-1,  $\gamma$ -secretase e APP no HC (Figura 4). Enquanto que, os camundongos pré-tratados com QTC-4-MeOBnA apresentaram uma redução na expressão dessas enzimas, o que demonstra o potencial da molécula em modular a cascata amiloidogênica. Através desses resultados pode ser presumido a redução da deposição de  $A\beta$ .

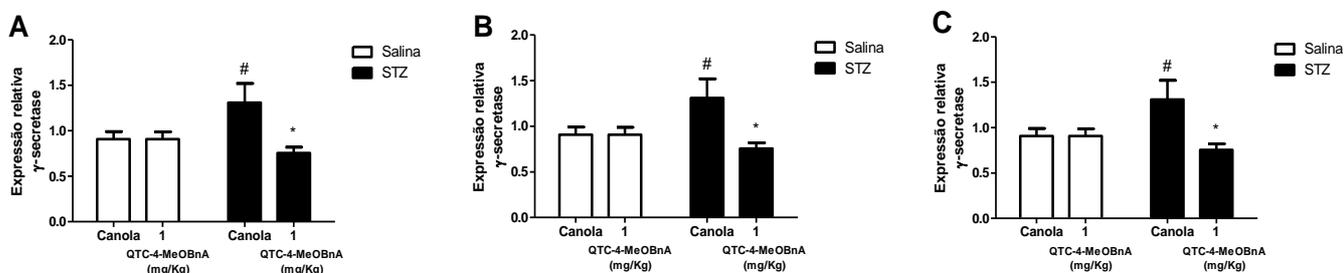


Figura 4. Efeito do pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA nos níveis de expressão relativa da  $\beta$ -secretase (A),  $\gamma$ -secretase (B) e proteína precursora amiloide (APP) (C) nos camundongos submetidos a injeção ICV de STZ. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n: 5-6). As análises foram feitas por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-

Keuls.(\*\*)  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo veículo e STZ e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao veículo salina.

O HP é uma das principais estruturas cerebrais relacionada a formação de memória e função cognitiva, e a atrofia tecidual nessa região pode chegar a 10% ao ano em pacientes com DA. Além do acúmulo de  $A\beta$  ser um dos principais eventos neurotóxicos na doença, ainda é responsável por reduzir diretamente a expressão e manutenção da potenciação a longo prazo (MANDER et al., 2015). Essa redução condiciona ao enfraquecimento de conexões sinápticas através da redução de estímulos elétricos cerebrais impedindo assim a consolidação da memória (YAN et al., 2016; MUSARDO et al., 2017).

#### 4. CONCLUSÕES

A partir desses resultados é possível atribuir capacidade da QTC-4-MeOBnA em proteger do dano cognitivo, em partes, à modulação da cascata amiloidogênica, um dos principais eventos relacionados a neurodegeneração na doença. Assim, devido ao potencial neuroprotetor, a QTC-4-MeOBnA é um promissor alvo terapêutico para mais estudos envolvendo DA.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN, P. S. et al. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 60-72, 2017.
- CANTER, R. G.; PENNEY, J.; TSAI, L.-H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 187-196, 2016.
- CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 3, n. 3, p. 367-384, 2017.
- HALEY, T. J.; MCCORMICK, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. **British journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 12, n. 1, p. 12-15, 1957.
- LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of Pharmacological methods**, v. 16, n. 4, p. 355-357, 1986.
- MANDER, B. A. et al.  $\beta$ -amyloid disrupts human NREM slow waves, n. and related hippocampus-dependent memory consolidation. **Nature Neuroscience**, v.18, n.7, p.1051-1057, 2015.
- MUSARDO, S.; MARCELLO, E. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: From the role of amyloid beta-peptide to the alpha-secretase ADAM10. **European Journal of Pharmacology**, 2017.
- SAKAGUCHI, M. et al. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, n. 2, p. 81-87, 2006.
- YAN, R. et al. Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease. **Neuroscience and Biobehavioral reviews**, v. 65, p. 326-340, 2016.