

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DE 1,3-TIAZOLIDIN-4-ONAS NA ATIVIDADE TOTAL E ISOFORMAS DA ACETILCOLINESTERASE EM HIPOCAMPO DE RATOS**

**ANITA ALMEIDA AVILA<sup>1</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>2</sup>; DANIEL SILVA<sup>3</sup>; FRANCIELE MARTINI <sup>4</sup>; WILSON CUNICO<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [anita\\_a\\_avila@hotmail.com](mailto:anita_a_avila@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mayara\\_sandrielly@hotmail.com](mailto:mayara_sandrielly@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [danielschuch08@gmail.com](mailto:danielschuch08@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Santa Maria – [francielemartini@gmail.com](mailto:francielemartini@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [wjcunico@yahoo.com.br](mailto:wjcunico@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa caracterizada por um progressivo e irreversível declínio em funções intelectuais e cognitivas do indivíduo. (FERREIRA-VIEIRA et al. 2016). As principais características neuropatológicas incluem deposição extracelular de placas formadas pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e o acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína tau hiperfosforilada. Essas modificações podem promover a perda de sinapses levando a morte neuronal (FERREIRA-VIEIRA et al. 2016).

A relação entre o sistema colinérgico e a DA tem sido muito explorada nos últimos anos. Vários estudos têm demonstrado que modificações neuroquímicas na sinalização colinérgica estão envolvidas com os déficits cognitivos em pacientes com DA (SCHLIEBS e ARENDT, 2006; AUBERT et al. 1992). O sistema colinérgico é composto pelo neurotransmissor acetilcolina, receptores nicotínicos e muscarínicos e as enzimas colina acetiltransferase e acetilcolinesterase (AChE) (PARFITT et al. 2012). A enzima AChE é responsável por realizar a hidrólise da acetilcolina em acetato e colina modulando assim a sinalização mediada por este neurotransmissor (FERREIRA-VIEIRA et al. 2016).

Fármacos inibidores da AChE vêm sendo usados para aumentar os níveis de acetilcolina e assim melhorar os déficits cognitivos associados com a DA. Entretanto, muitos destes fármacos apresentam efeitos colaterais indesejados (MINETT e BORTOLLUCCI, 2000). Sendo assim, o estudo de novos compostos com potencial inibitório da atividade da AChE torna-se relevante.

As tiazolidinonas são compostos heterocíclicos de cinco membros que apresentam em sua estrutura um átomo de enxofre, um átomo de nitrogênio e uma carbonila. Várias propriedades terapêuticas desses compostos têm sido descritas na literatura tais como ação antioxidante (GERONIKAKI et al. 2013) e antitumoral (SILVA et al. 2016). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de tiazolidinonas de origem sintética na atividade total da enzima AChE, bem como em suas isoformas em hipocampo de ratos.

### **2. METODOLOGIA**

#### **Síntese de moléculas**

Doze 1,3-tiazolidin-4-onas foram sintetizadas de acordo com (SILVA et al. 2016) pela reação multicomponente entre uma amina primária, um benzaldeído (4-(metiltio)benzaldeído ou 4-(metilsulfonil)benzaldeído) e o ácido mercaptoacético. Todas as tiazolidinonas foram devidamente confirmadas e caracterizadas por CG-EM e por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### Animais

Foram utilizados dez ratos Wistar machos adultos os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA 9219).

### Efeito *in vitro* das moléculas na atividade da AChE total em hipocampo

Os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo foi coletado. Para o ensaio da atividade da AChE total, o hipocampo foi homogeneizado em uma solução de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 1800 rpm durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático de acordo com (ELLMAN et al. 1961) com modificações. Este método baseia-se na formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato medido em um espectrofotômetro a 412 nm durante 2 minutos com intervalo de 30 segundos a 27°C. As moléculas testadas foram solubilizadas em metanol e preparadas em diferentes concentrações (0,1 - 250  $\mu\text{M}$ ). A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol AcSCh/h/ mg}$  de proteína.

### Efeito *in vitro* das moléculas na atividade da isoformas da AChE

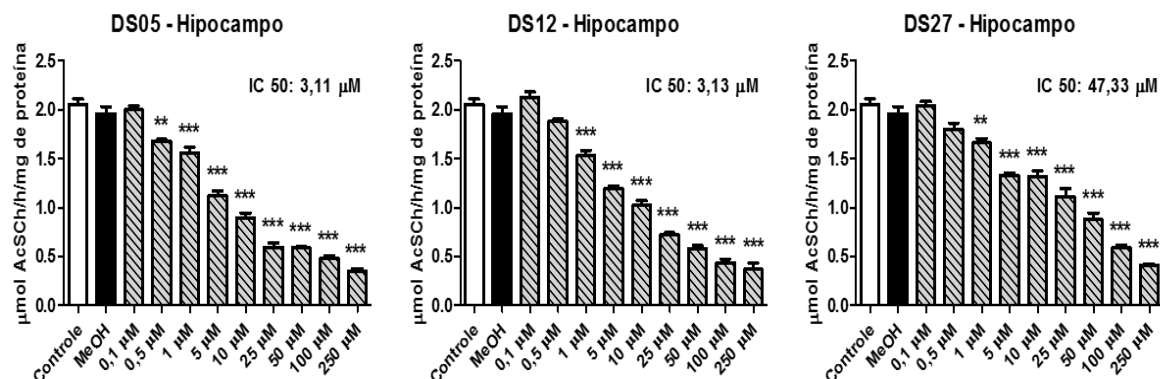
O hipocampo foi homogeneizado em solução tampão fostato sódico 30 mmol/L, pH 7 com inibidor de proteases, ácido etileno glicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)- $N,N,N',N'$ -tetraacético (EGTA). O homogenizado foi centrifugado a 100,000  $\times g$  a 4 °C por 60 minutos, coletado, e esse constituiu-se a isoforma solúvel em sal (SS ou G1). O pellet foi re-suspendido em 1% de Triton X-100 e as amostras centrifugadas a 100,000  $\times g$  a 4 °C por 60 minutos sendo o sobrenadante coletado como a isoforma solúvel em detergente (DS ou G4). A atividade da AChE foi determinada nas isoformas pelo método segundo (ELLMAN et al. 1961; DAS et al. 2005). A amostra foi pré-incubada por 2 minutos a 25 °C na presença das moléculas. A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato iodeto de acetiltiocolina (0,8 mM). A atividade enzimática foi determinada à 412 nm durante 2 minutos e expressa em  $\mu\text{moles/min/mg}$  de proteína.

### Análise estatística

Os dados foram analisados usando análise de variância ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey-Kramer, no programa Graphpad Prism 5. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (S.E.M).

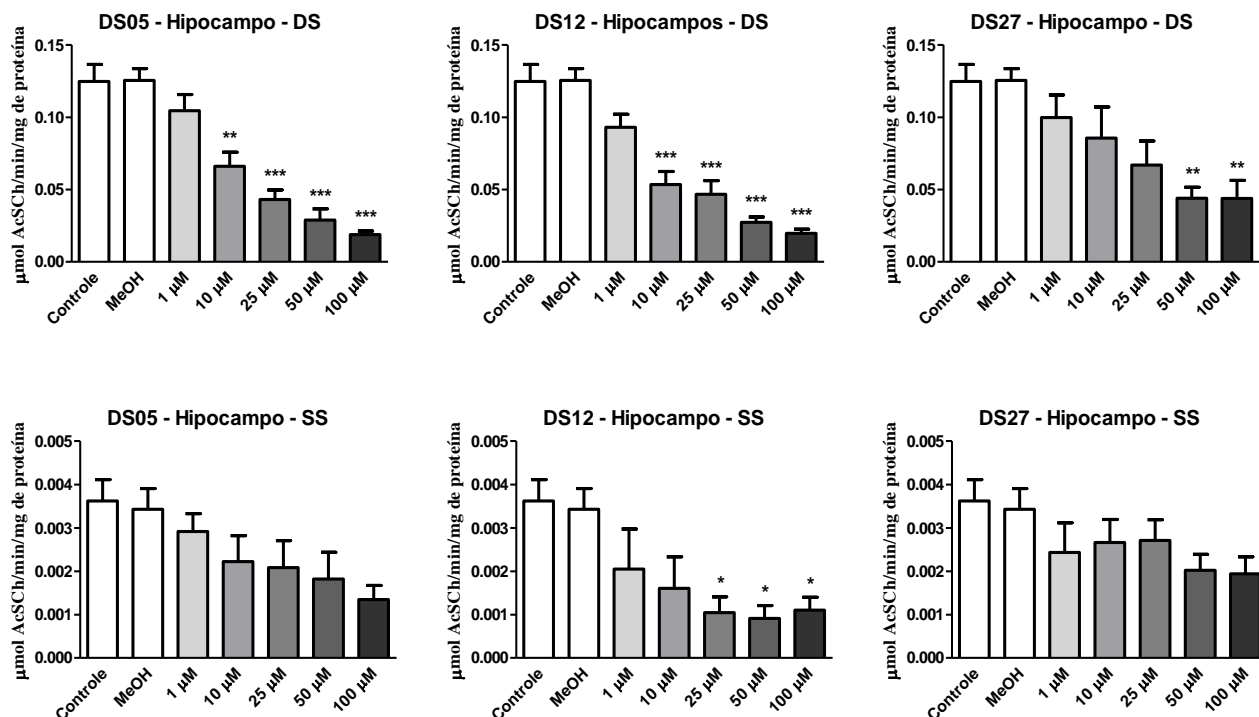
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das doze moléculas analisadas, três delas apresentaram melhores efeitos relacionados a inibição da atividade da enzima AChE. Como demonstrado na Figura 1, os compostos DS12 e DS27 apresentaram um efeito inibitório a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$ , por outro lado a molécula DS05 foi capaz de inibir a atividade da AChE a partir da concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  quando comparado com o grupo controle ( $P < 0.05$ ).



**Figura 1:** Efeito das 1,3-tiazolidin-4-onas DS05, DS12 e DS27 em diferentes concentrações (0,1 - 250 µM) sobre a atividade da AChE total em hipocampo de ratos. \*\*P < 0,01 \*\*\*P < 0,001 diferente do grupo controle.

As moléculas DS05 e DS12 foram capazes de inibir a atividade da fração DS da AChE nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µM. A molécula DS27 reduziu a atividade da fração DS da AChE de hipocampo nas concentrações de 50 e 100 µM. Em relação à fração SS, somente a molécula DS12 foi capaz de inibir a atividade enzimática nas concentrações de 25, 50 e 100 µM (Figura 2).



**Figura 2:** Efeito das 1,3-tiazolidin-4-onas DS05, DS12 e DS27 em diferentes concentrações (1-100 µM) sobre a atividade das frações detergente-solúvel (DS) e solúveis em sal (SS) da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de ratos. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 diferente do grupo controle (n = 4-8).

A AChE constitui-se em um importante alvo terapêutico para a melhorar a deficiência colinérgica associada a DA, sendo os inibidores desta enzima os principais fármacos atualmente empregados no tratamento desta patologia. Em cérebros de pacientes com DA, há uma redução seletiva no nível da isoforma ligada à membrana (G4) provavelmente devido à perda de terminais pré-sinápticos, enquanto os níveis da isoforma G1 permanecem inalterados. Os resultados demonstram que três moléculas foram capazes de inibir a atividade da AChE total *in vitro* nas menores concentrações avaliadas (0,5 – 1  $\mu$ M). Além disso, os compostos DS05 e DS27 foram seletivos para isoforma G4 enquanto que o composto DS12 foi capaz de inibir tanto a G1 quanto a G4. Compostos capazes de inibir ambas as isoformas podem ter uma eficácia terapêutica maior para aumentar a disponibilidade do neurotransmissor acetilcolina nos terminais sinápticos e assim levar a uma melhora dos déficits cognitivos na DA.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho constatou-se que as tiazolidin-4-onas testadas possuem um potencial efeito inibitório *in vitro* da enzima AChE em hipocampo de ratos. Desta forma, estas moléculas podem ser importantes alvos de estudos como alternativa terapêutica para patologias que envolvam alterações no sistema colinérgico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUBERT, I.; ARAUJO, D.; CÉCYRE, D.; ROBITAILLE, Y.; GAUTHIER, S.; QUIRION, R. Comparative Alterations of Nicotinic and Muscarinic Binding Sites in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **J. Neuroch**, v.58, n.2, p. 529-541, 1992.
- DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Role of Molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. **Pharmacol Biochem Behav**, v.81, n.1, p.89-99, 2005.
- ELLMAN, G.; COURTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol**, v.7, n. 2, p.88–95, 1961.
- FERREIRA-VIEIRA, T.; GUIMARAES, I.; SILVA, F.; RIBEIRO, F. Alzheimer's Disease: targeting the cholinergic system. **Curr Neuropharmacol**, v.14, n.1, p.101-115, 2016.
- GERONIKAKI, A.; PITTA, E.; LIARAS, K. Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. **Curr. Med. Chem**, v.20, n. 36, p.4460-4480, 2013.
- MINETT, T.; BORTOLLUCCI, P. Terapia Colinérgica na doença de Alzheimer. **Rev. Neurociências**, v.8, n. 1, p.11-14, 2000.
- PARFITT, G.; CAMPOS, R.; BARBOSA, A.; KOTH, A.; BARROS, D. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. **Neurobiol. Lear. Mem**, v.97, n.2, p.183-188, 2012.
- SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm**, v.113, n.11, p.1625-1644, 2006.
- SILVA D.; SILVA C.; SOARES M.; AZAMBUJA J.; CARVALHO T.; ZIMMER G.; FRIZZO C.; BRAGANHOL E.; SPANEVELLO R.; CUNICO W. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiangioma activity and cytotoxicity. **Eur. J. Med. Chem**, v.124, n.1, p.574-582, 2016.