

## EFEITO DE 5-((4 METOXIFENIL)TIO)BENZO[c][1,2,5]TIADIAZOL EM UM MODELO DE AMNÉSIA EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

KARLINE DA COSTA RODRIGUES<sup>1</sup>; RENATA LEIVAS DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; NELSON LUÍS DE CAMPOS DOMINGUES<sup>3</sup>; ETHEL ANTUNES WILHELM<sup>4</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – line.karline@hotmail.com; <sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – renataleivas15@hotmail.com; <sup>3</sup>Universidade Federal de Dourados – nelsondomingues@ufgd.edu.br; <sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora); <sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – cristiane\_luchese@yahoo.com.br (orientadora)

### 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial que impõe grandes desafios e demanda a implementação de políticas públicas específicas. Neste sentido, tem surgido uma relevante preocupação com o desenvolvimento de doenças crônicas que possam prejudicar a qualidade de vida da população, como no caso de doenças neurodegenerativas (SOUZA, 2015). A demência, uma das doenças crônicas mais prevalentes, é uma síndrome neurológica que acarreta o desenvolvimento de alguns sintomas como a amnésia. A amnésia é classificada como uma incapacidade total ou parcial de lembrar/ manter informações previamente adquiridas (SCHACTER, HARBLUK e MCLACHLAN, 1984), ou seja, com impacto direto na memória.

Estudos demonstram que há uma associação direta entre o sistema colinérgico e o desenvolvimento de processos neurodegenerativos. Dentre os principais neurotransmissores envolvidos na modulação da memória, encontra-se a acetilcolina (ACh), a qual é liberada na fenda sináptica e por ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) é hidrolisada no sistema nervoso central (SNC) (MARTINI, et al. 2015). As doenças neurodegenerativas, normalmente, apresentam um decréscimo da função colinérgica, acompanhada por um declínio de ACh e um aumento da atividade da AChE (VINUTHA et al. 2007).

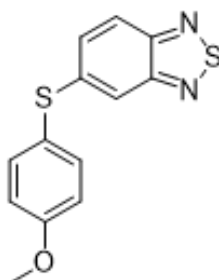
Atualmente, já existem medicamentos utilizados na clínica para estas desordens, como donepezila, galatamina e memantina; porém os mesmos apresentam efeitos adversos consideráveis (YUAN et al. 2018). Assim, estudos que visem a descoberta de compostos com atividade inibitória da AChE são de suma importância. Neste sentido, destacam-se os compostos orgânicos de sulfeto que apresentam atividades biológicas e farmacológicas relevantes. Importammentemente, compostos sulfeto de arila apresentam ação anti-inflamatória, que comumente encontra-se envolvida na patologia de doenças neurológicas (LEY e THOMAS, 2003; THANKACHAN et al. 2015).

Com base no que foi exposto, o presente estudo teve como intuito avaliar o efeito neuroprotetor de 5-((4 metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5] tiodiazol (composto 3B) em um modelo de amnésia induzido por escopolamina (ESC) em camundongos, bem como avaliar o envolvimento da atividade da enzima AChE.

### 2. METODOLOGIA

O composto 3B (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise, da Universidade Federal de Grande Dourados. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pela

Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº CEEA 1974/2016).



**Figura 1.** Estrutura química de 5-((4 metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5] tiodiazol (3B)

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos machos adultos da raça *Swiss* (20-25g), divididos em cinco grupos experimentais (8 animais/grupo). Os animais receberam o tratamento com o composto 3B (10 mg/kg), óleo de canola (10 ml/kg) ou donepezila (10 mg/kg) por via per oral (p.o.). Trinta minutos após, realizou-se a administração de ESC (0,4 mg/kg) ou salina 0,9% (5 ml/kg) pela via intraperitoneal (i.p.) (SOUZA et al. 2010). Os tratamentos foram realizados durante 10 dias.

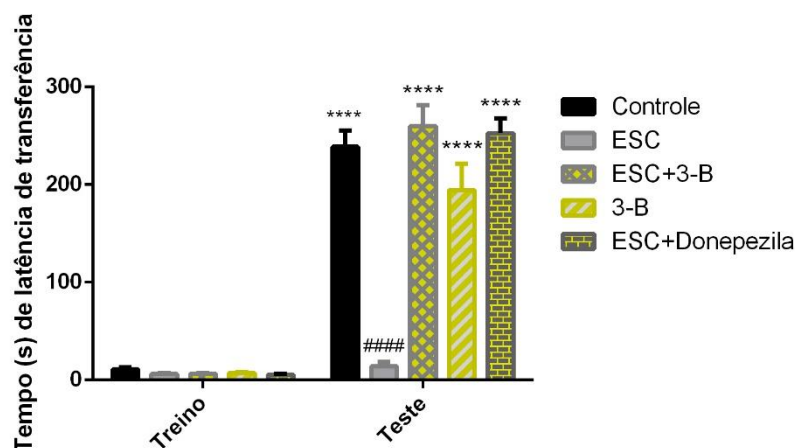
Após trinta minutos da administração de ESC ou salina, no 9º e 10º dia, foi realizado o teste comportamental da esQUIVA INIBITÓRIA. Este teste é utilizado para avaliar a memória não espacial de longo prazo. No 9º dia, os animais foram submetidos ao treino, no qual avaliou-se o tempo que o animal levava para descer da plataforma. Ao descer, o animal recebia um estímulo elétrico de 0,5 mA até que o mesmo retornasse para plataforma, permanecendo por 1 minuto, indicando assim o aprendizado da tarefa. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram submetidos ao teste, cronometrando-se o tempo de descida da plataforma, sem que recebessem o choque elétrico (SAKAGUCHI et al. 2006).

Posteriormente ao teste, os animais foram submetidos à eutanásia e as estruturas de córtex cerebral e hipocampo foram removidas para a dosagem da atividade da enzima AChE. Para esta dosagem, as estruturas foram homogeneizadas em tampão *Médium I* na proporção de 1:10, centrifugadas a 3000 rotações por minutos/10 minutos. A atividade da enzima foi determinada colorimetricamente a 412 nm de acordo com o método descrito por ELLMAN (1961).

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

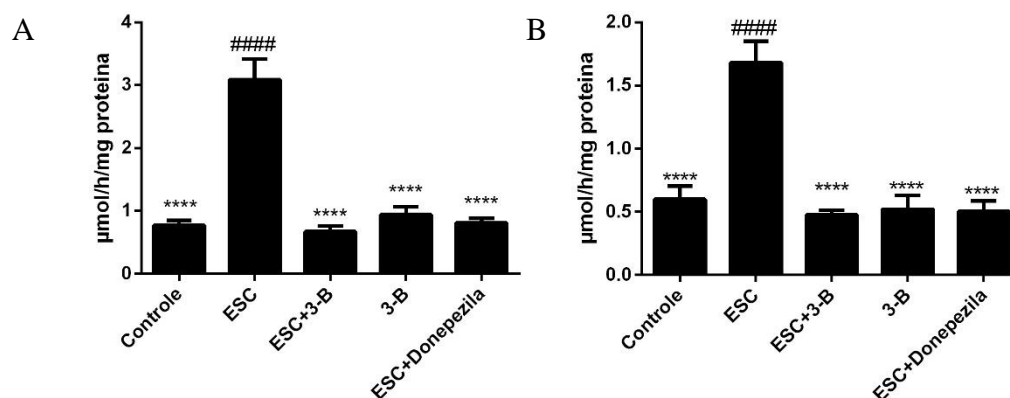
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na figura 2, na fase do treino da esQUIVA INIBITÓRIA não houve diferença significativa entre os grupos. No teste, os animais que receberam a indução com ESC apresentaram menor tempo de descida da plataforma, indicando prejuízo de memória. O tratamento com o composto 3B, por sua vez, foi capaz de prevenir este dano cognitivo. Ainda, foi utilizado o tratamento com donepezila como controle positivo, tendo em vista que o mesmo é utilizado na clínica para o tratamento de doenças neurológicas. O efeito neuroprotetor do composto foi similar ao demonstrado pelo controle positivo.



**Figura 2.** Avaliação do efeito do composto 3B no treino e teste da esQUIVA inibitória. (\*\*\*\*) indicam  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo ESC; e (####) indicam  $p < 0,0001$ , quando comparado com o grupo controle.

Conforme apresentado na Figura 3, a administração de ESC causou um aumento na atividade da enzima AChE no córtex cerebral e no hipocampo dos camundongos. Este resultado corrobora com o encontrado na tarefa da esQUIVA inibitória, indicando que houve um dano cognitivo. Além disso, a administração do composto 3B, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de prevenir este aumento em ambas as estruturas cerebrais. Adicionalmente, pode-se constatar que o composto apresentou efeito semelhante ao medicamento já utilizado na clínica, o donepezila. Com base nos resultados, sugere-se que o composto foi capaz de modular a disfunção na neurotransmissão colinérgica induzida pela ESC.



**Figura 4.** Efeito do composto 3B na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (A) no córtex cerebral e (B) no hipocampo dos camundongos. (\*\*\*\*) indicam  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo ESC; e (####) indicam  $p < 0,0001$ , quando comparado com o grupo controle.

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o composto 3B, na dose de 10 mg/kg, apresentou efeito protetor contra o comprometimento de memória em um modelo de amnésia induzido por ESC. Além disso, este efeito parece envolver a modulação da enzima

AChE. Todavia, estudos adicionais se fazem necessários para elucidar outros possíveis mecanismos envolvidos na atividade do composto.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, Jr. V.; FEATHERSTONE, M.R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, California, v.7, n.1, p.88-95, 1961.
- LEY, S. V.; THOMAS, A. W. Modern synthetic methods for copper-mediated C(aryl)-O, C(aryl)-N, and C(aryl)-S bond formation. **Angewandte Chemie International Edition**, v.42, p.5400- 5449, 2003.
- MARTINI, F.; BRUNING, C. A.; SOARES, S. M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Inhibitory Effect of Ebselen on Cerebral Acetylcholinesterase Activity In Vitro: Kinetics and Reversibility of Inhibition. **Current Pharmaceutical Design**, USA, v.21, n.7, p. 920-924, 2015.
- MATTSON M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v.430, p. 631-639.
- SAKAGUCHI, M.; KOSEKI, M.; WAKAMATSU, M.; MATSUMURA, E. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.530, p. 81-87; 2006.
- SCHACTER, D.L.; HARBLUK, J.L.; MCLACHLAN, D.R. Retrieval without recollection: An experimental analysis of source amnesia. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v. 23, n. 5, p. 593-611, 1984.
- SOUZA, A.C.G.; BRÜNING, C.A.; LEITE, M.R.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice. **Behavioural Pharmacology**, v.21, p.556–562, 2010.
- SOUZA, N. dos S. O Papel Coadjuvante Terapêutico da Fitoterapia na Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v.15, n.62, 2015.
- THANKACHAN, A.P.; SINDHU, K.S.; KRISHNAN, K.K.; ANILKUMAR, G.A. Novel and efficient zinc-catalyzed thioetherification of aryl halides. **RSC Advances**, v.5, p.32675-32678, 2015.
- VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.359-63, 2007.
- YUAN, C.; GUO, X.; ZHOU, Q.; DU, F.; JIANG, W.; ZHOU, X.; LIU, P.; CHI, T.; JI, X.; GAO, J.; CHEN, C.; LANG, H.; XU, J.; LIU, D.; YANG, Y.; QIU, S.; TANG, X.; CHEN, G.; ZOU, L. OAB-14, a bexarotene derivative, improves Alzheimer's disease-related pathologies and cognitive impairments by increasing  $\beta$ -amyloid clearance in APP/PS1 mice. **Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis of Disease**. 1865, 161-180, 2018.
- ZHANG, W.W.; SONG, M.K.; CUI, Y.Y.; WANG, H.; ZHU, L.; NIU, Y.Y., YANG, L.M.; LU, Y.; CHEN, H.Z. Differential neuropsychopharmacological influences of naturally occurring tropane alkaloids anisodamine versus scopolamine. **Neuroscience Letters**. v. 443, p. 241-245, 2008