

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE 2'-(1,2,3-TRIAZOIL)-ACETOFCENONAS NA ATIVIDADE DA ENZIMA MONOAMINA OXIDASE B DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS

EVELYN MIANES BESCKOW¹; MARIANA GALLIO FRONZA²; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO¹; LUCIELLI SAVEGNAGO²; DIEGO ALVES³; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING¹

¹*Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – evy591@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.*

²*Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Universidade Federal de Pelotas.*

³*Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas.*

1. INTRODUÇÃO

A atuação das enzimas monoamina oxidases (MAOs) na regulação de atividades do sistema nervoso central (SNC) tem sido alvo de diversos estudos bioquímicos e farmacológicos, que visam desenvolver novas terapias para o tratamento de inúmeras desordens neurológicas e psiquiátricas, como Transtorno Depressivo Maior (TDM) (SABRI *et al.*, 2020), Doença de Parkinson (DP) (KANG *et al.*, 2018) e Doença de Alzheimer (DA) (SCHEIDIN-WEISS *et al.*, 2017). Ao metabolizar neurotransmissores no cérebro, as MAOs desempenham papéis críticos na regulação comportamental, cognitiva e endócrina (CARRADORI *et al.*, 2018). Compostos que atuem na modulação destas enzimas, podem resultar num avanço para tratar diversas patologias que acometem o SNC.

Existem duas isoformas da MAO, a MAO-A e MAO-B, ambas associadas à membrana externa mitocondrial. As isoformas possuem 70% de similaridade entre si na sequência de aminoácidos, porém diferem em suas especificidades por substrato, inibidores e localizações tecidual (TIPTON, 2018). Preferencialmente a MAO-A catalisa a desaminação de serotonina e noradrenalina, enquanto que a MAO-B possui maior especificidade pelos substratos benzilamina, β -feniletilamina e dopamina (CARRADORI *et al.*, 2018). Tais diferenças permitem desenvolver estratégias farmacológicas para novas abordagens terapêuticas além de reduzir os efeitos colaterais (HUANG *et al.*, 2019).

A MAO-B parece desempenhar um papel central na DA, visto que contribui para a formação de placas β amiloide, destruindo neurônios colinérgicos, levando à disfunções cognitivas (CAI, 2014). Além disso, a inibição desta enzima pode atuar aumentando os níveis de dopamina na DP, a qual caracteriza-se por perda significativa de células dopamíngicas do mesencéfalo (KANG *et al.*, 2018). A super expressão da MAO-B também parece estar relacionada com a fisiopatologia da TDM, visto que implica em disfunção mitocondrial, geração de peróxido de hidrogênio em excesso e produção de metabólitos tóxicos podendo resultar em sintomas depressivos (MORIGUCHI *et al.*, 2019). Dessa forma, a busca de novos fármacos visando inibir a MAO-B pode ter várias aplicabilidades.

Compostos da classe das acetofenonas têm demonstrado uma gama de atividades biológicas relevantes, como efeito do tipo antidepressivo em camundongos, efeito antioxidante e efeito inibitório sobre a atividade da MAO (SOUSA *et al.*, 2018). Considerando os dados já apresentados na literatura e que os inibidores da monoamina oxidase estão envolvidos na terapia de várias patologias, principalmente a DA, no presente trabalho selecionamos 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas com diferentes substituintes e verificamos suas capacidades de inibição da isoforma MAO-B, através de teste *in vitro*, em homogenatos de cérebros de camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1 Compostos

As 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas (figura 1) foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), e os experimentos bioquímicos foram realizados no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), ambos localizados na Universidade Federal de Pelotas.

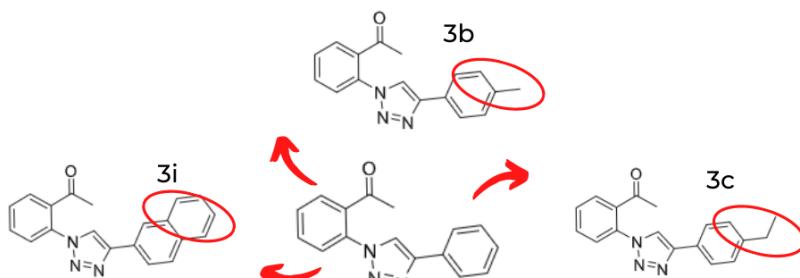


Figura 1. Estruturas químicas das 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas (3b,3c e 3i).

2.2 Animais

Para investigar o potencial inibitório das 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas na atividade da MAO-B foram utilizados cérebros de camundongos Swiss machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFPel (CEEA 50890-2019). Os animais foram submetidos à eutanásia por isoflurano para a remoção do cérebro.

2.3 Preparação mitocondrial

O tecido cerebral foi preparado conforme descrito por SOTO-OTERO *et al.* (2001) para obtenção de uma fração rica em mitocôndria. O cérebro dos camundongos foi homogeneizado em uma solução tampão de homogeneização (Na_2HPO_4 0,0168 M / KH_2PO_4 0,0106 M isotonizado com KCl 0,0036 M, pH 7,4) na proporção de 1:4 (peso/volume) e, submetido à centrifugação. O sobrenadante foi novamente centrifugado e após, o pellet (P1) foi ressuspêndido com tampão de homogeneização. A nova fração foi centrifugada e ressuspêndida em tampão de ensaio formando a fração a ser utilizada no experimento. A concentração proteica dos homogenatos cerebrais foi medida pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão, fixada em 1 mg/mL.

2.4 Ensaio de atividade da MAO-B

A atividade da MAO-B foi realizado conforme descrito em SOTO-OTERO *et al.* (2001). Alíquotas de amostras foram incubadas a 37 °C por 5 min em um meio contendo solução tampão, o inibidor específico clorgilina (um inibidor de MAO-A, 250 nM) e 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas, dissolvidas em DMSO (concentrações finais de 0,01 a 500 μM). Em seguida, quinuramina (60 μM) foi adicionada à reação, servindo como um substrato não seletivo. As amostras então foram incubadas a 37°C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi encerrada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a NaOH 1M formando 4-hidroxiquinolina, um produto fluorescente. A intensidade de fluorescência foi avaliada através de um fluorímetro em excitação correspondente a 315 nm e emissão de 380 nm. Os resultados foram calculados e expressos como nmol de 4-OH quinolina/mg de proteína/minuto.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do software GraphPad Prism 7.04, utilizando a análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls. A concentração que inibe 50% da atividade da enzima (IC_{50}) foi determinada por regressão não linear. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que os compostos **3b** ($F_{(7, 34)} = 43,5$; $p<0,001$), **3c** ($F_{(6, 30)} = 72,5$; $p<0,001$) e **3i** ($F_{(8, 39)} = 43,88$; $P<0,001$) foram capazes de inibir significativamente a atividade da MAO-B em cérebros de camundongos (figura 2). Para uma melhor comparação entre os dados, os resultados também foram expressos em IC_{50} (tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas que inibem 50% da atividade da MAO-B (IC_{50}).

| Compostos | IC_{50} (μ M) MAO-B |
|-----------|----------------------------|
| 3b | 173.5 |
| 3c | 77.18 |
| 3i | 41.47 |

O composto **3i**, que possui como substituinte um anel aromático, apresentou o menor valor de IC_{50} (41.47 μ M). Demonstrando um potencial superior de inibição da MAO-B em uma menor concentração, quando comparado aos demais compostos testados.

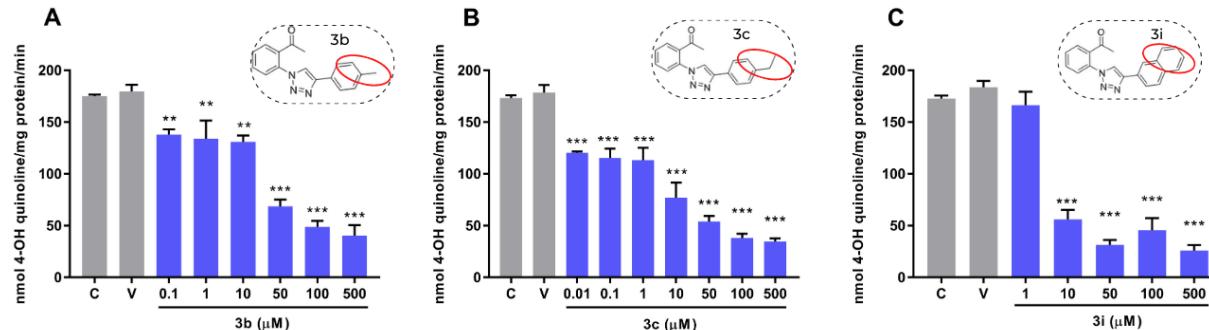


Figura 2. Efeito dos compostos (A) **3b**, (B) **3c** e (C) **3i** sobre a atividade da MAO-B em cérebro de camundongos *in vitro*. Os dados foram expressos como médias \pm EPM, ($n = 4 - 6$ experimentos independentes). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $*p < 0,05$, $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$ quando comparado com o grupo de controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keul). C: controle; V: veículo.

Os inibidores da MAO-B podem contribuir para o tratamento de diversas patologias, como doença de Parkinson e doença de Alzheimer (KANG *et al.*, 2018; SCHEDIN-WEISS *et al.*, 2017). Além disso, seu uso clínico pode representar uma alternativa para minimizar efeitos colaterais ocasionados por inibidores não seletivos da MAO (HUANG *et al.*, 2019). Mais estudos são

necessários para investigar o potencial de inibição dos compostos **3b,3c** e **3i** em relação a MAO-A.

4. CONCLUSÕES

A busca por compostos mais adequados para tratar desordens neurológicas e psiquiátricas é de grande importância. Através de estudos bioquímicos *in vitro*, as 2'-(1,2,3-triazoil)-acetofenonas testadas demonstraram inibir a MAO-B, podendo ser exploradas como novos inibidores da MAO.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Estados Unidos, v.72, p.248-254, 1976.
- CAI, Z. Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). **Mol Med Rep**, Greece, v.9, n.5, p.1533-154, 2014.
- CARRADORI, S.; SECCI, D.; PETZER, J. P. MAO inhibitors and their wider applications: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, Inglaterra, v.28, n.3, p.211-226, 2018.
- HUANG, C.; XIONG, J.; GUAN, H. D.; WANG, C. H. *et al.* Discovery, synthesis, biological evaluation and molecular docking study of (R)-5-methylmellein and its analogs as selective monoamine oxidase A inhibitors. **Bioorg Med Chem**, Place Inglaterra, v.27, n.10, p.2027-2040, 2019.
- KANG, S. S.; AHN, E. H.; ZHANG, Z.; LIU, X. *et al.* alpha-Synuclein stimulation of monoamine oxidase-B and legumain protease mediates the pathology of Parkinson's disease. **EMBO J**, Alemanha, v.37, n.12, 2018.
- MORIGUCHI, S.; WILSON, A. A.; MILER, L.; RUSJAN, P. M. *et al.* Monoamine Oxidase B Total Distribution Volume in the Prefrontal Cortex of Major Depressive Disorder: An [11C]SL25.1188 Positron Emission Tomography Study. **JAMA Psychiatry**, Estados Unidos, v.76, n.6, p.634-641, 2019.
- SABRI, M. A.; SABER-AYAD, M. M. MAO Inhibitors. *In: StatPearls*. Islândia, 2020.
- SCHEIDIN-WEISS, S.; INOUE, M.; HROMADKOVA, L.; TERANISHI, Y. *et al.* Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with gamma-secretase and regulates neuronal amyloid beta-peptide levels. **Alzheimers Res Ther**, Inglaterra, v.9, n.1, p.57, 2017.
- SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; SANCHEZ-SELLERO, I. *et al.* Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. **Life Sci**, Estados Unidos, v.69, n.8, p.879-889, 2001.
- SOUSA, F. S. S.; BIRMAN, P. T.; BALDINOTTI, R.; FRONZA, M. G. *et al.* alpha-(phenylselanyl) acetophenone mitigates reserpine-induced pain-depression dyad: Behavioral, biochemical and molecular docking evidences. **Brain Res Bull**, Estados Unidos, v.142, p.129-137, 2018.
- TIPTON, K. F. 90 years of monoamine oxidase: some progress and some confusion. **J Neural Transm (Vienna)**, Austria, v.125, n.11, p.1519-1551, 2018.