



AVALIAÇÃO DO EFEITO GLIOPROTETOR DA 3-(3-(DIETILAMINO)PROPIL)-2-(4-(METILTIO)FENIL)TIAZOLIDIN-4-ONA EM CULTIVO PRIMÁRIO DE ASTRÓCITOS

FERNANDO LOPEZ AVEZ¹; NATHALIA PEDRA²; DANIEL SILVA³; WILSON CUNICO⁴; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As tiazolidin-4-onas são compostos que possuem um anel heterocíclico de cinco membros, contendo um átomo de enxofre e um de nitrogênio, e um grupo carbonila na posição 4 (TRIPATHI *et al.*, 2014). Esse núcleo farmacóforo permite inúmeras substituições nas posições 2, 3 e 5, o que dá origem a diversas atividades biológicas destes compostos (KAUR *et al.*, 2017) tais como ações antitumorais (DA SILVEIRA *et al.*, 2019), anti-inflamatórias (LIARAS; FESATIDOU; GERONIKAKI, 2018) e neuroprotetoras (DA SILVA *et al.*, 2016).

A neuroinflamação é uma resposta inflamatória, originada no sistema nervoso central (SNC), desencadeada após injúria, com ativação de células da glia (MORALES *et al.*, 2014), em especial, astrócitos e micróglia. Apesar de uma resposta aguda ser considerada benéfica em decorrência de indução do reparo tecidual, a persistência da resposta neurinflamatória contribui para o processo de morte neuronal (WILKINS *et al.*, 2014). Embora a relação da neuroinflamação e doenças neurodegenerativas seja bem evidenciada, todavia ainda são necessários mais estudos que estabeleçam se é uma relação causal ou apenas uma consequência (ELLWARDT; ZIPP, 2014).

Os astrócitos são células do SNC que participam da neurotransmissão (SANTELLO; VOLTERRA, 2012), da formação e funcionamento da barreira cérebro-sangue (FIGLEY; STROMAN, 2011), na regulação da plasticidade sináptica e no suporte metabólico aos neurônios (MORALES *et al.*, 2014). Alguns exemplos de desencadeadores de resposta neuroinflamatória são a exposição a moléculas de patógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias, e o estresse oxidativo (GLASS *et al.*, 2010).

O LPS causa modificações estruturais nos astrócitos e induz a liberação de moléculas pró-inflamatórias como citocinas, prostanoídes e óxido nítrico (JENSEN; MASSIE; DE KEYSER, 2013; TYAGI *et al.*, 2010). O estresse oxidativo pode ser induzido por uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) por células gliais ativadas e por ativação das vias das ciclooxigenases (COX) e da lipoxigenase (LOX) (NIRANJAN, 2014). A fonte de ERO em astrócitos, na sua maioria, é a NADPH oxidase astrocitária, em resposta à ERO liberada pela micróglia ativada. Assim, os astrócitos são ativados e passam a também liberar ERO. Isso culmina num ciclo de liberação de ERO e outros

compostos, como citocinas, que está associado à neurotoxicidade presente nas doenças neurodegenerativas (GLASS *et al.*, 2010). Destarte, a bioprospecção de compostos que atuem na redução de ERO na neuroinflamação é capaz de conduzir à descoberta de novos compostos para o tratamento da neuroinflamação e, conseqüentemente, de doenças neurodegenerativas.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) em cultivo primário de astrócitos de ratos expostos a LPS em um protocolo de prevenção e de reversão. A partir de ensaios da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por DCFH-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), e de proliferação celular por sulforodamina B (SRB) avaliou-se a ação sobre estresse oxidativo e a citotoxicidade celular, respectivamente.

2. METODOLOGIA

O composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) foi sintetizado de acordo com Silva *et al.* (2016) no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos da UFPel. A tiazolidin-4-ona sintetizada foi devidamente confirmada e caracterizada por CG-EM e por RMN de ^1H e ^{13}C .

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 9219). As culturas primárias de astrócitos foram obtidas a partir do córtex cerebral de ratos wistar neonatos com 1 a 2 dias de vida segundo Gottfried *et al.* (1999) e mantidas em condições de cultivo por 20 dias até maturação e confluência.

Foram avaliados os efeitos do composto DS27 em dois protocolos: prevenção e reversão. No protocolo de prevenção, as células foram expostas ao composto DS27 diluído em DMSO nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{M/mL}$ por 3 horas. Após, as células foram expostas ao LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) por 3 horas. No protocolo de reversão, as células foram expostas primeiro ao LPS, na mesma concentração e tempo citados, e, após, tratadas com o composto DS27 por 3 horas. Um grupo apenas recebeu tratamento com LPS, sem exposição às concentrações de DS27, e outro grupo, controle, não recebeu quaisquer tratamentos. Após os tratamentos, foi realizado o ensaio de proliferação celular por SRB segundo Da Silveira *et al.* (2019) e os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) segundo Dos Santos *et al.* (2016).

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No protocolo de prevenção o LPS aumentou os níveis de EROS e a proliferação celular em cultura primária de astrócitos e o composto DS27 não foi capaz de prevenir estas alterações. Já no protocolo de reversão, o LPS induziu um aumento de EROS, sendo que o composto DS27 foi capaz de reverter esta alteração em todas as concentrações testadas, quando comparado ao grupo LPS (Figura 1). No protocolo de reversão não foram observadas alterações na proliferação celular dos astrócitos em nenhum dos grupos avaliados (Figura 1).

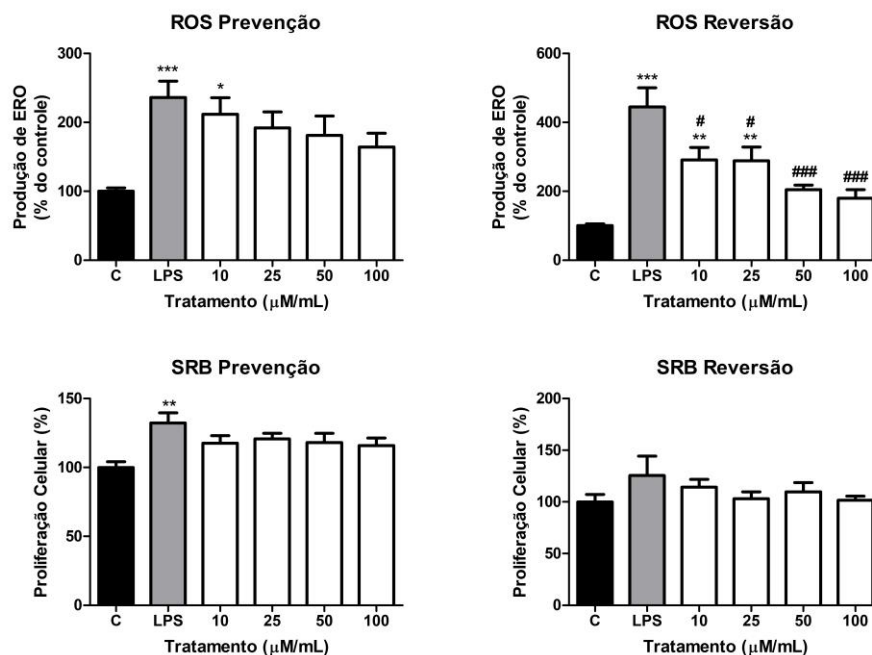


Figura 1 – Efeito do composto DS27 em cultura de astrócitos antes da exposição com LPS (protocolo de prevenção) e após a exposição ao LPS (protocolo de reversão) nos testes de proliferação celular (SRB) e níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). *, **, *** Estatisticamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$; respectivamente). #, ### Estatisticamente diferente do grupo LPS ($P < 0,05$ e $P < 0,0001$; respectivamente).

A partir dos dados obtidos, observou-se que a tiazolidin-4-ona DS27 não apresentou citotoxicidade aos astrócitos nas concentrações testadas e contribuiu para a diminuição da produção de ERO, no protocolo de reversão.

No estado neuroinflamatório, a produção exacerbada de ERO pelo astrócito é um dos elementos que contribuem para a neurotoxicidade. (GLASS *et al.*, 2010). Esse aumento pode ser induzido por compostos liberados pela micróglia ativada bem como pela ação das enzimas COX e LOX, uma vez que a produção de prostaglandinas aumenta a peroxidação lipídica e diminui os compostos antioxidantes endógenos da célula (NIRANJAN, 2014). Uma vez que inúmeras tiazolidin-4-onas foram estudadas e sintetizadas para apresentarem ação antiinflamatória, por inibição de COX e LOX (LIARAS; FESATIDOU; GERONIKAKI, 2018), existe a possibilidade de que a DS27 atue em algum passo da via das prostaglandinas, podendo ser uma explicação para a redução de ERO encontrada no protocolo de reversão. Entretanto, é necessário elucidar qual via envolvida no aumento de ERO é o alvo molecular do composto aqui estudado.

4. CONCLUSÕES

Finalmente, tendo em vista o grande potencial farmacológico das tiazolidin-4-onas e os resultados obtidos no presente estudo, a DS27 apresenta-se como um candidato promissor a um fármaco atuante na neuroinflamação e, potencialmente, no tratamento de doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DA SILVA, D. S. *et al.* Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 124, p. 574–582, 2016.
- DA SILVEIRA, E. F. *et al.* 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 783–797, 2019.
- DOS SANTOS, L. M. *et al.* Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 424, n. 1–2, p. 69–78, 2016.
- ELLWARDT, E.; ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 262, n. Part A, p. 8–17, 2014.
- FIGLEY, C. R.; STROMAN, P. W. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 577–588, 2011.
- GLASS, C. K. *et al.* Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.
- GOTTFRIED, C. *et al.* Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**, [S. l.], v. 833, n. 2, p. 142–149, 1999.
- JENSEN, C. J.; MASSIE, A.; DE KEYSER, J. Immune players in the CNS: The astrocyte. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 824–839, 2013.
- KAUR, S. *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones : A review. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 75, p. 406–423, 2017.
- LIARAS, K.; FESATIDOU, M.; GERONIKAKI, A. Thiazoles and Thiazolidinones as COX/LOX Inhibitors. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 685–706, 2018.
- MORALES, I. *et al.* Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 8, n. 1 APR, p. 1–9, 2014.
- NIRANJAN, R. The Role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of parkinson's disease: Focus on astrocytes. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 28–38, 2014.
- SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNF α in synaptic function: Switching gears. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 638–647, 2012.
- TRIPATHI, A. C. *et al.* 4-Thiazolidinones : The advances continue . **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 72, p. 52–77, 2014.
- TYAGI, E. *et al.* Cholinergic protection via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. **Neurochemistry International**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 135–142, 2010.
- WILKINS, H. M. *et al.* Bioenergetic dysfunction and inflammation in alzheimer's disease: A possible connection. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–13, 2014.