

EFEITO DA 3-(3-(DIETILAMINO)PROPIL)-2-(4-(METILTIO)FENIL)TIAZOLIDIN-4-ONA NA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES EM CULTIVO PRIMÁRIO DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO LIPOPOLISSACARÍDEO

FERNANDO LOPEZ ALVEZ¹; MAYARA PEREIRA SOARES²; NATÁLIA PONTES BONA³, DANIEL SCHUCH DA SILVA⁴, WILSON CUNICO⁵, ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

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

²*Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – nataliabona@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é uma reação imune no sistema nervoso central (SNC), apresentando reatividade de células gliais, em especial micróglia e astrócitos, e sendo mediada por fatores pró-inflamatórios como citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; RANSOHOFF, 2016).

Das células da glia, os astrócitos destacam-se devido aos papéis de manutenção da homeostasia do SNC, a partir de uma comunicação mútua com as demais células residentes por meio de citocinas, ERO e de metabólitos como os nucleotídeos de adenosina (BURNSTOCK *et al.*, 2011; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Os astrócitos respondem a insultos no SNC com mudanças morfológicas e genéticas que refletem nas suas funções e influenciam a neuroinflamação (SOFRONIEW, 2020). Ainda nesse contexto, a expressão de receptores de reconhecimento de padrões, partícipes do sistema imune inato, denominados receptores do tipo toll (TLR), permite que o astrócito reconheça uma ampla gama de抗ígenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias, sendo um meio de disparo da reatividade astrócitária (PAUL-CLARK *et al.*, 2012). O LPS tem sido amplamente utilizado para estudos envolvendo a neuroinflamação, a qual é uma condição associada a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson (BAIZABAL-CARVALLO; ALONSO-JUAREZ, 2020; QIAN *et al.*, 2021).

As ecto-nucleosídeo trifosfato hidrolases (E-NTPDases) são uma família de enzimas que hidrolisam di- e tri- nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, enquanto a ecto-5'-nucleotidase (eN) é uma enzima que cliva a adenosina monofosfato (AMP) em adenosina. Essas enzimas fazem parte do sistema purinérgico e são responsáveis por grande parte da hidrólise de ATP até adenosina, sendo expressas em astrócitos (WINK *et al.*, 2006; ZIMMERMANN, 2021). O ATP extracelular e seus produtos de degradação ativam importantes vias de sinalização através de receptores purinérgicos – ligados à proteína G e ativados por adenosina (receptores P1), ionotrópicos (receptores P2X) e metabotrópicos (P2Y) (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Essa via de sinalização é um meio de comunicação entre as células do SNC, e, portanto, tornou-se um alvo farmacológico no contexto da neuroinflamação, na possibilidade de modular as interações entre neurônios e células reativas da glia, como os astrócitos (BURNSTOCK *et al.*, 2011; WINK *et al.*, 2006).



As tiazolidinonas constituem-se de um anel heterocíclico de cinco membros contendo um átomo de enxofre na posição um, um átomo de nitrogênio na posição três e um grupo carbonila em outra posição, e apresentam diversas funções biológicas dependendo dos substituintes presentes (KAUR MANJAL *et al.*, 2017).

Em vista da necessidade de bioprospectar novos compostos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, este trabalho objetivou avaliar os efeitos do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) na atividade das enzimas NTPDases e ecto-5'-nucleotidases em cultivo primário de astrócitos de ratos em modelo *in vitro* de neuroinflamação por LPS.

2. METODOLOGIA

O composto DS27 foi sintetizado de acordo com Da Silva *et al.* (2016), no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos da UFPel. A tiazolidinona 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 46528-2018). 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.

Foi avaliado o efeito do composto DS27 no seguinte protocolo: as células foram expostas a LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por 3 h. A seguir, o meio era removido e meio de cultivo contendo concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de DS27 era adicionado e deixado por 24 h. A atividade de NTPases e eN foi analisada segundo Chan, Delfert e Junger (1986), em triplicata, utilizando ATP, ADP e AMP.

Os dados foram expressos como média±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

Foi observado um aumento na hidrólise de ATP no grupo tratado com LPS em relação ao controle ($P<0,05$), enquanto houve uma diminuição significativa ($P<0,05$), na hidrólise dos grupos tratados com 50 e 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de DS27 em relação ao grupo LPS. Isso pode ser devido a uma modulação da atividade da enzima, pela DS27, ou diminuição da expressão da NTPDase 2 – principal enzima que hidrolisa de ATP em astrócitos (WINK *et al.*, 2006). Durante o processo de morte celular, há um grande extravasamento de ATP (ZIMMERMANN, 2021), possivelmente refletindo no aumento da atividade da NTPDase no grupo LPS. A diminuição nos grupos DS27 pode se dar por diminuição de morte celular, logo, diminuição do substrato disponível.

Na hidrólise da adenosina difosfato (ADP), uma diminuição significativa foi observada no grupo tratado com 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ($P<0,001$), seguido dos grupos 25 e 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ($P<0,01$) e do grupo 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ($P<0,05$) em relação ao grupo LPS. Em astrócitos, a NTPDase1 e 3 são as responsáveis pela hidrólise de ADP à adenosina monofosfato. O grupo LPS apresentou novamente um aumento significativo ($P<0,05$) na hidrólise de ADP em relação ao grupo controle.

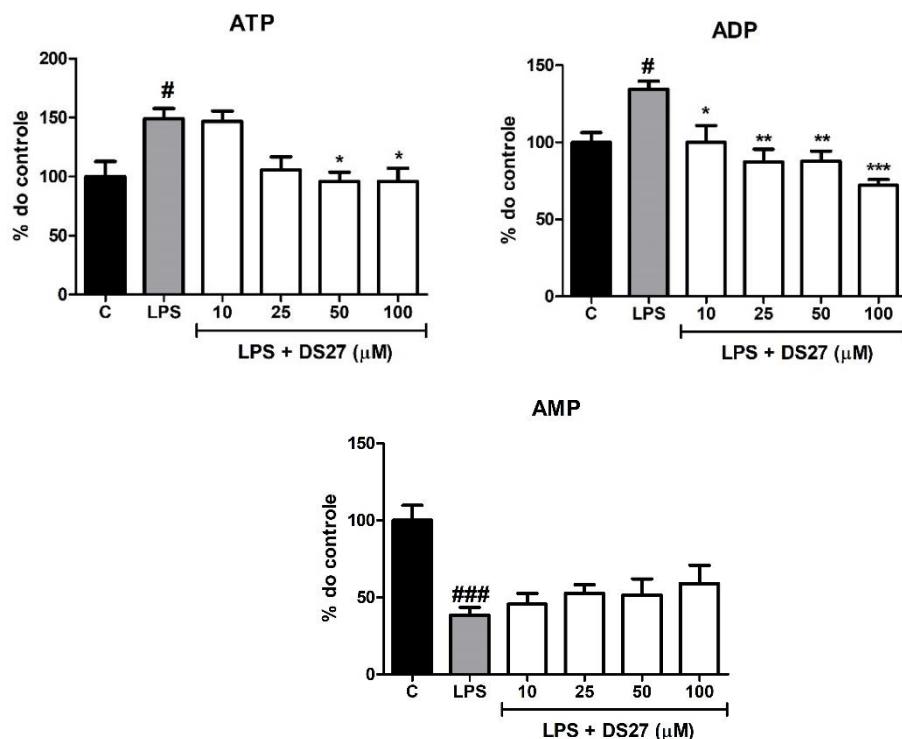


Figura 1 – Efeito do composto DS27 em cultura de astrócitos expostos a LPS (10 µg/ml) na atividade de hidrólise de ATP, ADP eAMP por ectonucleotidases. #,### Estatisticamente diferente do grupo controle ($P<0,05$; $P<0,001$, respectivamente). * , ** , *** Estatisticamente diferente do grupo LPS ($P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$, respectivamente).

Na hidrólise de AMP, apenas o grupo tratado com LPS apresentou redução da hidrólise em comparação com o grupo controle ($P<0,001$). Os grupos tratados com DS27 não apresentaram resultados significativamente diferentes do grupo LPS.

4. CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas, o cultivo primário de astrócitos de ratos submetidos ao dano induzido por LPS apresentou alterações na hidrólise de ATP e ADP após 24h, sendo revertido pelo tratamento com a tiazolidinona 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-on (DS27). Entretanto, o composto não foi capaz de reverter a diminuição da hidrólise de AMP induzida por LPS.

Tendo em vista o potencial farmacológico e terapêutico das tiazolidin-4-onas e do sistema purinérgico, o presente trabalho observou um efeito modulador da atividade de ectonucleotidases pelo DS27, sugerindo que este composto pode ter uma ação terapêutica promissora por interferir em mecanismos associados a neuroinflamação. Entretanto, são necessários mais estudos que permitam confirmar esse papel.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIZABAL-CARVALLO, José Fidel; ALONSO-JUAREZ, Marlene. The Link between Gut Dysbiosis and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Neuroscience**, [s. l.], v. 432, p. 160–173, 2020.
- BURNSTOCK, Geoffrey *et al.* Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 229–274, 2011.
- CHAN, Kwok Ming; DELFERT, Dennis; JUNGER, Kurt D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986.
- DA SILVA, Daniel Schuch *et al.* Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 124, p. 574–582, 2016.
- DISABATO, Damon J.; QUAN, Ning; GODBOUT, Jonathan P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 139, p. 136–153, 2016.
- GOTTFRIED, Carmem *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.
- KAUR MANJAL, Sundeep *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 75, p. 406–423, 2017.
- OLIVEIRA, Ágatha; ILLES, Peter; ULRICH, Henning. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 104, p. 272–281, 2016.
- PAUL-CLARK, M. J. *et al.* Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 200–215, 2012.
- QIAN, Xiao hang *et al.* Inflammatory pathways in Alzheimer's disease mediated by gut microbiota. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 68, n. November 2020, p. 101317, 2021.
- RANSOHOFF, Richard M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, [s. l.], v. 353, n. 6301, p. 777–783, 2016.
- SOFRONIEW, Michael V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.
- VERKHRATSKY, Alexei; NEDERGAARD, Maiken. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 239–389, 2018.
- WINK, M. R. *et al.* Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. **Neuroscience**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 421–432, 2006.
- ZIMMERMANN, Herbert. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 117–125, 2021.