

SAIS DE ISOTIOURÔNIO: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA ENZIMA MONOAMINA OXIDASE CEREBRAL *IN VITRO*

NATALIA GONÇALVES TAVARES¹; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH²;
CINARA TEIROBA DE ÁVILA³; MARCUS MANDOLESI SÁ⁴; CRISTIANI
FOLHARINI BORTOLATTO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – natalia10.g.tavares@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – taisteixeira.r@gmail.com

³Universidade Federal de Santa Catarina – cinara.t.avila@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Santa Catarina – marcus.sa@ufsc.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um processo complexo que ocorre no organismo quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (ER) e as defesas antioxidantes, levando a danos oxidativos em biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA. Isso pode resultar em várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (TELEANU et al., 2022). Uma forma de diminuir os níveis de ER é por ação de antioxidantes, os quais são definidos como substâncias presentes em baixas concentrações, que realizam funções de atrasar ou inibir as taxas de oxidação causadas pelos radicais livres, podendo inibir as reações de lipoperoxidação, por exemplo (SILVA et al., 2022).

As monoaminas oxidases (MAO) são enzimas que desempenham um papel importante na regulação do sistema nervoso central via degradação de monoaminas. Existem sob duas isoformas, MAO-A e MAO-B, que têm diferentes especificidades por substratos e inibidores. Elas estão envolvidas no tratamento de condições psiquiátricas como depressão e ansiedade, e neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e de Parkinson. Uma consequência da ação exacerbada da MAO que pode ocorrer em tais condições é através da alteração da biodisponibilidade da formação de ER, visto que a atividade da MAO resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHETNEV et al., 2023). Nesse sentido, há a busca por antioxidantes e inibidores da MAO de ação central.

Os sais de isotourônio são compostos estáveis que vêm sendo muito estudados. Dentre as atividades biológicas descritas na literatura destaca-se a atividade antitumoral (CISILOTTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; MUNARETTO et al., 2020). Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a atividade antioxidante de sais isotourônio bem como sua ação inibitória sobre a atividade das isoformas da MAO em tecido cerebral *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese e diluição dos compostos

Os sais de isotourônio **16-21** (Figura 1) foram sintetizados no Laboratório de Metodologia e Síntese Orgânica (MESOLab) da Universidade Federal de Santa Catarina (CISILOTTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; MUNARETTO et al., 2020). Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e foram testados na concentração fixa de 200 μM . Os seguintes compostos foram testados: bromidrato de (*Z*)-2-[(*N*-aminoisotouriureido)metil]-3-fenil-2-propenoato de metila (**16**); bromidrato de (*Z*)-2-[(*N*-aminoisotouriureido)metil]-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de metila (**17**); bromidrato de (4*E*,8*Z*)-5-amino-3,4-diaza-9-fenil-2-metil-8-metoxicarbonil-6-tianona-2,4,8-trieno (**18**); bromidrato de (4*E*,8*Z*)-5-amino-3,4-

diaza-2-metil-8-metoxicarbonil-9-(4-metoxifenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (19); bromidrato de (*4E,8Z*)-5-amino-3,4-diaza-2-metil-8-metoxicarbonil-9-(4-nitrofenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (20) e (*4E,8Z*)-5-amino-3,4-diaza-2-metil-8-metoxicarbonil-9-(4-nitrofenil)-6-tianona-2,4,8-trieno (21). Trolox foi utilizado como um antioxidante padrão e diluído em DMSO.

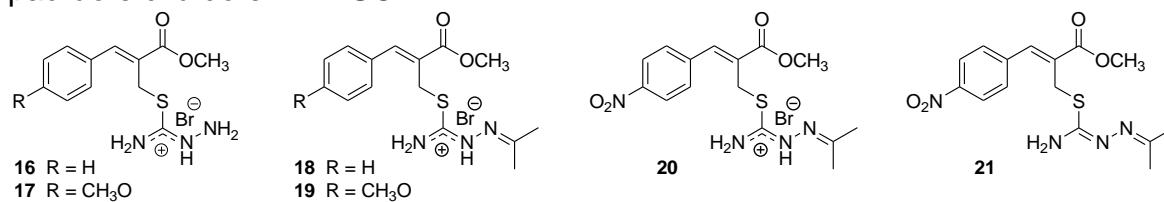


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos estudados

2.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação antioxidante dos sais de isotourônio foi realizada através da técnica do TBARS seguindo a metodologia de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), que analisa os índices de peroxidação lipídica, induzida por nitroprussiato de sódio (NPS) neste estudo. Como amostra biológica foi utilizado cérebro total de ratos Wistar, que foi homogeneizado em Tris HCl 50 mM pH 7,4 em proporção 1:10 (peso/volume) e centrifugado; o sobrenadante (S_1) foi utilizado para a técnica. Todos os sais foram testados em 200 μM . Para validar o experimento, como controle positivo, utilizou-se o trolox nas concentrações de 100 e 200 μM . Os grupos foram: controle, veículo e drogas em diferentes concentrações (composto ou controle positivo). Todos receberam água, tris-HCl 50 mM, amostra biológica e os respectivos compostos. Por fim, adicionou-se NPS, exceto no grupo controle. Foi realizada a incubação por 1 hora a 37 °C. Após, foi adicionado o ácido tiobarbitúrico (TBA), tampão de ácido acético e dodecil sulfato de sódio (SDS), seguido por uma incubação de 1 hora a 95 °C. A absorbância foi medida a 532 nm através de um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em TBARS/ g tecido.

2.3. Ensaio de inibição da MAO-A e MAO-B cerebral

O tecido cerebral, rico em mitocôndrias, foi preparado seguindo um método prévio (SOTO-OTERO et al., 2001). Foi analisada a atividade das duas isoformas (MAO-A e MAO-B) da enzima responsável pela degradação das monoaminas, seguindo a metodologia de KRAJL (1965). Quinuramina foi utilizada como substrato para isoformas MAO-A e MAO-B gerando 4-hidroxiquinolina, um produto fluorescente. Para isso, iniciou-se uma pré-incubação a 37 °C por cinco minutos com os inibidores pargilina (um inibidor da MAO-B, 250 nM) para a determinação da isoforma A e clorgilina (um inibidor da MAO-A, 250 nM) para a determinação da isoforma B. Em seguida, os compostos foram adicionados (200 μM) e incubados por dez minutos a 37 °C. Depois, quinuramina foi adicionada (90 μM - MAO-A e 60 μM - MAO-B) e incubada por dez minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com ácido tricloroacético a 10%. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação por cinco minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e recebeu NaOH 1 M. As leituras foram realizadas em um fluorímetro (Excitação: 315 nm; Emissão: 380 nm). Os resultados foram expressos como nmol de 4-OH quinolina/mg de proteína/minuto.

2.4. Análise estatística

Os resultados experimentais foram avaliados pelo software GraphPad Prism (versão 8.0.2). As análises estatísticas foram feitas por meio de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Os valores foram expressos com média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sobre a ação antioxidante dos sais de isotiourônio **16-21** no ensaio de lipoperoxidação estão demonstrados na Figura 2. A ANOVA revelou que houve diferença entre os grupos experimentais [$F_{(9,24)}=45,77$; $p<0,0001$]. Análise *post hoc* detectou uma indução de dano oxidativo aos lipídios no grupo NPS, quando comparado ao grupo controle ($p<0,0001$). A análise estatística indicou que todos os sais estudados foram capazes de reverter o aumento de lipoperoxidação causada pelo NPS, apresentando $p<0,0001$. O trolox, controle positivo, apresentou efeito antioxidante em ambas as concentrações (100 e 200 uM) ($p<0,0001$).

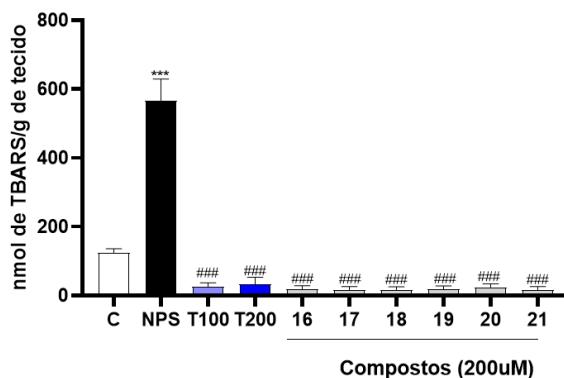


Figura 2. Efeito antioxidante dos compostos **16-21** no ensaio de peroxidação lipídica induzida por NPS em tecido cerebral. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. One-Way ANOVA/Tukey *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. E valores com ### $p < 0,001$ ao grupo NPS. C-controle; NPS-nitroprussiato de sódio; T-trolox.

O sistema nervoso central é suscetível aos danos do estresse oxidativo devido a ser rico em lipídios, ter uma alta demanda de energia (alto consumo de oxigênio) e à sua baixa concentração de antioxidantes (SILVA et al., 2022). Portanto, é importante explorar antioxidantes. Neste estudo, os sais de isotiourônio demonstraram a capacidade de diminuir a lipoperoxidação no tecido cerebral.

Os efeitos dos sais de isotiourônio **16-21** sobre a atividade da MAO-A e MAO-B estão apresentados na Figura 3. Através da ANOVA de uma via, foi demonstrado que houve diferença entre os grupos experimentais para a MAO-A [$F_{(7,28)}=51,04$; $p<0,0001$] e MAO-B [$F_{(7,21)}=11,16$; $p<0,0001$]. A análise estatística de múltiplas comparações revelou que todos os compostos tiveram perfil inibitório sobre a atividade da MAO-A (Fig. 3A) e MAO-B (Fig. 3B), apresentando $p<0,0001$ em relação ao veículo.

Os inibidores da MAO-A são comumente utilizados no tratamento da depressão, pois afetam neurotransmissores envolvidos na patologia. E ainda, os inibidores seletivos da MAO-B são usados no tratamento coadjuvante da doença de Parkinson (SHETNEV et al., 2023). Nossos resultados destacaram os sais de isotiourônio como candidatos promissores para futuras investigações sobre a inibição da enzima MAO em suas duas isoformas.

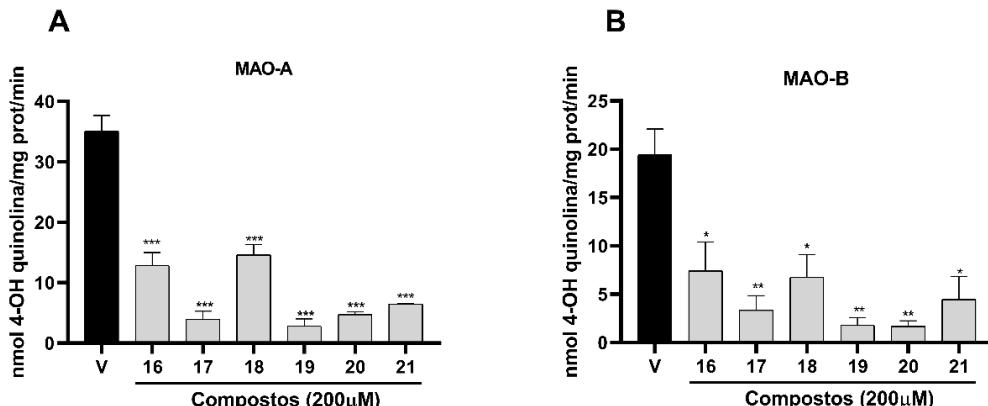


Figura 3. Ação dos sais de isotiourônio **16-21** sobre a atividade da MAO-A e MAO-B cerebral. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. One-Way ANOVA/Tukey *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,01 em relação ao grupo veículo (V; DMSO).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, nota-se que todos os sais de isotiourônio **16-21** foram capazes de reverter a peroxidação lipídica, indicando que possuem atividade antioxidante em tecido cerebral. Em relação à atividade inibitória da MAO, os compostos foram efetivos em inibir as duas isoformas. Sendo assim, acredita-se que esses compostos sirvam para dar continuidade a estudos futuros envolvendo doenças neurológicas correlacionadas ao estresse oxidativo e alterações no metabolismo de monoaminas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CISIOTTO, J. et al. Isothiouronium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.15, n.3, p.353-362, 2015.
- FERREIRA, M. et al. Allylic isothiouronium salts: The discovery of a novel class of thiourea analogues with antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.129, n.31, p.151-158, 2017.
- KRAJL, M. A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. **Biochemical Pharmacology**, v.14, n.11, p.1684-1686, 1965.
- MUNARETTO, L. S. et al. Synthesis of isothiosemicarbazones of potential antitumoral activity through a multicomponent reaction involving allylic bromides, carbonyl compounds and thiosemicarbazide. **Tetrahedron**, v.76, p.131231, 2020.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- SHETNEV, A. et al. Monoamine oxidase inhibition properties of 2,1-benzisoxazole derivatives. **Molecular Diversity**, 2023. doi: 10.1007/s11030-023-10628-4
- SILVA, L. E. Q. et al. A narrative review: antioxidant use in neurodegenerative diseases. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.2, p.10661-10669, 2022.
- SOTO-OTERO, R. et al. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. **Life Science**, v.69, p.879-899, 2001.
- TELEANU, D. M. et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, p.5938, 2022.