

THIAZOLIDINONE PREVENTS COGNITIVE DEFICIT AND ALTERATIONS IN INFLAMMATORY CYTOKINES IN CEREBRAL CORTEX OF RATS EXPOSED TO ESCOPOLAMINE

ANITA AVILA DE SOUZA¹; RAPHAELA CASSOL PICCOLI²; JULIA EISENHARDT
DE MELLO³; WILLIAM DOMINGUES⁴; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE
AGUIAR⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – anita_a_avila@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – raphaelacassol@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – julia_eisenhardt@hotmail.com

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

⁵ Universidade Federal do Ceará – mayara_sandrielly@hotmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUCTION

Thiazolidinones are heterocyclic, synthetic and versatile compounds, one of which is possible to direct the therapeutic action through the position of different substituents in the thiazolidinone nucleus (SEBOLETSWIE; CELE; SINGH, 2023). The drugs Etozolin, Pioglitazone and Ralitoline, are examples of the therapeutic importance of this pharmacophore ring. In addition, studies have demonstrated the potential therapeutic of new thiazolidinones, with emphasis on the anticholinesterase, antioxidant and anti-inflammatory action in pre-clinical models of Alzheimer's disease (AD) (DA SILVA *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2023).

AD is characterized by neurodegeneration progressive and irreversible that generates a severe cognitive decline in patients. The etiology of AD has not yet been elucidated, but it has already been demonstrated that there is a glial activation around the plaques of the peptide β -amyloid in the brain of patients, leading to the release of inflammatory mediators, such as the tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), prostaglandins and reactive oxygen species (ERO). The inflammatory response in the brain exacerbates the mechanisms of synaptic plasticity and neuronal survival, contributing to neurodegeneration in AD (SORIA LOPEZ; GONZÁLEZ; LÉGER, 2019). Therapeutic options are still restricted, being the inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) the first choice drugs, however, the efficacy of treatment is limited besides generating important adverse effects (MARUCCI *et al.*, 2021).

The induction of cognitive deficit by escopolamine (ESC) in rodents is a model widely used in the study of new compounds for the treatment of AD. ESC is a tertiary amine, a competitive non-selective antagonist of muscarinic receptors of acetylcholine. The blockade of these receptors causes a cholinergic deficit that, in rodents, mimics important biochemical and behavioral changes, similar to those found in patients with AD (TANG, 2019).

Thus, the objective of this study was to investigate the efficacy of the compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one (DS27) in the prevention of cognitive deficit, as well as in the alterations of inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in the cerebral cortex of rats exposed to ESC.

2. METHODOLOGY

Experimental model of memory deficit and treatment with DS27

O composto DS27 foi sintetizado no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e posteriormente confirmado e caracterizado por CG-EM e RMN (Silva *et al.*, 2016). Foram utilizados ratos *Wistar* machos de 60 dias, os quais foram obtidos do Biotério Central da UFPEL. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA 022443/2023-12). Os ratos foram divididos em cinco grupos: I - controle (C), II - escopolamina (ESC), III- DS27 (5 mg/kg), IV- DS27 (10 mg/kg) e V- Donepezil (5 mg/kg). Os animais foram tratados com DS27 por via oral durante 7 dias. No 8º dia foi realizado o teste de campo aberto seguido do treino na esQUIVA inibitória e 1 hora após foi administrada ESC (1mg/kg) por via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após foi aplicado o teste da esQUIVA inibitória.

Análise comportamental

A atividade locomotora foi avaliada através do teste do campo aberto (PACHECO *et al.*, 2018) e a memória através do teste da esQUIVA inibitória (GUTIERRES *et al.*, 2012). Após o teste, os animais foram eutanasiados e o córtex cerebral e o sangue foram coletados para as posteriores análises.

Análises bioquímicas e moleculares

Em córtex cerebral os níveis de IL-10 foram avaliados por kit ELISA de acordo com as instruções do fabricante, enquanto as expressões de mRNA de IL-6 e TNF- α foram avaliados por PCR (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os parâmetros bioquímicos em soro foram avaliados por kit de comercial (Bioclin, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8, para o teste de esQUIVA inibitória foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com um nível de significância de $P \leq 0,05$, e os resultados foram expressos como média e intervalo interquartil. Os demais resultados foram analisados usando análise de variância unidirecional, seguido pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer, com um nível de significância de $P \leq 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (E.P).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que nenhum dos tratamentos causou alterações locomotoras nos animais (Figura 1A), enquanto que a ESC induziu um déficit cognitivo nos animais (Figura 1B). Esse efeito pode ser associado ao antagonismo de receptores muscarínicos de acetilcolina, reduzindo assim a neurotransmissão colinérgica (TANG, 2019). Por outro lado, o DS27 na maior dose foi capaz de prevenir o déficit de memória. Em estudos anteriores já foi demonstrado que o DS27 atua como inibidor da AChE (DA SILVA *et al.*, 2020), o que poderia melhorar a neurotransmissão, podendo ser esse efeito associado a prevenção do déficit cognitivo.

Além disso, já foi demonstrado que pacientes com DA possuem um aumento no perfil inflamatório tanto a nível periférico como no sistema nervoso central (LI *et al.*, 2023). No presente trabalho foi demonstrado que a ESC induziu um processo de inflamação em córtex cerebral evidenciado através da redução nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (Figura 1 C-E). A persistência da neuroinflamação induz a liberação de espécies reativas que levam a danos oxidativos a biomoléculas, gerando um quadro de retroalimentação positiva, que geram mais danos aos tecidos e morte neuronal

(SORIA LOPEZ; GONZÁLEZ; LÉGER, 2019). Por outro lado, o DS27 foi capaz de prevenir a neuroinflamação induzida pela ESC. Essa ação anti-inflamatória do DS27 também já foi relatada *in vitro* em astrócitos expostos a LPS (ALVEZ *et al.*, 2023).

Não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 1) sugerindo que o composto DS27, nas doses e tempo de tratamento deste estudo, não apresenta efeitos tóxicos.

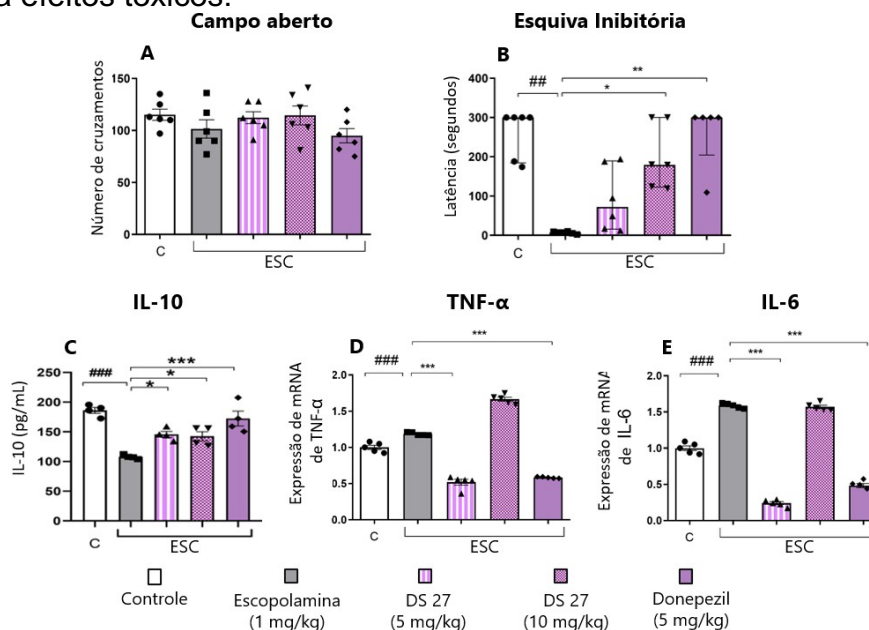


Figura 1: Avaliação da atividade locomotora (A) e memória (B), níveis de IL-10 (C), expressão de mRNA de TNF-α (D) e IL-6 (E) em córtex cerebral em ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por escopolamina (ESC 1 mg/kg) e tratados com o composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)thiazolidin-4-ona (DS27 5 e 10 mg/kg) e donepezil (DON 5 mg/kg). Os valores representam a média \pm E.P (n = 5-6). (B). Os valores representam a mediana e o intervalo interquartil (n=5-6). ### $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ quando comparado ao grupo ESC.

Tabela 1: Efeitos do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)thiazolidin-4-ona (DS27) e donepezil no soro de ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por escopolamina (ESC 1 mg/kg). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Parâmetros bioquímicos	Controle	ESC	ESC + DS27 (5 mg/kg)	ESC + DS27 (10 mg/kg)	ESC + DON (5 mg/kg)
Glicose	189,9 \pm 11,99	182,8 \pm 8,88	193,7 \pm 8, 26	202,2 \pm 8,17	203,1 \pm 7,62
Triglicerídeos	172,9 \pm 22,21	139,6 \pm 9,18	154 \pm 12,48	191,8 \pm 9,06	154,1 \pm 18,47
Colesterol total	69,78 \pm 3,85	66,85 \pm 3,16	74,37 \pm 3,68	68,83 \pm 1,44	64,87 \pm 2,47
Ureia	58,58 \pm 2,70	51,76 \pm 2,05	52,95 \pm 2,77	58,17 \pm 5,19	51,17 \pm 1,21
Ácido úrico	3,00 \pm 0,32	2,15 \pm 0,18	2,59 \pm 0,36	2,16 \pm 0,19	2,79 \pm 0,23
Albumina	3,07 \pm 0,09	3,15 \pm 0,04	2,87 \pm 0,09	2,95 \pm 0,03	2,88 \pm 0,04
Proteína total	3,90 \pm 0,06	3,51 \pm 0,08	3,57 \pm 0,09	3,57 \pm 0,11	3,10 \pm 0,06

4. CONCLUSÕES

O composto DS27 foi capaz de prevenir o déficit cognitivo e as alterações nas citocinas inflamatórias induzido por ESC. Esses dados sugerem que este composto pode ter um efeito promissor na mitigação do comprometimento cognitivo e na neuroinflamação associados a condições neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEZ, F.; BONA, N.; PEDRA, N.; DA SILVA, D.; CUNICO, W.; STEFANELLO, F.; DE ANDRADE, C.; SOARES, M.; SPANEVELLO, R. Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, United States, v. 43, n. 1, p. 283–297, 2023.
- DA SILVA, D.; SOARES, M.; MARTINI, F.; PESARICO, A.; MATTOS, B.; DE SOUZA, A.; DA SILVA, C.; SCAINI, J.; MACHADO, K.; NOGUEIRA, C.; SPANEVELLO, R.; CUNICO, W. In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. **Neurochemical Research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 241–253, 2020.
- DA SILVA, D.; SOARES, M.; TEIXEIRA, F.; DE MELLO, J.; DE SOUZA, A.; LUDUVICO, K.; DE ANDRADE, C.; SPANEVELLO, R.; CUNICO, W.. Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1554–1566, 2021.
- DOS SANTOS, A.; TEIXEIRA, F.; DA SILVA, D.; MELLO, J.; LUDUVICO, K.; TAVARES, R.; STEFANELLO, F.; CUNICO, W.; SPANEVELLO, R. Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits, increase in phosphorylated tau protein, oxidative damage and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease model: Comparison with donepezil drug. **Brain Research Bulletin**, United States, v. 193, p. 1–10, 2023.
- GUTIERRES, J.; CARVALHO, F.; SCHETINGER, M.; RODRIGUES, M.; SCHMATZ, R.; PIMENTAL, V.; VIEIRA, J.; ROSA, M.; MARISCO, P.; RIBEIRO, D.; LEAL, C.; RUBIN, M.; MAZZANTI, C.; SPANEVELLO, R. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 23–24, p. 1221–1228, 2012.
- LI, Z.; WU, H.; LUO, Y.; TAN, X. Correlation of serum complement factor 5a level with inflammatory response and cognitive function in patients with Alzheimer's disease of different severity. **BMC Neurology**, v. 23, n. 1, p. 319, 2023.
- LIVAK, K. ; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, United States, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- MARUCCI, G.; BUCCIONI, M.; BEN, D.; LAMBERTUCCI, C.; VOLPINI, R.; AMENTA, F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, England, v. 190, p. 108352, 2021.
- PACHECO, S.; SOARES, M.; GUTIERRES, J.; GERZSON, M.; CARVALHO, F.; AZAMBUJA, J.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 193–204, 2018.
- SEBOLETSSWE, P.; CELE, N.; SINGH, P. Thiazolidinone-Heterocycle Frameworks: A Concise Review of Their Pharmacological Significance. **ChemMedChem**, Germany, v. 18, n. 7, p. e202200618, 2023.
- LOPEZ, J.; GONZÁLEZ, H.; LÉGER, G. Alzheimer's disease. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 167, p. 231–255, 2019.
- TANG, Kim San. The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. **Life Sciences**, v. 233, p. 116695, 2019.