

## **TIAZOLIDINONA PREVINE O DEFÍCIT COGNITIVO E ALTERAÇÕES NAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS A ESCOPOLAMINA**

**ANITA AVILA DE SOUZA<sup>1</sup>; RAPHAELA CASSOL PICCOLI<sup>2</sup>; JULIA EISENHARDT DE MELLO<sup>3</sup>; WILLIAM DOMINGUES<sup>4</sup>; MAYARA SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [anita\\_a\\_avila@hotmail.com](mailto:anita_a_avila@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [raphaelacassol@gmail.com](mailto:raphaelacassol@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [julia\\_eisenhardt@hotmail.com](mailto:julia_eisenhardt@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [williamwwe@yahoo.com.br](mailto:williamwwe@yahoo.com.br)

<sup>5</sup> Universidade Federal do Ceará – [mayara\\_sandrielly@hotmail.com](mailto:mayara_sandrielly@hotmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [rspanevello@gmail.com](mailto:rspanevello@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

As tiazolidinonas são compostos heterocíclicos, sintéticos e versáteis, uma vez que é possível direcionar a ação terapêutica através da posição de diferentes substituintes no núcleo tiazolidinona (SEBOLETSWE; CELE; SINGH, 2023). Os fármacos Etozolin, Pioglitazona e o Ralitoline, são exemplos da importância terapêutica desse anel farmacofórico. Além disso, estudos tem demonstrado o potencial terapêutico de novas tiazolidinonas, com destaque para a ação anticolinesterásica, antioxidante e anti-inflamatória em modelos pré-clínicos da doença de Alzheimer (DA) (DA SILVA *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2023).

A DA é caracterizada por neurodegeneração progressiva e irreversível que gera um declínio cognitivo severo nos pacientes. A etiologia da DA ainda não foi elucidada, mas já foi demonstrado que ocorre uma ativação glial ao redor das placas do peptídeo  $\beta$ -amilóide no cérebro dos pacientes, levando a liberação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (ERO). A resposta inflamatóriacerebral exacerbada afeta mecanismos regulatórios de plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal, contribuindo para a neurodegeneração na DA (SORIA LOPEZ; GONZÁLEZ; LÉGER, 2019). As opções terapêuticas ainda são restritas, sendo os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) os fármacos de primeira escolha, no entanto, a eficácia do tratamento é limitada além de gerar importantes efeitos adversos (MARUCCI *et al.*, 2021).

A indução de déficit cognitivo por escopolamina (ESC) em roedores é um modelo muito utilizado no estudo de novos compostos para o tratamento da DA. A ESC é uma amina terciária, antagonista competitivo não-seletivo dos receptores muscarínicos de acetilcolina. O bloqueio desses receptores causa um déficit colinérgico que, em roedores, mimetizam importantes alterações bioquímicas e comportamentais, similares às encontradas em pacientes com DA (TANG, 2019).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) na prevenção do déficit cognitivo, bem como nas alterações das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no córtex cerebral de ratos expostos a ESC.

### **2. METODOLOGIA**

#### **Modelo experimental de déficit de memória e tratamento com 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- $\alpha$  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).

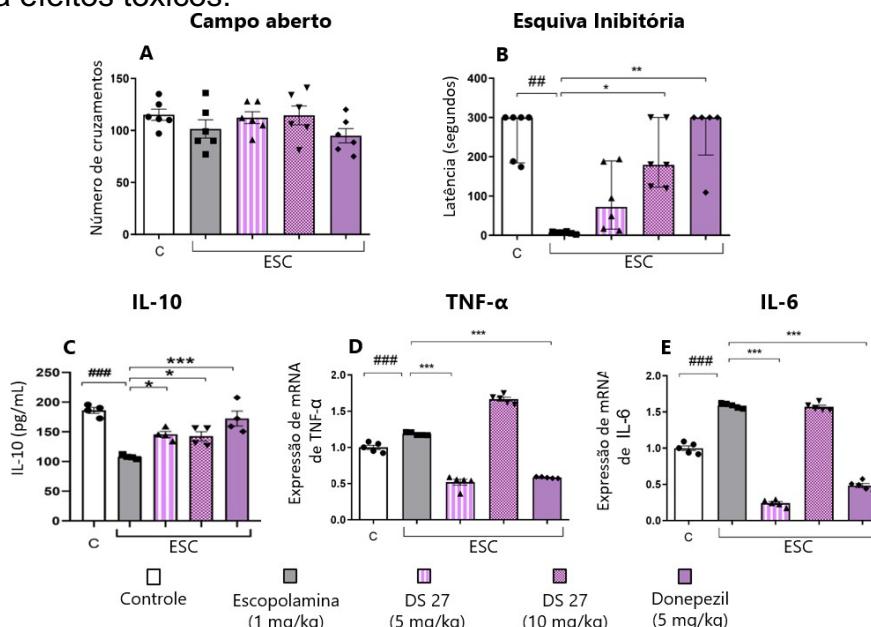
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

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- $\alpha$  (Figura 1 C-E). A persistência da neuroinflamação induz a liberação de espécies reativas que levam a danos oxidativos a biomoléculas, gerando um quatro 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- $\alpha$  (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)tiazolidin-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)tiazolidin-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)
<b>Glicose</b>	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
<b>Triglicerídeos</b>	172,9 $\pm$ 22,21	139,6 $\pm$ 9,18	154 $\pm$ 12,48	191,8 $\pm$ 9,06	154,1 $\pm$ 18,47
<b>Colesterol total</b>	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
<b>Ureia</b>	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
<b>Ácido úrico</b>	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
<b>Albumina</b>	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
<b>Proteína total</b>	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. I.J, 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.
- SEBOLETSWE, 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.