

INTERAÇÃO ENTRE UM COMPOSTO ORGANOSSULFURADO E A ENZIMA Na^+/K^+ ATPASE NA DOENÇA DE ALZHEIMER: ABORDAGEM *IN SÍLICO* E *EX VIVO*

MELIZA DA CONCEIÇÃO OLIVEIRA¹; KARLINE DA COSTA RODRIGUES²;
NELSOL LUIS DE CAMPOS DOMINGUES³; BEATRIZ FUZINATO DOS SANTOS⁴;
ETHEL ANTUNES WILHELM⁵; CRISTIANE LUCHESE⁶;

¹Universidade Federal De Pelotas (UFPel) – melizacoliveira@hotmail.com; ²Universidade Federal De Pelotas (UFPel) – line.karline@hotmail.com; ³Universidade Federal Da Grande Dourados – nelsondomingues@ufgd.edu.br; ⁴Universidade Federal Da Grande Dourados – beatriz_biafuzinato@hotmail.com; ⁵Universidade Federal De Pelotas (UFPel) – ethelwihelm@yahoo.com.br (co-orientadora); ⁶Universidade Federal De Pelotas (UFPel) – cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora);

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa, progressiva e irreversível, caracterizada por um início insidioso que leva à perda de memória e comprometimento cognitivo, além de sintomas comportamentais que impactam as atividades diárias dos pacientes (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). As principais características neuropatológicas da DA incluem a formação de placas senis extracelulares compostas por agregados filamentosos da proteína β -amilóide (A β) e emaranhados neurofibrilares intracelulares. Além desses marcadores, também são observados alterações bioquímicas, como o aumento do estresse oxidativo e a redução da atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase (BAIS; KUMARI; PRASHAR, 2015).

Já em relação as terapias atualmente disponíveis para a DA, sabe-se que estas possuem efeito paliativo e algumas restrições quando aplicadas a pacientes com outras condições em comorbidade. Embora essas intervenções possam aliviar os sintomas, não previnem ou revertem os danos neuropatológicos causados pela doença (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2021; HYDE et al., 2013). Dentro desta situação, nosso grupo de pesquisa (LaFarBio) tem se dedicado na procura de uma abordagem inovadora, visando tratar a DA, que apresente resultados que garantam segurança e qualidade de vida aos pacientes acometidos por essa patologia. Nesse contexto, o composto ((4-metoxifenil)thio)benzo[c][1,2,5]tiadiazol (MTDZ) tem se destacado, demonstrando a capacidade de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* no córtex cerebral de camundongos, além de exibir efeitos antinociceptivos e anti-amnésicos (DA COSTA RODRIGUES et al., 2022; DA MOTTA et al., 2022, 2023).

Desta forma, para ampliar a compreensão da ação deste composto, torna-se interessante investigar o modelo de DA esporádica induzido por estreptozocina (STZ), modelo que causa alterações neurológicas como acúmulo de proteínas β -amilóides e tau hiperfosforiladas, além de induzir neuroinflamação e aumentar o estresse oxidativo (NEVMERZHYTSKA; YAREMENKO, 2024). Como parte deste estudo, será realizada inicialmente uma análise *in silico* da interação molecular entre o MTDZ e a enzima Na^+/K^+ ATPase, com o objetivo de avaliar suas afinidades de ligação. Posteriormente, investigaremos os efeitos dessa enzima em córtex cerebral de camundongos submetidos ao modelo de DA com indução por STZ, visando determinar o potencial terapêutico do MTDZ no tratamento da DA.

2. METODOLOGIA

O composto MTDZ foi sintetizado e caracterizado conforme metodologia previamente descrita por Santos et al. (2020). O estudo foi conduzido utilizando

camundongos Swiss adultos, machos e fêmeas, com peso entre 25-35g. Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas – UFPel (CONCEA nº 8970-2021).

Para observar a interação do composto MTDZ com a enzima Na⁺/K⁺ ATPase, foi utilizado o software AutoDockTools (KONDAPURAM; SARVAGALLA; COUMAR, 2021; SANNER, 1999). A preparação de proteínas foram otimizadas e o software CHIMERA (v. 1.5.3) foi usado para remover ligantes em 3D (PETTERSEN et al., 2004). O encaixe molecular foi conduzido usando o Autodock4 (Dimensões X:123, Y105, Z:125), com base no sítio inibitório da digoxina (PDB ID: 4RET), um inibidor da subunidade alfa das bombas de Na⁺K⁺/ATPases (SHIN et al., 2018). As interações proteína-ligante foram analisadas pelo software Discovery Studio Visualizer 4.5 e pelo software PyMol 3.0.

Para avaliação *ex vivo*, os animais submetidos ao modelo de DA por administração icv de STZ (3mg/kg, 3µL), foram tratados por 36 dias com MTDZ (10mg/kg, via gavagem) ou com óleo de canola (grupo controle, 10mg/kg, via gavagem), posteriormente sendo submetidos a eutanásia e removidos os córtices cerebrais para análise *ex vivo*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, para fins de comparação nos resultados de *docking molecular*, utilizamos Donepezil (DON) como controle positivo, um fármaco comumente empregado no tratamento da DA (SHIN et al., 2018). O sítio de ligação da Digoxina (PDB ID: 4RET), um inibidor bem estabelecido da Na⁺/K⁺-ATPase (REN et al., 2021), foi usado para determinar o espaço de busca para as simulações de docking. Os resultados confirmaram a eficácia do DON como um potente ligante da enzima -8,1 kcal/mol, coerente com seu uso clínico. apresentou interações de aminoácidos Pi-sigma (Ile322) e Pi-alquil (Leu800, Arg893) (Figura 1A).

Embora o MTDZ tenha exibido uma afinidade de ligação inferior (-6,1 kcal/mol, Figura 1B), seus múltiplos tipos de interações sugerem um potencial como modulador da Na⁺/K⁺-ATPase. O composto MTDZ complexado com Na⁺/K⁺-ATPase apresentou uma afinidade de ligação mediada por interações Pi-sigma (Ile322), Pi-enxofre (Phe790, Phe323, Phe793, Tyr315), par Pi-lone (Thr804), Alquil e Pi-alquil (Leu800, Ile325, Cys111, Leu132) com resíduos Na⁺K⁺/ATPase.

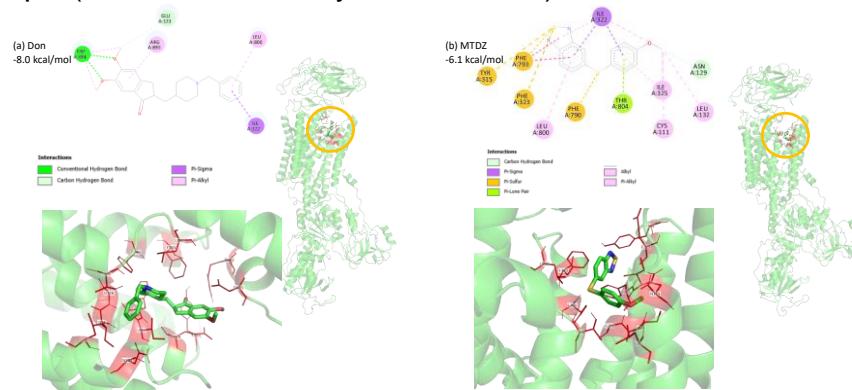


Figura 1. Proteína-ligante da enzima Na⁺K⁺/ATPase (PDB ID: 7e20) e Donepezil (Don) (A) e MTDZ (B) em 2D e 3D.

Os resultados indicam que os diversos tipos de interação observados para MTDZ, incluindo interações de par Pi-enxofre e Pi-lone, sugerem que ele também se liga efetivamente, mas com uma afinidade ligeiramente menor.

Independentemente da via que pode estar envolvida na modulação da Na^+/K^+ -ATPase, é razoável supor que o MTDZ possivelmente exerça um efeito sobre a atividade enzimática.

A regulação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase afeta diretamente a comunicação entre células nervosas, o funcionamento do cérebro e o comportamento dos animais (APELL; HITZLER; SCHREIBER, 2017), onde a enzima Mg^{2+} ATPase é um cofator importante na atividade desta enzima, podendo estar ligadas a problemas neurológicos, características da DA. Em relação a Na^+/K^+ -ATPase a indução com STZ causou diminuição significativa quando comparada ao controle em ambos os sexos (Figura 2A), enquanto que na enzima Mg^{2+} não houveram diferenças entre STZ e controle e sim uma diferença na atividade desta enzima entre os sexos avaliados (Figura 2B). Todavia, os tratamentos causaram o aumento da enzima Na^+/K^+ -ATPase, onde o MTDZ demonstrou-se em fêmeas mais expressivo que o controle positivo utilizado. As diferenças sexuais são tipicamente mediadas pelas ações dos hormônios esteroides sexuais, bem como diferenças nos substratos neuroquímicos entre homens e mulheres (MOSER; PIKE, 2016). Uma vez, que já foi demonstrado em alguns modelos experimentais de roedores com DA, camundongos fêmeas exibiram patologia mais pronunciada em comparação aos machos (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004).

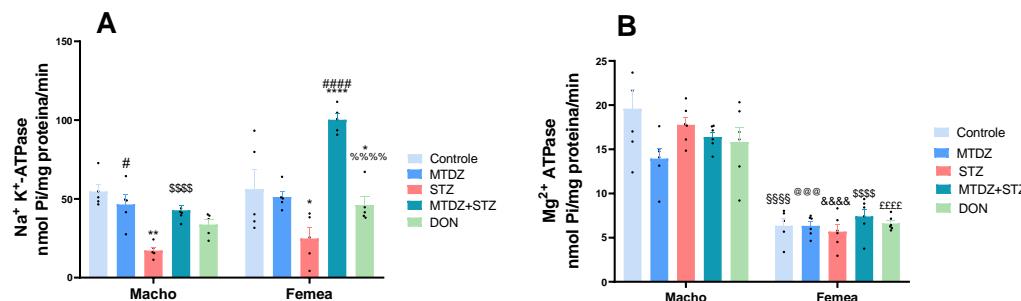


Figura 2. Efeito do 5-((4-metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5]tiodiazol (MTDZ) na atividade das enzimas ATPases no córtex cerebral: (a) Na^+/K^+ -ATPase cerebral; (b) Mg^{2+} ATPase. (**) indicam $p < 0,01$ e (*) indicam $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; (#) indica $p < 0,05$ e (####) indica $p < 0,0001$ em comparação com o grupo STZ; (\$\$\$\$) indica $p < 0,0001$ em comparação com o grupo de machos controle; (@ @) indica $p < 0,01$ e (@ @ @) indica $p < 0,001$ em comparação com o grupo de machos MTDZ; (&&) indica $p < 0,01$ e (&&&) indica $p < 0,0001$ em comparação com o grupo de machos STZ; (\$) indica $p < 0,05$ e (\$\$\$\$) indica $p < 0,0001$ em comparação com grupo macho MTDZ+STZ; (££) indica $p < 0,01$ e (££££) denota $p < 0,0001$ em comparação com grupo macho DONE (Análise de variância bidirecional/teste de Tukey).

4. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados deste estudo demonstram que o composto modulou a via Na^+/K^+ -ATPase, contribuindo para seu efeito benéfico na DA, bem como comorbidades adicionais. Estudos futuros são necessários para entender outros mecanismos exercidos pelo MTDZ e seus efeitos fisiológicos em outros modelos de DA e doenças neuropsíquicas, de forma a fornecer uma base sólida para futuras investigações mais detalhadas neste campo de estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. v.15, n.3, p. 321–387, mar. 2019.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 17, n. 3, p. 327–406, mar. 2021.
- BACHURIN, S. O.; BOVINA, E. V.; USTYUGOV, A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1186–1225, set. 2017.
- BAIS, S.; KUMARI, R.; PRASHAR, Y. A Review on Current Strategies and Future Perspective in Respect to Alzheimer's Disease Treatment. **Current Research in Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 15 dez. 2015.
- DA COSTA RODRIGUES, K. et al. A new arylsulfanyl-benzo-2,1,3-thiadiazoles derivative produces an anti-amnesic effect in mice by modulating acetylcholinesterase activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, p. 109736, jan. 2022.
- DA MOTTA, K. P. et al. Target enzymes in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in Swiss mice: A new acetylcholinesterase inhibitor as therapeutic strategy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 352, p. 109772, jan. 2022.
- DA MOTTA, K. P. et al. The Antinociceptive Responses of MTDZ to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy and Acute Nociception in Mice: Behavioral, Pharmacological, and Biochemical Approaches. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 9, p. 1217, 29 ago. 2023.
- HYDE, C. et al. Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model†. **Age and Ageing**, v. 42, n. 1, p. 14–20, jan. 2013.
- KONDAPURAM, S. K.; SARVAGALLA, S.; COUMAR, M. S. Docking-Based Virtual Screening Using PyRx Tool: Autophagy Target Vps34 as a Case Study. Em: **Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 463–477.
- MOSER, V. A.; PIKE, C. J. Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 67, p. 102–118, ago. 2016.
- NEVMERZHYSKA, N.; YAREMENKO, L. Characteristics of streptozotocin-induced and okadaic acid-induced models of Alzheimer's disease. **The Ukrainian Scientific Medical Youth Journal**, v. 147, n. 2, p. 98–104, 12 ago. 2024.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- REN, Y. et al. Structural Insights into the Interactions of Digoxin and Na⁺/K⁺-ATPase and Other Targets for the Inhibition of Cancer Cell Proliferation. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3672, 16 jun. 2021.
- SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 17, n. 1, p. 57–61, fev. 1999.
- SHIN, C. Y. et al. The Effects of Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, on Impaired Learning and Memory in Rodents. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 274–281, 1 maio 2018.
- WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, n. 3, p. 347–366, 1 mar. 2004.