

### 3-(PIRIDIN-2-IL)-2-(PIRIDIN-2-ILIMINO)TIAZOLIDIN-4-ONA ATENUA A CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS *IN VITRO*

LUIZ ROBERTO CARRARO JUNIOR<sup>1</sup>, AMÁLIA CONÇALVES ALVES<sup>2</sup>, JOSÉ COAN CAMPOS JUNIOR<sup>2</sup>, TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH<sup>2</sup>, CÉSAR AUGUSTO BRUNING<sup>2</sup>, CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luizrobertocarraro@hotmail.com](mailto:luizrobertocarraro@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [amaliaalvs@gmail.com](mailto:amaliaalvs@gmail.com);  
[coanjunior@hotmail.com](mailto:coanjunior@hotmail.com); [taisteixeira.r@gmail.com](mailto:taisteixeira.r@gmail.com); [cabruning@yahoo.com.br](mailto:cabruning@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [cbortolato@gmail.com](mailto:cbortolato@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS), quando presentes no organismo humano em pequenas quantidades, são reconhecidas por suas ações fisiológicas como, por exemplo, a regulação de fatores de transcrição. Entretanto, é possível que ocorra um aumento considerável destas espécies reativas, devido a algum fator externo ou patologia, resultando em prejuízos à célula, podendo levar à morte celular (Touyz 2012).

Pesquisas demonstram que o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas está associado ao estresse oxidativo (EO), que ocorre quando uma formação excessiva de EROS supera os mecanismos antioxidantes biológicos (Singh et al. 2019), sendo o cérebro um tecido especialmente susceptível. Estudos também relatam que doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e o câncer, estão relacionados diretamente com o estresse oxidativo (Poprac et al. 2017). Baseando-se nisso, esforços vêm sendo direcionados para a síntese e avaliação biológica de moléculas capazes de atuar como antioxidantes, que possuam a capacidade de neutralizar o excesso de EROS no organismo, simulando os mecanismos biológicos.

Compostos com o núcleo 2-imino-tiazolidin-4-ona têm atraído atenção ao longo dos anos devido as suas propriedades farmacológicas de amplo espectro, além de conter em sua estrutura duas piridinas, que são bem conhecidas por possuírem diversas atividades biológicas (Luchese et al. 2012; Peglow et al. 2017; Wichitnithad et al. 2011).

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante do composto 3-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilimino)tiazolidin-4-ona (PPIT), através dos ensaios de carbonilação de proteínas e de atividade mimética à enzima superóxido dismutase (SOD-like) em tecido de cérebro de camundongos *in vitro*.

## 2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), localizado na Universidade Federal de Pelotas. O composto PPIT (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), presente na mesma universidade. Este projeto está cadastrado no COCEPE sob o código 3138 e o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPeL 51340-2019).

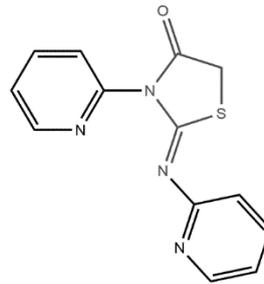


Figura 1. Estrutura molecular do PPIT.

## 2.1. Ensaio da carbonilação de proteínas

Este experimento *in vitro* foi modificado de Levine et al. (1990) que consiste em causar dano oxidativo às proteínas do tecido a ser analisado para determinar a capacidade do composto em reverter o processo de carbonilação proteica. As amostras biológicas de tecido cerebral foram armazenadas em freezer mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do preparo do homogenato. Os homogenatos de cérebro foram preparados com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 1: 10 (peso/volume), e subsequentemente diluídos 1:8.

Em diferentes tubos de ensaio, foi adicionado o composto PPIT para ser testado nas concentrações de 200 e 500  $\mu\text{M}$ , enquanto o grupo controle recebeu o veículo (dimetilsulfóxido). O homogenato foi adicionado a todos os tubos e, a seguir, o nitroprussiato de sódio (NPS), utilizado como um indutor de carbonilação proteica e os tubos foram imediatamente levados à incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Após esse período, ácido clorídrico (HCl) 2M foi adicionado aos tubos branco e a solução de dinitrofenil hidrazina (DNPH) aos tubos teste, deixando-os repousar por 1 hora no escuro e agitando a cada 15 minutos, para facilitar a reação. Em seguida, 500  $\mu\text{l}$  de tampão de desnaturação, 1,5 ml de etanol, 1,5 ml de hexano foram adicionados a todos os tubos e, logo após, foram agitados por 40 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. O sedimento formado no tubo foi lavado duas vezes com 1 ml de solução de etanol/acetato de etila (1:1). Deixou-se secar por 2 minutos, e o pellet foi ressuspensionado com 1 ml de tampão desnaturante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol carbonil/g de tecido.

## 2.2. Atividade SOD-like

Esse protocolo foi baseado em Marklund and Marklund (1974) cujo objetivo é medir a atividade antioxidante do composto, por meio de sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol, que é catalisada pelo radical superóxido. Portanto, este teste avalia se o mecanismo de ação antioxidante de uma dada substância poderia estar relacionado a uma ação mimética à enzima SOD.

PPIT (25-500  $\mu\text{M}$ ) ou ácido ascórbico (AA) (10-200  $\mu\text{M}$ , um controle positivo) foi adicionado em tubos contendo tampão tris-HCl (pH 8,5). Exceto para o branco, pirogalol foi adicionado em todos os tubos. A absorbância da solução foi medida cineticamente, no mesmo momento em que o pirogalol foi adicionado à mistura, a 412 nm por 2 minutos, observando seus valores de absorbância a cada 15 segundos.

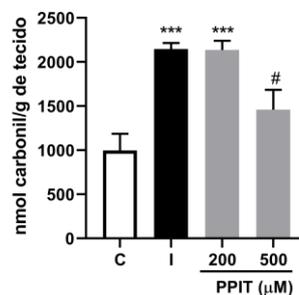
### 2.3. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 8.02 e os resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os grupos foram comparados entre si através da análise de variâncias ANOVA de uma via (dados paramétricos) seguidas pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

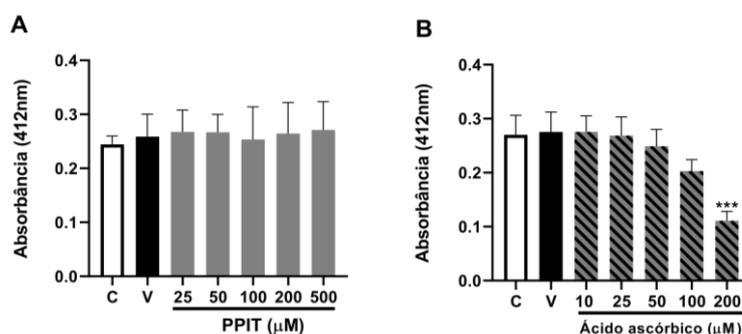
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio de carbonilação de proteínas estão demonstrados na Figura 2 ( $F_{(3,12)} = 12,30$ ;  $p = 0,0006$ ). Como pode ser observado, o NPS aumentou os níveis de carbonilação de proteínas ( $p < 0,001$ ), os quais foram reduzidos pelo composto PPIT na concentração de 500  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). A redução dos níveis de carbonilação proteica pelo PPIT demonstra a capacidade deste composto em atuar como um antioxidante em tecido cerebral, protegendo as proteínas de danos oxidativos.

A Figura 3 ilustra os achados experimentais no ensaio mimético à enzima SOD (SOD-like). Conforme pode ser visto pela Fig. 3A ( $F_{(6,14)} = 0,1279$ ;  $p > 0,10$ ), o composto PPIT, em todas as concentrações testadas, não foi capaz de inibir a auto-oxidação do pirogalol ( $p > 0,05$ ). Estes dados nos sugerem que a ação *scavenger* de superóxido não está entre os possíveis mecanismos de ação antioxidante do composto. A Figura 3B demonstra os resultados encontrados para o AA, um controle positivo ( $F_{(6,14)} = 12,14$ ;  $p < 0,0001$ ). Como previsto, o AA (200  $\mu\text{M}$ ) inibiu a auto-oxidação do piragolol ( $p < 0,001$ ), validando os resultados encontrados neste ensaio.



**Figura 2.** Efeito do PPIT no ensaio de carbonilação de proteínas em tecido cerebral de camundongos. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (\*\*\*)  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle (C) e (#)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo induzido (I). ANOVA de uma via/Newman-Keuls.



**Figura 3.** Efeito do PPIT no ensaio de atividade mimética à SOD. Ácido ascórbico (AA) foi usado como um controle positivo. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. (\*\*\*)  $p < 0,0001$  quando comparado com o grupo veículo (V). ANOVA de uma via/Newman-Keuls.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que o PPIT possui atividade antioxidante em tecido cerebral de camundongos *in vitro*, a qual é observada através da redução dos níveis de proteínas carboniladas formadas. Este achado sugere o potencial deste composto para ser testado em modelos de distúrbios neurológicos associados ao estresse oxidativo. Entretanto, esta ação não é mediada por um mecanismo de captura de radicais superóxido, uma vez que, diferente do controle positivo, o PPIT não foi capaz de impedir a auto-oxidação do pirogallol no ensaio de atividade mimética à SOD. Portanto, mais testes são necessários para a elucidação de mecanismos de ação antioxidante do PPIT.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, and E. R. Stadtman. 1990. 'Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins', **Methods Enzymol**, 186: 464-78.
- Luchese, C., R. Brandao, C. I. Acker, and C. W. Nogueira. 2012. '2,2'-dipyridyl diselenide is a better antioxidant than other disubstituted diaryl diselenides', **Mol Cell Biochem**, 367: 153-63.
- Marklund, S., and G. Marklund. 1974. 'Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase', **Eur J Biochem**, 47: 469-74.
- Peglow, T.J., R.F. Schumacher, R. Cargnelutti, A.S. Reis, C. Luchese, E. A. Walters, and G. Perin. 2017. 'Preparation of bis(2-pyridyl) diselenide derivatives: Synthesis of selenazolo[5,4-b]pyridines and unsymmetrical diorganyl selenides, and evaluation of antioxidant and anticholinesterasic activities.', **Tetrahedron Letters**, 58: 3734-38.
- Poprac, P., K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C. J. Rhodes, and M. Valko. 2017. 'Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases', **Trends Pharmacol Sci**, 38: 592-607.
- Singh, A., R. Kukreti, L. Saso, and S. Kukreti. 2019. 'Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases', **Molecules**, 24.
- Touyz, R. M. 2012. 'Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress', **Primer on the Autonomic Nervous System**: 335-38.
- Wichitnithad, W., J. P. O'Callaghan, D. B. Miller, B. C. Train, and P. S. Callery. 2011. 'Time-dependent slowly-reversible inhibition of monoamine oxidase A by N-substituted 1,2,3,6-tetrahydropyridines', **Bioorg Med Chem**, 19: 7482-92.