

## INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MODULADOR DE TIAZOLIDINONA SOBRE O STATUS REDOX EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE AMNÉSIA

ANITA AVILA DE SOUZA<sup>1</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>2</sup>;  
FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA<sup>3</sup>; DANIEL SILVA<sup>4</sup>; WILSON CUNICO<sup>5</sup>;  
ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – anita\_a\_avila@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – mayara\_sandrielly@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - fe.t@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

### INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pelo médico alemão Alois Alzheimer, em 1906, o qual definiu como uma neuropatologia, não reconhecida, que cursa com demência, destacando os sintomas de déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras (GOEDERT et al., 2006). A fisiopatologia da DA é complexa, e várias hipóteses foram descritas para explicar a patogênese da doença, no entanto, a etiologia exata ainda não é clara (PENG et al., 2016). Entretanto, sabe-se que o estresse oxidativo, está presente ao longo de todas as fases desta patologia causando danos neuronais e morte celular (KAMAT et al., 2016; KUMAR et al., 2018; TANG et al., 2019).

Os principais fármacos utilizados para o tratamento da DA apresentam muitos efeitos adversos além de custos elevados, e objetivam apenas o tratamento dos sintomas retardando o progresso da DA (JOE et al., 2019; KUMAR et al., 2018). Desta forma destaca-se a importância do estudo de novas classes de compostos em busca de melhores terapias que possam beneficiar pacientes DA.

As tiazolidinonas são compostos heterocíclicos de cinco membros que apresentam em sua estrutura um átomo de enxofre, um átomo de nitrogênio e uma carbonila. Várias propriedades terapêuticas já têm sido descritas na literatura em relação a esses compostos como ação antioxidante (GERONIKAKI et al., 2013), antitumoral e anti-inflamatória (SILVA et al., 2016). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vivo* da tiazolidinona sintética 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolindin-4-ona (**DS12**) sobre o déficit de memória e em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo experimental de amnésia induzida pela administração de escopolamina.

### 2. METODOLOGIA

#### Síntese da molécula

A síntese do 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolindin-4-ona (**DS12**) foi realizada pela reação multicomponente de uma amina primária, um benzaldeído e o ácido mercaptoacético (SILVA et al., 2016). A tiazolidinona foi devidamente confirmada e caracterizadas por CG-EM e por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### Animais e modelo experimental de déficit de memória induzido por escopolamina

Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos adultos os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. O protocolo experimental foi

aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA 46528-2018). Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (C), escopolamina (SCO), SCO+DS12 (5 mg/kg) e SCO+DS12 (10 mg/kg).

Os animais foram tratados com a DS12 por via oral durante 7 dias, no 8º dia foi realizado o treino na esQUIVA inibitória e 1 hora após foi aplicada a dose de 1mg/kg de escopolamina (SCO) por via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos ao teste da esQUIVA inibitória no qual o tempo de latência foi cronometrado. Em seguida procedeu-se a eutanásia e o córtex cerebral foi coletado.

### **Estresse Oxidativo em córtex cerebral**

#### **- Preparação da amostra**

O córtex cerebral foi homogeneizado (1/10 p/v) usando tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo KCl 140 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 2500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado em análises posteriores.

#### **- Espécies reativas de oxigênio (ERO)**

Foi adicionado tampão Tris-HCl na amostra e posteriormente foi adicionado Diacetato de Diclorofluoresceína (DCFH-DA). A oxidação de DCFH-DA em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi mensurada em espectrofotômetro de fluorescência (ALI et al., 1992).

#### **- Quantificação de nitritos**

Os nitritos foram medidos pela reação de Griess. O homogeneizado foi incubado com sulfanilamida a 1% e dicloridrato de N-1-nafiletiletlenodiamina a 0,3% à temperatura ambiente por 10 min. A absorvância foi medida a 540 nm usando nitrito de sódio como padrão (STUEHR et al., 1989).

#### **- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O sobrenadante foi misturado com 10% de TCA e centrifugados. O sobrenadante foi coletado e misturado com TBA (0,67%) e incubado em bloco seco a 100°C por 30 min. Os níveis de TBARS foram determinados em absorvância a 535 nm (ESTERBAUER et al., 1990).

#### **- Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

Este ensaio baseia-se na inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido ao adenocromo. A atividade da SOD foi medida de acordo com Misra e Fridovich 1972.

#### **- Atividade da Catalase (CAT)**

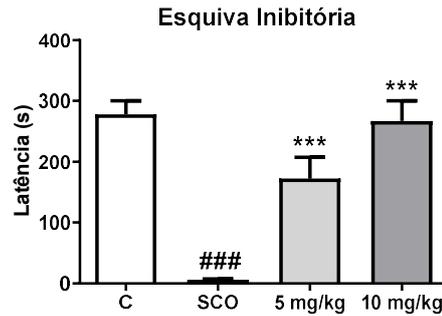
A decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) foi monitorada continuamente a 240 nm por 180 seg a 37°C, de acordo com Aebi 1984.

#### **- Análise estatística**

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de Tukey-Kramer. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

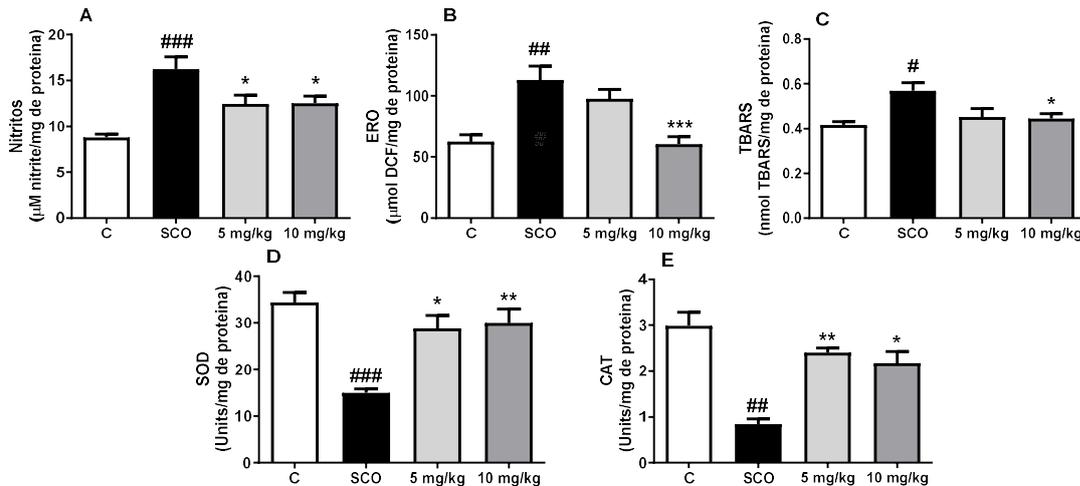
Foi possível observar que a administração da molécula DS12 em ambas concentrações foi capaz de prevenir os danos de memória causados pela SCO (figura 1).



**Figura 1:** Efeito do tratamento com tiazolidinona DS12 (5 mg/kg e 10 mg/kg) sobre o déficit de memória em ratos submetidos a um modelo de amnésia induzido por escopolamina. ###P < 0,001 comparado ao grupo controle, \*\*\*P < 0,001 comparado ao grupo escopolamina.

Em córtex cerebral a SCO induziu um aumento significativo das ERO, nitritos e TBARS, enquanto que o tratamento com a molécula DS12 nas concentrações de 5 e 10 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de nitritos e na concentração de 10 mg/kg também foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de ERO e TBARS. Além disto, a SCO causou uma redução na atividade das enzimas SOD e CAT, e a DS12 em ambas as concentrações foi capaz de prevenir estas alterações (Figura 2).

### Córtex Cerebral



**Figura 2:** Efeito do tratamento com tiazolidinona DS12 (5 mg/kg e 10 mg/kg) nos níveis nitritos (A), espécies reativas de oxigênio (B), TBARS (C) e atividade das enzimas superóxido dismutase (D) e catalase (E) em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de amnésia induzido por escopolamina (SCO). #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 diferente do grupo controle, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 diferente do grupo SCO.

A SCO é um antagonista do receptor muscarínico que quando administrado de forma sistêmica possui capacidade de prejudicar a memória e o aprendizado (TANG et al., 2019). Os resultados demonstram que a SCO induziu comprometimento da memória, observado pelo menor tempo de latência dos animais na plataforma, além disto cabe destacar que as alterações causadas pela SCO nos marcadores de estresse oxidativo são similares as encontradas na DA, principalmente no hipocampo e no córtex cerebral, regiões do cérebro que apresentam as principais lesões neuropatológicas (AGOSTINHO et al., 2010).

Neste contexto o pré-tratamento realizado com a DS12 nas concentrações de 5 e 10 mg/kg foi capaz de prevenir a perda de memória induzida pela SCO (Figura 1), bem como foi capaz de prevenir as alterações dos marcadores de estresse oxidativo em córtex cerebral (Figura 2).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com este trabalho somam com as propriedades biológicas já relatadas em estudos anteriores com esta classe de compostos, sugerindo assim que elas podem ter um potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA. Entretanto mais estudos são necessários para melhor elucidação dos mecanismos de atuação desta molécula.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105:121–126, 1984.
- AGOSTINHO, P.; CUNHA, R.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Current pharmaceutical design**. 16:2766-2778, 2010.
- ALI, F.; LEBEL, P.; BONDY, C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology** 13:637–648, 1992.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol** 186:407–421, 1990.
- GERONIKAKI, A.; PITTA, E.; LIARAS, K. Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. **Curr. Med. Chem.** 20: 4460-4480, 2013.
- GOEDERT, M.; SPILLANTINI, G. A century of Alzheimer's disease. **Science**. 314:777-81, 2016.
- JOE, E.; RINGMAN, M. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. **BMJ**. 367, 2019.
- KAMAT, P.; KALANI, A.; RAI, S.; SWARNKAR, S.; TOTA, S.; NATH, C.; TYAGI, N. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's Disease. Understanding the therapeutics strategies. **Mol. Neurobiol.** 53: 648-661, 2016.
- Kumar, d.; gupta, s.; ganeshpurkar, a.; gutti, g.; Krishnamurthy, s.; modi, g.; singh, s. Development of piperazinediones as dual inhibitor for treatment of Alzheimer's disease. **Eur. J. Med. Chem.** 150:87–101, 2018.
- MISRA, O.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** 247:3170–3175, 1972
- PENG, X.; XING, P.; LI, X.; QIAN, Y.; SONG, F.; BAI, Z.; HAN, G.; LEI, H. Towards Personalized Intervention for Alzheimer's Disease. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. 14: 289-297, 2016.
- SILVA, D.; SILVA, C.; SOARES, M.; AZAMBUJA, J.; CARVALHO, T.; ZIMMER, G.; FRIZZO, C.; BRAGANHOL, E.; SPANAVELLO, R.; CUNICO, W. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiangioma activity and cytotoxicity. **Eur. J. Med. Chem.** 29: 574-582, 2016.
- STUEHR, J.; NATHAN, F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.** 169:1543–1555, 1989.
- TANG, J.; OLIVEIROS, A.; JANG, M. Dysfunctional Mitochondrial Bioenergetics and Synaptic Degeneration in Alzheimer Disease. **Int Neurology J.** 23:5-10, 2019.