

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO COMPOSTO (Z)-3-(PIRIDIN-2-IL)-2-(PIRIDIN-2-ILIMINO)TIAZOLIDIN-4-ONA SOBRE A ENZIMA MONOAMINA OXIDASE EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS

DIANER NORBERG STRELOW¹; AMÁLIA GONÇALVES ALVES¹; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH¹; JOSÉ COAN CAMPOS JÚNIOR²; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING¹; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO¹

¹Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM)- strelowdianer@gmail.com; amaliaalvs@gmail.com; taisteixeira.r@gmail.com, cabruning@yahoo.com.br; cbortolato@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- Laboratório de Química Aplicada a Bioativos - coan.junior@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima ligada à membrana mitocondrial externa responsável por catalisar a reação de desaminação oxidativa de monoaminas. Entre os substratos da MAO encontram-se neurotransmissores, hormônios e compostos exógenos biologicamente ativos. Em razão disso, esta enzima desempenha um papel crítico na regulação de atividades do sistema nervoso central (SNC) e está relacionada ao desenvolvimento de inúmeras desordens neurológicas e psiquiátricas (DROZAK et al., 2006), fundamentadas principalmente no fato de que a sua catálise origina metabólitos potencialmente tóxicos, como aldeídos e peróxido de hidrogênio (FINBERG et al., 2016).

A enzima apresenta-se sob duas isoformas, MAO-A e MAO-B, que apesar de apresentarem 70% de similaridade na sequência de aminoácidos, diferem quanto à distribuição, seletividade de inibição e especificidade de substrato (KUMAR et al., 2017). Preferencialmente a MAO-A catalisa a desaminação de serotonina e noradrenalina, enquanto que a MAO-B possui maior especificidade pelos substratos benzilamina, β -feniletilamina e dopamina (FINBERG et al., 2016).

Os medicamentos inibidores da MAO (IMAO) são utilizados sobretudo nos tratamentos de depressão e doenças neurodegenerativas, como de a Doença de Parkinson (DP) e de Alzheimer (DA) (YOUJIM et al., 2006). Com essa relevância, a DA destaca-se por estar entre as mais frequentes doenças neurodegenerativas no mundo, estando o aumento da atividade da MAO-B relacionado à perda de funções cognitivas, um dos principais transtornos causados pela doença (KUMAR et al., 2017). Ainda, em relação aos IMAO é válido ressaltar a importância da busca de terapias que ofereçam menores riscos de reações indesejáveis e maior seletividade enzimática, visto que o tratamento de diversas patologias do SNC envolve diferentes mecanismos de inibição.

Por outra perspectiva, ao quadro de depressão resistente ao tratamento (DRT) tem sido proposta a terapia combinada, baseada na utilização de um inibidor da MAO e antidepressivos ou estimulantes, apresentando uma melhora clínica significativa (THOMAS et al., 2015). Assim, estudos têm se voltado para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem inibindo a MAO com potencial neuroprotetor. Dentre as pesquisas de compostos orgânicos sintéticos, alguns resultados recentes revelam o potencial de derivados de iminotiazolidinonas como IMAO (ABBAS et al., 2016).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar se o composto (Z)-3-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-illimino)tiazolidin-4-ona (PPIT; Fig. 1) seria capaz de inibir a

atividade enzimática das isoformas MAO-A e/ou MAO-B em cérebro de camundongos *in vitro*.

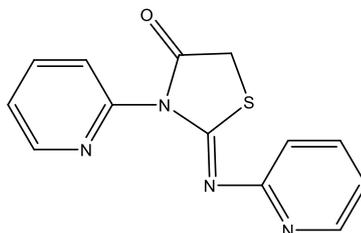


Figura 1. Estrutura química do composto PPIT

2. METODOLOGIA

O composto PPIT foi sintetizado pelo Laboratório de Química Aplicada a Bioativos e os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), localizados na Universidade Federal de Pelotas.

2.1 Animais

Para o experimento foram utilizados cérebros de camundongos Swiss machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas e diretrizes do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPeL). Os animais foram submetidos à eutanásia por isoflurano para a remoção do cérebro.

2.2 Preparação mitocondrial

O tecido cerebral foi preparado conforme descrito por SOTO-OTERO et al. (2001) para obtenção de uma fração rica em mitocôndria. O cérebro de camundongos foi homogeneizado em tampão de homogeneização na proporção de 1:4 (peso/volume) e submetido à centrifugação. O sobrenadante foi novamente centrifugado e após, o pellet (P1) foi ressuspensionado com tampão de homogeneização. A nova fração foi centrifugada e ressuspensionado o *pellet* (P2) final em tampão de ensaio, formando a fração a ser utilizada no experimento.

2.3 Ensaio de atividade da MAO

A avaliação da atividade da enzima monoamina oxidase foi baseada na metodologia de WEISSBACH et al. (1960) na qual a oxidação de um substrato, a quinuramina, pelas isoformas MAO-A e MAO-B resulta na formação de 4-hidroxiquinolina, um produto fluorescente. Dessa forma, a inibição enzimática é determinada pela redução de fluorescência emitida.

Os ensaios foram realizados de forma que as amostras foram pré-incubadas a 37°C por cinco minutos com os respectivos inibidores enzimáticos. Assim, a pargilina, inibidora da MAO-B foi utilizada para determinar a atividade da isoforma MAO-A, e a clorgilina, inibidora da MAO-A, para determinar a atividade da MAO-B. Na etapa seguinte foi feita a adição do composto a ser testado e a incubação por dez minutos a 37°C, seguida da adição de quinuramina e incubação por trinta minutos nas mesmas condições.

A reação foi parada com ácido tricloroacético a 10%, e posteriormente feita a centrifugação por cinco minutos a 4°C. Foi retirado o sobrenadante, acrescido hidróxido de sódio 1M e a leitura foi feita em um fluorímetro em excitação correspondente a 315 nm e emissão de 380 nm.

Para o teste de ambas isoformas, o composto PPIT foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizado nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 µM. O tubo controle recebeu o veículo (DMSO). Os resultados foram calculados e expressos como nmol de 4-OH quinolina/mg de proteína/minuto.

2.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados paramétricos foi realizada através do software GraphPad Prism 7.04, utilizando a análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do composto PPIT sobre a atividade das isoformas da MAO em cérebro de camundongo estão demonstrados na Fig. 2. A partir dos experimentos realizados foi possível observar que o composto PPIT em todas as concentrações testadas não afeta de forma significativa a MAO-A ($F_{(5,18)}=2,42$; $p=0,0761$), como observado na Fig. 2A.

Em contrapartida, a análise estatística dos dados revelou um perfil inibitório do composto PPIT sobre a MAO-B, reduzindo de forma significativa a atividade enzimática nas concentrações de 200 e 500 µM ($F_{(5, 18)}=8,763$; $p=0,0002$) como mostrado na Fig. 2B.

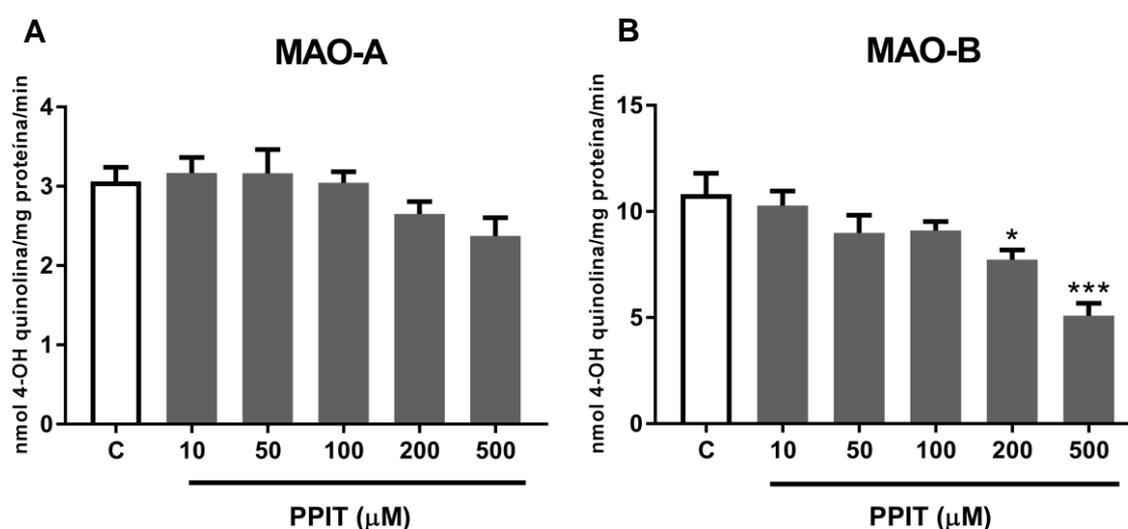


Figura 2. Efeitos do composto PPIT sobre a atividade da MAO-A (A) e MAO-B (B) em cérebro de camundongos *in vitro*. Os dados representam a média ± EPM. N=4 experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ comparado ao controle (c). ANOVA de uma via/Newman-Keuls.

Esses resultados demonstram que PPIT inibiu a MAO-B de forma seletiva, uma característica desejada na busca por novos compostos para o tratamento de

doenças do SNC. Sua inibição reduz a formação de espécies reativas de oxigênio e eleva a disponibilidade de monoaminas, gerando benefícios às funções neurológicas, enquanto que a seletividade de inibição reduz o risco de reações adversas.

4. CONCLUSÕES

Em suma, pode-se concluir que o composto PPIT inibe de forma seletiva a atividade da MAO-B em cérebro de camundongos *in vitro*. Assim, sugere-se que o composto possa ser um bom candidato para pesquisa de novos fármacos neuroprotetores. Entretanto, fazem-se necessários estudos adicionais a fim de caracterizar o mecanismo de inibição enzimática *in vitro* e seu potencial terapêutico em modelos animais de doenças humanas relacionadas à MAO-B.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, N. et al. Symmetrical aryl linked bis-iminothiazolidinones as new chemical entities for the inhibition of monoamine oxidases: Synthesis, *in vitro* biological evaluation and molecular modelling analysis. **Bioorganic Chemistry**, v. 70, p. 17-26, 2016.
- DROZAK, J.; KOZLOWSKI, M. Monoamine oxidase as a target for drug action. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 60, p. 498-515, 2006.
- FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 340, p. 1-15, 2016.
- KUMAR, B.; GUPTA, V. P.; KUMAR, V. A Perspective on Monoamine Oxidase Enzyme as Drug Target: Challenges and Opportunities. **Current Drug Targets**, v. 18, n. 1, p. 87-97, 2017.
- SOTO-OTERO, R. et al. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. **Life Sciences**, v. 69, n. 8, p. 879-889, 2001.
- THOMAS, S. J. et al. Combination Therapy with Monoamine Oxidase Inhibitors and Other Antidepressants or Stimulants: Strategies for the Management of Treatment-Resistant Depression. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 4, p. 433-449, 2015.
- WEISSBACH, H. et al. A Rapid Spectrophotometric Assay of Monoamine Oxidase Based on the Rate of Disappearance of Kynuramine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 235, n. 4, p. 1160-1163, 1960.
- YODIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.