

## EFEITO NEUROPROTETOR DE TIAZOLIDINONA EM UM MODELO ANIMAL DE DÉFICIT DE MEMÓRIA

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](mailto:anita_a_avila@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mayara\\_sandrielly@hotmail.com](mailto:mayara_sandrielly@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [fe.t@hotmail.com](mailto:fe.t@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [danielschuch08@gmail.com](mailto:danielschuch08@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [wjcunico@yahoo.com.br](mailto:wjcunico@yahoo.com.br)

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

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa cujos principais sintomas são déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Além disto, os aspectos anatomopatológicos da doença são o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares bem como a perda neuronal (GOEDERT et al., 2006).

A relação entre o sistema colinérgico e a demência do tipo Alzheimer tem sido amplamente descrita na literatura, uma vez que modificações neuroquímicas na sinalização colinérgica estão envolvidas nas alterações de memória, aprendizagem e atenção (SCHLIEBS, 2006). Neste sistema a acetilcolinesterase (AChE) é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (ODA, 1999). Os principais fármacos hoje licenciados para o tratamento da DA são inibidores da AChE, entretanto, estes fármacos apresentam amplos efeitos adversos, bem como um alto custo para o tratamento (FORLENZA, 2005; ARAÚJO et al., 2016).

Além disso, estudos têm demonstrado que a inibição da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase tem uma significativa correlação com os déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson, (JOVICIĆ et al., 2008; BAGH et al., 2008). Esta enzima é responsável pelo equilíbrio eletrolítico celular, pelo controle dos potenciais de repouso e pela modulação da liberação e captação de neurotransmissores (STAHL et al., 1986).

As tiazolidinonas são compostos heterocíclicos de origem sintética, que tem demonstrado várias propriedades terapêuticas como ação antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (GERONIKAKI et al., 2013; SILVA et al., 2016). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vivo* da 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one na atividade das enzimas AChE e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo experimental de déficit de memória induzido por escopolamina, bem como avaliar a memória destes animais no teste de esQUIVA inibitória.

### 2. METODOLOGIA

#### Síntese da molécula

A síntese da tiazolidinona 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolidin-4-ona (**DS12**) foi realizada de acordo com Silva et al. (2013) pela reação multicomponente de uma amina primária, um benzaldeído (4-(metiltio)benzaldeído ou 4-(metilsulfonil)benzaldeído), e o ácido mercaptoacético. Quando necessário, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando como eluente a mistura hexano:acetato de etila na proporção 8:2. A

tiazolidinona sintetizada foi devidamente confirmada e caracterizada por CG-EM e por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O composto DS12 foi solubilizada em óleo de canola e foi utilizada para o presente estudo.

### 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. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA 9219). 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 molécula (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, onde o hipocampo e o córtex cerebral foram coletados.

### Atividade da acetilcolinesterase em córtex e hipocampo

Os tecidos foram homogeneizados em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, centrifugados e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático de acordo com ELLMAN et al. (1961), o qual, baseia-se na formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoico. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol AcSch/h/ mg}$  de proteína.

### Atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

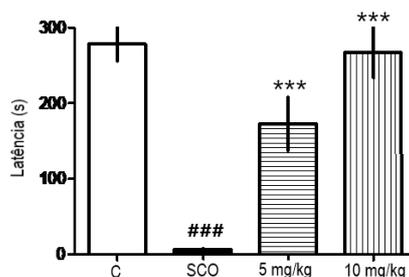
Os tecidos foram homogeneizados em Tris-HCl, livre de fosfato, centrifugados e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático de acordo com FISKE e SUBBAROW (1927). A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi quantificado colorimetricamente utilizando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como padrão. A atividade específica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi calculada através da diferença entre a atividade insensível à ouabaína da atividade geral (na ausência da ouabaína) e os resultados foram expressos em nmol de Pi/mg de proteína/minuto.

### 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

No teste de esQUIVA inibitória, observou-se que as duas concentrações da molécula DS12 foram capazes de prevenir o déficit de memória induzido pela

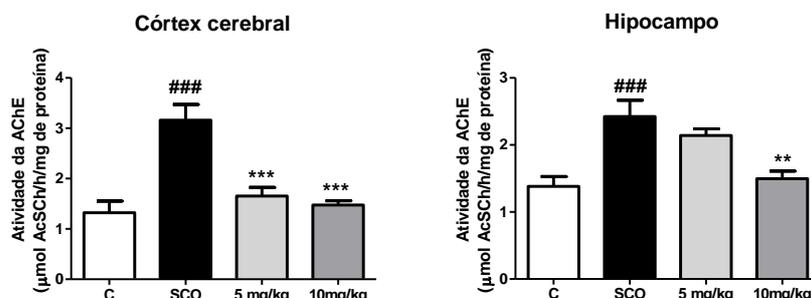


SCO ( $P < 0,001$ , Figura 1).

**Figura 1:** Efeito do tratamento com 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolindin-4-ona (DS12) (5mg/kg e 10mg/kg) sobre a memória de ratos

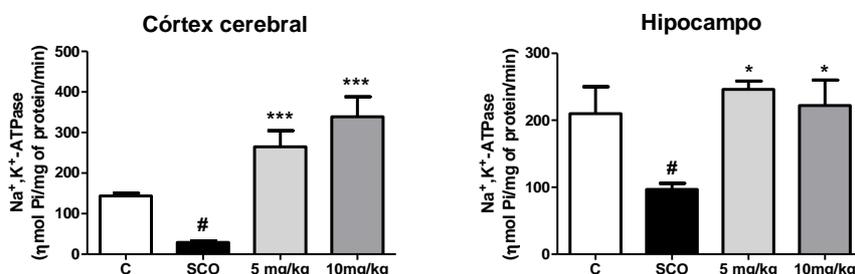
submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por SCO (1mg/kg.)  
<sup>\*\*\*</sup>P<0,001 comparado ao grupo controle, <sup>###</sup>P<0,001 comparado ao grupo SCO.

Quanto a atividade a AChE, observou-se que a SCO aumenta a atividade desta enzima em córtex cerebral e hipocampo (P<0,001). Por outro lado, em córtex cerebral observou-se que ambas concentrações da molécula DS12 testadas foram capazes de prevenir este aumento, e em hipocampo somente a dose de 10 mg/kg preveniu o aumento da atividade da AChE ( P<0.01, Figura 2).



**Figura 2:** Efeito do tratamento com 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolindin-4-ona (DS12) (5mg/kg e 10mg/kg) na atividade da AChE em córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por SCO (1mg/kg). <sup>###</sup>P<0,001 comparado ao controle, <sup>\*\*</sup>P<0,01, <sup>\*\*\*</sup>P<0,001 comparado ao grupo SCO.

Ainda, os resultados demonstraram que ambas as concentrações da molécula avaliada foram capazes de prevenir a inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase causado pela SCO em córtex cerebral e hipocampo (P<0.05, Figura 3)



**Figura 3:** Efeito do tratamento com 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(piperidina-1-yl)propil)tiazolindin-4-ona (DS12) (5mg/kg e 10mg/kg) na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos a um modelo de déficit de memória induzido por SCO (1mg/kg). <sup>#</sup>P<0,05 ao grupo controle, <sup>\*</sup>P<0,05, <sup>\*\*\*</sup>P<0,001 comparado ao grupo SCO.

No presente trabalho observou-se que o tratamento com a molécula DS12 foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido pela SCO o qual está associado à diminuição das funções colinérgicas centrais (MORE et al., 2016). Nesse sentido, avaliou-se a atividade da AChE, o qual foi aumentada pela SCO e o tratamento com a molécula DS12 foi capaz de prevenir este aumento em ambas concentrações e estruturas cerebrais testadas. Nesse sentido, um dos mecanismos pelos quais a molécula DS12 pode prevenir o déficit de memória induzido pela SCO, possivelmente seja através da inibição da atividade da AChE tanto em córtex cerebral quanto em hipocampo.

Além disso, tendo em vista a relação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase com os déficits cognitivos encontrados em doenças neurodegenerativas, a grande importância da

transmissão colinérgica na DA, bem como os problemas relacionados ao principais fármacos disponíveis para o seu tratamento, faz-se importante a busca por novos compostos que possuam a capacidade de atuar melhorando esta transmissão e que gerem menores efeitos adversos, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, a molécula DS12 também demonstrou ser eficiente em prevenir a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzido pela SCO.

#### 4. CONCLUSÕES

Estes achados somam com as propriedades biológicas 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

- ARAÚJO, M.; SANTOS, L. et al. Acetilcolinesterase- AChE: Uma enzima de interesse Farmacológico. **Ver. Virtual Quím**, v.8, n.6, p.1818-1834, 2016.
- BAGH, B.; MAITI, K. et al. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radic. Res.**, v. 6, n. 42, p. 574 –581, 2008.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n.1-2, p.248-54, 1976.
- ELLMAN, G.; COURTNEY, K. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol**, v. 7, n.2, p: 88–95, 1961.
- FISKE, H.; SUBBAROW, Y. The nature of the “inorganic phosphate” in voluntary muscle. **Science**, v. 65, n. 1686, p. 401-403, 1927.
- FORLENZA, V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Psiquiatr. Clín.** v. 32, n.3, p. 137-148, 2005.
- GERONIKAKI, A.; PITTA, E. et al. Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. **Curr. Med. Chem**, v. 20, n. 36, p. 4460-4480, 2013.
- GOEDERT, M.; SPILLANTINI, G. A century of Alzheimer's disease. **Science**. v. 314, n.5800, p. 777-781, 2006.
- JOVICIĆ, E.; POPOVIĆ, M.; NESIĆ, J. et al. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the rat. **J. Alzheimers Dis.**, v. 1, n.14, p. 85–93, 2008.
- MORE, V; KUMAR, H. et al. Toxin-induced experimental models of learning and memory impairment. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 9, p. 1447, 2016.
- Oda, Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathol. Int.** v. 49, n. 11, p. 921–937, 1999.
- SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J. Neural. Trans**, v. 113, n. 11, p. 1625-1644, 2006.
- SILVA, D.; SILVA, C. et al. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiangioma activity and cytotoxicity. **Eur. J. Med. Chem**, v. 29, n. 124, p. 574-582, 2016.
- STAHL, W.L.; HARRIS, W.E.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv. Neurol.**, v. 56, n. 44, p. 681–693, 1986.