

## EFEITO *IN VITRO* DE TIAZOLIDINONAS NA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATOS

BRUNA MATTOS<sup>1</sup>; CAROLINE MACHADO<sup>2</sup>; FABIANO SOARES<sup>2</sup>; JESSICA PUREZA<sup>2</sup>; DANIELA GOUVÊA<sup>3</sup>; ROSELIA SPANEVELLO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – bruna.mtt@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – smachado.caroline@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - daniela\_gouvea@hotmail.com

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

### 1. INTRODUÇÃO

O neurotransmissor acetilcolina (ACh) possui um papel crucial no sistema nervoso participando de processos envolvendo comportamento, aprendizado e memória (Blockland, 1996). A enzima acetilcolinesterase (AChE) encontra-se presente em neurônios colinérgicos e catalisa a reação de hidrólise da ACh, possuindo um papel essencial na regulação dos eventos fisiológicos promovidos por este neurotransmissor (Grisaru, 1999; Das et al. 2001).

A AChE é atualmente um importante alvo terapêutico em muitas doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA). Os inibidores da AChE vem sendo usados para aumentar os níveis de acetilcolina e assim melhorar os déficits cognitivos característicos da doença (Davis, 1994; Anand 2013, Ferris & Farlow, 2013). Medicamentos inibidores da AChE como Tacrina, Donepezil, Rivastigmina e Galantamina constituem atualmente o tratamento sintomático de escolha para a DA, entretanto alguns ainda apresentam efeitos colaterais indesejados e custos elevados (Wilkinson et al., 2004). Sendo assim o estudo de compostos que possam interagir com a atividade desta enzima torna-se relevante na busca de melhores terapias que possam beneficiar portadores de doenças neurodegenerativas.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* o efeito de duas substâncias heterocíclicas da classe das tiazolidinonas na atividade da AChE de córtex cerebral e hipocampo de ratos.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Química

As substâncias de interesse foram sintetizadas no Laboratório de Química Aplicada à Bioativos (LaQuiABio) via reação multicomponente entre o 4-metilbenzaldeído, a 2-aminoetilpiperidina e o ácido mercaptoacético para a tiazolidinona AK26 (PP-TZ) e reação entre o 4-nitrobenzaldeído, a 2-aminoetilmorfolina e o ácido mercaptoacético para a tiazolidinona DP9 (MF-TZ).

#### 2.2. Avaliação *in vitro* das tiazolidinonas na atividade da AChE

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos (n=5) os quais foram submetidos à eutanásia e as estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) foram removidas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 10 mM. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 1000g por 10 min, e o sobrenadante obtido foi utilizado no ensaio enzimático. A atividade da AChE foi determinada de acordo

com o método de Ellman et al. (1961), o qual baseia-se em medir o aumento da absorbância à 412 nm decorrente da formação de um ânion amarelo, o ácido 5-5'-ditiosnitrobenzóico.

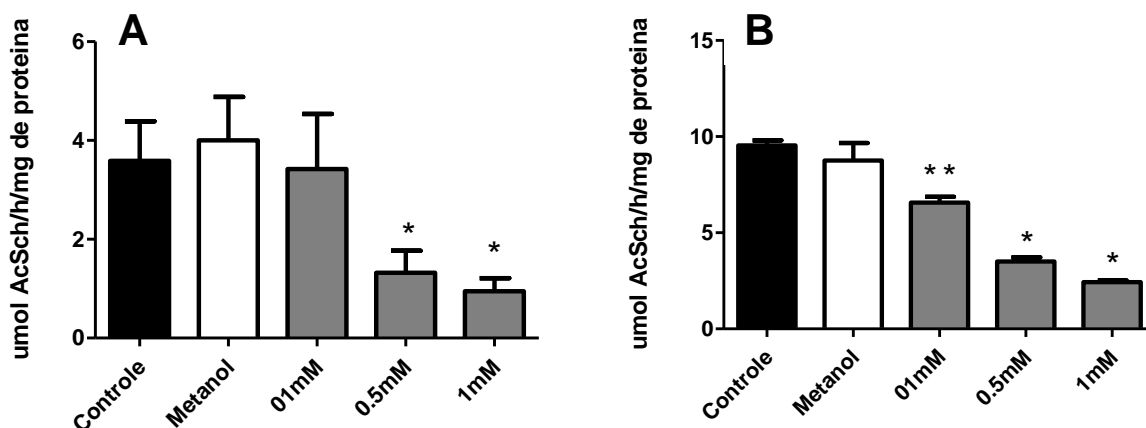
O meio de reação foi composto de 100 mM de tampão fosfato pH (7,5) e 1 mM de DTNB. A enzima foi pré - incubada por 2 minutos com diferentes concentrações das duas tiazolidinonas (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM) dissolvidas em metanol. A reação foi iniciada pela adição 0.8 mM do substrato acetilcolina e monitorada por 2 min a 412 nm em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de acetilcolina hidrolisada/hora/mg de proteína.

### 2.3. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

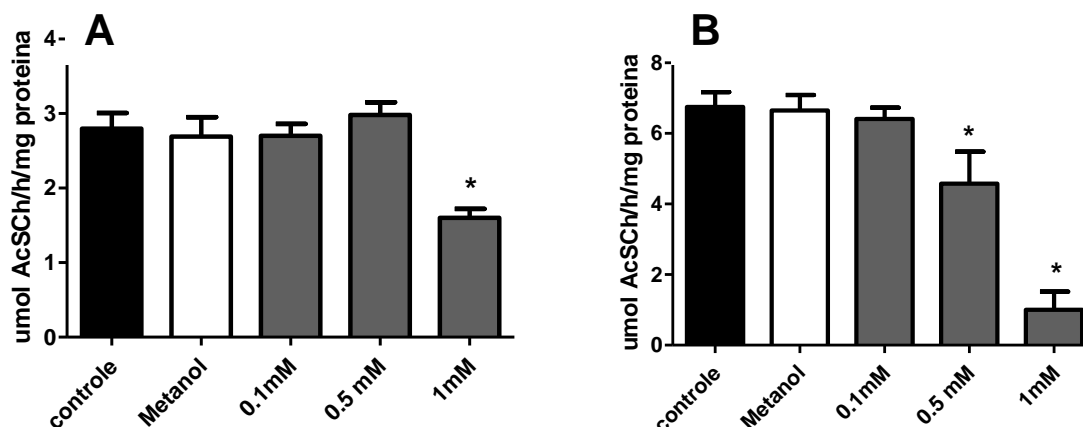
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a molécula AK26 inibiu *in vitro* a atividade da AChE em córtex cerebral nas concentrações de 0.5 mM (63%) e 1mM (73%). O mesmo efeito foi observado na AChE de hipocampo onde essa molécula causou uma inibição significativa na atividade da enzima em todas as concentrações avaliadas: 0,1mM (30%), 0,5 mM (63%) e 1mM (74%) ( $P < 0.05$ ). (Figura 1 A e B).



**Figura 1:** Efeito *in vitro* da molécula AK26 na atividade da AChE em córtex cerebral (A) e hipocampo de ratos (B). \* \*\*Diferente dos outros grupos,  $P < 0.05$ . (n=5).

A molécula DP9 também causou uma inibição significativa na atividade da AChE *in vitro*. Em córtex cerebral a atividade da AChE foi inibida somente na maior concentração avaliada (1mM - 43%) enquanto que no hipocampo essa molécula inibiu a atividade da enzima na concentração de 0.5 mM (33%) e 1mM (85%) quando comparado ao grupo controle ( $P < 0.05$ , Figura 2 A e B).



**Figura 2:** Efeito *in vitro* da molécula DP9 na atividade da AChE em córtex cerebral (A) e hipocampo de ratos (B). \* Diferente dos outros grupos,  $P < 0.05$ . (n=5).

As áreas cerebrais mais afetadas na DA são o córtex cerebral e hipocampo, regiões associadas com aprendizado e memória. Os portadores de DA têm níveis reduzidos de acetilcolina por isso inibidores de AChE são amplamente utilizados no tratamento com a finalidade de melhorar déficits cognitivos. As tiazolidinonas AK26 e DP9 avaliadas nesse estudo foram capazes de inibir a AChE tanto em córtex cerebral quanto hipocampo sugerindo que elas podem ser bons candidatos terapêuticos para o tratamento de disfunções colinérgicas associadas a doenças neurodegenerativas.

#### 4. CONCLUSÕES

As tiazolidinonas demonstraram efeitos inibitórios *in vitro* sobre a atividade da AChE em diferentes regiões cerebrais. Estudos adicionais ainda são necessários para avaliar o potencial de aplicação dessas moléculas em doenças neurodegenerativas que dependem da modulação desta enzima como, por exemplo, a DA.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, P.; SINGH, B.A. Review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res**, (4):375-399, v.4, p.375-99, 2013.

BLOCKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Res**, v. 21, p.285-300, 1996.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sci**, v.68, p.1545-1455, 2001.

DAVIS, K.L. Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's **Dis. Neuropsychopharma**, (4):258, v.4, p.258, 1994.

ELLMANN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v.7, p.88-95, 1961.

FERRIS, S.H.; FARLOW, M. Language impairment in Alzheimer's disease and benefits of acetylcholinesterase inhibitors. **Clin Interv Aging**, v.8, p.1007-1014 2013.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur J Biochem**, v.264, p.672-686, 1999.

WILKINSON, D.G.; FRANCIS, P.T.; SCHWAM, E.; PAYNE-PARRISH, J. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. **Drug Aging**, v.7, p.453-478, 2004.