



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Ação da Quinacrina, inibidor de PLA₂, sobre a proteína beta-amiloide
em modelo de Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster***

Aluno: Luiz Gabriel Alves Santos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Dr^a. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

UBERLÂNDIA – MG

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Ação da Quinacrina, inibidor de PLA₂, sobre a proteína beta-amiloide
em modelo de Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster***

Aluno: Luiz Gabriel Alves Santos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Dr^a. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S237 2020	<p>Santos, Luiz Gabriel Alves, 1994- Ação da Quinacrina, inibidor de PLA2, sobre a proteína beta-amiloide em modelo de Doença de Alzheimer em "Drosophila melanogaster" [recurso eletrônico] / Luiz Gabriel Alves Santos. - 2020.</p> <p>Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho. Coorientadora: Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.647 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962-, (Orient.). II. Azevedo, Fernanda Van Petten de Vasconcelos ,1980-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Trinta de outubro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	09:00h
Matrícula do Discente:	11822GBI009				
Nome do Discente:	Luiz Gabriel Alves Santos				
Título do Trabalho:	Ação da Quiracrina, inibidor de PLA ₂ , sobre a proteína beta-amiloide em modelo de Doença de Alzheimer em <i>Drosophila melanogaster</i> .				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INCT em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TERANANO).				

Aos trinta dias do mês de outubro de dois mil e vinte, às 08:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador), Adriana Freitas Neves e Luiz Carlos de Oliveira Júnior. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Luiz Ricardo Goulart Filho apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/10/2020, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FREITAS NEVES, Usuário Externo**, em 30/10/2020, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos de Oliveira Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/10/2020, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2358320** e o código CRC **34FEC3AE**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Ação da Quinacrina, inibidor de PLA₂, sobre a proteína beta-amiloide
em modelo de Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster***

Aluno: Luiz Gabriel Alves Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Examinadores: Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Júnior / FAMED-UFU

Prof^a. Dr^a. Adriana Freitas Neves / IBIOTEC-UFCAT

Data da Defesa: 30/10/2020

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, que sempre proveu forças para a continuidade e superação de cada desafio e obstáculo presente nessa fase.

Dedico aos meus pais, **Luiz Carlos** e **Maria Auxiliadora**, ao meu irmão **Lucas**, à minha namorada **Jéssica**, e aos meus demais familiares e amigos, que tanto serviram de apoio e estímulo para que eu chegasse até aqui, e que continuam me incentivando a seguir em frente e continuar crescendo sempre.

Ao meu avô **Sr. Sebastião Luiz**, que, em dezembro desse ano, faz um ano de falecimento, e que foi exemplo de persistência, lucidez e de trabalho duro até o final.

E em homenagem **a todos os idosos**, aqueles que sofrem com o mal de Alzheimer, bem como a todos os familiares e profissionais da saúde que lutam para prover o melhor bem-estar e sobrevida àqueles que tanto contribuíram para a sociedade. Que a ciência consiga progredir cada vez mais para tornar essa doença menos agressiva e menos recorrente na vida dos idosos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à **Universidade Federal de Uberlândia**, ao **Instituto de Biotecnologia** e ao **Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica** por gerarem a oportunidade em que fui agraciado de participar desse mestrado, bem como em fornecerem toda a estrutura física e pedagógica para que o curso fosse executado.

Agradeço imensamente ao professor responsável por esse projeto e meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**, o qual me recebeu, me deu oportunidade, acreditou e confiou em mim até o final, e ainda me fez despertar interesse em áreas as quais nunca imaginei que pudessem agregar para minha carreira científica.

Agradeço ainda à minha coorientadora, **Dra. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo**, por investir seu tempo e energia em me ajudar com essa pesquisa e estar sempre me incentivando a alcançar meu potencial e a melhorar a cada dia. Levarei comigo seu exemplo de dedicação e trabalho duro.

Agradeço à **Natieli**, que vinculada ao **Laboratório de Nanobiotecnologia** e ao curso de **Biotecnologia**, se dispôs a entrar nesse projeto e me ajudou profundamente em diversas etapas dos experimentos.

Ainda, não poderia deixar de agradecer em especial à **Serena Malta**, do **Laboratório de Genética (LABGEN)**, que foi fundamental no auxílio e nos ensinamentos em relação ao manejo e experimentação com *Drosophila melanogaster*, além de auxiliar nas demais etapas dos experimentos, os quais seriam impossíveis de serem concluídos sem ela.

Agradeço também aos laboratórios e professores parceiros, os quais abriram suas portas e contribuíram para essa realização: **Prof. Dr. Nilson Nicolau Jr.**, do **Laboratório de Modelagem Molecular**, agradeço pelo tempo dedicado em me ensinar um pouco sobre modelagem e *docking* molecular. Ao **Prof. Dr. Foued**

Salmen Espindola, o qual disponibilizou o **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI)** para os ensaios bioquímicos, com a ajuda de quem virou um grande amigo, o **Heitor**. Ao **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**, que disponibilizou o **Laboratório de Nanobiotecnologia** para realização do teste de Metabolômica, com ajuda da **Paula, Larissa e Mário**. Ao **Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira**, o qual disponibilizou um dos espaços em que passei grande parte do tempo e que me agregou imensamente, que foi o **LABGEN**, onde contei com grande ajuda da **Serena, Alice, Heitor, Natieli e Victória**, e todos os demais membros do laboratório que contribuíram para a execução dos experimentos com *Drosophila*, e que se tornaram amigos e parceiros. Agradeço intensamente.

Agradeço à mestra **Lorena Polloni**, pelos treinamentos, pela ajuda e conselhos que tive no início do mestrado, junto ao **Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX)** e à professora **Dra. Veridiana Ávila**, a qual guardo com carinho os ensinamentos que tive em sua disciplina e a consideração que cultivamos um pelo outro.

Ao **Laboratório de Morfologia e Cultura Celular**, do **Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)**, coordenado pela professora **Dra. Renata Zanon**, meus profundos agradecimentos pelos ensinamentos e aperfeiçoamentos na linha de neurociência.

Agradeço a todos os professores que lecionaram para mim nesse mestrado e que, em algum detalhe, contribuíram para minha dissertação e para meu conhecimento como pesquisador, mas principalmente, à professora **Dra. Rute Brito**, que foi minha supervisora de estágio em docência e permitiu, junto à professora **Dra. Ana Maria Bonetti (responsável pela disciplina do estágio)**, que eu ajudasse e lecionasse na disciplina de Genética Veterinária do curso de Medicina Veterinária da UFU, minha eterna casa de formação.

Ao **Laboratório de Nanobiotecnologia**, agradeço a todos que em algum momento contribuíram para minha caminhada, em especial a **Luciana**, que sempre esteve à disposição para o fornecimento de materiais e para qualquer dúvida que eu tivesse.

À **Natássia**, que foi a primeira a me treinar nos ambientes internos do laboratório e que virou amiga e conselheira para qualquer momento que eu precisar. Aos amigos e colegas que fiz e que sempre estão dispostos a me ajudar e a torcer por mim: **Gabriela, Antonielle, Douglas, Sara, Esther, Mariana Zóia, Fernanda** e a todos que, em algum momento, tiveram comigo alguma interação e puderam contribuir para a minha jornada.

Às Agências de Fomento, FAPEMIG, CNPq e principalmente **CAPES**, por financiarem essa pesquisa e minha pós-graduação.

À todos, meu “muito obrigado”!

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	A Doença de Alzheimer.....	15
1.1.1	Aspectos gerais.....	15
1.1.2	Epidemiologia.....	16
1.1.3	Etiopatogenia	18
1.1.4	Hipótese amiloidogênica (A β) e a Doença de Alzheimer (DA)	20
1.1.5	Terapias existentes para Doença de Alzheimer	22
1.2	Fosfolipase A ₂	24
1.2.1	Aspectos gerais.....	24
1.2.2.	A hipótese da β -amiloide em Doença de Alzheimer e a PLA ₂	26
1.2.2	Inibidor de PLA ₂	28
1.3	Doenças neurodegenerativas e modelos <i>in vivo</i> de estudo	31
1.3.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	32
2.	OBJETIVO GERAL.....	36
2.1.	Objetivos Específicos	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1.	Modelagem e <i>docking</i> molecular.....	37
3.2.	Predição farmacocinética e toxicológica da QNC.....	37
3.3.	Obtenção das linhagens de moscas utilizadas.....	37
3.4.	Cruzamento para geração do modelo mimético ao de DA.....	38
3.5.	Preparação da Quinacrina	39
3.6.	Ensaio de toxicidade	40
3.7.	Avaliação comportamental por teste locomotor.....	40
3.8.	Quantificação de β -amiloide por teste de Tioflavina T.....	43
3.8.1.	Coleta de amostras	43

3.8.2.	Quantificação de proteína total por Bradford	43
3.8.3.	Preparo da solução de Tioflavina T e da amostra	43
3.8.4.	Quantificação de β -amilóide	44
3.8.5.	Análise estatística.....	44
3.9.1.	Coleta de amostra	44
3.9.2.	Extração dos metabólitos	45
3.9.3.	Análise de IES/EM por infusão direta	45
3.9.4.	Identificação e análise estatística dos metabólitos.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1.	Modelagem e <i>docking</i> molecular.....	47
4.3.	Predição farmacocinética e toxicológica da QNC.....	49
4.3.1.	Absorção intestinal (em humanos)	51
4.3.2.	Permeabilidade e sensibilidade epidérmica	51
4.3.3.	Substrato de Glicoproteína-P	52
4.3.4.	Permeabilidade na BHE e no SNC.....	53
4.3.5.	Dose máxima tolerável	54
4.4.	Ensaio de toxicidade da QNC	55
4.5.	Ensaio locomotor.....	57
4.6.	Quantificação de β -amiloide por Tioflavina T	60
4.7.	Ensaio de metabolômica	62
5.	CONCLUSÃO	68
	Referências Bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Fatores ambientais e genéticos na Doença de Alzheimer	18
Figura 2 - Processamento de PPA nas células do SNC	21
Figura 3 - Sítio de clivagem do glicerofosfolípídeo pelas diferentes fosfolipases	25
Figura 4 - Estrutura química da Quinacrina	29
Figura 5 - Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Figura 6 - Representação esquemática do cruzamento entre as linhagens elav-Gal4, UAS-GFP (fêmeas virgens) e UAS-BACE, UAS-PPA (machos)	39
Figura 7 - Imagem fotográfica dos grupos de tratamento de QNC no suporte para o teste de escala	41
Figura 8 - Estrutura do <i>docking</i> entre Dmel sPLA ₂ -III e a QNC	47
Figura 9 - Diagrama bidimensional do complexo sPLA ₂ -QNC	48
Figura 10 - Ensaio de toxicidade com QNC em Dmel w ¹¹¹⁸	55
Figura 11 - Ensaio de toxicidade com QNC em Dmel <i>AD-like</i>	56
Figura 12 - Gráficos da escalada de perfil “sintomático”	58
Figura 13 - Gráficos da escalada de perfil “pré-sintomático”	59
Figura 14 - Gráfico do ensaio de quantificação de A β	61
Figura 15 - <i>Heatmap</i> com presença e expressão dos metabólitos nas amostras de Dmel tratadas e não tratadas com QNC	63
Figura 16 - Esquema hipotético da via de ativação e ação de algumas das PLA ₂ por meio de oligômeros de A β e a ação da QNC sobre elas	66

LISTA DE ABREVIATURA

Aβ	<i>Amyloid-β protein</i> – Proteína β -amiloide
AA	Ácido araquidônico
AACOCF₃	Araquidonil-trifluorometil-cetona
AICD/AID	<i>Amyloid intracellular domain</i> – Domínio intracelular de amiloide
APOE	Apolipoproteína E
APP	<i>Amyloid precursor protein gene</i> – Gene da proteína precursora de amiloide
BACE	<i>β-site APP-cleaving enzyme</i> – β -secretase
Ca²⁺	Íons cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
COX-2	Ciclooxigenase-2
cPLA₂	PLA ₂ citosólica
d.p.e.	Dias pós eclosão
DA	Doença de Alzheimer
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i>
Elav	<i>Embryonic lethal abnormal visual system</i> – Sistema visual anormal letal embrionário
FCT	Fragmento carboxiterminal
FXTAS	Síndrome de tremor/ataxia associada ao x frágil
IL	Interleucina
LPC	Lisofosfatidilcolina
MAFP	Metil-araquidonil-fluorofosfonato
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPT	<i>Microtubule-associated protein tau gene</i> – Gene da proteína tau associada a microtúbulo
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear kappa B
PG	Prostaglandinas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinase A

PLA₂	<i>Phospholipase A₂</i> – Fosfolipase A ₂
PSEN1	Gene da presenilina 1
PSEN2	Gene da presenilina 2
PPA	Proteína precursora de amiloide
QNC	Quinacrina
RD	Reposicionamento de droga
SNC	Sistema Nervoso Central
sPLA₂	Fosfolipase A ₂ (PLA ₂) secretada
sPPA	Forma solúvel de PPA
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i> – Fator de necrose tumoral α

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo, que resulta em déficit cognitivo e motor, além de não possuir cura. Ela está associada com a via de produção do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), derivado da proteína precursora de amiloide (PPA) e da enzima que cliva essa proteína, produzindo a $A\beta$, β -secretase (BACE). Estudos recentes evidenciam a relação entre a produção de $A\beta$ e o acúmulo dessa molécula que resulta na formação de oligômeros, com a presença da enzima fosfolipase A_2 (PLA₂). Considerando a limitação na descoberta de novos fármacos que regulem essa doença, novas alternativas vêm sendo estudadas, dentre elas a quinacrina, que é um inibidor de PLA₂ e a relação na regulação da proteína β -amiloide. Associado a isso, o presente estudo foi feito em *Drosophila melanogaster*, o qual é um modelo que expressa os genes PPA e BACE. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação da quinacrina sobre a proteína beta-amiloide em modelo de Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*. Foram obtidos resultados preliminares *in silico* da PLA₂ de *Drosophila* com a molécula de quinacrina. Posteriormente foi feita predição farmacocinética desse fármaco, que nos possibilitou observar parâmetros farmacocinéticos em sistemas pré-estabelecidos, como o de absorção intestinal e permeabilidade no sistema nervoso central. Essa análise revelou que a quinacrina possui similaridades com o fármaco mais utilizado hoje contra Alzheimer, que é a rivastigmina. Observamos também que a quinacrina não foi capaz de causar toxicidade em modelo de *Drosophila* durante o tratamento de sobrevivência, nas concentrações de 6,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, e promoveu aumento de escalada no ensaio locomotor, principalmente na menor dose de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, bem como reduziu os níveis de β -amiloide por ensaio bioquímico nessa mesma concentração, e alterou a expressão de nove metabólitos nessa mesma concentração em relação ao grupo controle na análise de grupos metabólicos (metabolômica). Com isso, verificou-se que a quinacrina possui um grande potencial em regular e inibir $A\beta$, através da inibição de PLA₂ em modelo mimético à doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Fosfolipase A_2 . *Drosophila melanogaster*. Quinacrina. Proteína Beta-Amiloide.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease that results in cognitive and motor deficit and it also has no cure. It is associated with the production pathway of the peptide amyloid- β ($A\beta$), derived from the amyloid precursor protein (APP) and the enzyme that cleaves this protein, producing $A\beta$, is the β -secretase (BACE) enzyme. Recent studies show the relationship between the production of $A\beta$ and the accumulation of this molecule with forms oligomers, with the presence of the phospholipase A_2 enzyme (PLA_2). Considering the limitation in the discovery of new drugs that regulate this disease, new alternatives have been studied, including quinacrine, which is a PLA_2 inhibitor, and the relationship in the regulation of amyloid- β protein. Therefore, this study has been done in *Drosophila melanogaster*, which is a model that expresses the *APP* and *BACE* genes. The objective of this research has been to evaluate the action of quinacrine on amyloid-beta protein in Alzheimer's Disease model in *Drosophila melanogaster*. Preliminary results have been obtained *in silico* of *Drosophila's* with the quinacrine molecule. Later, a pharmacokinetic prediction of this drug has been made, that allowed us to observe pharmacokinetic parameters in pre-established systems, such as intestinal absorption and permeability in the central nervous system. This analysis revealed that quinacrine has similarities with the drug most used today against Alzheimer, which is rivastigmine. We also observed that quinacrine was not able to cause toxicity in *Drosophila* model during survival treatment, at concentrations of 6.25 to 200 $\mu\text{g/mL}$, and promoted an increase in climbing in the locomotor assay, mainly at the lowest dose of 6.25 $\mu\text{g/mL}$, as well as reduced amyloid- β levels by biochemical assay in that same concentration, and altered the expression of nine metabolites in this same concentration in relation to the control group in the analysis of metabolic groups (metabolomics). It was found that quinacrine has a great potential to regulate and inhibit $A\beta$, through the inhibition of PLA_2 in a mimetic model of Alzheimer's Disease in *Drosophila melanogaster*.

Key words: Alzheimer's Disease. Phospholipase A_2 . *Drosophila melanogaster*. Quinacrine. Beta Amyloid Protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Alzheimer

1.1.1 Aspectos gerais

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa presente no sistema nervoso central (SNC) e é caracterizada pelo aumento progressivo na perda de memória e de déficits cognitivos, com manifestação mais frequente a partir dos 65 anos de idade (SMALL; MAYEUX, 2011).

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas como patologias que envolvem a destruição progressiva e irreversível dos neurônios, que são células responsáveis pelas principais características do sistema nervoso, que consiste na recepção, transmissão e processamento de estímulos, como a transmissão sináptica, bem como a formação de redes e circuitos neurais. Além disso, são responsáveis pela formação estrutural do sistema nervoso, como a substância cinzenta, composta do corpo celular neuronal, e a substância branca e fibras nervosas, compostas de prolongamentos dos neurônios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SMALL; MAYEUX, 2011). As consequências desses processos neurodegenerativos estão relacionadas com redução ou perda de função motora e/ou cognitiva (SMALL; MAYEUX, 2011).

As alterações neurodegenerativas estão relacionadas também com a degradação de subconjuntos de neurônios com funções específicas, sendo que muitos desses transtornos estão relacionados com acúmulo anormal de proteínas anormais no ambiente intra- ou extracelular, proteínas essas que podem atuar como marcadores histológicos/moleculares. Por exemplo: a proteína beta amiloide (A β) e a proteína Tau, presentes na DA, e a proteína Tau presente também na degeneração lobar frontotemporal e degeneração corticobasal respectivamente (FROSCH, 2013).

Frosch (2013) descreveu também que as doenças neurodegenerativas, assim como outras doenças que acometem o SNC, provocam sintomas relacionados com a região específica a qual o encéfalo é afetado, como: neurônios afetados na região gânglio basal resultam em transtornos de movimentos; enquanto que os afetados na região cerebelar resultam em ataxia;

e principalmente no caso da DA, está relacionada com neurônios afetados na região cortical do cérebro, o qual resulta em redução progressiva e perda de memória, linguagem, conhecimento e planejamento, ou seja, são déficits cognitivos característicos do quadro geral de *Demência*, presente não somente na DA, mas em qualquer outra enfermidade que possa lesionar os neurônios dessa região (SHARMA et al., 2019).

Com o aumento da longevidade nos seres humanos, associada com uma melhora na qualidade de vida, o surgimento de outras enfermidades relacionadas com o declínio cognitivo, a exemplo das demências e demais doenças neurodegenerativas relacionadas com o processo de envelhecimento, têm crescido exponencialmente. A exemplo disso encontra-se a demência, que é uma das maiores causas de morbidade em idosos e sua prevalência acomete entre 2% a 25% dos pacientes com 65 anos ou mais. A Doença de Alzheimer é considerada a causa mais comum de demência no idoso, com apresentação clínica e patológica bem definidas (DE ABREU; FORLENZA; DE BARROS, 2005; MARINHO; LAKS; ENGELHARDT, 1997; ROZENTHAL; ENGELHARDT; LAKS, 1995).

1.1.2 Epidemiologia

Com aumento da qualidade de vida e da longevidade, é comum surgirem patologias derivadas da senescência celular, entre elas estão as demências e doenças neurodegenerativas (DE ABREU; FORLENZA; DE BARROS, 2005). Na década de 40 a média de expectativa de vida dos brasileiros em geral era de 42,9 anos para os homens e 48,3 anos para as mulheres. Em 2018 houve um aumento médio de 30,8 anos na expectativa de vida, sendo 72,8 anos para homens e 79,9 para mulheres (IBGE, 2019). Além disso, para pessoas residentes nos Estados Unidos, em 1900 a expectativa era de 50 anos no geral. Em 2013, porém, a expectativa aumentou em 76 anos para homens e 81 anos para mulheres. Esses aumentos foram resultados de vários fatores, como: redução de mortalidade infantil, desenvolvimento de antibióticos e vacinas, melhora da saúde pública, saneamento básico e nutrição e etc. (SANES; JESSELL, 2014).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017), cerca de 50 milhões de pessoas no mundo possuem demência, sendo que 60% dessas são residentes em países em desenvolvimento. Estima-se que por ano surgem aproximadamente 10 milhões de novos casos, como também existe uma projeção que descreve que em 2030 o número de pessoas com demência chegue a 80 milhões e em 2050 atinja o número de 152 milhões de pessoas acometidas por essa doença. Existem diversas formas de demências, mas a DA é a mais comum, presente entre 60 a 70% dos casos (OPAS, 2017).

De acordo com a *Alzheimer's Disease Internacional* (ADI), em 2015, 12,88 (28% do total) milhões de pessoas pertencentes aos países do grupo G7 (Canadá, França, Alemanha, Reino Unido, Itália, Japão e Estados Unidos) desenvolveram algum tipo de demência, enquanto que 37,47 (80%) milhões de pessoas com o mesmo conjunto de enfermidades eram do grupo pertencente ao G20, na qual o Brasil é membro (PRINCE *et al.*, 2015).

Além disso, em 2009 ocorreram 1.003 óbitos de pessoas do gênero masculino no Brasil, tendo a Doença de Alzheimer como causa básica e com taxa de mortalidade de 52,8% por 100 mil habitantes, enquanto que para pessoas do gênero feminino ocorreram 2.039 óbitos, com taxa de mortalidade de 67,9% (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Esse estudo foi realizado com população acima de 59 anos.

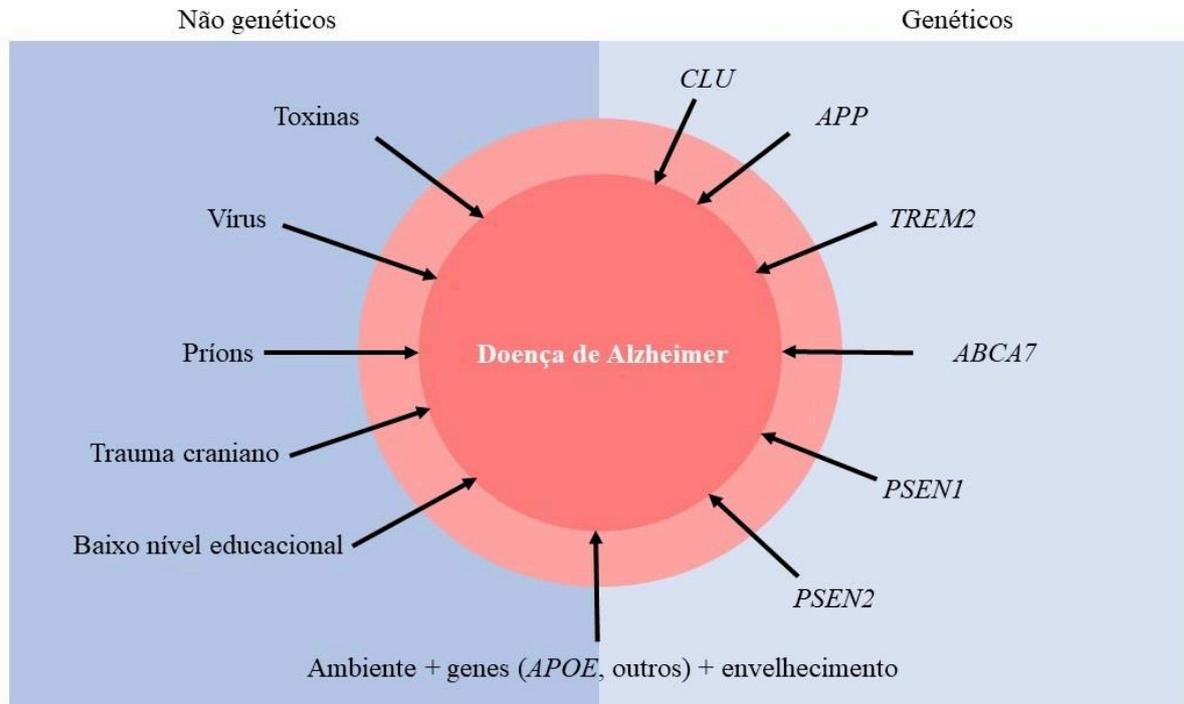
Tendo em vista a prevalência e ocorrência da Doença de Alzheimer nas diferentes regiões do mundo e de grupos demográficos, é importante analisar os fatores de risco associados com a patogênese dessa doença.

Existem diversos fatores de riscos relacionados à DA, porém é importante destacar que não são causas específicas dessa doença, e que sua ocorrência pode estar relacionanda à outras comorbidades, como: diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo, hipertensão, depressão, tabagismo e também baixo nível educacional (fator esse que pode não ser apenas individual, mas também fator de risco coletivo) (NORTON *et al.*, 2014; SANES; JESSELL, 2014).

Associado a esses fatores, existe também o fator genético, que está relacionado com o polimorfismo do gene que codifica a apolipoproteína E (APOE) (Fig.1). Essa alteração genética está presente na maioria dos casos, porém

existem também em menor quantidade, alterações associadas à outros genes, como o *TREM2*, *ABCA7*, *CLU* e entre outros (MASTERS et al., 2015).

Figura 1 - Fatores ambientais e genéticos na Doença de Alzheimer.



Relação geral entre os fatores de risco que promovem a DA, desde mecanismos não-genéticos, exemplificado por toxinas, vírus e fatores sociais, à mecanismos genéticos, como mutações em genes como o *APP*. Fonte: (MASTERS et al., 2015; SANES; JESSELL, 2014) (Adaptado).

A figura 1 demonstra possíveis fatores de risco envolvidos com a ocorrência da Doença de Alzheimer e ilustra os fatores que envolvem alterações nos genes, como fatores externos, envolvendo microrganismos (vírus e toxinas bacterianas), traumas mecânicos, associado ao nível social, revelando assim uma heterogeneidade de fatores que podem promover essa doença (MASTERS et al., 2015; SANES; JESSELL, 2014).

1.1.3 Etiopatogenia

Atualmente a principal causa da Doença de Alzheimer é a causa genética, ainda que existem outras causas pouco conhecidas e também considerando outros fatores de risco anteriormente descritos (SMALL; MAYEUX, 2011).

Nesse sentido, foi relatado que no geral, existem quatro principais de genes relacionados com a ocorrência da DA, sendo: mutação no gene da proteína precursora de amiloide (*APP*), localizada no cromossomo 21; mutações existentes no gene da presenilina 1 (*PSEN1*) no cromossomo 14; mutação no gene da presenilina 2 (*PSEN2*) no cromossomo 1; e a isoforma APOE4 da proteína codificada pelo gene *APOE* no cromossomo 19 (Fig. 1) (MASTERS et al., 2015; SANES; JESSELL, 2014).

As mutações referentes aos três primeiros genes citados acima estão relacionadas com o acúmulo e agregação de um peptídeo denominado A β (do inglês: *amyloid β*) e relacionadas também com uma forma autossômica dominante da doença, que se manifesta de forma precoce antes dos 50 anos de idade. A isoforma APOE4 está relacionada com as formas esporádicas e familiares mais típicas da doença, que se manifestam depois dos 60 anos de idade, e além disso, essa alteração também não é considerada uma “mutação”, e sim uma variante que ocorre de forma “natural” com o envelhecimento (SMALL; MAYEUX, 2011).

Além de mutações presentes no gene *APP*, a Doença de Alzheimer também está envolvida com outras vias, como a via da proteína Tau presente nos axônios, e até 2014 não foram encontradas mutações referentes ao gene que codifica essa proteína (SANES; JESSELL, 2014). Recentemente, o gene que codifica a proteína Tau foi identificado como *MAPT* (do inglês: *microtubule-associated protein tau gene*) e codifica no cérebro humano seis principais isoformas dessa proteína, dentre as quais ficam presentes nos microtúbulos dos axônios e contribuem para a movimentação axonal e plasticidade sináptica, todavia, ocorrem alterações bioquímicas nessas moléculas em algumas patologias, tornando-as insolúveis no meio e participando de processos neurotóxicos por meio de agregações neurofibrilares (GULISANO et al., 2018; SANES; JESSELL, 2014).

Estudos recentes revelaram mutações no gene *MAPT* relacionadas com as taupatias, doenças relacionadas com desregulação dessa proteína, causando Demência Frontotemporal e Degeneração Corticobasal, sugerindo uma possível relação também com a Doença de Alzheimer, ainda que precise ser melhor estudada (GULISANO *et al.*, 2018). Além disso, diferentes pesquisadores consideraram a contribuição da proteína Tau para a patogenia da DA em caráter

pós-traducional, como hiperfosforilação e ubiquitinação (CHIDAMBARAM; CHINNATHAMBI, 2020; JAGUST, 2018).

Considerando as diversas vias e hipóteses que contribuem para a ocorrência e desenvolvimento da DA, abordaremos melhor a hipótese da A β , a qual está relacionada com agregação do peptídeo beta amiloide, visto que participa de uma cascata diretamente relacionada com o modelo experimental apresentado neste trabalho, e que também é relacionada na literatura, como [do latim]: *primum movens*, ou seja, raiz da causa ou raiz do problema da DA, e a cascata da proteína Tau seria *downstream* à da A β (GULISANO *et al.*, 2018).

1.1.4 Hipótese amiloidogênica (A β) e a Doença de Alzheimer (DA)

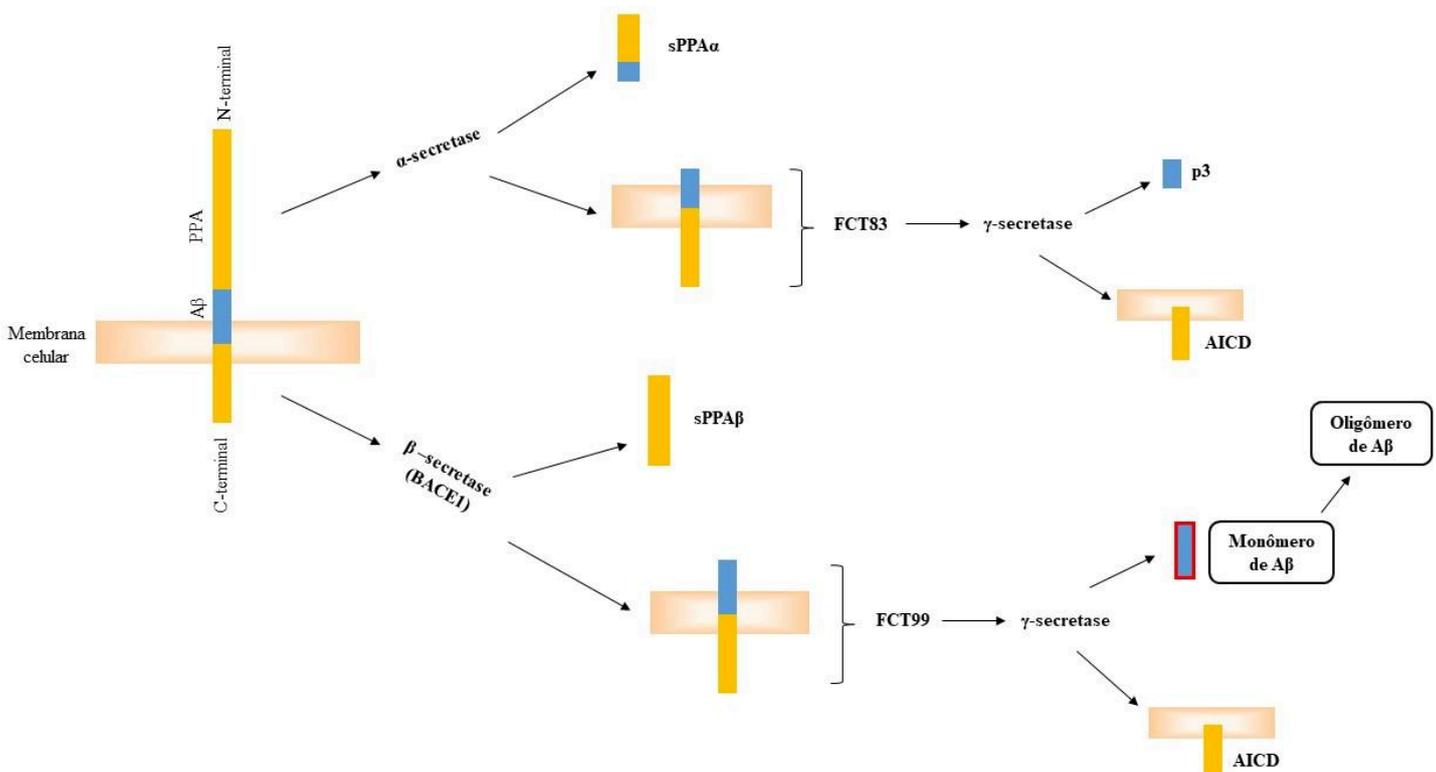
O gene *APP* é a região do DNA que codifica a proteína precursora de amiloide (PPA ou APP do inglês: *amyloid precursor protein*) e está localizado no cromossomo 21, sendo esse processo a etapa inicial na hipótese amiloidogênica ou teoria da cascata de A β (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE - US, 2020).

Essa molécula é uma glicoproteína transmembrana presente em diversos tecidos, principalmente no cérebro, seja nos dendritos, axônios e corpos celulares neuronais, como também em várias células não-neuronais, e após sua formação, ela é clivada em formas solúveis de PPA (sPPA), peptídeos intracelulares AICD/AID (do inglês: *amyloid intracellular domain*) e peptídeos A β que variam entre 38 e 43 aminoácidos, sendo o A β ₄₀ o mais comum e o A β ₄₂ (ou A β ₁₋₄₂) encontrado em menores concentrações e relacionado com a formação de monômeros e oligômeros de A β ₄₂, os quais possuem propriedade neurotóxicas e formam agregações e formações de placas amiloides (ou placas senis), que progridem para DA (BARAGE; SONAWANE, 2015; GULISANO *et al.*, 2018; MAWUENYEGA *et al.*, 2013; SANES; JESSELL, 2014; ZHANG *et al.*, 2011).

Jiang *et al.* (2014) e Yukel & Tacal (2019) fizeram uma revisão sobre tráfego e processamento proteolítico da PPA, demonstrando que existe uma translocação dela do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, também denominado de rede Golgi/trans-Golgi e que posteriormente ela se fixa na membrana plasmática da célula (JIANG *et al.*, 2014; YUKSEL; TACAL, 2019). Quando as moléculas de PPA ficam altamente retida na célula, proteases são recrutadas para clivar a proteína precursora de amiloide e ao final da cascata,

gerar moléculas que serão solúveis e irão desempenhar também funções de neuroproteção no Sistema Nervoso Central, por outro lado, esse processo também pode gerar formas insolúveis e neurotóxicas derivadas de PPA (JIANG *et al.*, 2014; YUKSEL; TACAL, 2019). As principais enzimas envolvidas nessa clivagem são: α -secretase, β -secretase (também chamada de BACE ou BACE1, do inglês: *β -site APP-cleaving enzyme*) e γ -secretase, que é responsável pela clivagem dessa glicoproteína em um sítio específico e região específica da célula (Fig. 2) (YUKSEL; TACAL, 2019).

Figura 2 - Processamento de PPA nas células do SNC.



As barras alaranjadas representam a PPA e seus fragmentos carboxiterminal (FCT); as barras azuis representam a sequência de aminoácidos relacionados ao peptídeo A β e o produto dele na via da α -secretase, que é o p3. Ao final a barra azul com contorno vermelho, representa monômero neurotóxico de A β que posteriormente sofrerá agregação com formação de oligômeros dessa molécula, produzindo neurotoxicidade no meio. Fonte: Autoral e adaptado (BARAGE; SONAWANE, 2015; GULISANO *et al.*, 2018; YUKSEL; TACAL, 2019).

A α -secretase cliva a PPA localizada na membrana plasmática, gerando seu produto solúvel, que é a sPPA α e fragmento carboxiterminal (FCT ou C-terminal) (Fig. 2), sendo FCT83 também solúvel, enquanto que a BACE1 cliva a

PPA localizada na membrana dos endossomos, que quando sofre internalização pela célula, produz sPPA β e FCT99 (ou FCT β). A γ -secretase possui a função de clivar os FCTs gerados, produzindo AICD/AID, além de pequenos peptídeos p3 a partir de FCT83 e monômeros de A β a partir de FCT99 (Fig. 2), sendo os principais A β ₄₀, que não estão relacionados com neurotoxicidade e os peptídeos A β ₄₂ relacionados com neurotoxicidade (BARAGE; SONAWANE, 2015; GULISANO *et al.*, 2018; YUKSEL; TACAL, 2019).

Após a exocitose de monômeros de A β ₄₂ em cérebros já idosos e propensos à DA, essas moléculas ficam elevadas no meio extracelular e passam a se agregar, formando os oligômeros, agregados e placas amiloides, com as respectivas alterações patológicas, como estresse oxidativo, neuroinflamação, atrofia cerebral e declínio cognitivo (CASELLI; KNOPMAN; BU, 2020; FROSCHE, 2013; SANES; JESSELL, 2014).

Além de ser conhecido na literatura essa migração dos monômeros de A β em placas senis, também vem sendo relatado mais dois pontos: a importância dos oligômeros dessa molécula para neurotoxicidade e declínio cognitivo independente da formação das placas, o que ocorre, por exemplo, na Doença de Alzheimer Familiar, causada pela mutação E693 Δ (Osaka) no gene *APP*, e também a relação desses oligômeros com a desregulação lipídica no SNC e com a atividade geral da fosfolipase A₂ (PLA₂ – do inglês: *phospholipase A2*) nesse tecido (BARUPAL *et al.*, 2019; PALAVICINI *et al.*, 2017; SAGY-BROSS *et al.*, 2015).

1.1.5 Terapias existentes para Doença de Alzheimer

Atualmente existem alguns fármacos que são utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer, sendo os principais pertencentes a classe dos inibidores de colinesterase, como a Rivastigmina, Donepezila e Galantamina, no qual a Rivastigmina está presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e é fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em sua forma de pílula e adesivo transdérmico (BRASIL, 2018; SMALL; MAYEUX, 2011).

Essa classe está relacionada com outra via molecular da DA, que é a via colinérgica, a qual é um dos principais mecanismos relacionados com a

transmissão sináptica e formação de memória, e que também se torna alterada nessa doença, provavelmente em função de estresse oxidativo e das diversas causas e fatores que promovem a Doença de Alzheimer (HAMPEL *et al.*, 2018).

Além disso, ainda que os fármacos mais usados hoje para a DA sejam inibidores dessa via, eles não são considerados como “curas” *in situ*, mas agentes que aliviam os sinais clínicos e promovem uma melhora na qualidade de vida (HAMPEL *et al.*, 2018; LOERA-VALENCIA *et al.*, 2019).

Diversas pesquisas vêm estudando novos alvos terapêuticos e realizando estudos clínicos com outros fármacos que possam ser mais específicos para essa doença, porém isso se torna complexo devido à heterogeneidade fenotípica e genética da DA e de vias moleculares associadas a ela, dificultando a descoberta e aprovação de drogas que possam atingir mais de uma via e obter maior controle da doença (BARAGE; SONAWANE, 2015; HAMPEL *et al.*, 2018).

Nesse sentido, nas últimas décadas uma nova metodologia vem sendo utilizada para simplificar e acelerar esse processo, que é classificada como reposicionamento de drogas (RD), a qual aborda o uso de fármacos já existentes na indústria farmacêutica e no mercado, aprovados ou não por agências reguladoras, mas que foram produzidos para uma doença em específico. Com base em seu mecanismo de ação, esses fármacos são testados em outras doenças e vias moleculares, os quais podem validar ou não sua eficácia em outras patologias, e contribuir substancialmente para o *screening* de drogas em modelos experimentais, estudos pré-clínicos e clínicos (IHARA; SAITO; FRIEDLAND, 2020).

A vantagem desse método é que não é necessária a produção de um novo fármaco do “zero”, como é feito de forma convencional e nem demandar tempo avaliando sua estrutura e estabilidade química, considerando que esse trabalho já foi feito anteriormente, o que gera economia e rapidez para o processo (IHARA; SAITO; FRIEDLAND, 2020; PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

Como observamos em relação à Doença de Alzheimer, foi visto a complexidade de estabelecer um fármaco eficiente para a doença, então atualmente vem sendo avaliadas diversas drogas para diferentes alvos dessa doença, sendo que, de todos os estudos clínicos ocorrendo atualmente para DA no mundo, aproximadamente 30% ocorrem por meio desse tipo de reposicionamento (RD), a exemplo do protocolo inicialmente criado para

hipertensão e hipercolesterolemia, que é de Losartana + Amlopidina + Atorvastatina, e outro criado para diabetes composto Metformina que já estão em fase III de estudos clínicos, além de vários outros também presentes nessa fase, além da fase I e II (CUMMINGS *et al.*, 2019; IHARA; SAITO; FRIEDLAND, 2020).

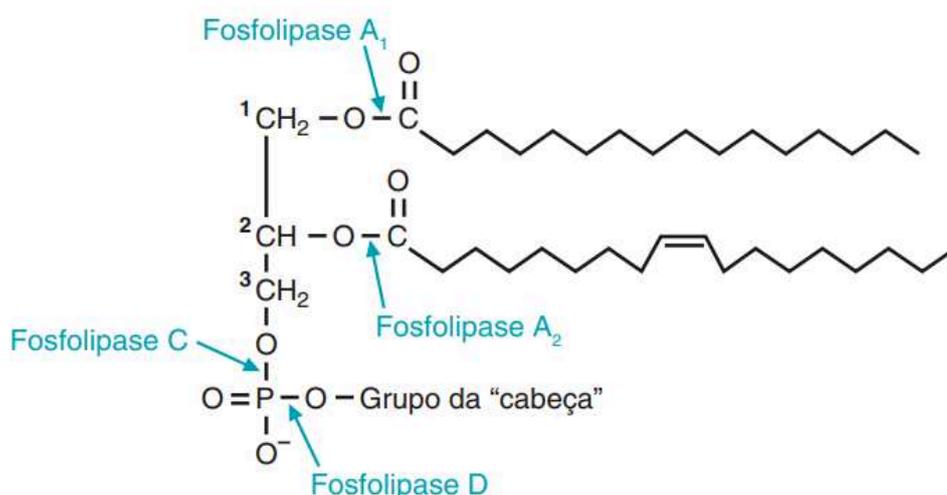
Diante disso, uma classe de fármaco que possui forte potencial em contribuir para o tratamento ou descoberta de uma nova via de sinalização da Doença Alzheimer é classificado como inibidores de fosfolipase A_2 . A via bioquímica relacionada com essa fosfolipase vem sendo fortemente descrita e associada com a Doença de Alzheimer, tanto pela análise de pacientes humanos, quanto em modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como, vem sendo associada também com outros processos neurodegenerativos, envolvendo formação do ácido araquidônico e de mediadores inflamatórios os quais resultam em um ambiente de degradação celular, proteica, estresse oxidativo e morte celular. (FAROOQUI *et al.*, 2005; FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006; ONG *et al.*, 2015; SANCHEZ-MEJIA *et al.*, 2008; TENG *et al.*, 2019).

1.2 FOSFOLIPASE A_2

1.2.1 Aspectos gerais

A fosfolipase A_2 (PLA_2) é uma enzima chave no metabolismo dos fosfolipídeos, que contribuem para constituição das membranas celulares. A PLA_2 exerce sua ação através da clivagem do ácido graxo na posição sn=2 desses fosfolipídeos ou glicerofosfolipídeos, hidrolisando a ligação entre a posição 2 do ácido graxo e do glicerol (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007). Essa hidrólise libera como produto o ácido araquidônico e lisofosfolipídeos, que após modificações bioquímicas, se transformam em compostos ativos denominados eicosanóides, prostaglandinas e leucotrienos respectivamente, como representados na Figura 3. É importante relatar que existem outros tipos de fosfolipases que clivam o ácido graxo em diferentes posições do glicerofosfolipídeo e que muitas vezes são responsáveis por sua denominação (ONG *et al.*, 2015; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Figura 3 - Sítio de clivagem do glicerofosfolípídeo pelas diferentes fosfolipases



Fonte: (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007)

Atualmente existem mais de 20 isoformas da fosfolipase A₂ subdivididas em média de 11 grupos que se distribuem nas diversas espécies, como mamíferos, insetos e serpentes, e nos mamíferos as principais fosfolipases identificadas no sistema nervoso central são do grupo II e III, as quais são as sPLA₂, e do grupo IV, que é a cPLA₂ (SIX; DENNIS, 2000; YAGAMI; YAMAMOTO; KOMA, 2014).

As principais isoformas que serão abordadas nesse trabalho serão: cPLA₂, sPLA₂-IIA e sPLA₂-III.

A cPLA₂, também chamada de PLA₂ citosólica ou PLA₂ do grupo IV, é uma fosfolipase presente na maior parte das células de mamíferos, possui como principal aminoácido em seu sítio ativo a serina, e sua ativação ocorre no citoplasma dessas células, mediante influxo de Ca²⁺, fosforilação por MAPK (do inglês: *mitogen-activated protein kinase*) e/ou mediante resposta à cascatas de sinalização interna, além de estar elevada no tecido cerebral (FAROOQUI et al., 2005; MURAKAMI et al., 2017; SIX; DENNIS, 2000). Essa fosfolipase possui massa molecular de aproximadamente 85 kDa e foi inicialmente descoberta em humanos, na década de 90, e posteriormente seu cDNA foi clonado também em camundongos, ratos, galinhas e *zebrafish* (MURAKAMI et al., 2017).

As demais fosfolipases citadas são do grupo secretada, sPLA₂, ou seja, possuem sua função catalítica ativa no ambiente extracelular e envolve principalmente o aminoácido histidina (SIX; DENNIS, 2000). Esse conjunto de

fosfolipase está presente em 7 dos 11 grupos gerais de PLA₂, e em 10 subgrupos, considerando os genes parálogos que codificam essa proteína (ex: as sPLA₂ do subgrupo IIA e IID são codificadas por genes localizados no cromossomo 1, mas localizados em loci diferentes) e no geral possuem massa molecular de 14 kDa (SIX; DENNIS, 2000).

A sPLA₂ foi o primeiro tipo de fosfolipase identificado, e as fosfolipases do grupo IIA foram descobertas e classificadas originalmente no veneno de serpentes, como as do gênero *Crotallus* e *Bothrops*, além de insetos venenosos, como vespas, e secreções produzidas por mamíferos, como fluido sinovial e suco pancreático (BURKE; DENNIS, 2009; SIX; DENNIS, 2000). Recentemente foi relatada a presença dessa molécula em tecido cerebral de mamíferos, foi caracterizada como dependente de Ca²⁺, e possui dois tipos de receptores de superfície celular, sendo que em células neurais o receptor presente é classificado em “tipo N” (FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006).

A sPLA₂ do grupo III, por outro lado, foi originalmente identificada no veneno de abelhas, no veneno de escorpiões e em tecido cerebral de *Drosophila melanogaster*, e também está presente em mamíferos, tanto em tecido testicular, quanto tecido neural, além de possuir características bioquímicas próximas das fosfolipases do grupo II, como tamanho próximo e ligações dissulfeto conservadas (QURASHI et al., 2012; RYU et al., 2000; SATO et al., 2010; SIX; DENNIS, 2000; YUI et al., 2015).

1.2.2. A hipótese da β-amiloide em Doença de Alzheimer e a PLA₂

Recentemente foram identificadas três isoformas da PLA₂ com maior associação com a Doença de Alzheimer, e principalmente interligadas com a via da Aβ, que são as isoformas: cPLA₂ (PLA2GIVA), sPLA₂-IIA (PLA2GIIA) e sPLA₂-III (PLA2GIII) (GENTILE et al., 2012; MOSES et al., 2006; PALAVICINI et al., 2017; SAGY-BROSS et al., 2015; YAGAMI; YAMAMOTO; KOMA, 2014; YUI et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

A cPLA₂ é a principal isoforma dessa enzima associada com a DA e com a cascata da Aβ, além de vários estudos demonstrarem sua presença em pacientes com a doença (FAROOQUI et al., 2000), além disso, Sagy-Bross et al. (2015) observaram que sua ativação está associada com a via da Aβ por meio

de estudos *in vitro* e *in vivo*, através da fosforilação da cPLA₂ na serina 505 (SAGY-BROSS *et al.*, 2015). Um estudo em que fizeram infusão prolongada de Aβ₁₋₄₂ tanto em cultura *in vitro* neuronal de ratos, quanto *in vivo* em camundongos, mostrou que a exposição à esse peptídeo resultou no aumento da expressão de PPA e cPLA₂ concomitantemente, bem como foi mostrado a forma fosforilada da cPLA₂ na serina 505, e também, a administração do inibidor dessa enzima previamente à adição de Aβ preveniu o aumento da expressão de cPLA₂ e de PPA, sugerindo uma relação direta entre eles (SAGY-BROSS *et al.*, 2015).

Ademais, Sagy-Bross *et al.* (2015) demonstraram também a relação entre a clivagem dos fosfolipídeos de membrana pela cPLA₂ e a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), contribuindo para a neuroinflamação e neurotoxicidade, além também de demonstrar a relação dessa via com a via da proteína quinase A (PKA) e da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP ou AMP cíclico) (SAGY-BROSS *et al.*, 2015).

Por outro lado, Barupal *et al.* (2019) e Palavicini *et al.* (2017) revelaram que a superexpressão de PPA, bem como formação dos oligômeros de Aβ e alta ativação de cPLA₂ provocaram desregulação lipídica no sistema nervoso central, com conseqüente aumento do estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio e acúmulo de lipídeos, como ácidos graxos insaturados através da fosforilação da cPLA₂ mediada pela via da MAPK, corroborando com um estudo mais recente, que demonstrou desregulação lipídica em pacientes de DA (BARUPAL *et al.*, 2019; PALAVICINI *et al.*, 2017).

Foi descrito também a participação da sPLA₂-IIA na fisiopatologia da Doença de Alzheimer, além de identificar sua expressão gênica e proteica no hipocampo de pacientes em relação ao grupo controle, bem como a imunorreatividade de astrócitos expressando sPLA₂ e sua relação com a indução de Aβ₁₋₄₂ e de citocinas pró-inflamatórias nesse tecido, entre elas a interleucina 1β (IL-1β), que também promoveu aumento na expressão de fosfolipase (MOSES *et al.*, 2006).

Zhang *et al.* (2018) corroboraram o estudo anterior em que os astrócitos revelaram maior ativação após exposição à Aβ, mediante expressão de GFAP (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*) e a exposição ao referido peptídeo também induziu elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β,

relatada anteriormente, além de IL-6 e fator de necrose tumoral α (do inglês: *tumor necrosis factor α* – TNF- α), promovendo assim um ambiente neurotóxico e de morte celular, agravando então os sinais clínicos dessa doença (ZHANG, L. *et al.*, 2018).

Além dessas duas PLA₂s supracitadas, temos também a sPLA₂-III (também chamada de PLA₂G3), que foi relatada sua presença em cérebro de camundongos, sendo esse, o segundo tecido com maior expressão dessa proteína (SATO *et al.*, 2010). Em 2015 foi exposto em outro trabalho a expressão elevada dessa enzima em pacientes com DA, semelhante ao mostrado com a sPLA₂-IIA e também nos astrócitos, além de ter sido elucidado em modelo *in vivo* que a alta expressão dessa enzima no cérebro desses animais resulta na redução da expressão da enzima de degradação de insulina (IDE), a qual, segundo eles, é responsável pelo *clearance* de A β do cérebro, e quando reduzida, promove acúmulo de A β , como ocorrido também em ambientes de estresse oxidativo (YUI *et al.*, 2015).

Tendo em vista a atividade multivariada dessas isoformas de fosfolipases em relação à Doença de Alzheimer e com a via da beta-amiloide, e considerando que os fármacos hoje existentes não demonstram total efetividade em combater essa doença, além da não comprovação de inibição das fosfolipases, que é de suma importância no desenvolvimento da doença. Nesse aspecto, é primordial entendermos como os inibidores de fosfolipases atuam, suas vias de ativação e inibição, bem como seu papel diante do potencial terapêutico contra a doença de Alzheimer e a inter-relação com as neurodegenerações como um todo.

1.2.2 Inibidor de PLA₂

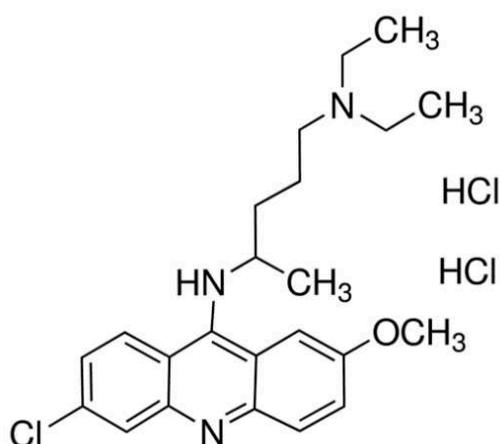
Devido a existência de várias proteínas da classe das fosfolipases, é relatado também a existência de várias classes de inibidores específicos para cada isoforma da proteína. Também existem inibidores que não são específicos, ou não seletivos, sendo então de amplo espectro, capazes de inibir ou regular mais de uma classe ou isoforma de PLA₂ (FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006; ONG *et al.*, 2015).

A existência de inibidores seletivos nos permite considerar maior eficiência, como o araquidonil-trifluorometil-cetona (AACOCF₃) e metil-

araquidonil-fluorofosfonato (MAFP), os quais atuam eficientemente em inibir as fosfolipases citosólicas (cPLA₂) (FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006; ONG et al., 2015). Anteriormente foi relatado que a Doença de Alzheimer pode ter o envolvimento com mais de uma isoforma dessa proteína, e por ser uma doença que mesmo não tendo cura efetiva, e de possuir muitas vias a serem estudadas, pode ser vantajoso um estudo mais aprofundado de inibidores não seletivos de PLA₂.

Um exemplo desse tipo de inibidor é a Quinacrina (QNC), ou Dihidrocloreto de Quinacrina (*6-Chloro-9-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-2-methoxyacridine dihydrochloride*) representada na figura 4 abaixo.

Figura 4 - Estrutura química da Quinacrina



Fonte: Sigma-Aldrich (Q3251)

A quinacrina, também chamada de mepacrina e em determinada época chegou a ser registrada como Atabrine[®], é considerada uma droga da classe das acridinas, e foi descoberta em 1932 como potencial antimalárico. Foi utilizada em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial até 1945, quando foi então substituída pela cloroquina (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011; KUMAR; SHARMA; PRASAD, 2018). Durante esse período, milhares de soldados norte-americanos fizeram uso desse medicamento, tanto de forma profilática, quanto de forma terapêutica contra malária, servindo de objetos de pesquisa em relação à eficácia e toxicidade do composto (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011).

Ao longo dos anos foram descobertos novos alvos e novas doenças que começaram a ser tratadas com a QNC, como a giardíase, teníase, lúpus

eritematoso, artrite reumatoide, alguns tipos de cânceres, e também as desordens neurológicas, como a doença de Parkinson e dos Príons. Além disso, foi demonstrado também seu efeito no tratamento de lesões pós traumática e pós isquêmica no SNC, devido à sua atividade anti-inflamatória e neuroprotetora (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011; FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006).

Ademais, outros estudos demonstraram que a quinacrina é capaz de atuar em outras doenças bem como em modelos específicos de neurodegeneração. Qurashi et al. (2012) avaliou o uso da QNC em modelo transgênico de mutação presente na Síndrome de tremor/ataxia associada ao x frágil (FXTAS), induzida em *Drosophila melanogaster* (Dmel) e foi obtido resposta favorável das moscas tratadas com quinacrina no teste locomotor de escalada (QURASHI et al., 2012), como também foi visto resposta à esse fármaco em modelos de camundongos com colite ulcerativa (CHUMANEVICH et al., 2016) e com lesão renal aguda induzida em ratos (AL ASMARI et al., 2017).

Chumanevich et al. (2016) ressaltou, por meio de estudo de colite ulcerativa, que o tratamento com QNC suprimiu a produção de óxido nítrico sintase induzido (iNOS) *in vitro* e reduziu a produção dele e de ciclooxigenase-2 (COX-2) em mais da metade *in vivo* em modelo de colite em camundongos. Sabendo da atuação da fosfolipase A_2 *upstream* à cascata de produção da COX-2, temos a hipótese que a inibição dessa enzima ocorre em função da inibição da PLA₂ (CHUMANEVICH et al., 2016).

A quinacrina é conhecida por atingir mais de um alvo, sendo além da PLA₂, também pode intercalar com o DNA e inibir enzimas nucleares, como telomerasas e topoisomerasas, mas principalmente por modular vias sinalizadoras inflamatórias e envolvidas com vias tumorais, como a via do fator nuclear kappa-B (do inglês: *nuclear factor kappa-B* - NF-κB), TNF-α e IL-1β (CHUMANEVICH et al., 2016; DOMINICK et al., 2004; EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011; JANI et al., 2010; LANGER et al., 1999; WAGNER et al., 1998).

Com relação à Aβ, foi visto em um estudo prévio a inibição *in vitro* do peptídeo Aβ₁₋₄₀ por um composto derivado da QNC em dose dependente e avaliado pelo ensaio de quantificação de Aβ por Tioflavina T e por microscopia de força atômica, mostrando o potencial desse fármaco para inibir esse peptídeo, ainda que com mecanismo pouco conhecido (DOLPHIN et al., 2008).

1.3 Doenças neurodegenerativas e modelos *in vivo* de estudo

Considerando as complexidades existentes nas doenças neurodegenerativas, é necessário o uso de modelos de estudo que possam tornar eficiente a busca por novos medicamentos contra doenças como Doença de Alzheimer, Parkinson, Doença de Huntington e etc. Contudo, essa busca por novos medicamentos pode se tornar limitada, considerando que muitas das estratégias existentes na área de *drug discovery* são voltadas para um método denominado “abordagem baseada em alvo”, ou *target-based approach*, no qual o cientista se baseia especificamente na ação da droga em moléculas específicas e em vias bioquímicas, método esse que é mais abordado em culturas *in vitro* e em ensaios bioquímicos (SOLANA-MANRIQUE *et al.*, 2019).

Diversos modelos celulares vêm sendo usados para esse método, porém ele possui limitações relacionadas à outros sistemas biológicos do mesmo organismo, visto que culturas celulares possuem em sua maioria um tipo de célula e com isso, inúmeras variáveis precisariam ser esclarecidas para que o composto possa ter sucesso em humanos, tendo a prova de que muitos são eficazes *in vitro*, mas quando administrados em humanos se tornam falhos (SOLANA-MANRIQUE *et al.*, 2019; STRANGE, 2016).

Nesse sentido, existe uma abordagem alternativa que se adequa à exigência das doenças neurodegenerativas, que é a abordagem baseada em fenótipo, ou, *phenotype-based approach / phenotype-based drug discovery*, a qual é uma ferramenta direcionada para a resposta fenotípica da célula, do tecido ou do sistema, e revela informações fundamentais para o desenvolvimento de drogas, com relação à absorção, distribuição, toxicidade ou excreção, tendo como modelo principal de estudo animais de laboratório (*in vivo*), mas sendo possível também o uso de co-cultura de tipos celulares diferentes, cultura celular tri-dimensional (3D) e cultura organotípica (*ex vivo*) (SOLANA-MANRIQUE *et al.*, 2019; STRANGE, 2016; SZABO *et al.*, 2017).

Com relação aos modelos animais, existem vários usados para o *screening* de drogas e para outros objetivos em pesquisas biomédicas e genéticas, sendo os principais os roedores, como ratos e camundongos, os não-mamíferos, como *Zebrafish* e pequenos invertebrados, como *Drosophila*

melanogaster (Dmel) e *Caenorhabditis elegans*, sendo a Dmel o principal modelo genético e de *screening* inicial de fármacos contra doenças neurodegenerativas e principalmente para DA (SOLANA-MANRIQUE *et al.*, 2019; SZABO *et al.*, 2017).

1.3.1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster é uma espécie de mosca, chamada de mosca da fruta, pertencente à família Drosophilidae e ao gênero *Drosophila*, que abrange em torno de 1500 espécies, sendo a Dmel a principal mosca utilizada em pesquisas genéticas e de biologia do desenvolvimento (SHARMA *et al.*, 2019). Essa espécie começou a ser utilizada no meio científico em torno de 1900 pelo então ganhador do Prêmio Nobel (1933) Thomas Morgan, que utilizou essa linhagem em estudos de hereditariedade, e nesse mesmo período foi descoberto a primeira mutação presente que manifesta o olho branco, referente ao gene *white* e desde então, vem sendo utilizado como modelo em diversas doenças humanas e também para estudo dos mais variados tipos de mutações espontâneas e induzidas (SHARMA *et al.*, 2019).

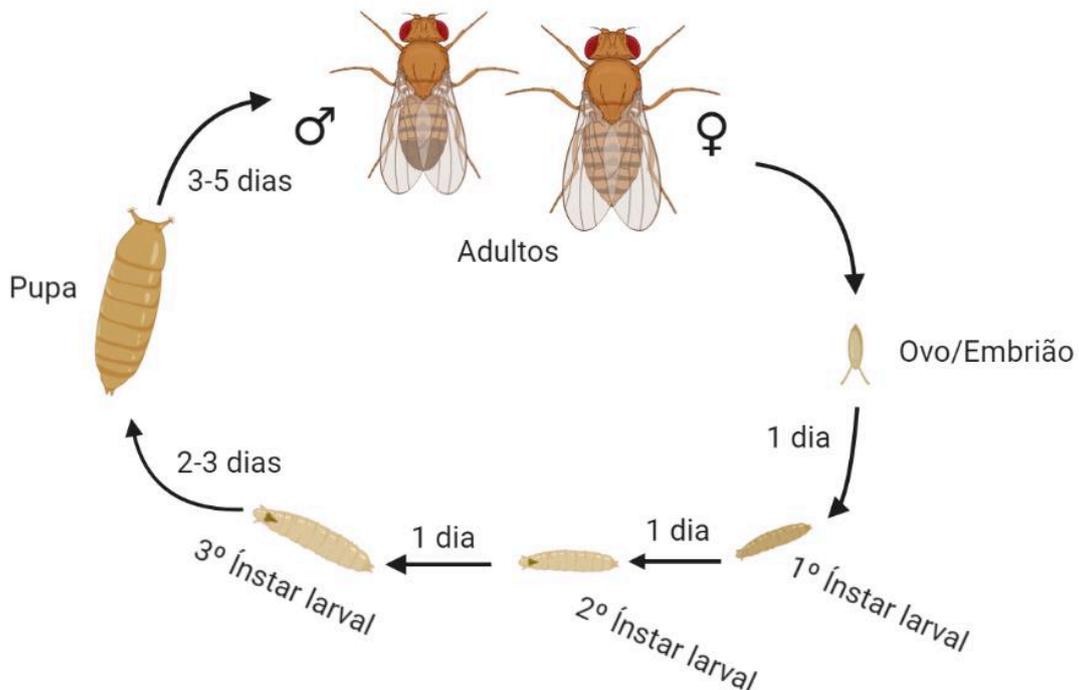
A *D. melanogaster* possui genoma haploide com apenas quatro cromossomos, diferente dos camundongos que possuem 20 e os humanos 23 cromossomos. Essa é uma das vantagens que torna esse modelo amplamente utilizado para manipulação genética, entretanto, mesmo com essa diferença de cromossomos, a Dmel possui 75% dos genes com similaridade genética em relação a espécie humana. Outro fato interessante é a biologia celular entre as moscas e os humanos, que é evolutivamente conservada, dentre elas a regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular. Além disso, algumas vias hoje conhecidas nos mamíferos foram originalmente descobertas na Dmel, como o gene *WNT* hoje extensamente estudado em humanos, baseado no gene *wingless* das moscas (RUBIN *et al.*, 2000; SHARMA; CHOPRA, 1976; SHARMA *et al.*, 2019).

A maior vantagem no uso da *D. melanogaster* em pesquisa é sua propriedade de possuir ciclo de vida curto e, conseqüentemente, intervalo curto entre gerações, o que facilita cruzamentos genéticos (SHARMA *et al.*, 2019). Assim como borboletas e mariposas, a Dmel é classificada como um

holometábolo, ou seja, um animal que sofre metamorfoses e possui ciclo de vida compreendido em quatro estágios gerais: embrião/ovo, larva, pupa, e adulto, sendo que todo esse processo de embrião até o adulto depende da temperatura do ambiente (SHARMA et al., 2019). O ciclo dura de 9 a 10 dias em ambiente controlado a 25°C, e caso o ambiente esteja mais frio, ex: 18°C, o ciclo pode chegar até 19 dias, em contrapartida com o ambiente mais quente, ex: 28°C, o ciclo de embrião/ovo até adulto é de 7 dias em média, tornando esse animal altamente sensível à temperatura e ao ambiente externo (SHARMA et al., 2019).

Após o cruzamento, ocorre a fertilização e posterior ovopostura no meio de cultivo, seguido da embriogênese, e após as larvas se formarem, elas passam por três diferentes estágios denominados de “ínstar”, sendo o 1º ínstar larval formado um dia após o final da embriogênese e o 2º e 3º ínstar formados com um dia de intervalo para cada, enquanto que o último estágio larval dura em média 2 ou 2,5 a 3 dias para se transformar em pupa e finalmente após 3 a 5 dias sofre eclosão e com isso o surgimento da mosca adulta (Fig. 5). Após todos esses estágios, a mosca adulta encontra-se sexualmente ativa em até 12 horas após eclosão (SHARMA et al., 2019).

Figura 5 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*



Após o cruzamento entre o macho e fêmea, é realizada a ovopostura no meio de cultivo, seguido de embriogênese e ao final dela, um dia depois a formação do 1º ínstar larval, seguido dos

próximos até a formação da pupa e posteriormente a eclosão dos adultos de 3 a 5 dias. Fonte: autoral, adaptado de (SHARMA et al., 2019). Ilustração criada com BioRender.com.

Outra vantagem importante da Dmel, principalmente para os geneticistas, é o fato de ela possuir “cromossomos balanceadores”, e o termo “balanceador” junto ao cromossomo significa a capacidade de manter as linhagens de moscas “geneticamente” estáveis, ou seja, evitam que ocorram mutações letais ou esterilidade. Assim ocorre um *screening* de mutações que são capazes de ajudar a manter a integridade entre as mutações em homólogos, e os cromossomos geneticamente modificados possuem sequências invertidas, as quais previnem a recombinação entre cromossomos homólogos (KAUFMAN, 2017; SHARMA et al., 2019).

Um exemplo desses balanceadores é o TM6B associado à mutação *Tubby*¹ presente no cromossomo 3, que condiciona o fenótipo de pupa achatada e volumosa, sendo que cromossomos sem esse balanceador não condicionam esse fenótipo, servindo também para balancear mutações letais e diferenciar larvas mutantes homozigotas de heterozigotas (LATTAO et al., 2011; SILVA, 2019).

Outra técnica muito utilizada é o sistema de superexpressão do transgene binário *GAL4/UAS*, o qual o *GAL4* é um fator de transcrição responsável por direcionar a expressão do transgene *UAS downstream* para *upstream*, por isso o nome *UAS* (do inglês: *upstream activator sequence*) e o *GAL4* é capaz de realizar esse processo por meio da fusão com o promotor tecido-específico (SHARMA et al., 2019).

Foi identificado também o gene *Elav* (do inglês: *embryonic lethal abnormal visual system*) como um dos principais genes atuantes no SNC da Dmel, e foi identificado também seu promotor e a possibilidade de associar ele com a *GAL4* para se tornar um direcionador (*driver*) de expressão de uma característica desejável para o SNC por meio do sistema *GAL4/UAS* (CHAKRABORTY et al., 2011; SILVA, 2019; YAO; WHITE, 1994).

O sistema *GAL4/UAS* é o mais simples e eficiente sistema de desenvolvimento de moscas como modelos de doenças neurodegenerativas, principalmente Doença de Alzheimer, que vem sendo utilizado para expressar o gene *PPA* e conseqüentemente sua variante humana $A\beta_{1-42}$ nos neurônios da Dmel por meio do direcionador *Elav-GAL4*, e com ele foi possível fazer as

moscas desenvolverem oligômeros e placas de A β com consequente déficit neuronal (CHAKRABORTY et al., 2011; CROWTHER et al., 2005; NANDAN; NAGARKAR-JAISWAL, 2019; SILVA, 2019).

Portanto, foi identificado o desenvolvimento do modelo de DA em Dmel desde 2005, e tendo aprimoramentos ao longo do tempo, como em 2011, em que foi gerado um novo modelo de Doença de Alzheimer em *D. melanogaster* por meio da expressão de *Elav; APP; BACE*, e esse foi validado em um trabalho mais recente de 2019, corroborando, por análises moleculares e genéticas, a eficiência do modelo e a geração de um quadro mimético à DA em Dmel (CHAKRABORTY et al., 2011; CROWTHER et al., 2005; SILVA, 2019).

Diante disso, após descrever a eficácia em expressar a doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*, bem como a eficácia da quinacrina, um fármaco que vem sendo testado e avaliado desde os anos 50, nosso estudo pretende avaliar o papel da Quinacrina, um inibidor de fosfolipase, diante dos níveis de A β em modelo mimético à Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da Quinacrina, inibidor de PLA₂, sobre a proteína beta-amiloide em modelo da doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*.

2.1. Objetivos Específicos

- Realizar modelagem molecular *in silico* por homologia da sPLA₂-III da Dmel;
- Avaliar ação da QNC diante da via da fosfolipase e sua possível inibição;
- Realizar estudo de modelagem e *docking* molecular da sPLA₂-III e sítios de ligação/inibição com a molécula de QNC e posteriormente avaliar a estabilidade da ligação;
- Realizar predição farmacocinética da QNC na espécie humana e comparar com os resultados obtidos e com o que já foi relatado na literatura;
- Conduzir ensaio de toxicidade e sobrevivência dose-dependente da QNC no modelo de DA em Dmel;
- Conduzir ensaio locomotor (escalada) nos mesmos modelos de Dmel tratadas com QNC em forma de tratamento “pós-sintomático” e de forma profilática;
- Realizar ensaio bioquímico de quantificação de A β na cabeça das moscas tratadas com QNC;
- Realizar análise metabolômica da cabeça das moscas para identificação do perfil de metabólitos gerados entre os grupos tratados e controles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelagem e *docking* molecular

Análise *in silico* por meio de modelagem molecular da proteína sPLA₂-III de Dmel (CG1583) foi analisado por homologia, através dos softwares *HHpred/MODELLER* (ZIMMERMANN *et al.*, 2018). Posteriormente, foi gerada a molécula tridimensional (3D) da quinacrina em formato “.MOL2” por meio da plataforma ZINC12 (IRWIN *et al.*, 2012) (hoje atualizado para ZINC15) e posteriormente foi realizado o *docking* molecular desse fármaco com a molécula de sPLA₂ com 50 ciclos por meio do programa *GOLD – Protein Ligand Docking Software* (JONES *et al.*, 1997).

3.2. Predição farmacocinética e toxicológica da QNC

A predição farmacocinética da quinacrina foi realizada por meio da plataforma gratuita *pkCSM* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>), que é um preditor de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade de pequenas moléculas por meio de assinaturas baseadas em gráficos, através da utilização de uma análise comparativa da quinacrina com um banco de dados com 18.000 compostos. Eles foram comparados por meio de suas estruturas químicas a partir de dois mecanismos principais: propriedades farmacofóricas, ou seja, a plataforma identifica assinaturas e impressões digitais como lipofilicidade (log P), peso molecular, área de superfície, ligações químicas e as rotações entre elas (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015), e os “padrões baseados em distância”, gerados por uma assinatura gráfica que foi adaptada pelo algoritmo *Cutoff Scanning Matrix (CSM)* (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

3.3. Obtenção das linhagens de moscas utilizadas

As moscas utilizadas nos experimentos foram adquiridas no Banco de Estoque *Bloomington Stock Center*, na Universidade de Indiana (EUA) (Quadro 1) e mantidas no Laboratório de Genética, do Instituto de Biotecnologia da UFU.

Quadro 1 – Informações técnicas sobre as linhagens utilizadas.

BL#	Genótipo	Expressão	Local (Chr)	Denominação
5146	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155], P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1, w[*]	Expressão de GAL4 nos neurônios sob controle de elav e com início no sistema nervoso já na fase embrionária	X	elav-Gal4
33797	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-BACE1.Exel}7b, P{w[+mC]=UAS-APP.695.Exel}1/TM6B, Tb[1]	Expressão de 695 isoformas de aminoácidos da PPA humana e também expressão da BACE1 humana sob controle da UAS	3	UAS-BACE

BL#: número referência da linhagem no *Bloomington Stock Center*; Genótipo: componentes e genes presentes; Chr: cromossomo. Fonte: *Bloomington Stock Center*, adaptado de (SILVA, 2019).

As moscas foram mantidas em incubadora específica (Incubadora BOD com fotoperíodo SL-224 da SOLAB) com temperatura média de 25º e ciclo circadiano de 12/12 horas.

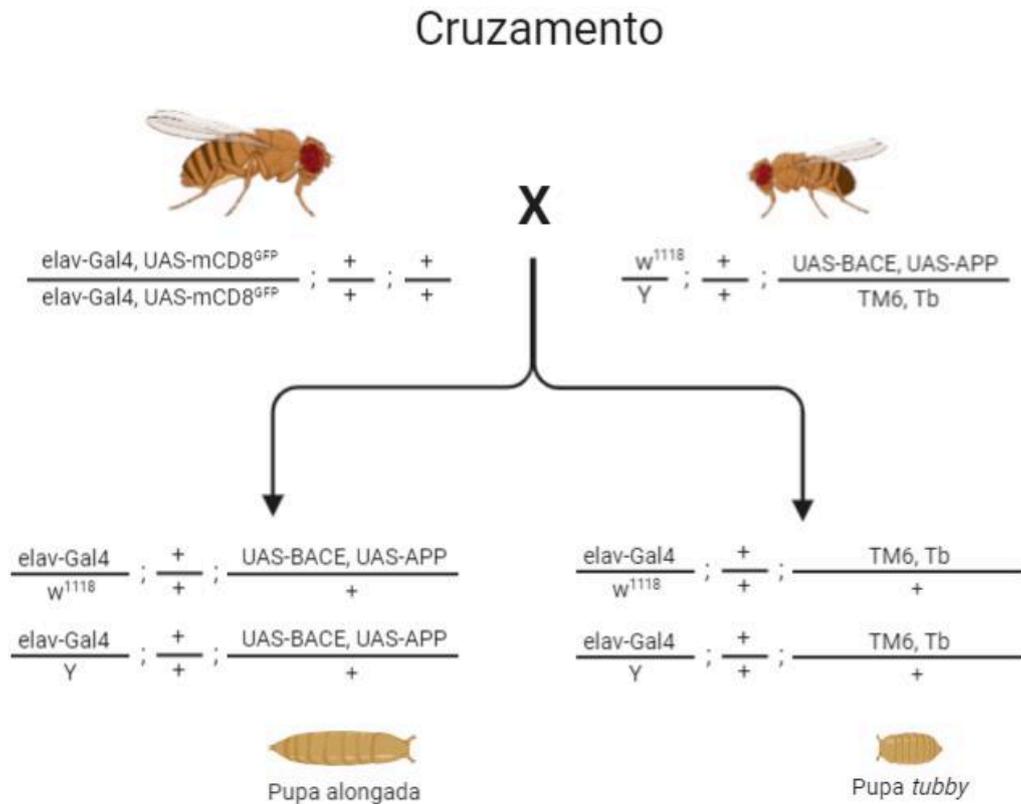
As Dmel mantidas para expansão e cruzamento ficaram alojadas em frascos de vidro transparentes com tampa de espuma para possibilitar passagem do ar e meio de cultivo padrão *Bloomington* (<https://bdsc.indiana.edu/information/recipes/index.html>) na base do frasco. O tamanho do frasco, volume e tipo do meio de cultivo variou com o tipo de experimento e com o número de moscas presentes nele.

3.4. Cruzamento para geração do modelo mimético ao de DA

As fêmeas virgens de elav-Gal4 foram cruzadas com os machos UAS-BACE para gerar o modelo, sendo que apenas 50% dos indivíduos da geração seguinte apresentam o fenótipo desejado (modelo β -amiloide ou *Alzheimer*

Disease AD-like) e a outra metade foi excluída da seleção pela apresentação de um fenótipo específico, que é a apresentação de pupas achatadas derivadas do balanceador *tubby*, enquanto que as pupas das moscas com o genótipo de interesse são alongadas e são selecionadas 7 a 9 dias após o cruzamento (Fig. 6).

Figura 6 – Representação esquemática do cruzamento entre as linhagens elav-Gal4, UAS-GFP (fêmeas virgens) e UAS-BACE, UAS-PPA (machos)*.



Fonte: autoral, adaptado de Silva (2019). Ilustração criada com BioRender.com.

3.5. Preparação da Quinacrina

A quinacrina foi adquirida da Sigma[®] Aldrich (EUA) como *Quinacrine dihydrochloride* (Q3251) (Fig. 4) em pó, em frasco de 25 gramas. Posteriormente foi diluída em água destilada em solução estoque de 720 µg/ml e mantida a 4°C.

3.6. Ensaio de toxicidade

Foram utilizados dois tipos de moscas para esse ensaio. A primeira foi a linhagem *White*¹¹¹⁸, a qual foi usada para verificar da toxicidade da QNC nessa espécie sob diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) que correspondem de (40 a 1,2 µM respectivamente).

Os grupos controles, foram tratados apenas com água destilada, e tanto para esse tratamento, quanto para todos os tratamentos com a QNC, os compostos foram preparados no volume de 5ml e posteriormente homogeneizado no meio de cultura padrão *Bloomington* (purê de batata YOKI® enriquecido com glicose em pó e Nipagin) para alimentação das moscas.

As moscas foram alojadas com esse meio em tubos de acrílico (*vials*) com um número inicial de 27 moscas por *vial* e cada grupo foi estruturado em triplicatas, que foram mantidas na incubadora, com ambiente controlado e troca de meio realizado três vezes por semana.

Para obter a curva de toxicidade, foi feito a contagem de morte de indivíduos a cada troca de meio por 57 dias até a último indivíduo e os dados foram plotados em planilhas e posteriormente em software de análise estatística.

Posteriormente foi feita também análise de toxicidade nas moscas de *AD-like* nas concentrações selecionadas com base nos resultados da primeira toxicidade, que foram: 200, 25 e 6,25 µg/mL. A contagem desses indivíduos foi feita por um período de 42 dias.

As análises estatísticas foram feitas no *Graphpad Prism* versão 8.0.2 com o uso dos testes de comparação de curva (Teste Log-rank (*Mantel-Cox*); Teste de tendência Logrank; e teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon*).

3.7. Avaliação comportamental por teste locomotor

O teste locomotor padronizado para *Dmel* com alteração neurodegenerativa é o teste de *geotaxia negativa* (*Rapid iterative negative geotaxis – RING*), também denominado de teste de Escalada, pois se refere ao tipo de movimento que as moscas executam após estímulo mecânico contra

alguma superfície lisa, que é a escalada na parede do *vial* em sentido contrário à gravidade (GARGANO *et al.*, 2005).

Esse estímulo necessita de ter intensidade suficiente contra uma superfície para levar as moscas ao fundo do *vial*, e posteriormente elas possuem o instinto para escalam para o topo do tubo. Esse ensaio foi mensurado e registrado por câmera de vídeo de dispositivo digital, como celular, para posterior análise dos movimentos.

Para cada replicata do experimento foram utilizadas em média 15 a 28 moscas alojadas em cada *vial* limpo e transparente, sendo também cada concentração uma triplicata, e cada *vial* foi fixado em um suporte de madeira para facilitar o posicionamento quanto a luz, quanto a câmera e quanto a intensidade do estímulo mecânico (Fig. 7).

Figura 7 – Imagem fotográfica dos grupos de tratamento de QNC no suporte para o teste de escala.



As etiquetas fixadas no topo dos tubos são as concentrações da droga ($\mu\text{g/ml}$) e cada grupo é uma triplicata representada pelo número de ordem. A linha vermelha ao centro é o limite mínimo de distância escalada para análise. Fonte: acervo próprio.

As moscas tratadas com a QNC são as de genótipo *AD-like*, e pelo número de triplicatas e de *vials* utilizados em relação ao tamanho do suporte, elas foram testadas separadamente das moscas do grupo controle.

As *Dmel* do grupo controle foram divididas em três subgrupos: moscas da linhagem *elav-Gal4*, *UAS-BACE* e de *AD-like*, gerando também nove *vials* e separadas dos grupos tratados com quinacrina, porém foram estimuladas nas mesmas condições e conformidades ambientais e mecânicas.

Previamente ao teste, esses insetos foram aclimatados por 20 minutos na sala de teste, com iluminação controlada e ambiente silencioso, sendo a 40 cm de distância da fonte luminosa, a qual é uma lâmpada fluorescente de cor branca (com as especificações: 18W, 220V, 6500K e 122mA).

Os estímulos mecânicos foram representados como “batidas” realizadas sobre esponjas para suavizarem os impactos e levarem as moscas para o fundo do tubo, sendo: 3 batidas e posteriormente gravação de em média 30 segundos da escalada, e esse processo repetido seis vezes, gerando seis vídeos para análise.

Os vídeos foram analisados pelo programa *QuickTime Player* na seguinte metodologia: após o suporte ser posicionado na superfície e as esponjas começarem a ser retiradas do espaço, o tempo foi travado e contado o *frame* atual (o qual se torna o tempo 0) somado com 120 *frames*, gerando um padrão de 4 segundos exatos de leitura. Nesse tempo, as moscas que escalaram 5 ou mais cm (linha vermelha da figura 7) foram contabilizadas e registradas em planilha para posterior análise estatística.

Para esse teste foram feitos dois tipos de tratamentos, um de perfil *tardio* ou “sintomático”, ou seja, tratamento feito em moscas de idade mais avançada, sendo o primeiro tratamento com moscas de 10 a 13 d.p.e e com a primeira escalada 24 horas depois, a segunda escalada 7 dias depois e a terceira 14 dias depois da primeira. As moscas foram tratadas três vezes por semana junto com a troca do meio.

O outro tipo de tratamento foi por método *preventivo*, ou “pré-sintomático”, ou seja, as moscas foram tratadas nos primeiros dias pós eclosão (0 a 3 d.p.e) e com nenhum sinal de distúrbio neurológico, e após 24 horas do primeiro tratamento, foi realizada a primeira escala e as seguintes com 4, 10, 16 e 23 dias. Todas as moscas utilizadas nesse ensaio foram machos.

As análises estatísticas foram feitas no *Graphpad Prism* versão 8.0.2 com o uso dos testes de normalidade *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov* com $\alpha=0,05$, teste *t* não-pareado com $P < 0,05$ e teste *two-way ANOVA* com valor de significância $P < 0,05$, seguido de comparações múltiplas com teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

3.8. Quantificação de β -amiloide por teste de Tioflavina T

3.8.1. Coleta de amostras

Esse ensaio e o seguinte foram feitos para avaliar primeiramente só o perfil de tratamento “sintomático”, e para isso, novas moscas *AD-like* foram geradas e tratadas nas doses 200, 25 e 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por três dias com intervalo de uma semana, e os grupos controles foram tratados com água destilada. Uma semana depois do *endpoint*, as moscas foram eutanasiadas em nitrogênio líquido. *Post mortem* foi feito a decapitação e coleta das cabeças das moscas machos e armazenamento em tubos de 1.0 mL com 10 cabeças por tubo. Cada grupo foi dividido em triplicatas e posteriormente essas amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para preservação do tecido neural.

3.8.2. Quantificação de proteína total por Bradford

Antes de ocorrer a quantificação de beta-amiloide, foi realizado anteriormente a quantificação de proteínas totais pela metodologia de *Bradford*, e posteriormente foram normalizadas em relação à $A\beta$.

Nessa fase foi utilizado placa de ELISA de 96 poços, BSA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), reagente *Bradford*, e água Milli-Q. Cada amostra foi homogeneizada dentro do gelo, com homogeneizador, e posteriormente centrifugada à 10.000 rpm por 2 minutos a 4°C e em seguida foi coletado o sobrenadante.

Foram colocados 5 μL de amostra nos poços da placa, completados com 95 μL de água Milli-Q, e finalmente com 200 μL do *Bradford* filtrado, e após 10 minutos na ausência de luz, a placa foi colocada no espectrofotômetro (*Molecular Devices, Menlo Park*) para leitura no comprimento de onda de 576 nm.

3.8.3. Preparo da solução de Tioflavina T e da amostra

Todo o processo foi realizado na ausência de luz, e a solução foi coberta com papel alumínio. 8 mg de tioflavina T foi diluída em 10 mL de PBS 1x, com posterior filtragem dessa solução em filtro de 20 μm para formação da solução

estoque. Em seguida foi diluído 20 µL dessa solução em 4,98 mL de PBS 1x, a qual foi utilizada no ensaio.

Em seguida o pH do PBS 1x foi ajustado para 7,0 e mantido refrigerado, foi utilizado no volume de 10 µL para cada cabeça de Dmel e posteriormente homogeneizados dentro de gelo, com homogeneizador. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos a 4°C e posteriormente foi coletado o sobrenadante para a quantificação. Todas as amostras foram mantidas no gelo.

3.8.4. Quantificação de β-amilóide

O sobrenadante das amostras foi pipetado em microplacas de fluorescência SPL (96 poços) no volume de 2 µL, e posteriormente foi adicionada a solução de tioflavina T (198 µL/poço) na ausência de luz, seguido por incubação e agitação por 20 minutos e a leitura feita marca no fluorímetro (*Perkin-Elmer LS 55*), com excitação a 450 nm e emissão de 482 nm.

3.8.5. Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada pelo programa *Graphpad Prism* versão 8.0.2 com a normalização feita pelo teste de distribuição normal “D’Agostino e Pearson” ($\alpha = 0,05$) e a análise de comparação múltipla *One-way ANOVA* com o teste de Dunnet.

3.9. Ensaio de metabolômica

3.9.1. Coleta de amostra

Esse ensaio foi realizado também para avaliar o perfil de tratamento “sintomático”, com as moscas *AD-like* geradas e tratadas nas doses 200, 25 e 6,25 µg/mL por três dias com intervalo de uma semana, e os grupos controles tratados com água destilada. Uma semana depois do *endpoint* as moscas foram eutanasiadas em nitrogênio líquido. *Post mortem* foi feito a decapitação e coleta

das cabeças das moscas machos e armazenamento em tubos de 2 mL com 10 cabeças por tubo. Cada grupo foi dividido em duplicatas e posteriormente essas amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para preservação do tecido neural.

3.9.2. Extração dos metabólitos

Foram utilizadas 10 cabeças de moscas por tubo e 1000 µL de metanol grau espectroscópico em tubo de 2 mL, e com auxílio de ponteira as cabeças foram maceradas e homogeneizadas no metanol para liberação dos metabólitos no meio, e posteriormente foram incubados por 4 horas à -80°C. Após centrifugação por 15 min à 13000 g, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, e então seco em concentrador a vácuo por 30 min.

Para as análises de espectrometria de massa, as amostras foram solubilizadas em 500 µL de metanol grau espectroscópico, e filtradas em filtro de ponta de seringa com poro de 0,22 µm.

3.9.3. Análise de IES/EM por infusão direta

As análises de ionização por eletrospray (IES) e espectrometria de massa (EM) por infusão direta foram realizadas com um cromatógrafo líquido (*High performance liquid chromatography*- HPLC) (*Agilent Infinity 1260*) para injeção das amostras, acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução tipo quadrupolo tempo-de-voo (*quadrupole time-of-flight* – Q-TOF) (*Agilent 6520B*) com fonte IES. Os parâmetros do cromatógrafo foram: 0,2 mL.min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90% metanol e 10% de água acidificada com ácido fórmico (0,1% (v.v⁻¹)), o volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min⁻¹ à uma temperatura de 220°C e ao capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVa.

3.9.4. Identificação e análise estatística dos metabólitos

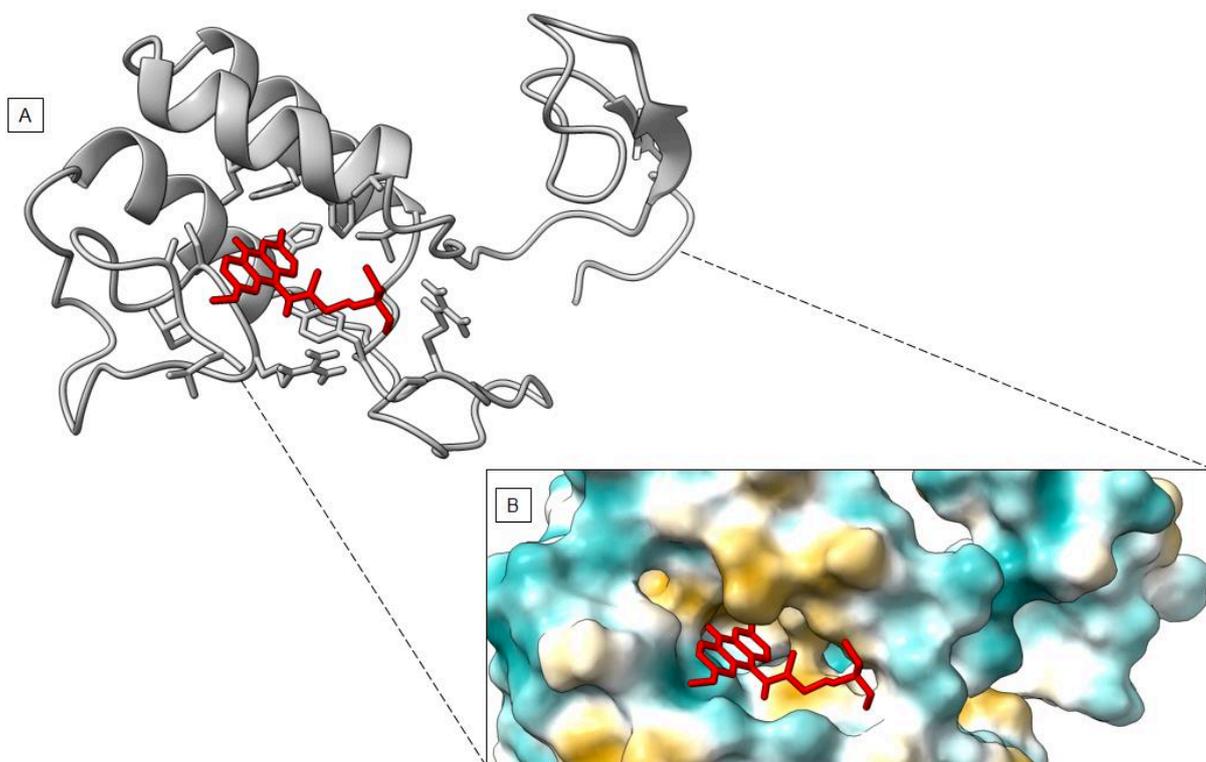
Os espectros de massas foram submetidos ao software *Mass Profiler Professional (Agilent)* para alinhamento, normalização, teste de significância, *fold change* e análise multivariada. Os metabólitos foram filtrados utilizando abundância absoluta mínima de 10.000 contagens, frequência de 100% (apenas os compostos encontrados em 100% das amostras biológicas dentro de pelo menos um grupo foram considerados), $p < 0,05$ e *fold change* > 2 . Os dados foram transformados em escala de \log_2 e a abundância dos metabólitos foi analisada usando o teste ANOVA, com $p < 0,05$ como critério de significância. Para identificar a diferença significativa entre os grupos foi utilizado o teste *post hoc* Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Modelagem e *docking* molecular

A molécula 3D de sPLA₂-III da Dmel foi gerada por homologia pelo *HHpred* e *MODELLER* e foi possível simular o *docking* da fosfolipase com a molécula de QNC para ter uma noção de como elas se interagem *in silico* (Fig. 8).

Figura 8 – Estrutura do *docking* entre Dmel sPLA₂-III e a QNC.

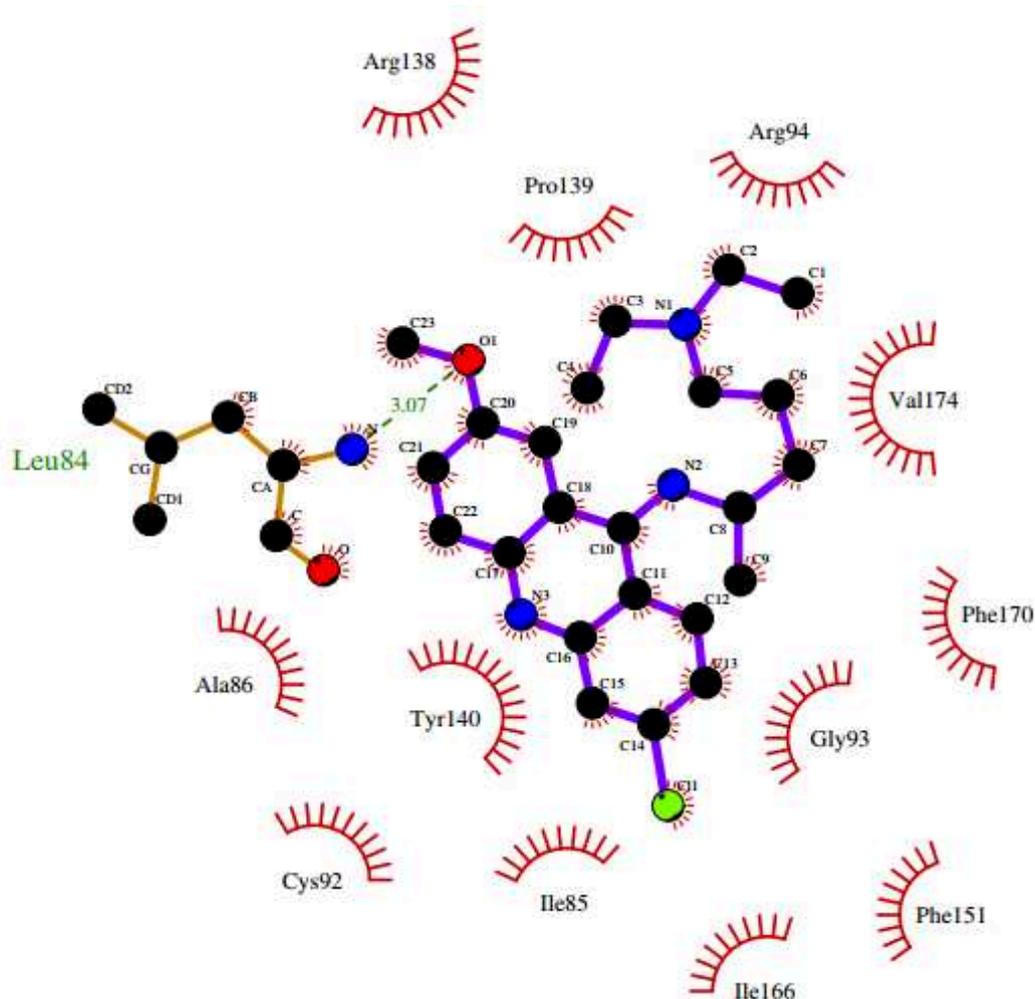


(A) Estrutura em hélice da sPLA₂-III (estruturas em prata) ligada à QNC (molécula em vermelho).
(B) Representação de superfície hidrofóbica da sPLA₂ com a QNC ligada. Fonte: autoral.

Na figura 8 é possível ver o sítio de ligação na região central dessa PLA₂, principalmente na imagem (B), com a representação de superfície hidrofóbica, é possível ver a abertura existente que permite a entrada da QNC na molécula de fosfolipase.

Em complemento, foi gerado o diagrama bidimensional desse *docking*, representado na figura 9.

Figura 9 – Diagrama bidimensional do complexo sPLA₂-QNC.



Nessas estruturas semi-circulares em vermelho temos representados os resíduos de aminoácidos da PLA₂ ligados na QNC por interação hidrofóbica. As esferas são átomos e os traços em vermelhos saindo delas são também interações hidrofóbicas reagindo com os resíduos. As linhas roxas são ligações covalentes entre os átomos da QNC e as linhas douradas são ligações entre átomos da PLA₂. A linha traçada verde entre um dos átomos de nitrogênio (azul) da PLA₂ e de oxigênio (vermelho) da QNC é ligação de hidrogênio. Fonte: autoral.

Na figura 9 podemos observar a interação da molécula de quinacrina em todas as regiões da sPLA₂-III, o que favorece estabilidade na interação entre essas duas moléculas.

No *Protein Data Bank (PDB)* ainda não existe estrutura cristalizada da sPLA₂-III nem em Dmel e nem em humanos, em outras espécies existe apenas

a homóloga da *Apis mellifera* (PDB:1POC). Porém existem outras formas de PLA₂ humana e de outras espécies nessa base de dados, com exceção da *D. melanogaster*.

Sabemos que a QNC possui amplo espectro de ação (ONG *et al.*, 2015), e com isso, a análise de apenas uma isoforma da PLA₂ se torna limitada para entender a ação da QNC, contudo, esse é o primeiro registro “público” de uma molécula de PLA₂ de Dmel modelada e ligada *in silico* com a QNC. Diante disso, procuramos validar essa espécie como um modelo de estudo para *screening* de drogas, sugerindo então que esse fármaco pode atuar na inibição da fosfolipase nessa espécie, corroborando com o achado de Qurashi *et al.* (2012).

Em 2003 foi caracterizada a sPLA₂ grupo III em *D. melanogaster*, bem como o seu gene (Anotação *Flybase*: CG1583) localizado no cromossomo X e sua dependência por Ca²⁺ e atividade catalítica contra fosfolipídeos de membrana tanto no corpo, quanto na região da cabeça da mosca (RYU *et al.*, 2003).

Um estudo mais recente mostrou essa mesma PLA₂ (CG1583) tendo participação em modelo de FXTAS induzido em Dmel. Esse trabalho foi capaz de demonstrar inibição da PLA₂ por meio de outros inibidores em *Drosophila*, mas principalmente pela quinacrina, por meio de análise locomotora, onde o tratamento com QNC fez com que as moscas escalassem mais do que as moscas do controle negativo (mutação da repetição de CGG que mimetiza FXTAS) com diferença significativa (QURASHI *et al.*, 2012).

4.3. Predição farmacocinética e toxicológica da QNC

A plataforma ZINC12 (código ZINC12: ZINC03830246) foi utilizada previamente à predição farmacocinética e toxicológica da quinacrina, por meio da obtenção da estrutura química desse fármaco em formato *SMILES* (do inglês: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*)(CC[NH+](CC)CCC[C@@H](C)Nc1c2ccc(cc2[nH+]c3c1cc(cc3)OC)Cl), o qual foi posteriormente usado na plataforma pkCSM (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da predição farmacocinética da QNC pelo *pkCSM*.

Propriedade	Modelo	Valor de predição		Unid.
		QNC	Rivastigmina	
Absorção	Absorção intestinal (em humanos)	91,83	91,68	Numérica (% absorvida)
Absorção	Permeabilidade na pele	-2,75	-2,95	Numérica (log Kp)
Absorção	Substrato de Glicoproteína-P	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	Permeabilidade na BHE	0,12	0,05	Numérica (log BB)
Distribuição	Permeabilidade no SNC	-1,32	-2,25	Numérica (log PS)
Toxicidade	Dose máxima tolerável	0,70	0,36	Numérica (log mg/kg/dia)
Toxicidade	Sensibilidade epidérmica	Não	Não	Categórico (Sim/Não)

Todos os resultados gerados não foram incluídos nessa tabela, é possível acessá-los colocando o número SMILES da QNC nessa plataforma.

Fonte: *pkCSM-pharmacokinetics* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>)

Foram geradas predições da QNC e do fármaco Rivastigmina, que é o mais utilizado atualmente no tratamento da DA e que é capaz de reduzir sintomas da Doença (código ZINC12: ZINC00004413), para fins comparativos. Essas predições serão analisadas e comparadas com dados já presentes na literatura relacionados com cada propriedade farmacocinética e toxicológica.

Os autores criaram conjuntos de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, como: permeabilidade dérmica, permeabilidade na barreira hemato-encefálica, absorção intestinal, como também hepatotoxicidade, avaliando se o fármaco requerido é inibidor ou não de glicoproteína-P e etc. Mais informações sobre os grupos de predição e suas interpretações podem ser consultadas no site (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/theory>) e também nas

informações complementares do artigo gerado (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

4.3.1. Absorção intestinal (em humanos)

A absorção intestinal é uma das principais propriedades a serem avaliadas por um fármaco, principalmente considerando administração via oral e os sítios de absorção. Esse modelo ou parâmetro foi gerado para obter um valor preditivo para a quinacrina, que possui a unidade de valor determinado em porcentagem (%) e que se relaciona com a quantidade de droga que é absorvida no intestino. Dessa mesma forma foi analisado a Rivastigmina. Diante disso, observa-se que a via de administração da QNC por predição *in silico*, tem valor próximo do valor de absorção da Rivastigmina. Essa plataforma ainda demonstrou nos valores de referência de fármacos com absorção abaixo dos 30% são considerados ruins para essa via. Chumanevich *et al.* (2016) realizaram administração da quinacrina via oral em camundongos modelos de colite ulcerativa e revelaram resultados promissores quanto à absorção do fármaco no tecido intestinal e ausência de efeitos colaterais nesses animais.

4.3.2. Permeabilidade e sensibilidade epidérmica

A permeabilidade é uma das principais propriedades analisadas em *screening* de drogas, seja para avaliar eficácia e colocar o fármaco em evidência para indústrias interessadas em *drug delivery* por meio da epiderme. A plataforma conduziu esse modelo com base na constante de permeabilidade epidérmica ($\log K_p$ – cm/h), estabelecida inicialmente por Potts & Guy (1995).

Segundo o *pkCSM*, um composto possui baixa capacidade de penetrar na pele se possuir o $\log K_p > -2,5$, portanto, como o resultado foi de -2,7 o qual é um valor menor, a quinacrina possui boa permeabilidade e esse valor está próximo do valor da Rivastigmina, que é -2,95. Esse preditor foi construído utilizando 211 compostos no banco de dados que tiveram a permeabilidade testada *in vitro* em células de tecido epitelial humano.

Com relação à sensibilidade epidérmica, o resultado deu negativo da mesma forma que a Rivastigmina, mostrando que pela predição que a QNC

parece não desencadear reação dermatológica. Essa predição foi construída com 254 compostos conhecidos por provocarem reação na pele.

Estudos anteriores mostraram que de 120.000 soldados tratados com QNC e monitorados durante a 2ª Guerra Mundial, 1,6% desenvolveram erupções cutâneas derivadas do tratamento com QNC, e essa reação foi reversível com a suspensão do tratamento (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011). Além disso, estudos mostraram que já foi relativamente comum pacientes tratados com QNC apresentarem manchas de cor amarelada na pele e de forma assintomática, mas que também desaparecem com a redução da dose ou interrupção do tratamento (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011).

Porém, houve um estudo em específico conduzido em modelo murino de inflamação de pele, em que o tratamento com quinacrina reduziu essa inflamação na pele, por meio da inibição de NF-κB, corroborando o uso desse fármaco também em relação à lúpus eritematoso (GORBACHEV *et al.*, 2007).

Esses achados sugerem que, tendo um maior controle da dose efetiva desse fármaco na espécie alvo, ou tendo algum dispositivo que possibilite a administração desse fármaco em uma dose menor e com eficácia, é possível pensar na QNC como uma nova droga a ser administrada via tópica e com outras propriedades que possa explorar por meio da epiderme.

4.3.3. Substrato de Glicoproteína-P

A Glicoproteína-P (Pgp) é uma proteína transmembranar presente em vários tecidos do organismo e principalmente nas células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), e possui a função de controlar a entrada de compostos no tecido-alvo e principalmente de “expulsar” ou realizar efluxo de xenobióticos ou qualquer outro produto que possa ser maléfico para esse sistema (SILVA, R. *et al.*, 2015). O fato da quinacrina ser representada como um substrato de Pgp, como representado na tabela 1, evidencia sua importância e nos ajuda a atender sua farmacocinética, bem como sua via de penetração tanto no SNC, quanto em outros tecidos.

Nesse preditor foram armazenados 332 compostos caracterizados por serem transportados pelo canal Pgp. O resultado gerado por ele em relação à QNC foi corroborado por estudos prévios (AHN *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2006).

Ahn et al., (2012) conduziram um experimento realizado em camundongos, em que utilizaram camundongos FVB como “tipo selvagem” e camundongos *knockout* para os genes *MDR1A* e *MDR1B* (*Mdr1^{0/0}*), que codificam a glicoproteína-P, e avaliaram a ação da quinacrina e passagem por essa proteína nesses animais. Os animais foram tratados com QNC via oral na dose de 40 mg/kg/dia por 29 dias, e foi observado acúmulo dessa droga no cérebro dos animais selvagens na média de 1,6 μM com a Pgp ativa, e nos animais *Mdr1^{0/0}* observaram acúmulo de 84 μM e acúmulo elevado também em outros tecidos, como baço e rins. Posteriormente eles associaram a administração de quinacrina nos animais selvagens com administração prévia de inibidor de Pgp, como Ciclosporina A, e observaram que a associação com o inibidor elevou nos níveis de quinacrina no cérebro desses animais e não provocou toxicidade (AHN *et al.*, 2012).

O resultado da Rivastigmina apresentou negativo, porém esse resultado se torna controverso, visto que Mohamed, Keller, Kaddoumi (2016) relataram uma relação direta de ação entre esse fármaco e os canais Pgps, sendo necessário validação dessa predição *in vivo* (MOHAMED; KELLER; KADDOUMI, 2016).

4.3.4. Permeabilidade na BHE e no SNC

O cálculo dessas propriedades foi feito com base em dois algoritmos, o primeiro com relação ao logBB, que é um algoritmo que calcula a razão da concentração de um fármaco presente no cérebro, sobre a concentração do mesmo fármaco no sangue. O logPS, o qual é relacionado com a permeabilidade no SNC, é um algoritmo que calcula a área da superfície do produto.

Para a predição da BHE, foram armazenados no bando de dados 320 compostos que tiveram o logBB mensurado experimentalmente, e o pkCSM definiu que se o composto desejado tiver $\log\text{BB} > 0,3$, sugere que ele tem uma boa penetração na BHE, enquanto que se o composto tiver $\log\text{BB} < -1$, pode ter a propriedade de penetrar pouco pela BHE.

Para a predição de SNC, foram armazenados 153 compostos em que o logPS foi mensurado experimentalmente, e a plataforma definiu que compostos

com $\log PS > -2$ são sugestivos de realmente penetrar no SNC, e compostos com $\log PS < -3$ são considerados incapazes de penetrar no SNC.

O $\log BB$ da QNC foi de 0,12, evidenciando uma taxa de penetração considerável na barreira hemato-encefálica (BHE), ainda que de forma preditiva e menor que o valor de referência, esse valor ainda está no intervalo de valores que representam boa penetração, da mesma forma que o valor da rivastigmina, que inclusive se encontra menor que o da quinacrina.

E o valor da QNC foi corroborado com estudos prévios e o mesmo se deu com o $\log PS$ que foi de -1,32, que é um valor maior que -2, mostrando também a capacidade da QNC de penetrar no SNC e também sendo corroborado com estudos prévios tanto em humanos (AHN *et al.*, 2012), quanto em *Drosophila* (QURASHI *et al.*, 2012) e a rivastigmina mostrou um valor menor em relação à QNC, porém também dentro do intervalo, corroborando com o efeito já conhecido de atuar no SNC.

4.3.5. Dose máxima tolerável

Segundo o $pkCSM$, esse parâmetro é comum nos estudos de fase clínica I, baseados nas doses obtidas em animais de laboratório e transpostas para humanos. É um modelo importante para fazer predição de *screening* de droga, pois essa predição possui dados de 1.222 compostos derivados de *clinical trials* em humanos.

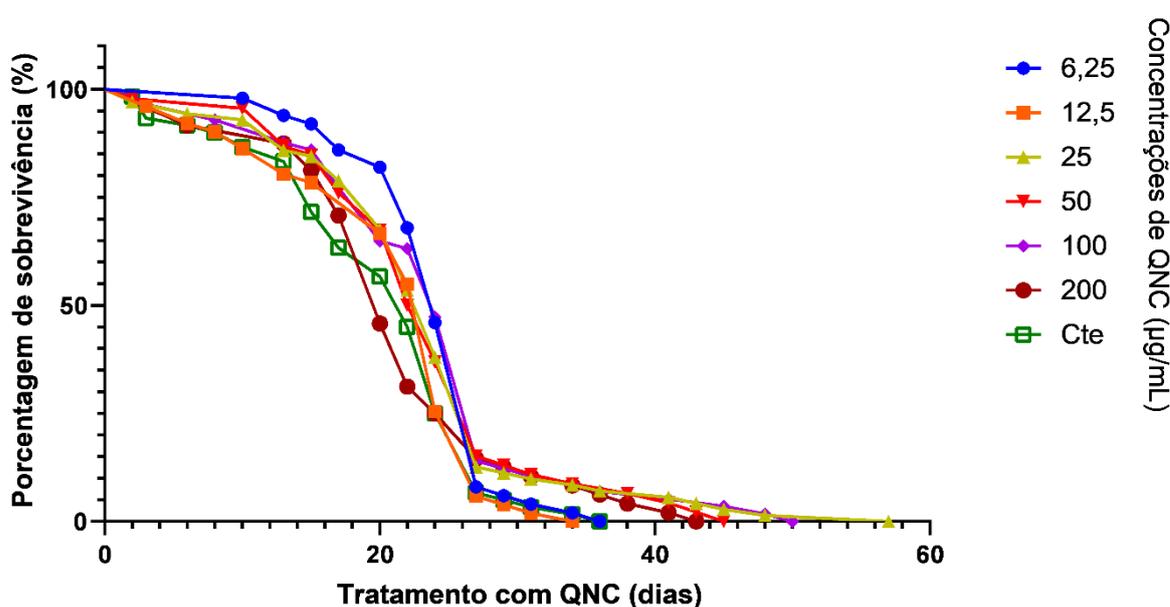
Esse modelo também possui valor logaritmo, que é \log de mg/kg/dia. A plataforma definiu que o valor de \log menor ou igual a 0,47 é baixo e maior que 0,47 é alto e o valor preditivo da QNC para grupo foi de 0,70 sendo considerado alto, enquanto que o valor da rivastigmina foi de 0,36, considerado baixo.

De acordo Ahn *et al.* (2012), a maior dose tolerável e não tóxica de QNC via oral para camundongos é de 40 mg/kg/dia. O \log desse valor calculado é em média 1,60, quase o dobro do valor, porém a predição ainda forneceu valor acima da média e que corresponde com a janela de dose da QNC.

4.4. Ensaio de toxicidade da QNC

Para avaliar a toxicidade desse composto, foram usados dois tipos de *D. melanogaster*, sendo o primeiro da linhagem w^{1118} a qual não possui genótipo de *AD-like*, e nela foi feito um *screening* de concentrações para que pudéssemos selecionar as mais adequadas (Fig. 10). Essas moscas foram avaliadas e tratadas por 57 dias e não houve diferença estatística entre as concentrações.

Figura 10 – Ensaio de toxicidade com quinacrina em *Dmel w¹¹¹⁸*.



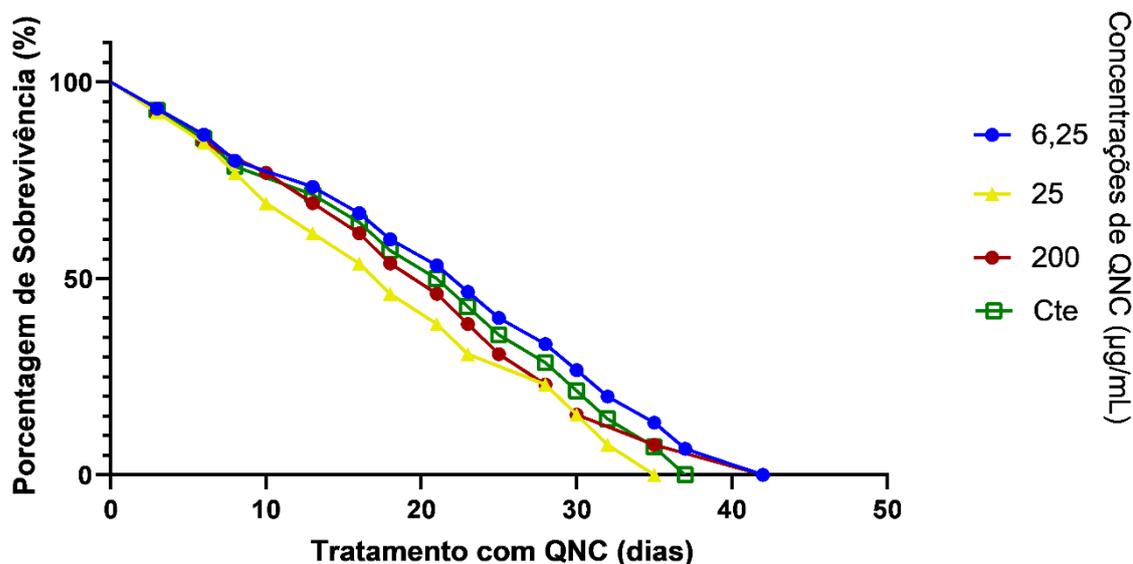
Cte: controle; QNC: quinacrina. Fonte: autoral.

Como não houve diferença estatística significativa entre as concentrações, optamos pelo critério visual a fim de selecionar as concentrações que seriam utilizadas nesse estudo. A dose de 6,25 µg/mL promoveu melhor sobrevivência para as moscas até o 24º dia, por isso, ela foi uma das selecionadas. A dose de 25 µg/mL foi selecionada por manter as moscas vivas por mais tempo, e vimos que a dose de 200 µg/mL não apresentou alta toxicidade visto que até o 17º dia mais de 70% das moscas estavam vivas e o total das moscas tratadas com essa dose sobreviveram até o 43º dia. O grupo controle apresentou sobrevivência de 50% da população em média até o 21º dia.

Com isso, foram selecionadas três doses para os tratamentos nas moscas *AD-like*, sendo a dose mais baixa (6,25 µg/mL), mais alta (200 µg/mL) e uma

intermediária com melhor resposta aparente (25 µg/mL) e foi feito um novo estudo de toxicidade com as moscas de genótipo *AD-like*. (Fig. 11).

Figura 11 – Ensaio de toxicidade com quinacrina em *Dmel AD-like*.



Cte: Controle; QNC: quinacrina. Fonte: autoral.

No gráfico de sobrevivência foi observado um maior desempenho do tratamento de 6,25 µg/mL, apesar de não ter apresentado diferença estatística. As moscas do grupo controle sobreviveram até o 37º dia, e 50% da sua população sobreviveu até o 21º dia, enquanto que 50% da população do grupo tratado com 6,25 µg/mL sobreviveram até 22º dia, portanto, além de essa dose não ter sido tóxica para as moscas, também elevou um pouco a sobrevivência. A dose de 25 µg/mL não elevou a sobrevivência, porém também não foi tóxica, visto que sua população média sobreviveu até o 17º dia e total até o 35º, além de a dose de 200 µg/mL, que é maior, ter promovido sobrevivência da população média entre o 19º e 20º dia.

Chakraborty *et al.* (2011) foi um dos responsáveis por estabelecer o modelo desse genótipo (*elav; APP; BACE*), relatando que o tempo médio de vida, ou seja, 50% da população, foi de 32 dias. Contudo, como vimos que o grupo controle sobreviveu menos, e esse fator pode ter sofrido influências externas do ambiente, o qual afeta diretamente o microambiente das moscas como: clima fora da incubadora, incidência solar, pluviosidade e etc.

Independente disso, esse é considerado um modelo vantajoso para estudos de doenças neurodegenerativas e doença de Alzheimer.

Além disso, esses dados podem ser corroborados com dois estudos mais recentes de sobrevida sob tratamento com quinacrina: o primeiro é de 2013 e foi o primeiro estudo clínico de fase II dessa droga realizado em humanos, nas doses de 100 e 300 mg em pacientes com doença dos Príons, e não foi visto toxicidade, como corroborado nos estudos pré-clínicos, porém também não foi visto aumento de sobrevida em relação aos controles (GESCHWIND et al., 2013).

O segundo estudo é mais recente, de 2016, e evidenciou por meio de análise de sobrevida, que camundongos imunodeficientes e modelos ortotópicos de câncer de tireóide tratados com quinacrina obtiveram 10 dias a mais de sobrevida (36 dias no total) do que o grupo não tratado (22 dias), enquanto que houve um tratamento comparativo desses animais com doxorubicina, um quimioterápico convencional para tratamento de alguns tipos de cânceres, e os animais tratados com ele tiveram 31 dias de sobrevida (ABDULGHANI et al., 2016). Nesse trabalho a QNC foi fornecida via oral pela ração na dose de 100 mg/kg, diariamente por um mês.

Esses dados nos sugerem que a quinacrina não possui toxicidade sobre as moscas, e possivelmente manifesta alta tolerabilidade em mamíferos.

Tendo em vista a ação da quinacrina sobre a sobrevida das moscas, o próximo passo foi avaliar a ação dessa droga sobre o sistema locomotor desse animal, uma vez que genótipo dessa mosca expressa A β no sistema nervoso central, a Dmel também manifesta sinal neurodegenerativo no sistema locomotor (CHAKRABORTY et al., 2011; MALTA, 2018; SILVA, 2019).

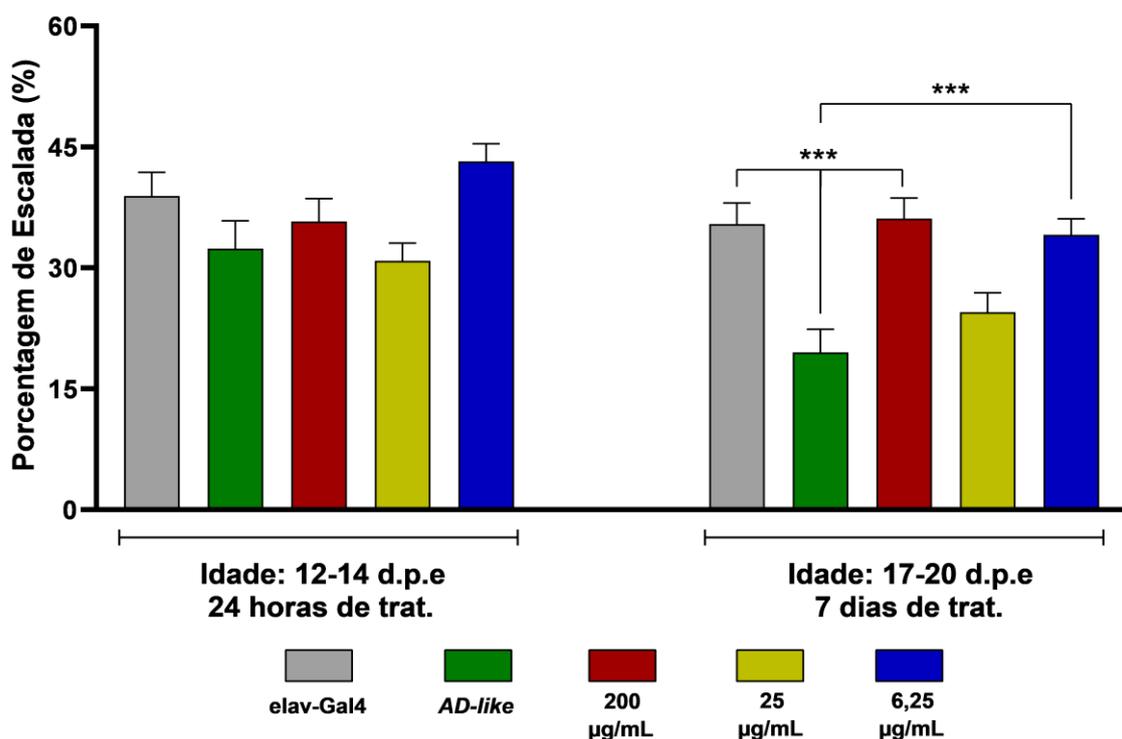
4.5. Ensaio locomotor

O teste de escalada é considerado um teste locomotor padronizado para avaliação motora de Dmel, e as moscas submetidas a esse teste foram divididas em dois perfis de tratamento: um “sintomático” (Fig. 12), em que elas passam a ser tratadas a partir do 10^o-13^o d.p.e, e o “pré-sintomático”, no qual elas passam a ser tratadas logo após a eclosão das pupas (Fig. 13).

Além disso foram feitos tratamentos em dois tempos diferentes e 5 grupos de moscas macho:

- Um grupo controle parental, que é *elav-Gal4* tratado com água destilada;
- Outro grupo controle, que é o de *AD-like*, tratado também com água;
- E os grupos *AD-like* tratados com QNC, nas doses de 200; 25 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 12 – Gráficos da escalada de perfil “sintomático”.



As doses representadas em vermelho, amarelo e azul são os tratamentos com QNC em moscas *AD-like*. As diferenças estatísticas foram geradas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, dentro de *One-way ANOVA* e representadas pelos asteriscos, sendo que *** indica $P < 0,001$.
Fonte: autoral.

Para o tratamento de 24 horas, o grupo controle “negativo” (*AD-like*) escalou em proporção semelhante aos outros, e portanto, nesse momento ainda não manifestou sequelas neurodegenerativas relevantes.

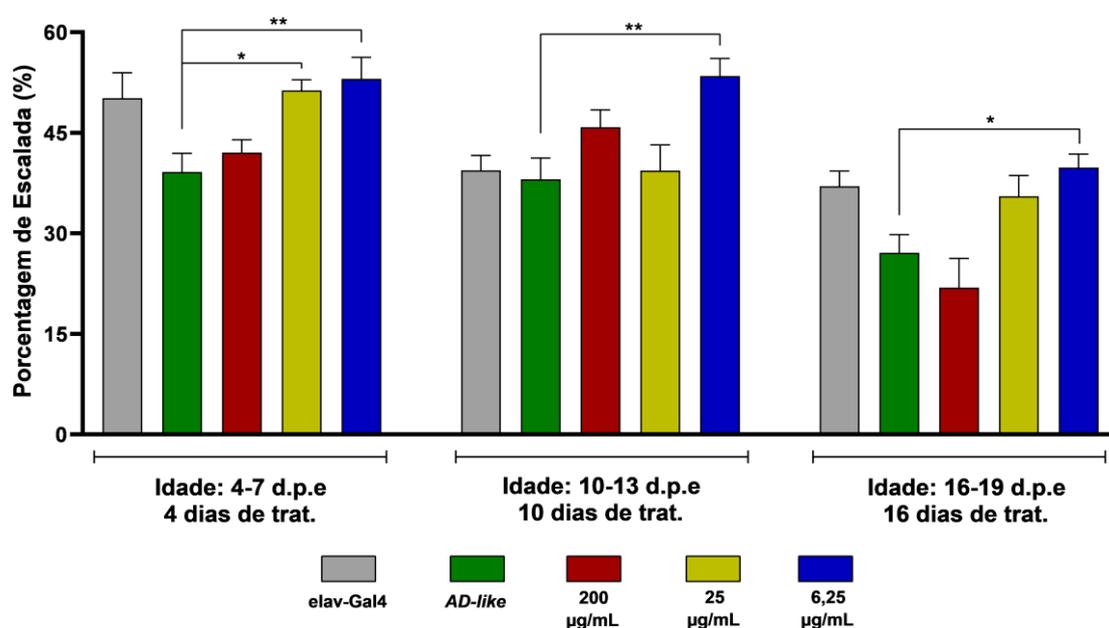
Contudo, foi possível notar uma discreta elevação no nível de escalada do grupo tratado com a dose de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de QNC, ainda que sem diferença estatística.

Em relação as mesmas moscas, porém com idade mais avançada (de 17 a 20 d.p.e) e sendo tratadas por uma semana, foi possível notar um decréscimo

significativo do grupo *AD-like* em relação ao elav-Gal4, confirmando o efeito neurodegenerativo determinante de tempo do genótipo, e foi visto eficiência significativa das doses de 200 e 6,25 µg/mL. As moscas tratadas nessas doses mantiveram a escalada quase que o dobro em relação ao restante, sendo que o grupo *AD-like* escalou 19,5%, o grupo de 200 µg/mL, 36% e o de 6,25 µg/mL escalaram 34%.

Aliado a esses resultados, temos também a escalada de perfil “pré-sintomático”, ou seja, com tratamento realizado logo após a eclosão das moscas e sem sinal neurológico (Fig. 13).

Figura 13 – Gráficos da escalada de perfil “pré-sintomático”.



As doses e os métodos estatísticos foram os mesmos do teste anterior. * indica $P < 0,03$ e ** indica $P < 0,006$. Todos os grupos, apesar de serem separados didaticamente, são o mesmo grupo avaliado em tempos diferentes de tratamento. Fonte: autoral.

Esse experimento foi realizado cinco vezes nesse perfil, sendo a primeira escalada (24h) e a última (23 dias) sem diferença estatística. Como presente no gráfico, foi visto diferença estatística na escalada com 4, 10 e 16 dias de tratamento. Na escalada de 4 dias de tratamento foi notada diferença estatística na dose de 25 µg/mL em relação ao controle, porém a maior eficácia foi vista na dose de 6,25 µg/mL por ter apresentado diferença em todos esses três testes.

No estudo de Qurashi et al. (2012), foi feito tratamento com quinacrina por via oral em moscas modelo de Síndrome do X frágil (FXTAS) e fizeram teste de

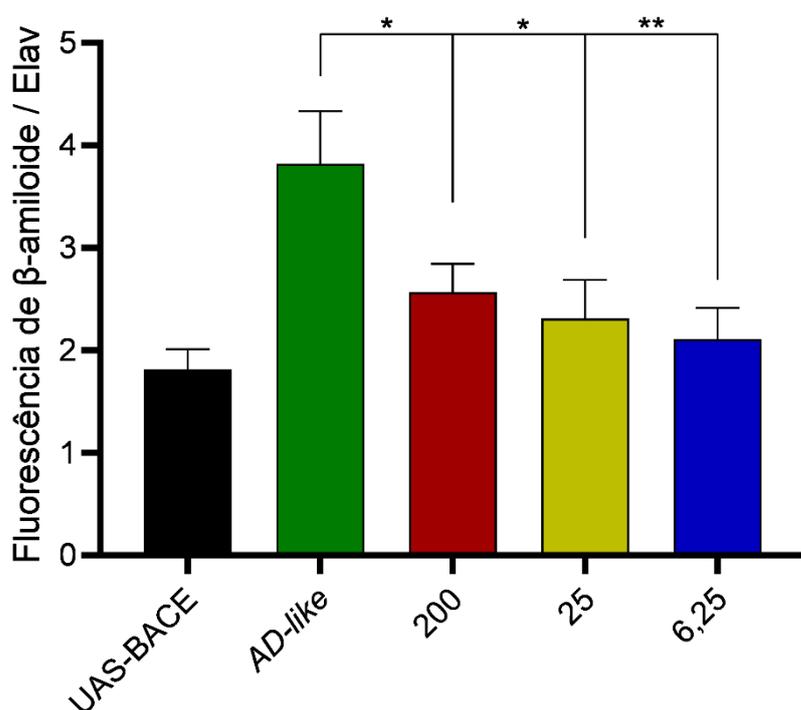
escalada com elas, observando diferença estatística do grupo tratado em relação ao controle não tratado ($P < 0,001$) (QURASHI et al., 2012). Esse foi o primeiro trabalho em que foi feito tratamento com quinacrina em moscas modelo de neurodegeneração, e que foi realizado teste de escalada para avaliação locomotora desse tratamento. O modelo de Alzheimer em Dmel que utilizamos (*elav; APP; BACE*) foi estabelecido por Chakraborty et al. (2011), o qual o validou também por teste de escalada, juntamente com os trabalhos de Silva (2019) e Malta (2018), os quais também utilizaram o mesmo modelo e mostraram a eficiência dele por meio do teste de escalada (CHAKRABORTY et al., 2011; MALTA, 2018; SILVA, 2019).

Vale lembrar o sintoma dependente do tempo, ou seja, o tempo em que os sinais neurológicos começam a se manifestar nas moscas após a fase de eclosão da pupa, em que as moscas do modelo *Elav; APP; BACE (AD-like)* apresentaram maior declínio locomotor a partir de 10 d.p.e (dias pós eclosão), e essa informação foi corroborada no estudo recente de Silva (2019), em que foi relatado declínio significativo de capacidade motora da *AD-like* em relação ao controle também em 10 d.p.e, e na quantificação de A β foi visto aumento 3 vezes maior dessa proteína em moscas com 10 d.p.e do que com zero d.p.e, sendo importante essa análise para decisão da forma de protocolo de tratamento, se seria realizado antes da manifestação dos sintomas, ou no início ou durante, e como isso poderia influenciar a resposta do modelo (CHAKRABORTY et al., 2011; SILVA, 2019).

4.6. Quantificação de β -amiloide por Tioflavina T

Sabendo que a quinacrina está envolvida com a progressão motora das moscas *AD-like* por dose-dependência, e sabendo da relação da DA com formação de monômeros/oligômeros de A β e a formação de placas amiloide, foi efetuado a quantificação de proteína A β por ensaio bioquímico de tioflavina T (Fig. 14).

Figura 14 – Gráfico do ensaio de quantificação de A β .



Essa análise foi realizada por meio da normalização desses dados com os dados de elav-Gal4, por meio do teste de D'Agostino e Pearson ($\alpha = 0,05$) para exclusão de proteínas *off target* que pudessem ser identificadas na quantificação. A diferença estatística entre os grupos foi gerada por teste de múltiplas comparações em *One-way ANOVA*, sendo que * indica $P < 0,05$ e ** indica $P = 0,003$. Unidade das concentrações nas colunas de cor vermelha, amarela e azul: $\mu\text{g/mL}$. Fonte: autoral.

Para esse experimento, inicialmente foram separadas moscas para um tratamento de perfil "sintomático", o qual foi iniciado de 17 a 20 d.p.e e tratadas com QNC nas doses presentes na Figura 14 por uma semana, e posteriormente essas moscas foram eutanasiadas em nitrogênio líquido e decapitados para coleta de cabeças.

A Tioflavina T se liga à proteína A β e também pode se ligar a outras proteínas, criando *off target* e vieses, por isso os dados foram normalizados para o grupo de elav-Gal4, o qual é o único que não produz a A β , em contraste com o grupo UAS-BACE que carrega os genes *PPA/BACE*, e consequentemente expressam A β , ainda que em níveis basais, sendo então um controle parental.

As moscas do genótipo de Alzheimer são as que expressam A β em maior quantidade e por isso o nível de fluorescência se encontra elevado no controle *AD-like*, e com o tratamento com a QNC, foi possível notar redução significativa

em todas as doses administradas por via oral, sendo que a dose de 6,25 µg/mL foi a que obteve maior diferença significativa em relação ao grupo controle.

Foi possível observar então uma ação eficaz da quinacrina na concentração de 6,25 µg/mL ($\pm 1,2$ µM), que é uma com pouca possibilidade de ser tóxica ou de criar efeitos adversos. Essa eficácia foi vista nos testes de escalada em seus perfis diferentes de tratamento, tardio e preventivo, com maior diferença estatística no perfil tardio, e atividade locomotora estável por um intervalo maior de tempo no perfil preventivo. Além disso, foi mostrado também a redução no nível de proteína A β dependente da dose sob o tratamento de quinacrina nas moscas.

Estudos prévios realizaram a mensuração de A β em Dmel por meio da Tioflavina T, porém com outros tipos de tratamentos, como extrato de Feijão “Adzuki”, o qual também provocou redução de agregação A β , e um estudo recente validou o modelo usado de Dmel para DA por meio da mensuração de A β , mostrando que os parentais não possuem elevação dessa proteína, apenas a geração seguinte carreadora do genótipo de DA (*DA-like*) (MIYAZAKI et al., 2019; SILVA, 2019).

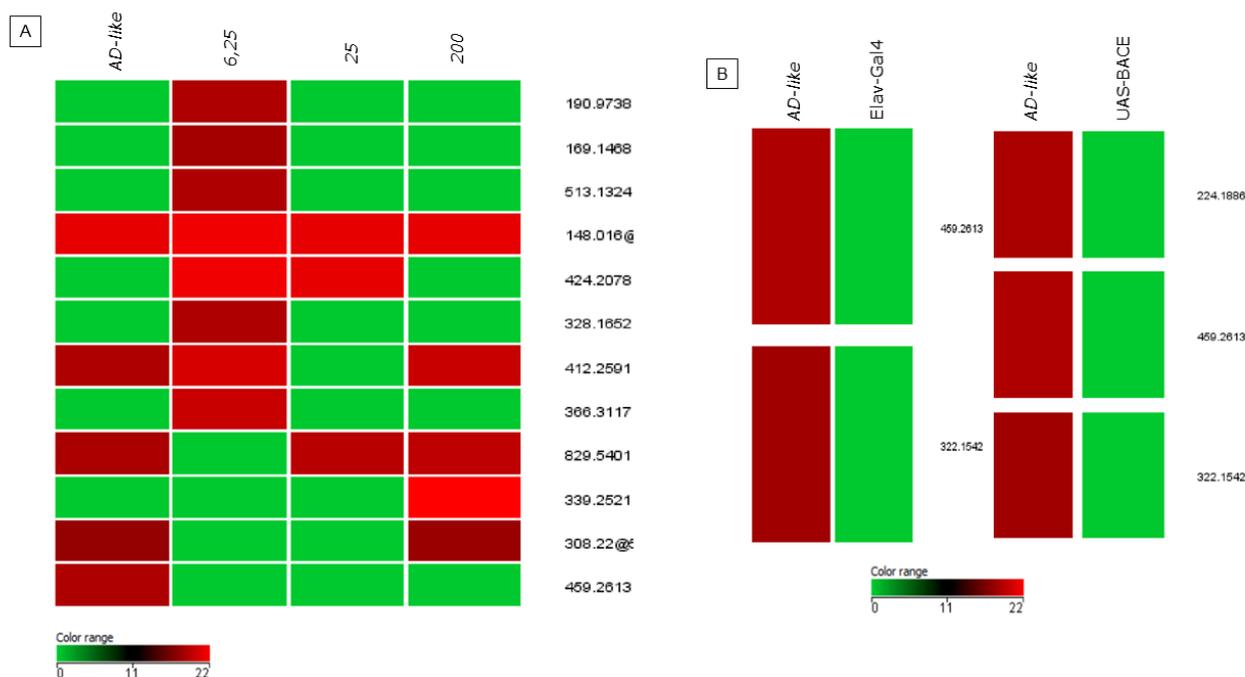
Esse é o primeiro trabalho que mensura a ação da quinacrina em modelo de Alzheimer em *Drosophila* e que demonstra a redução da A β , por mensuração de Tioflavina T, sugerindo também que a principal ação da QNC, como inibidor de PLA₂, possa ter relação direta na redução dos níveis de A β e de déficit neuronal.

Para entender melhor como esses resultados foram possíveis, decidimos identificar e quantificar o conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados após o tratamento com a quinacrina.

4.7. Ensaio de metabolômica

Foi realizado o ensaio de metabolômica com amostras das cabeças das moscas *AD-like* tratadas com quinacrina e placebo em perfil “pós sintomático”. Essa análise foi obtida por meio do aparelho *Agilent*, (EM) e foram obtidos na primeira análise os resultados presentes nas figuras 15 e quadro 2.

Figura 15 – *Heatmap* com presença e expressão dos metabólitos nas amostras de *Dmel* tratadas e não tratadas com QNC.



(A) *Heatmap* da análise dos grupos tratados com QNC (representados nas colunas com concentração em $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle *AD-like*. $P < 0,05$ e Fold Change $\geq 2,0$. (B) Dois *heatmaps* de análise do grupo controle *AD-like* com seus parentais: Elav-Gal4 e UAS-BACE. $P < 0,05$ e Fold Change $> 2,0$. A escala de *color range*, ou seja, de escala de cores, representa o nível de expressão de cada metabólito, sendo a escala de vermelho com mais expressão e escala de verde com menos. Fonte: autoral.

Na figura 15 temos três *heatmaps* representados em duas imagens, na imagem (A) temos o *heatmap* da análise dos grupos tratados com as doses 6,25; 25; 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e o grupo controle *AD-like* na primeira coluna. Nessa análise foi registrado a presença de 12 metabólitos entre esses grupos, representados pelos códigos numéricos no canto direito das linhas, por meio da análise estatística entre eles, e a expressão de cada um foi representada pela escala de cor, sendo a dose de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ o grupo em que foi relatada a expressão diferenciada de nove metabólitos em relação ao controle, sendo mais expressos ou menos expressos diferencialmente.

Na imagem (B) da figura 15 temos dois *heatmaps* de duas análises em relação aos controles, sendo a da esquerda a análise de controle *AD-like* em relação ao elav-Gal4 e o da direita a análise de *AD-like* em relação ao UAS-BACE.

Nessa imagem é possível obter dois resultados: um está relacionado com a expressão de metabólitos, no qual podemos ver os metabólitos presentes nos grupos *elav-Gal4* e *UAS-BACE* estão com menor expressão em relação ao *AD-like* e o outro resultado está voltado para a quantidade de metabólitos em comum entre os controle e o *AD-like*, sendo que na análise desse grupo em relação a *elav-Gal4*, foram encontrados dois metabólitos em comum, e na análise de *AD-like* em relação a *BACE*, foram encontrados três metabólitos.

Por outro lado, na análise das moscas *AD-like* tratadas com quinacrina e placebo, foram encontrados 12 metabólitos em comum entre esses grupos. Isso sugere que nesse genótipo possam haver modificações genéticas e epigenéticas que desencadeiem novas vias moleculares. Essa análise é corroborada pela análise de sequenciamento de RNA feito por Silva (2019), no qual identificou genes com níveis elevados de expressão em moscas *AD-like* em relação ao controle, como genes relacionados com aumento da replicação de DNA e do ciclo de Krebs (SILVA, 2019).

Em seguida temos o quadro 2, que mostra o número de metabólitos encontrados em cada comparação entre os grupos tratados e não tratados. Nele foram vistos maior número de metabólitos presentes significativamente entre o grupo *AD-like* e 6,25 µg/mL, apesar de também quantidade semelhante entre o grupo 6,25 µg/mL e 200 µg/mL.

Quadro 2 – Matriz de comparação entre os grupos tratados e não tratados em relação ao número de metabólitos encontrados em cada comparação.

	<i>AD-like</i>	6,25	25	200
<i>AD-like</i>	12	10	4	2
6,25	2	12	9	10
25	8	3	12	4
200	10	2	8	12

Os valores na cor cinza são referentes ao número de metabólitos que tiveram diferença estatística entre cada comparação. Os que estão abaixo dos quadrados de cor preta (em branco) não foram significativos. As concentrações estão presentes em µg/mL, $P < 0,05$ e Fold Change $\geq 2,0$. Fonte: autoral.

Ott et al. (2016) conduziram o único estudo relatado na literatura sobre metabolômica em Dmel modelo de Alzheimer, contudo, a metodologia foi realizada por meio de Ressonância Magnética Nuclear, diferindo do presente estudo o qual realizou a metabolômica por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa e foram identificados metabólitos presentes no grupo modelo de DA em relação ao grupo de *Drosophila* que não era modelo (OTT *et al.*, 2016).

Considerando os resultados revelados em *Drosophila melanogaster* e a eficácia da dose de 6,25 µg/mL no tratamento com quinacrina, levantamos também a hipótese sobre a participação da Glicoproteína-P nesse processo.

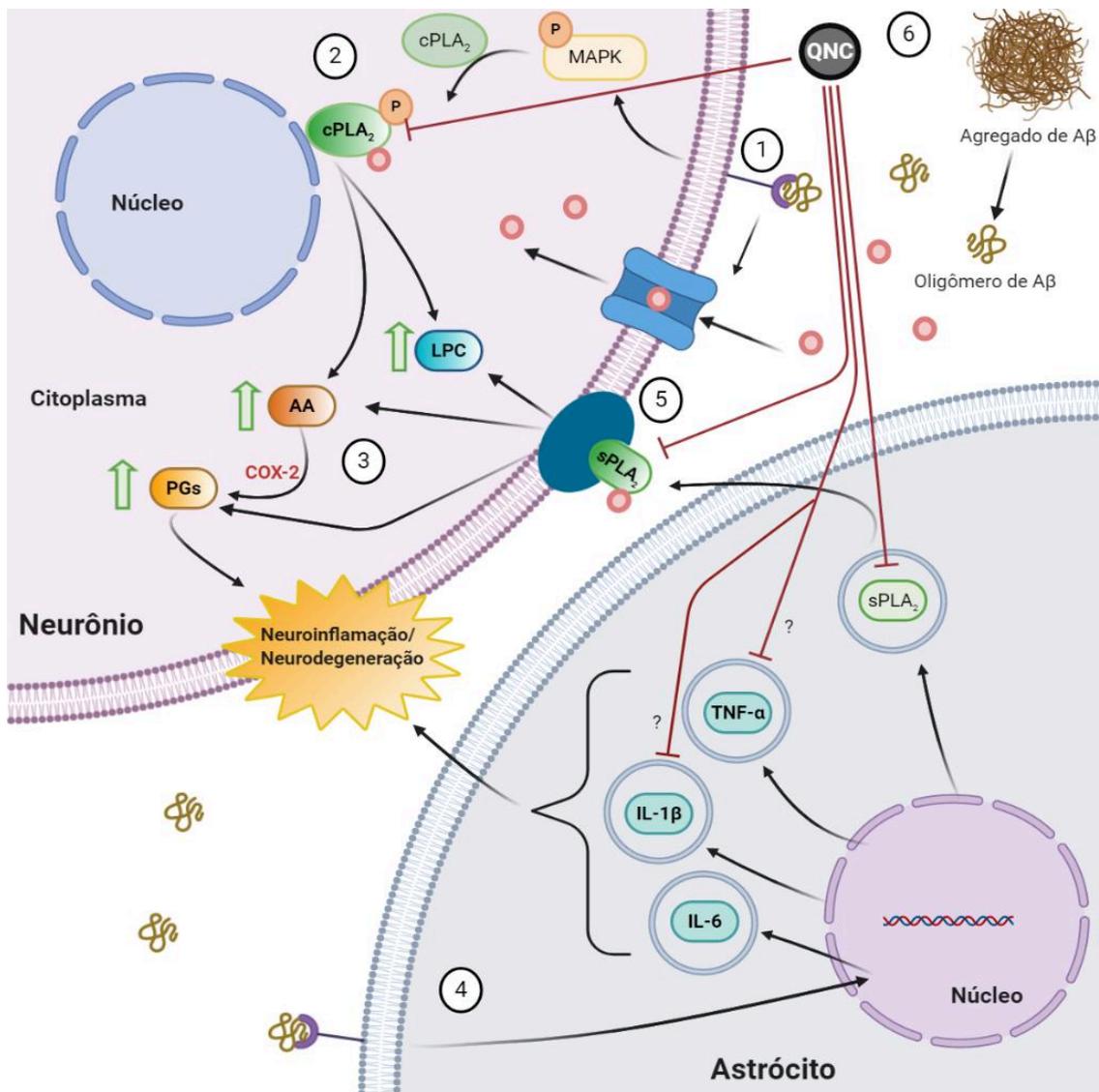
Estudos prévios mostraram que o avanço de idade tanto em humanos, quanto em ratos modelo de senescência provocou redução nos níveis de Pggs, e em pacientes com Alzheimer, bem como em animais modelos dessa doença também ocorreu associação entre a Pgp e a proteína Aβ, no qual, onde se tem presente da beta-amiloide no meio, a Pgp parece ser reduzida (CHIU *et al.*, 2015).

Em 1993 foi descrito que a glicoproteína-P está presente e expressa em *D. melanogaster* e seu gene homólogo ao gene *MDR* humano (GERRARD; STEWART; DEAN, 1993), nos fornecendo, portanto, a primeira hipótese de que o presente modelo de Doença de Alzheimer em Dmel também provoca a redução de Pgp na barreira hematoencefálica da mosca, e como visto na Tabela 1 e no item 4.3.3., a entrada da quinacrina no SNC é regulada pela Pgp, porém quando essa proteína é inibida ou reduzida, ocorre acúmulo de quinacrina no tecido alvo, logo, altas concentrações desse fármaco podem ser altamente retidas no cérebro, revelando pouca eficácia nas moscas.

Considerando os resultados presentes em nosso estudo e analisando os resultados de estudos prévios, criamos uma segunda hipótese, de que a fosfolipase A2 possui função diretamente relacionada com a patogenia da Doença de Alzheimer, tanto em humanos, quanto no modelo estabelecido em *Drosophila melanogaster* (*elav; APP; BACE*), no qual foi criado um esquema representativo de possíveis vias que são ativadas e inibidas diante do tratamento com a quinacrina, um inibidor de fosfolipase A₂ de amplo espectro, capaz de agir em seis etapas de ativação e posterior inibição da fosfolipase citosólica e secretada nos neurônios e astrócitos (Fig. 16). Essa imagem revela,

de forma hipotética, e com bases no presentes e estudos anteriores, que a cPLA₂ e a sPLA₂ são dependentes de Ca²⁺ para sua ativação, e a cPLA₂ é ativada também por meio da via de sinalização da MAPK posteriormente à ligação do monômero de Aβ com receptor de superfície da célula neural e depois de ativada, essa fosfolipase promove clivagem de fosfolipídeos, com consequente liberação de produtos dessa reação, como lisofosfatidilcolina (LPC) e prostaglandinas (PG) que conduzem reação inflamatória.

Figura 16 - Representação esquemática de vias de ativação das PLA₂ por meio de oligômeros de Aβ e a ação da quinacrina sobre elas.



A figura ilustra seis etapas, de forma hipotética, relacionadas com a ativação da cPLA₂ e sPLA₂ (Grupo IIA e III) nos neurônios e astrócitos, sendo: 1) Desprendimento dos oligômeros de Aβ dos agregados e ligação deles em receptores neuronais ainda pouco estudados. Essa ligação desencadeia cascatas de sinalização, que dentre elas é a ativação da via MAPK, que posteriormente provoca a fosforilação a cPLA₂ e paralelamente a isso, a ligação da molécula de

A β com seu receptor também provoca um aumento do influxo de Ca²⁺ (esferas cor de rosa) no citoplasma da célula. 2) No neurônio, a fosforilação da cPLA₂ está associada também com a ligação dessa molécula com os íons de Ca²⁺, os quais provocam sua translocação do citosol para membrana nuclear e ativam sua função catalítica, promovendo então a clivagem dos fosfolípidos de membrana e liberando para o meio intracelular ácido araquidônico (AA) e ácidos graxos, como lisofosfatidilcolina (LPC). 3) O AA é precursor de produção de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas (PG) por meio da ação das ciclooxigenases, como a do tipo 2 (COX-2), e esses mediadores então contribuem para o quadro de neuroinflamação, estresse oxidativo e posteriormente neurodegeneração. 4) Paralelo a essas reações, também foi encontrado reatividade astrocitária em relação à A β , sendo nela, após a ligação do peptídeo com o receptor, a ativação da transcrição e tradução de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais também são liberadas para o meio e contribuem para neuroinflamação, bem como é induzido a produção de sPLA₂ e o transporte dessa molécula para o meio extracelular, por meio de vesículas intracelulares. 5) E com o auxílio também Ca²⁺, ela aumenta sua atividade catalítica, se liga ao receptor, realizando a hidrólise de fosfolípidos de membrana nos neurônios, liberando também LPC, AA, PG e promovendo neuroinflamação e neurodegeneração. 6) Finalmente existe a hipótese e foi encontrado em estudos *in vitro* e *in vivo* a inibição (linha vermelho escuro) das PLA₂s, e possivelmente das citocinas pela QNC, onde pode ser possível regular maior parte do quadro patológico apresentado. Fonte: autoral, baseada em (CHUMANEVICH et al., 2016; FAROOQUI; ONG; HORROCKS, 2006; JANI et al., 2010; MOSES et al., 2006; PALAVICINI et al., 2017; SAGY-BROSS et al., 2015; YAGAMI; YAMAMOTO; KOMA, 2014). Ilustração criada pelo BioRender.com.

Processo semelhante ocorre com a sPLA₂ (tanto do grupo II-A, quanto do grupo III) após a ligação A β nos receptores celulares, provocando maior tradução dessa proteína e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Ao final, é possível presumir, com base nas evidências expostas, que a quinacrina inibe essas duas fosfolipases e também inibe algumas das citocinas, como TNF- α e IL-1 β , regulando o quadro de neuroinflamação e neurodegeneração presentes na DA.

Em nossos estudos foi visto que o tratamento com quinacrina regulou também os níveis de A β , conforme relatado também por Sagy-Bross et al. (2015), revelando possível relação entre PLA₂ e proteína beta-amiloide.

5. CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro trabalho que demonstrou modelagem molecular por homologia de fosfolipase A₂ de *Drosophila melanogaster*, e *docking* molecular dessa molécula interagindo com a quinacrina. Além disso, foi o primeiro a descrever o *screening* farmacocinético *in silico* da quinacrina e o *screening in vivo* dessa molécula em modelo de doença de Alzheimer em Dmel, no qual foram vistos resultados promissores (como redução dos sinais neurodegenerativos, redução dos níveis de proteína A β no cérebro de Dmel e aumento da expressão de metabólitos ainda não identificados nos grupos tratados com a concentração de 6,25 μ g/mL) e condizentes com os resultados obtidos nos trabalhos anteriores.

Tendo em vista as vantagens da Dmel no *screening* de drogas, tanto pelo ciclo curto de vida dessa espécie, quanto pelo baixo custo de manipulação e criação, também podemos ver a vantagem em ser manipulada com engenharia genética, bem como em ser modelo de Doença de Alzheimer, e tendo sido identificado PLA₂ ortóloga à humana e observando sua resposta à quinacrina, bem como a resposta também da proteína beta-amiloide, a *Drosophila melanogaster* se tornou um modelo excelente de estudo farmacológico inicial, gerando também economia para as outras etapas de estudos pré-clínicos, como estudo *in vitro* e *in vivo* em mamíferos.

Referências Bibliográficas

AHN, Misol *et al.* Pharmacokinetics of quinacrine efflux from mouse brain via the P-glycoprotein efflux transporter. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1–7, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039112>

AL ASMARI, Abdulrahman K. *et al.* Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. **BMC Nephrology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0450-8>

BARAGE, Sagar H.; SONAWANE, Kailas D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, [s. l.], v. 52, p. 1–18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>

BARUPAL, Dinesh Kumar *et al.* Sets of coregulated serum lipids are associated with Alzheimer's disease pathophysiology. **Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring**, [s. l.], v. 11, p. 619–627, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.07.002>

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - 2018. Diário da República, 1.ª série — N.º 96 de 18 de maio de 2018**. Brasília: [s. n.], 2018.

BURKE, John E.; DENNIS, Edward A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 50, n. Supplement, p. S237–S242, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>

CASELLI, Richard J; KNOPMAN, David S; BU, Guojun. An agnostic reevaluation of the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis: The role of APP homeostasis. **Alzheimer's and Dementia**, [s. l.], n. May, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/alz.12124>

CHAKRABORTY, Ranjita *et al.* Characterization of a drosophila Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 6, 2011a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020799>

CHIDAMBARAM, Hariharakrishnan; CHINNATHAMBI, Subashchandrabose. G-Protein Coupled Receptors and Tau-different Roles in Alzheimer's Disease. **Neuroscience**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.04.019>

CHIU, Catherine *et al.* P-glycoprotein expression and amyloid accumulation in human aging and Alzheimer's disease: preliminary observations. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. 2475–2482, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.020>

CHUMANEVICH, Alexander A *et al.* Repurposing the anti-malarial drug, quinacrine: new anti-colitis properties. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 33, 2016.

- CROWTHER, D. C. *et al.* Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 123–135, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.025>
- CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, [s. l.], v. 5, p. 272–293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008>
- DE ABREU, Izabella Dutra; FORLENZA, Orestes Vicente; DE BARROS, Hélio Lauer. Demência de Alzheimer: Correlação entre memória e autonomia. **Revista de Psiquiatria Clínica**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 131–136, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101-60832005000300005>
- DOLPHIN, Gunnar T. *et al.* A multimeric quinacrine conjugate as a potential inhibitor of alzheimer's β -amyloid fibril formation. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 952–963, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.200700602>
- DOMINICK, Pamela K. *et al.* Nucleic acid-binding ligands identify new mechanisms to inhibit telomerase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 14, n. 13, p. 3467–3471, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.04.055>
- EHSANIAN, Reza; VAN WAES, Carter; FELLER, Stephan M. Beyond DNA binding - A review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 13, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-13>
- FAROOQUI, Akhlaq A. *et al.* Brain cytosolic phospholipase A2: Localization, role, and involvement in neurological diseases. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 169–180, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/107385840000600308>
- FAROOQUI, Akhlaq A. *et al.* Inhibition of brain phospholipase A2 by antimalarial drugs: Implications for neuroprotection in neurological disorders. **Medicinal Chemistry Reviews - Online**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 379–392, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156720305774330485>
- FAROOQUI, Akhlaq A.; ONG, Wei Yi; HORROCKS, Lloyd A. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: Their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 591–620, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.7>
- FROSCHE, Matthew P. Sistema Nervoso Central. *In*: KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. (org.). **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 836.
- GARGANO, Julia Warner *et al.* Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*.

Experimental Gerontology, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 386–395, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>

GENTILE, M. T. *et al.* Role of cytosolic calcium-dependent phospholipase A2 in Alzheimer's disease pathogenesis. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 596–604, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8279-4>

GERRARD, Bernard; STEWART, Claudia; DEAN, Michael. Analysis of Mdr50: A Drosophila P-Glycoprotein/Multidrug Resistance Gene Homolog. **Genomics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 83–88, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1286>

GESCHWIND, Michael D. *et al.* Quinacrine treatment trial for sporadic creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology**, [s. l.], v. 81, n. 23, p. 2015–2023, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a9f3b4>

GORBACHEV, Anton V. *et al.* Quinacrine inhibits the epidermal dendritic cell migration initiating T cell-mediated skin inflammation. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 2257–2267, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200636708>

GULISANO, Walter *et al.* Role of Amyloid- β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 64, n. s1, p. S611–S631, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JAD-179935>

HAMPEL, Harald *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, [s. l.], v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>

HUANG, Yong *et al.* Quinacrine is mainly metabolized to mono-desethyl quinacrine by CYP3A4/5 and its brain accumulation is limited by P-glycoprotein. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1136–1144, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008664>

IHARA, Masafumi; SAITO, Satoshi; FRIEDLAND, Robert. Drug Repositioning for Alzheimer's Disease: Finding Hidden Clues in Old Drugs. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 1013–1028, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JAD-200049>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Em 2018, expectativa de vida era de 76,3 anos**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/26104-em-2018-expectativa-de-vida-era-de-76-3-anos>. Acesso em: 17 fev. 2020.

IRWIN, John J. *et al.* ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 1757–1768, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci3001277>

JAGUST, William. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 687–700, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0067-3>

JANI, Tanvi S. *et al.* Inhibition of NF- κ B signaling by quinacrine is cytotoxic to human colon carcinoma cell lines and is synergistic in combination with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or Oxaliplatin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 25, p. 19162–19172, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091645>

JIANG, Shangdong *et al.* Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-6>

JONES, Gareth *et al.* Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 267, p. 727–748, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>

KAUFMAN, Thomas C. A Short History and Description of Drosophila Aberrations , Forward Genetic Screens , and the Nature of Mutations. **Genetics**, [s. l.], v. 206, n. June, p. 665–689, 2017.

KUMAR, Rajesh; SHARMA, Sarita; PRASAD, Deonandan. Acridones: A Relatively Lesser Explored Heterocycle for Multifactorial Diseases. *In*: SILAKARI, Om (org.). **Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2018. p. 53–132. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102083-8.00003-0>

LANGER, Seppo W. *et al.* Inhibitors of topoisomerase II as pH-dependent modulators of etoposide- mediated cytotoxicity. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 2899–2907, 1999.

LATTAO, Ramona *et al.* Tubby-tagged balancers for the drosophila X and second chromosomes. **Fly**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 369–370, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/fly.5.4.17283>

LOERA-VALENCIA, R. *et al.* Current and emerging avenues for Alzheimer's disease drug targets. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 286, n. 4, p. 398–437, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/joim.12959>

MALTA, Serena Mares. **Avaliação do inibidor de Epóxido Hidrolase (TPPU) em Drosophila melanogaster como inibidor do processo inflamatório na Doença de Alzheimer**. 2018. Work of Final Graduation - Federal University of Uberlândia, [s. l.], 2018.

MARINHO, V.; LAKS, J.; ENGELHARDT, E. Aspectos neuropsiquiátricos das demências degenerativas não-Alzheimer. **Revista Brasileira de Neuropsicologia**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 31–37, 1997.

MASTERS, Colin L. *et al.* Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 1, p. 1–18, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>

MAWUENYEGA, Kwasi G. *et al.* Amyloid-beta isoform metabolism quantitation by stable isotope-labeled kinetics. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 440, n. 1, p. 56–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.04.031>

MIYAZAKI, Honami *et al.* Adzuki bean (“*Vigna angularis*”) extract reduces amyloid- β aggregation and delays cognitive impairment in “*Drosophila*” models of Alzheimer’s disease. **Nutrition Research and Practice**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 64, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4162/nrp.2019.13.1.64>

MOHAMED, Loqman A.; KELLER, Jeffrey N.; KADDOUMI, Amal. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- β brain load and related pathology in Alzheimer’s disease mouse model. **Biochim Biophys Acta**, [s. l.], v. 1862, n. 4, p. 778–787, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.013>

MOSES, Guna S.D. *et al.* Secretory PLA2-IIA: A new inflammatory factor for Alzheimer’s disease. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 3, p. 1–11, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-28>

MURAKAMI, Makoto *et al.* Regulatory functions of phospholipase A2. **Critical Reviews in Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 2–6, p. 121–180, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20>

NANDAN, J; NAGARKAR-JAISWAL, Sonal. Methods for Creating Fly Models to Understand the Molecular Mechanisms Underlying Neurological Diseases. *In*: MUTSUDDI, Mousumi; MUKHERJEE, Ashim (org.). **Insights into Human Neurodegeneration: Lessons Learnt from *Drosophila***. Singapura: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. p. 46.

(NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE - US). **APP Gene: amyloid beta precursor protein**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP#>. Acesso em: 29 jun. 2020.

NORTON, Sam *et al.* Potential for primary prevention of Alzheimer’s disease: An analysis of population-based data. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 788–794, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70136-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70136-X)

ONG, Wei Yi *et al.* Synthetic and Natural Inhibitors of Phospholipases A2: Their Importance for Understanding and Treatment of Neurological Disorders. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 814–831, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00073>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE-OPAS. **Demência: número de pessoas afetadas triplicará nos próximos 30 anos**. [S. l.], 2017.

Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5560:demencia-numero-de-pessoas-afetadas-triplicara-nos-proximos-30-anos&Itemid=839. Acesso em: 15 maio 2020.

OTT, Stanislav *et al.* Metabolic changes may precede proteostatic dysfunction in a *Drosophila* model of amyloid beta peptide toxicity. **Neurobiology of Aging**,

[s. l.], v. 41, p. 39–52, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.01.009>

PALAVICINI, Juan Pablo *et al.* Oligomeric amyloid-beta induces MAPK-mediated activation of brain cytosolic and calcium-independent phospholipase A2 in a spatial-specific manner. **Acta neuropathologica communications**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 56, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0460-6>

PIRES, Douglas E.V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

PRINCE, Martin *et al.* **World Alzheimer Report**. Londres: [s. n.], 2015.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>

QURASHI, Abrar *et al.* Chemical screen reveals small molecules suppressing fragile X premutation rCGG repeat-mediated neurodegeneration in *Drosophila*. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 2068–2075, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/dds024>

ROZENTHAL, M.; ENGELHARDT, E.; LAKS, J. Memória: aspectos funcionais. **Rev Bras Neurol**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 157–160, 1995.

RUBIN, Gerald M. *et al.* Comparative genomics of the eukaryotes. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5461, p. 2204–2215, 2000. Disponível em:
<https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2204>

RYU, Yoonseok *et al.* Molecular characterization of a gene encoding the *Drosophila melanogaster* phospholipase A2. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, [s. l.], v. 1628, n. 3, p. 206–210, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(03)00143-X)

SAGY-BROSS, Chen *et al.* The role of cytosolic phospholipase A2 α in amyloid precursor protein induction by amyloid beta1-42: Implication for neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 132, n. 5, p. 559–571, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.13012>

SANCHEZ-MEJIA, Rene O. *et al.* Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1311–1318, 2008. Disponível em:
<https://doi.org/10.1038/nn.2213>

SANES, Joshua R.; JESSELL, Thomas M. O encéfalo que envelhece. *In*: KANDEL, Eric R. *et al.* (org.). **Princípios de Neurociência**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014a. p. 1167–1168.

- SATO, Hiroyasu *et al.* Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 120, n. 5, p. 1400–1414, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI40493>
- SHARMA, R. P.; CHOPRA, V. L. Effect of the wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 461–465, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90108-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90108-1)
- SHARMA, Vartika *et al.* Mighty Fly: An Introduction to *Drosophila*. In: MUTSUDDI, Mousumi; MUKHERJEE, Ashim (org.). **Insights into Human Neurodegeneration: Lessons Learnt from *Drosophila***. Singapura: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. p. 2–27.
- SILVA, Jéssica Regina da Costa. **Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo de doenças neurodegenerativas : de análises transcricionais à avaliação comportamental**. 2019. - Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2206>
- SILVA, Renata *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: Induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 149, p. 1–123, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- SIX, David A; DENNIS, Edward A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], p. 1–19, 2000.
- SMALL, Scott A.; MAYEUX, Richard. Doença de Alzheimer. In: ROWLAND, Lewis P.; PEDLEY, Timothy A. (org.). **Tratado de Neurologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 1080–1082.
- SMITH, Colleen; MARKS, Allan D; LIEBERMAN, Michael. Síntese de Ácidos Graxos, Triacilgliceróis e dos Principais Lipídeos de Membrana. In: SMITH, Colleen; MARKS, Allan D; LIEBERMAN, Michael (org.). **Bioquímica Médica Básica de Marks**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007a. p. 612–613.
- SOLANA-MANRIQUE, Cristina *et al.* *Drosophila* as a Model System for the Identification of Pharmacological Therapies in Neurodegenerative Diseases. In: MUTSUDDI, Mousumi; MUKHERJEE, Ashim (org.). **Insights into Human Neurodegeneration: Lessons Learnt from *Drosophila***. Singapura: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. p. 434–458.
- STRANGE, Kevin. Drug discovery in fish, flies, and worms. **ILAR Journal**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 133–143, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw034>
- SZABO, Mihaly *et al.* Cell and small animal models for phenotypic drug discovery. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 1957–1967, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129447>

TEIXEIRA, Jane Blanco *et al.* Doença de Alzheimer: Estudo da mortalidade no Brasil, 2000-2009. **Cadernos de Saude Publica**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 850–860, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00144713>

TENG, Tao *et al.* Cytosolic Phospholipase A 2 Facilitates Oligomeric Amyloid- β Peptide Association with Microglia via Regulation of Membrane-Cytoskeleton Connectivity. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 3222–3234, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1304-5>

WAGNER, M. *et al.* Mechanisms of cell activation by heavy metal ions. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 443–452, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19981205\)42:3<443::AID-JBM14>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981205)42:3<443::AID-JBM14>3.0.CO;2-H)

YAGAMI, Taturou; YAMAMOTO, Yasuhiro; KOMA, Hiromi. The role of secretory phospholipase A2 in the central nervous system and neurological diseases. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 863–876, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8565-9>

YAO, Kwok Ming; WHITE, Kalpana. Neural specificity of elav expression: Defining a Drosophila promoter for directing expression to the nervous system. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 41–51, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63010041.x>

YUI, Daishi *et al.* Enhanced phospholipase A2 group 3 expression by oxidative stress decreases the insulin-degrading enzyme. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143518>

YUKSEL, Melike; TACAL, Ozden. Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 856, n. February, p. 172415, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172415>

ZHANG, Leguo *et al.* Oleanolic acid protects against cognitive decline and neuroinflammation-mediated neurotoxicity by blocking secretory phospholipase A2 IIA-activated calcium signals. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 99, n. 16, p. 95–103, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.04.015>

ZHANG, Yun-wu *et al.* APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1–13, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>

ZIMMERMANN, Lukas *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 430, n. 15, p. 2237–2243, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>