

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação do inibidor de Epóxido Hidrolase (TPPU) em *Drosophila melanogaster* como
inibidor do processo inflamatório na Doença de Alzheimer

Serena Mares Malta

Uberlândia - MG

Julho 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do inibidor de Epóxido Hidrolase (TPPU) em *Drosophila melanogaster* como inibidor do processo inflamatório na Doença de Alzheimer

Serena Mares Malta

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Orientador

Msc. Jéssica Regina da Costa Silva

Co-orientador

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do inibidor de Epóxido Hidrolase (TPPU) em *Drosophila melanogaster* como
inibidor do processo inflamatório na Doença de Alzheimer

Serena Mares Malta

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de .

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do inibidor de Epóxido Hidrolase (TPPU) em *Drosophila melanogaster* como
inibidor do processo inflamatório na Doença de Alzheimer

Serena Mares Malta

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira
Orientador

Msc. Jéssica Regina da Costa Silva
Co-orientador

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em / /

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coordenador do curso de Biotecnologia

Uberlândia – MG

Julho – 2018

*Why should I worry about tomorrow, when I know
that all I got to do is trust You Lord?
Behind the scenes and in the details
You plan the perfect way for me
For good, every little thing, everything will be all right.*

- Hillsong Young & Free

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por ter me guiado em todo meu trajeto até aqui.

A minha mãe Silézia pelo apoio, carinho, e toda ajuda durante toda minha vida e em todas as etapas dela e também ao meu irmão Rodolfo. Pelo exemplo de luta e perseverança, pelas orações enquanto eu achava que tudo ia desmoronar. Por nunca terem duvidado da minha capacidade. Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos de vida, que estiveram comigo vivendo juntos momentos tão importantes, em especial à Isabelis (boatos que o nome certo dela é Isabela), e a Fer que fez a gentileza de me perseguir desde a 3º série sempre na mesma sala, no mesmo curso de faculdade e no mesmo mês de aniversário.

Aos amigos que conheci na faculdade e fizeram parte dessa experiência, compartilhando desesperos de provas, alegrias de aprovações e perrengues do dia a dia, gratidão ao Matheus, Felipe, Vinícius e ao Valter por estar sempre presente. Aos que além de amigos, foram companheiros de laboratório Lucas Matos e Letícia Leandro, gratidão por todas comidinhas compartilhadas, graminhas de TCC e apoio nos experimentos, vocês são as melhores companhias.

À toda equipe do LABGEN, aos que não estão perto (Paty e Ana), aos que sempre estiveram presentes, e aos que chegam a cada dia, vocês são uma equipe incrível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira, por me receber em seu laboratório sem nunca me julgar pelos atrasos ou notas quando fui sua aluna em uma das disciplinas. Por te enxergado como mais do que um currículo e um CRA, e sim como uma pessoa capaz, por ter depositado tanta confiança em mim e me atribuído responsabilidades que até então eu não sabia se seria capaz de cumpri-las, hoje posso dizer que esse trabalho é resultado de tudo de bom que você representa pra mim.

À Profª Ana M. Bonetti, que embora não fosse minha orientadora, sempre reconheceu meu esforço e encheu o laboratório todos os dias com sua vitalidade e bom exemplo.

Quase por último porém não menos importante, agradeço a minha Co-Orientadora Jéssica Regina, por ter rompido todas as barreiras de hierarquia e ter sido muito mais minha amiga do que eu jamais poderia imaginar. Por todo apoio durante todo meu trabalho, o mérito da conquista não é só meu, tem uma parte de você em cada etapa disso tudo. Gratidão pela pessoa que você é e pela forma como você se dedica a ajudar a qualquer um que necessite. Ao meu amigo José (noivo da menina Jéssica), que mesmo não sendo do laboratório e não tendo

nenhuma obrigação, me ajudou de forma imensurável. Vocês, assim como sua família, foram muito importantes pra mim e eu sou muito grata por isso.

Agradeço aos que não foram citados aqui, mas que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo.

Agradeço a todos os professores, técnicos e funcionários do curso de Biotecnologia que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Agradeço ao CNPq, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica, assim como a CAPES e UFU pelos equipamentos e instalações concedidas.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (D.A) é responsável por 60-70% dos casos de demência diagnosticados, cujo aumento estimado é de 10 milhões de diagnósticos anuais. A D.A é descrita como um declínio cognitivo progressivo que afeta a capacidade de formação de memória recente como também funções intelectuais básicas. Neuropatologicamente, é caracterizada pelo acúmulo de placas β amiloides e formação de emaranhados neurofibrilares, além disso, apresenta um caráter inflamatório que pode ser alvo de estudos para desenvolvimento de terapias. Diante disso, inibidores de epóxido hidrolase solúvel a base de uréia, cuja eficácia como anti-inflamatório já foi comprovada em diferentes casos, podem desempenhar um papel positivo no tratamento de D.A uma vez que apresenta efeito neuroprotetor. Dado a incidência da D.A e como ela prejudica os indivíduos afetados, é de extrema importância estudar tal patologia a fim de elucidar os processos envolvidos e desenvolver possíveis terapias. Uma das formas eficientes para realização desse estudo, é o uso de organismo modelo como *Drosophila melanogaster*, que além de um baixo custo, fácil manutenção e curto ciclo de vida, apresenta também um alto grau de conservação biológica entre seu genoma e o de humanos, e permite manipulação genética a fim de se obter modelos que mimetizem o processo da D.A. Neste estudo, buscamos investigar a toxicidade do inibidor de epóxido hidrolase solúvel TPPU em *Drosophila melanogaster*, como também avaliar seu efeito na progressão do Alzheimer em moscas modelos para a doença. Os resultados mostraram a viabilidade de se usar determinadas concentrações para tratamentos nas moscas, e também a não modulação dos efeitos da doença (avaliados por meios de teste comportamentais) nas moscas modelos de D.A.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, Doença de Alzheimer, TPPU.

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura química do 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU)	16
2. Curva de toxicidade do TPPU	19
3. Visualização da presença e ausência de pupas em meios contendo TPPU	19
4. Avaliação da presença de pupas e eclosão de adultos em meios contendo TPPU	20
5. Comparação da escalada entre machos e fêmeas modelos de Alzheimer tratadas com TPPU.....	22
6. Comparação da % da escalada entre moscas machos modelos de Alzheimer e seus parentais.....	23
7. Comparação da % de escalada entre moscas modelos de Alzheimer quando tratadas com veículo em relação ao controle negativo de água	27
8. Comparação da % de escalada entre os tratamentos com TPPU e o controle tratado com veículo (PEG).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

1. μL – microlitros
2. APP – Proteína precursora amiloide
3. βA – Beta amiloide
4. D.A – Doença de Alzheimer
5. EET – Ácido epoxieicodatrúenico
6. EHs – Epóxido hidrolase solúvel
7. HJ – Hormônio Juvenil
8. mg – miligrama
9. mL - mililitro
10. PEG – Polietileno glicol
11. RING – *Rapid Interactive Negative Geotaxis*
12. TPPU - 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. METODOLOGIA	15
3.1. Obtenção dos organismos modelos utilizados	15
3.2. Droga	15
3.3. Ensaio de toxicidade	16
3.4. Tratamento	17
3.5. Avaliação comportamental	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	26
6. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A demência, caracterizada como uma síndrome que implica na diminuição da capacidade intelectual, é uma das causas principais de incapacidade e dependência entre idosos no mundo. Dentre os casos de demência diagnosticados, 60-70% destes são consequências da Doença de Alzheimer considerada então a forma mais comum de demência. (MENTAL; GAP; PROGRAMME, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2017 já existiam 50 milhões de pessoas acometidas por demência e estima-se um aumento anual de 10 milhões de novos diagnósticos.

A Doença de Alzheimer (D.A) é descrita como um declínio cognitivo progressivo que se inicia geralmente com prejuízo na capacidade de formação de memórias recentes, e evolui afetando todas as funções intelectuais básicas além de possibilitar a morte prematura (MAYEUX; STERN, 2012) . A D.A pode manifestar-se precocemente quando ocorre em indivíduos com menos de 60 anos, e tardiamente em indivíduos acima de 65 anos, sendo que a diferença primordial entre essas duas formas está relacionada à suas características genéticas específicas (VIEGAS et al., 2011). A manifestação tardia é a mais comum, e representa 95% dos casos diagnosticados (OJOPI; BERTONCINI; DIAS NETO, 2004).

As características neuropatológicas da D.A. incluem redução de massa encefálica, lesões que podem resultar na perda de neurônios e funções sinápticas, depósitos extracelulares de peptídeo β amiloide (β A) no córtex, placas senis e também os emaranhados neurofibrilares (GEMELLI, et al., 2013; SERRANO-POZO et al., 2011). O processo proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) quando realizado pelas enzimas β e γ -secretase resultam em fragmentos de β A insolúveis que ao serem acumulados nos tecidos neuronais formam agregados fibrilares levando à neurotoxicidade (SERENIKI; VITAL, 2008; VIEGAS et al., 2011).

A Hipótese da Cascata Amiloide considera o efeito neurotóxico de β A como parte essencial do desenvolvimento da doença, e seu acúmulo e agregação são os responsáveis pela formação de placas senis cuja concentração pode estar relacionada com o grau de demência dos afetados. Os emaranhados neurofibrilares por sua vez, são compostos pela proteína TAU que está associada aos microtúbulos dos axônios (VIEGAS et al., 2011), cuja função é estabilizar os microtúbulos e regular os transportes axonais.

A hiperfosforilação anormal da proteína TAU, tem como consequência a degeneração progressiva dos neurônios (SALIM; ABRAHIN, 2012) como também apresenta certa

toxicidade aos mesmos. Diante disso, maneiras de se obter a neuroproteção são sempre de interesse nos estudos relacionados a D.A. Os metabólitos oriundos da clivagem do ácido araquidônico chamados de ácido epoxieicosatrienóico (EET), quando presentes, são rapidamente convertidos em di-hidroieicosatrienóicos por meio de hidrólise realizada pelas epóxido hidrolase solúveis (EHs), e o que os estudos indicam é que o aumento de EET através da inibição das EHs, tem surtido um efeito neuroprotetor e anti-oxidante (YAO et al., 2016).

Estudos com inibidores de EHs a base de ureia, apontam que estes possuem caráter anti-inflamatório (INGRAHAM; GLESS; LO, 2011; SHEN; HAMMOCK, 2012), e o uso desses inibidores podem apresentar resultados positivos no tratamento de D.A. já que diferentes estudos indicam que existe um processo inflamatório associado a D.A. capaz de influenciar no desenvolvimento e progressão da doença (AKIYAMA et al., 2000; LEE et al., 2010; MEDEIROS, 2007).

Evidências foram encontradas em cérebros de pacientes com D.A. a partir de exames *post mortem*, nos quais haviam mediadores inflamatórios em abundância (ROCHA et al., 2011) validando assim a correlação entre o processo inflamatório e a doença (SASTRE; KLOCKGETHER; HENEKA, 2006). Portanto, algumas das abordagens para o tratamento da D.A. incluem o uso de anti-inflamatórios, uma vez que é aceitável supor que são capazes de atuar como protetores neurais (IMIG; HAMMOCK, 2009; SIMPKINS et al., 2009) e que consequentemente tem potencial em aumentar o desempenho cognitivo (HALLIDAY et al., 2000).

Uma das formas eficientes para estudos de doenças como D.A., é o uso de organismos modelos como *Drosophilas*, camundongos entre outros, que auxiliam no maior entendimento dos mecanismos da doença, ajudam na elucidação dos fenômenos naturais e permitem o conhecimento sobre a ação de medicamentos em potenciais (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). A abordagem de *Drosophila melanogaster* como modelo para estudo de doenças neurodegenerativas é consolidada devido ao elevado grau de conservação biológica entre os genomas da mosca e de humanos, a disponibilidade de técnicas para manipulação e a vantagem do curto ciclo de vida (BILEN; BONINI, 2005).

A semelhança dos aspectos da biologia celular entre *Drosophila* e humanos, abrange desde a expressão gênica até sinaptogênese, conectividade neural, sinalização e morte celular (SANG; JACKSON, 2005). *Drosophilas* apresentam um sistema nervoso complexo, atraente para estudos de disfunção neuronal e doenças neurodegenerativas com capacidade de desenvolver comportamentos como aprendizagem e memória (CHAN; BONINI, 2000). Além

disso, há a possibilidade da expressão de proteínas mutantes que provocam a neurodegeneração mimetizando assim as doenças observadas em humanos e aumentando seu potencial como modelo de estudo dessas patologias (SANG; JACKSON, 2005).

O uso de linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster* encontradas em centros de estoques como o Bloomington, são preciosas ferramentas nos estudos relacionados a diferentes doenças incluindo a D.A. O cruzamento entre linhagens expressando GAL4 (*driver*) com linhagens expressando UAS (*responder*) tem como resultado proles que expressam os genes acoplados ao *responder* em locais específicos direcionados pelo *driver*. No caso de moscas modelos de D.A que mimetizam a via amilodogênica do processo humano, tem-se expresso proteínas precursora de amiloide (APP) e enzima β -secretase (BACE) ambos acoplados a UAS e direcionados ao cérebro (CHAKRABORTY et al., 2011; DAHMANN, 2008).

Sendo a D.A., uma patologia com grande incidência na população mundial, abordagens alternativas para tratamentos tornam-se relevantes como forma de minimizar os efeitos causados por ela. Uma dessas alternativas é o uso de anti-inflamatórios e inibidores de epóxido hidrolase. Por esse motivo é interessante avaliar como o uso de TPPU pode afetar o organismo de estudo e o desenvolvimento da patologia.

É válido considerar que o TPPU é comprovadamente eficiente para tratamentos em processos inflamatórios de outras doenças como periodontite em modelo animal (SILVA, 2016), porém, ainda não é cientificamente comprovado sua eficácia em relação às neurodegenerativas. Portanto, conhecer seus efeitos em organismos modelos de D.A, é de grande importância para compreender parte dos mecanismos da doença e desenvolver uma possível forma de tratamento que poderá ser mais explorada em trabalhos futuros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação do TPPU em *Drosophila melanogaster* modelo de D.A.

2.2. Objetivos Específicos

Determinar a toxicidade de diferentes concentrações de TPPU;

Estabelecer tratamentos em *Drosophila melanogaster* com diferentes concentrações de TPPU;

Avaliar ação do composto através de teste comportamental;

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção dos organismos modelos utilizados

Para a realização desse trabalho, foram utilizadas moscas (*Drosophila melanogaster*) do tipo selvagem *Canton S*, e em outro momento foram utilizadas moscas geneticamente modificadas, obtidas por meio do banco de estoque do Bloomington: P{GawB}elav^{C155},P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4,P{hsFLP}1,w^{*}(BL#5146) e w¹¹¹⁸,P(UAS-BACE,UAS-APP1.L)2 (BL#29877) que de agora em diante serão mencionadas como elav-Gal4 e UAS-BACE respectivamente. As moscas foram mantidas em estufas à 25 °C com ciclo circadiano de 12/12 horas de claro e escuro.

Para obtenção das moscas modelos de Alzheimer, foi realizado um cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 com machos da linhagem UAS-BACE. As linhagens parentais foram previamente expandidas, e alocados em frascos de vidro contendo meio de cultura padrão Bloomington. O cruzamento denominado expansão foi mantido durante 10 dias, no 7º dia foram retiradas todas as moscas utilizadas no cruzamento, e a partir do 10º dia foram coletadas fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 e realizado o cruzamento com machos da linhagem UAS-BACE, após 7 dias de cruzamento os frascos foram esvaziados e realizada coletas de pupas selecionadas que após eclodirem deram origem a moscas com genótipo w^{*}, elav-GAL-4; ; UAS-BACE,UAS-APP/+ citadas nesse trabalho como moscas modelos de Alzheimer.

3.2 Droga

O TPPU foi sintetizado por Paul D. Jones e doado pelo Prof. Dr. Bruce Hammock da *University of California - Davis*, a Figura 1 mostra sua estrutura química, cuja fórmula molecular é C₁₆H₂₀F₃N₃O₃ e seu aspecto é de um pó branco.

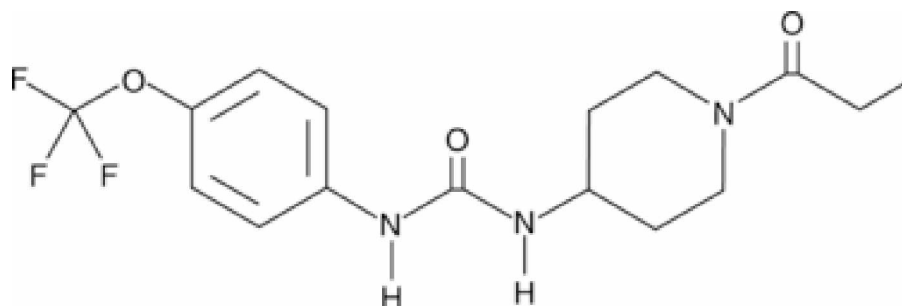


Figura 1. Estrutura química do 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU)

Para uso nesse trabalho o TPPU foi previamente diluído em polietilenoglicol (PEG), e considerando as características químicas do TPPU, a mistura de TPPU + PEG na concentração de 10mg/mL foi sonicada e deixada repousando *overnight* em temperatura ambiente de modo que, ao final, obtivemos uma solução límpida e cristalina.

Para se obter as concentrações desejadas tanto para apenas o veículo (PEG) quanto para a mistura droga + veículo, ambos foram diluídos em água destilada e homogeneizados por meio de agitação.

3.3 Ensaio de toxicidade

Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram submetidas ao ensaio de toxicidade a fim de definir quais doses seriam utilizadas nos testes de tratamento com moscas do modelo de Alzheimer. As moscas recém eclodidas foram inseridas em *vials* (tubos de acrílico transparentes) contendo meio de purê enriquecido (RIBEIRO; GAIVÃO, 2010) preparado com água e TPPU previamente diluído PEG.

Foram submetidas às seguintes concentrações: 12µg/mL, 6µg/mL, 3µg/mL, 1,5µg/mL e 0,75µg/mL do composto (ISLAM et al., 2017), acompanhadas pelos controles de água, e veículo PEG em concentração de 3,24% (v/v). Foi usado uma quantidade média de 27 moscas por *vial* e cada dose foi testada em triplicata. O volume total da preparação dos meios para cada *vial* foi de 5mL.

A obtenção da curva de toxicidade, foi feita a partir da contagem do número de mortes dos indivíduos a cada troca do meio durante 20 dias. Através deste ensaio foi também avaliado a presença de pupas em cada concentração do tratamento e suas respectivas taxas de eclosão, foi feita contagem manual seguida de análise estatística dos dados.

3.4 Tratamento

Após obtenção dos resultados do ensaio de toxicidade, foi estabelecido quais dosagens de TPPU seriam utilizadas no tratamento de moscas modelos de Alzheimer, as concentrações escolhidas foram 3µg/mL e 1,5µg/mL e controle de PEG a 0,824% (v/v). Foram feitos dois tratamentos em tempos distintos e sob diferentes condições. No primeiro momento, machos e fêmeas foram tratados separadamente e avaliados durante 14 dias com *n* de aproximadamente 16 moscas por *vial*. No segundo momento o tratamento foi aplicado apenas em machos, avaliados também durante 14 dias com *n* experimental médio de 30 moscas por *vial*. Em ambas as condições foram usados moscas das 3 linhagens (Alzheimer e ambos os parentais) todas com o mesmo intervalo de idade.

Mantidas na estufa a 24 °C, com troca do meio por 3 vezes na semana até a finalização de todo o processo, as moscas foram alimentadas com purê enriquecido preparado apenas com água destilada em seus primeiros dias de vida. A administração da droga por meio da alimentação começou quando as moscas atingiram idade na faixa de 8-12 dias após a eclosão, as que foram selecionadas para controle negativo, permaneceram em meio de purê feito com água destilada, e as moscas selecionadas para controle de veículo e tratamento passaram a receber sua alimentação de purê enriquecido preparado com solução contendo veículo e TPPU respectivamente.

Todas as dosagens utilizadas no tratamento foram testadas em triplicatas e todo o processo de tratamento sob a segunda condição (utilizando apenas machos) foi realizado em duplicata para melhor validação dos resultados obtidos.

3.5 Avaliação comportamental

O teste de RING (*Rapid Interactive Negative Geotaxis*) originalmente descrito por Gargano et (2005) consiste na avaliação do desempenho locomotor de *Drosophila melanogaster* através da capacidade de escalada. As moscas submetidas aos tratamentos com TPPU acompanhada de seus controles foram então avaliadas por meio deste teste no qual utilizou-se tubos transparente de 9,5 cm de altura por 2,3 cm de diâmetro que foram alocados em raque de doze lugares, após a alocação foram mantidas por 20 minutos em repouso e silêncio, a 40cm de distância de uma fonte luminosa constituída por lâmpada fluorescente de cor branca com as seguintes especificações: 18W, 220V, 6500K e 122mA. Após o período de

ambientação deu início à avaliação da escalada. Cada *vial* continha uma quantidade média de 27 moscas, e após desloca-las para o fundo dos mesmos por meio de 3 batidas consecutivas em esponjas, avaliou-se o progresso de escalada de uma altura igual ou superior a 5 centímetros, em função do tempo igual a 4 segundos. Esse teste pode indicar quando há redução da atividade locomotora associada a idade ou a fatores como neurodegeneração (MESQUITA et al., 2008).

As moscas foram avaliadas em diferentes tempos de tratamento, após 24 horas em meio contendo droga, 7 dias e 14 dias. Todos os procedimentos foram filmados com câmera de 8 megapixels, e as análises iniciais dos testes RING foram feitas utilizando-se o programa Quicktime®, com padronização de 4 segundos completos correspondentes a 120 frames de leitura do vídeo. A contagem dos frames foram feitas a partir do tempo em que a raque foi alocada em superfície plana após o deslocamento das moscas, sendo esse considerado como tempo 0 da escalada.

3.6 Análise estatística

Todos os dados obtidos nesse trabalho foram submetidos à análise estatística nos testes D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e KS todos para verificação da normalidade com α 0,05. As médias obtidas nos testes de toxicidade e o primeiro teste comportamental (realizado com machos e fêmeas), foram submetidas ao teste ANOVA sendo em seguida feito comparações múltiplas por meio do teste de *Tukey* (α 0,05). Os dados coletados na análise de empupamento e eclosão foram analisados por meio do teste *Kruskal-Wallis* ($P < 0,05$) sendo este um teste não paramétrico. Os resultados dos testes comportamentais feitos apenas com machos foram analisados por meio de teste *t* com significância estabelecida em $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas através do software GraphPad PrismR versão 7 com apresentação de valores com mínimo, média e máximo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da toxicidade do TPPU

Para a avaliação de toxicidade do composto com as moscas da linhagem *Canton S*, foram comparadas as porcentagens de sobrevivência entre os tratamentos nas diferentes doses (12, 6, 3, 1,5 e 0,75 $\mu\text{g/ml}$) e os grupos controles que receberam apenas água ou veículo (Figura 2).

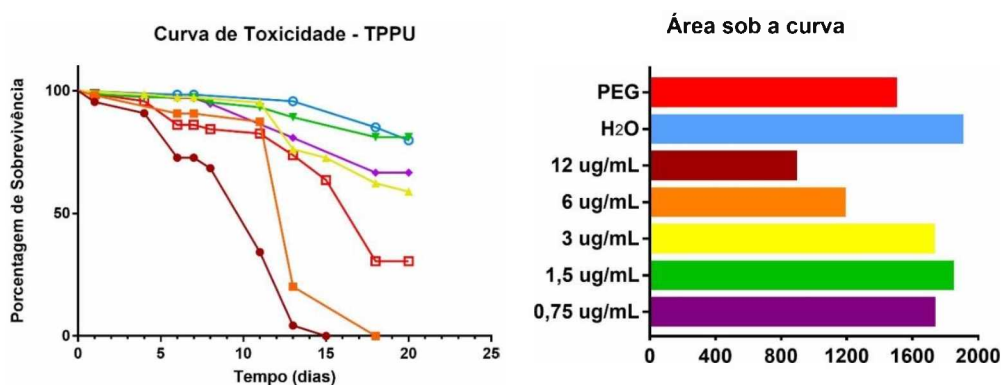


Figura 2- Curva de toxicidade do TPPU (A) Representação gráfica da % de moscas da linhagem Canton S, durante 21 dias de ensaio. (B) A área da curva de cada tratamento é representada nesse gráfico mostrando visualmente as diferenças que cada curva apresentou no decorrer do experimento.

Foi possível observar conforme mostrado na Figura 2, uma alta taxa de mortalidade nos tratamentos com TPPU em doses de 12µg/ml e 6µg/ml. O controle negativo feito com veículo (PEG) em concentração igual a 3,24% (v/v), também provocou uma alta taxa de mortalidade. No entanto, as moscas apresentaram maior taxa de sobrevivência no veículo quando comparado com moscas tratadas na maior dose de TPPU (12µg/ml - todas morreram no 15º dia de tratamento).

Como foram tratados indivíduos adultos, as fêmeas realizaram ovoposição em meio contendo TPPU. Por isso foi observar a redução e em alguns casos até mesmo ausência de pupas em *vials* nos diferentes tratamentos, consequentemente, foi avaliado a taxa de eclosão que essas pupas apresentaram de modo que isso foi capaz de auxiliar nas etapas seguintes desse trabalho.



Figura 3- Visualização da presença e ausência de pupas em meios contendo TPPU.

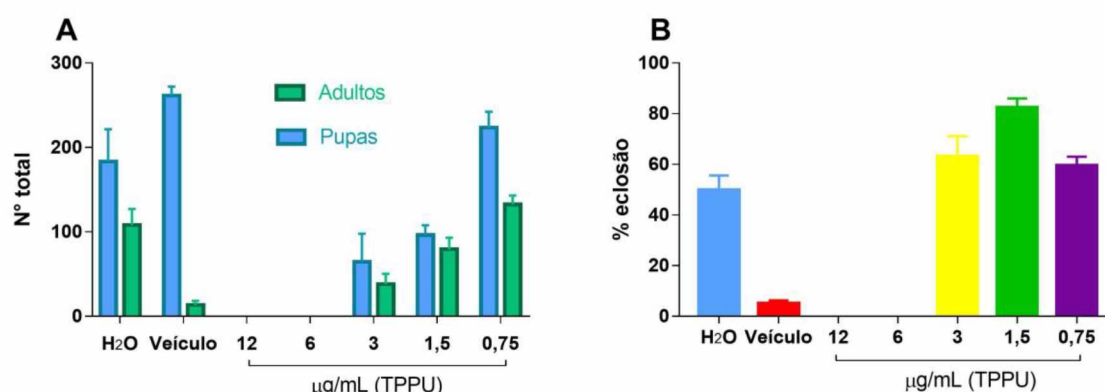


Figura 4- Avaliação da presença de pupas e eclosão de adultos em meios contendo TPPU. (A) Quantidade total de pupas presente nos *vials* de cada tratamento e a quantidade respectiva de eclosão. (B) Taxa de eclosão das pupas nos diferentes tratamentos.

Como podemos observar na Figura 3, a presença do TPPU nas maiores concentrações avaliadas (12µg/mL e 6µg/mL) resultou na completa ausência de pupas. Já os meios contendo TPPU em concentrações iguais a 3µg/mL e 1,5µg/mL, embora tenham tido uma menor quantidade de pupas em relação ao controle negativo (H₂O), Figura 4A ainda assim obtiveram uma boa relação entre a razão do número de pupas presentes no frasco pelo número de eclosão das mesmas. Tanto o veículo quanto o tratamento com TPPU 0,75µg/mL não interferiram na quantidade de pupas presentes no meio, porém, das pupas alocadas em *vials* cujos parentais e larvas receberam meio preparado contendo veículo, poucas eclodiram Figura 4B.

A não eclosão das pupas em altas concentrações de TPPU pode estar relacionada com a inibição da epóxido hidrolase responsável pela hidrólise do hormônio juvenil (HJ) nas fêmeas adultas e em larvas (MINAKUCHI; RIDDIFORD, 2006), essa atividade hidrolítica é necessária para a reprodução normal das fêmeas e sua ovoposição, e a interferência com o inibidor é uma hipótese válida que explica os resultados encontrados, uma outra hipótese é a relação entre a epóxido hidrolase que converte o HJ em HJ-diol em pupas, que tem sido alvo de inibição tendo como resultado um efeito inseticida (JIN MINNA; LIN XINDA, 2014; KHLEBODAROVA et al., 1996; TUSUN et al., 2017).

É importante ressaltar também que o TPPU já teve sua eficácia como anti-inflamatório comprovada em mamíferos, e embora a maior parte dos inibidores de EH eficientes em mamíferos não apresentaram efeitos em insetos, não se pode afirmar que um inibidor que tenha efeito em insetos não terá efeito em mamífero, dessa forma, não se pode

predizer com absoluta certeza qual será o efeito em insetos apenas baseado na pressuposição do não funcionamento (MINAKUCHI; RIDDIFORD, 2006).

4.2 Tratamento e avaliação comportamental

Após esses resultados obtidos, definiu-se que para o tratamento de moscas modelos de D.A seriam usados TPPU nas concentrações 3 e 1,5µg/mL, e veículo em concentração 0,824% (v/v). O motivo da escolha das doses se deu pelo fato de apresentarem baixa toxicidade e embora o segundo tratamento tenha sido realizado apenas com machos e, portanto, não esperava-se presença de pupas, o fato de o TPPU ser essencialmente um inseticida capaz de afetar a via do hormônio juvenil dos insetos, fez com que tal precaução fosse tomada, uma vez que não se sabe ao certo seu mecanismo de ação assim como não é possível afirmar como isso poderia afetar ou não os machos adultos que foram usados durante o tratamento.

O tratamento foi inicialmente aplicado em machos e fêmeas que foram criados separadamente. Na avaliação feita com 24 horas após início do tratamento, ficou evidente a diferença entre a % de escada de fêmeas em comparação aos machos, sendo que os machos apresentaram uma maior escalada independente do tratamento que receberam (Figura 5A). No teste de 48 horas machos do controle negativo novamente tiveram uma escalada maior que as fêmeas, porém nesse tempo, os indivíduos tratados com TPPU 3µg/mL não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 5B). Os grupos tratados com TPPU 1,5µg/mL por sua vez apresentaram diferença significativa em todos os testes durante todo o tratamento. No 7º e 14º dia não houve diferença na escalada dos grupos controles (água), e o grupo de machos tratados com TPPU 3µg/mL não foram analisados por terem sido perdidos (Figura 5C e 5D).

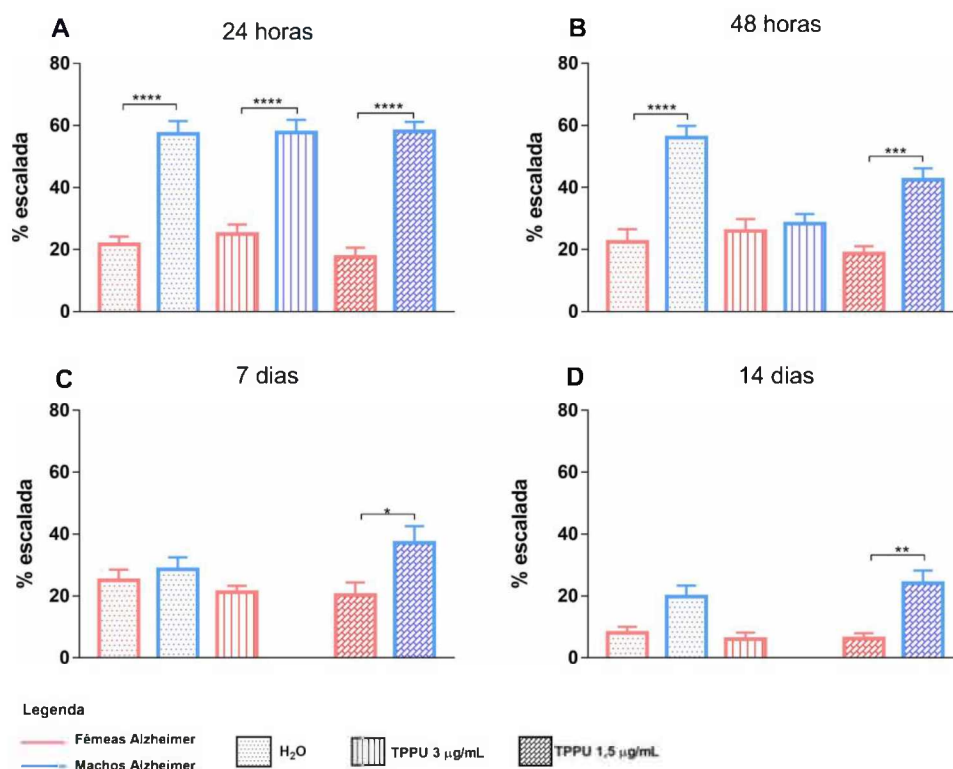


Figura 5- Comparação da escalada entre machos e fêmeas modelos de Alzheimer tratadas com TPPU. A, B e C representam a % de escalada após 24 horas, 7 dias e 14 dias respectivamente, de tratamento com TPPU acompanhado de controle negativo. D representa uma visualização das comparações ao longo do tempo total de análise do experimento. Os valores estão representado com máximo e média e foi utilizado teste ANOVA para cálculo da diferença estatística * indica $p < 0,05$ ** indica $p < 0,01$, **** indica $p < 0,0001$.

As diferenças encontradas entre a escalada de machos e fêmeas é naturalmente esperada uma vez que os machos apresentam atividade física espontânea maior que as fêmeas (WOODS; KOWALSKI; ROGINA, 2014). Isso influenciou na decisão de utilização apenas de machos no segundo tratamento somado ao fato de que a escalada em machos apresenta uma maior linearidade em função do tempo de análise (RHODENIZER et al., 2008).

Após resultados do primeiro tratamento, foi iniciado então o segundo tratamento que foi aplicado apenas em machos modelos de Alzheimer durante 14 dias. Foi avaliado por meio de comparação com os controles, a progressão esperada da doença, possível de ser visualizada a partir da análise da atividade locomotora das moscas. Conforme mostra a Figura 6(A-D), as moscas modelos de Alzheimer tendem naturalmente a apresentar uma porcentagem menor de escalada em relação ao controle, e como justificado, ao longo do tempo essa porcentagem tende a diminuir à medida que a doença se desenvolve no organismo. Essa diferença pode ser associada à neurodegeneração em função do tempo que ocorre em moscas modelos de Alzheimer (LÓPEZ ARIAS, 2012).

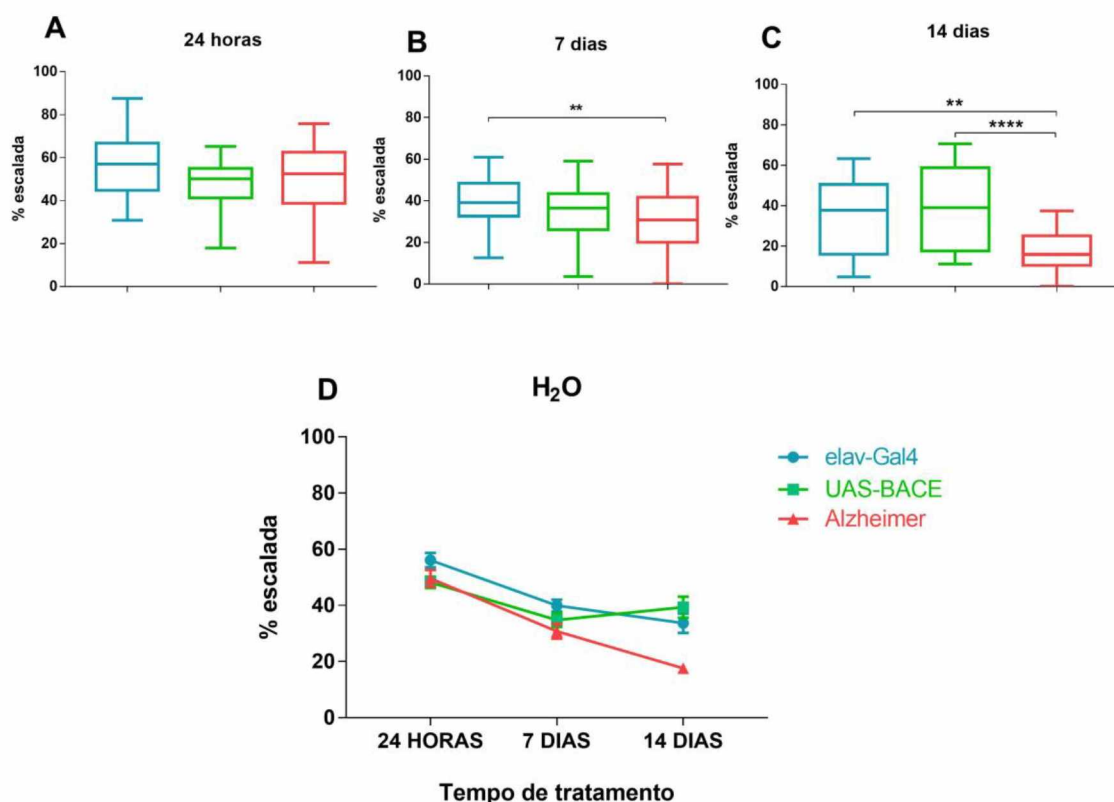


Figura 6. Comparação da % de escalada entre moscas machos modelos de Alzheimer e seus parentais. Moscas alocadas em meio preparado apenas com H₂O. A, B e C representam a % de escalada após 24 horas, 7 dias e 14 dias respectivamente, de tratamento do controle negativo. D representa uma visualização das comparações ao longo do tempo total de análise do experimento. Os valores estão representados com mínimo e máximo e foi utilizado teste *t* (realizado em duas etapas – foi comparado elav-Gal4 com Alzheimer seguido de comparação entre UAS-BACE e Alzheimer) para cálculo da diferença estatística. ** indica $p < 0,01$, **** indicap $< 0,0001$.

Quando submetidos à análise estatística, foi possível identificar a diferença significativa através de teste *t* ao comparar a escalada das moscas de Alzheimer com seus parentais de forma pareada (analisou-se Alzheimer x elav-Gal4 e em seguida Alzheimer x UAS-BACE). Uma vez que todos estavam inseridos em meios preparados apenas com água, temos a partir desses dados a validação do modelo para estudo da patologia de interesse. A diferença estatística pode ser observada a partir de diferentes métodos de avaliação e não apenas com o teste de geotaxia negativa, ensaios com observações tridimensionais também comprovam a dificuldade progressiva das moscas modelos em situações de deslocamento vertical (JAHN et al., 2011).

É importante que não haja interferência do veículo durante o tratamento a fim de evitar viés no experimento. No entanto, ao compararmos a escalada das moscas tratadas com veículo em relação ao controle negativo (água), obtivemos o resultado apresentado na Figura 7. Nos testes de 24 horas (Figura 7A) não houve diferença significativa entre a escalada dos controles

negativos comparados aos controles sob administração de veículo, porém, ao 7º e 14º dia de tratamento (Figura 7B-C) a escalada das moscas inseridas no meio de cultura preparado apenas com água, foi inferior à daquelas que receberam veículo, isso pode ser justificado pelo fato de que alguns estudos descrevem o PEG como tendo efeito neuroprotetor (KWON et al., 2011). O estudo citado traz uma revisão de diferentes ensaios relacionados a danos à medula espinhal, porém apresenta o uso de PEG como tendo um resultado positivo para a recuperação de axônios. A Figura 7D representa de forma temporal a % de escalada das moscas nos diferentes tratamentos

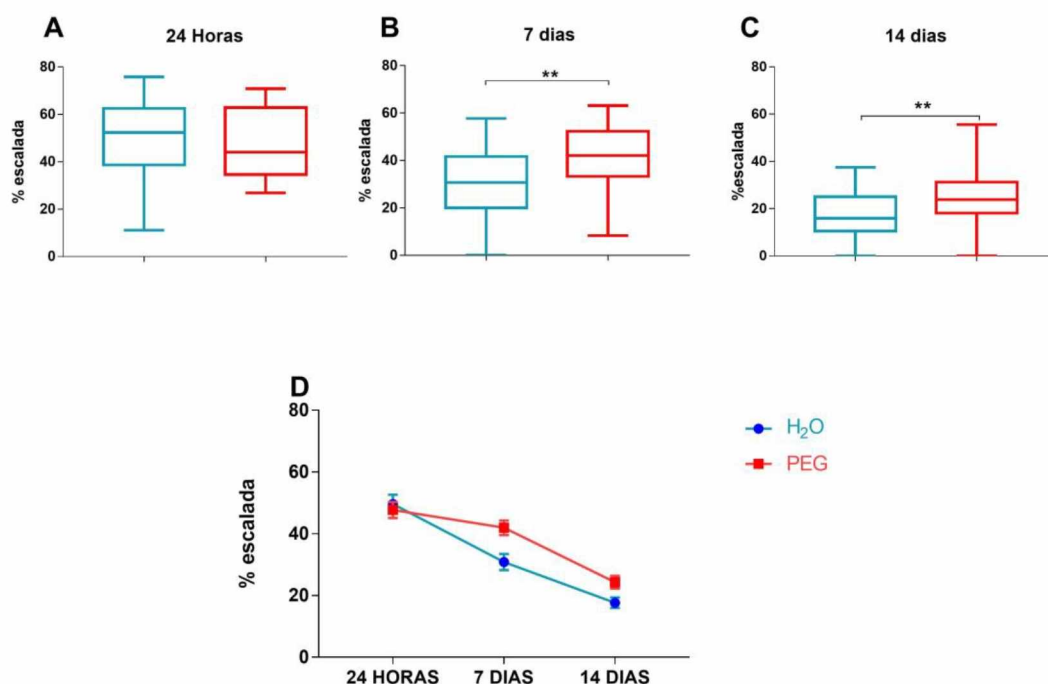


Figura 7. Comparação da % de escalada entre moscas modelos de Alzheimer quando tratadas com veículo em relação ao controle negativo da água. A, B e C representam a % da escalada das moscas após 24 horas, 7 dias e 14 dias respectivamente. D representa uma visualização das comparações ao longo do tempo total de análise do experimento. Os valores estão representado com mínimo e máximo e foi utilizado teste *t* para cálculo da diferença estatística. ** indica $p < 0,01$.

Ao compararmos os tratamentos com TPPU e o veículo (PEG), observamos conforme mostrado que no teste de 24 horas (Figura 8A) não houve diferença significativa entre os tratamentos, no teste de 7 dias houve diferença significativa entre tratamentos com TPPU 3µg/mL e veículo (Figura 8B), e no 14º não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos (Figura 8C). A Figura 8D representa de forma temporal a % de escalada das moscas nos diferentes tratamentos. A ausência de diferença significativa entre os tratamentos com TPPU e o veículo (PEG) mais especificamente a melhora da escalada esperada pela ação do TPPU, pode ser justificada pelo fato do TPPU ser um inibidor de EHS. Estudos indicam

que há diferença entre EHS e epóxido hidrolase microssomal (EHM) e ambas podem ter diferentes concentrações em diferentes tecidos com funções específicas. A possibilidade é que o TPPU seja capaz de inibir EHS mais do que inibir as EHM que possivelmente estava presente em maior quantidade no inseto, não se pode afirmar que a premissa é verdadeira pois os estudos que descrevem tais diferenças foram feitos em relação a saúde humana (MORISSEAU; HAMMOCK, 2013).

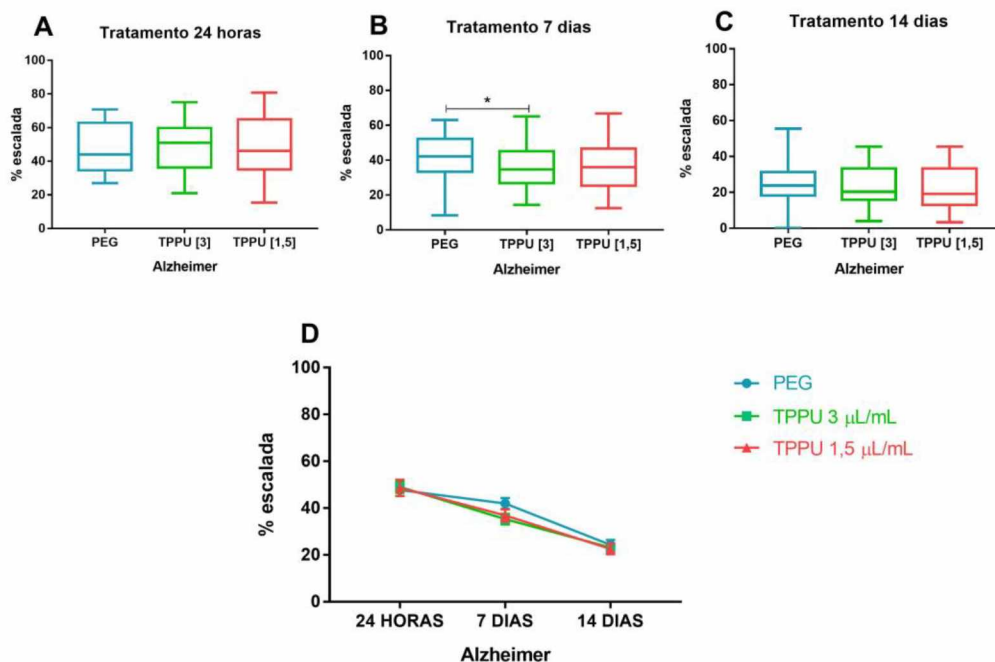


Figura 8. Comparação da % de escalada entre os tratamentos com TPPU e o controle tratado com veículo (PEG). A, B e C representam a % da escalada das moscas após 24 horas, 7 dias e 14 dias respectivamente. D representa uma visualização das comparações ao longo do tempo total de análise do experimento. Os valores estão representado com mínimo e máximo e foi utilizado teste *t* para cálculo da diferença estatística, * indica $p < 0,05$.

Outra hipótese é que a quantidade de TPPU testada não foi suficiente para inibir a quantidade de EH presente, já que é sabido que há um aumento de EH no cérebro de pacientes com D.A e também em outros organismos modelos como camundongos (FARIN; OMIECINSKI, 1993; LIU et al., 2006; TAJIMA et al., 2013). A diferença entre os tratamentos com veículo (PEG) e composto (TPPU) apenas no 7º dia de tratamento pode como já citado, estar relacionado ao efeito neuroprotetor gerado pelo veículo, e a ausência dessa diferença no teste com 14 dias pode ser devido a avançada progressão da doença a fim de não fosse mais visível o efeito do veículo quando comparado com TPPU 3µg/mL, ou até

mesmo que o PEG usado de veículo para TPPU 3µg/mL tivesse sido acumulado e gerado um efeito benéfico ao ponto de sua escalada se igualar com o controle do veículo.

5. CONCLUSÃO

- Foi possível concluir que doses maiores que 6µg/mL de TPPU são tóxicas e prejudiciais à *Drosophila melanogaster*.
- É possível realizar tratamentos em *Drosophila melanogaster* usando TPPU mesmo que esse seja um inseticida.
- A ação do composto TPPU enquanto anti-inflamatório não modula o comportamento (teste escalada) no modelo de Alzheimer utilizado

6. REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, H. et al. **Inflammation and Alzheimer's disease** *Neurobiology of Aging*, 2000.
- BILEN, J.; BONINI, N. M. *Drosophila* as a Model for Human Neurodegenerative Disease. **Annual Review of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 153–171, 2005.
- CHAKRABORTY, R. et al. Characterization of a *drosophila* Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- CHAN, H. Y.; BONINI, N. M. *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 11, p. 1075–1080, 2000.
- DAHMAN, C. **Methods in Molecular Biology** 420. [s.l: s.n.].
- FARIN, F. M.; OMIECINSKI, C. J. Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 40, n. 2–3, p. 317–335, 19 out. 1993.
- FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. Supl.2, p. 28–34, 2005.
- GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, 2005.
- GEMELLI, T. et al. Estresse Oxidativo como Fator Importante na Fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 67, 2013.

HALLIDAY, G. M. et al. Effect of anti-inflammatory medications on neuropathological findings in Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 57, n. June 2000, p. 831–836, 2000.

IMIG, J.; HAMMOCK, B. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 10, p. 794–805, 2009.

INGRAHAM, R. H.; GLESS, R. D.; LO, H. Y. Soluble epoxide hydrolase inhibitors and their potential for treatment of multiple pathologic conditions. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 4, p. 587–603, 2011.

ISLAM, O. et al. Inhibitors of soluble epoxide hydrolase minimize ischemia-reperfusion induced cardiac damage in normal, hypertensive and diabetic rats. **Cardiovascular therapeutics**, 15 mar. 2017.

JAHN, T. R. et al. Detection of early locomotor abnormalities in a Drosophila model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 197, n. 1, p. 186–189, 15 abr. 2011.

JIN MINNA, 金敏娜; LIN XINDA, 林欣大. Molecular mechanisms of the insect juvenile hormone. **Acta Ecologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 1361–1370, 2014.

KHLEBODAROVA, T. M. et al. A comparative analysis of juvenile hormone metabolizing enzymes in two species of Drosophila during development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 829–835, 1996.

KWON, B. K. et al. A Systematic Review of Non-Invasive Pharmacologic Neuroprotective Treatments for Acute Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 28, n. 8, p. 1545–1588, 25 ago. 2011.

LEE, Y. J. et al. **Inflammation and Alzheimer's disease** **Archives of Pharmacal Research**, 2010.

LIU, M. et al. Expression of microsomal epoxide hydrolase is elevated in Alzheimer's hippocampus and induced by exogenous β -amyloid and trimethyl-tin. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 8, p. 2027–2034, abr. 2006.

LÓPEZ ARIAS, B. Drosophila melanogaster como modelo de la pérdida sináptica temprana en la enfermedad de Alzheimer. 2012.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, 2012.

MEDEIROS, R. a Doença De Alzheimer Como Um Processo Neuroinflamatório. 2007.

MENTAL, W. H. O.; GAP, H.; PROGRAMME, A. Media centre Dementia. n. April, p. 6–9, 2012.

MESQUITA, C. B. et al. A resposta ao teste de atividade motora RING test em indivíduos de *Drosophila melanogaster* varia de modo dependente das. p. 3–5, 2008.

MINAKUCHI, C.; RIDDIFORD, L. M. Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, n. 2, p. 77–84, 2006.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Impact of Soluble Epoxide Hydrolase and Epoxyeicosanoids on Human Health. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 37–58, 6 jan. 2013.

OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B.; DIAS NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 1, p. 26–33, 2004.

RHODENIZER, D. et al. Genetic and environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 8, p. 739–48, ago. 2008.

RIBEIRO, I. P.; GAIVÃO, I. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 28, n. 2, p. 199–204, 2010.

ROCHA, N. P. et al. Processo inflamatório e neuroimunomodulação na Doença de Alzheimer: Revisão de literatura. **Revista Neurociencias**, v. 19, n. 2, p. 300–313, 2011.

SALIM, O.; ABRAHIN, C. Influência das Proteínas Beta Amilóide e Tau na Doença de Alzheimer. v. 10, n. 1, p. 57–60, 2012.

SANG, T.-K.; JACKSON, G. R. *Drosophila* models of neurodegenerative disease. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 3, p. 438–46, 2005.

SASTRE, M.; KLOCKGETHER, T.; HENEKA, M. T. **Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: Molecular mechanisms**. International Journal of Developmental Neuroscience. **Anais...**2006

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1 suppl, 2008.

SERRANO-POZO, A. et al. **Neuropathological alterations in Alzheimer disease**. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2011.

SHEN, H. C.; HAMMOCK, B. D. **Discovery of inhibitors of soluble epoxide**

hydrolase: A target with multiple potential therapeutic indications*Journal of Medicinal Chemistry*, 2012.

SILVA, C. A. T. DA. **O USO TERAPÊUTICO DE MEDIADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS DA VIA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO**, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17681/1/UsoTerapeuticoMediadores.pdf>>.

Acesso em: 9 jul. 2018

SIMPKINS, A. N. et al. Soluble epoxide inhibition is protective against cerebral ischemia via vascular and neural protection. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 6, p. 2086–2095, 2009.

TAJIMA, Y. et al. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 68, 9 maio 2013.

TUSUN, A. et al. Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase: A Promising Target for Hemipteran Pest Management. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

VIEGAS, F. P. D. et al. **Doença de alzheimer: Caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório***Revista Virtual de Química*, 2011.

WOODS, J. K.; KOWALSKI, S.; ROGINA, B. Determination of the spontaneous locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 86, 10 abr. 2014.

YAO, E. SHENG et al. TPPU protects tau from H₂O₂-induced hyperphosphorylation in HEK293/tau cells by regulating PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 36, n. 6, p. 785–790, 2016.