

EFEITO PROTETOR DE UM SELENOESTER EM C.ELEGANS: UMA POSSÍVEL TERAPIA PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Flávia Suelen de Oliveira Pereira ¹

Daiana Silva Ávila ²

Juliano Braun de Azeredo ³

Flávio Augusto Rocha Barbosa ⁴

Caroline Brandão Quines ⁵

Simone Pinton ⁶

Resumo:

A Doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por um distúrbio neurodegenerativo que apresenta como um dos mecanismos fisiopatológicos a agregação do A. Sendo que a DA não apresenta cura, o seu tratamento baseia-se na sintomatologia. O fármaco ideal seria aquele que apresentasse potencial multi-alvo. Com essa finalidade, compostos de selenoesteres, já demonstraram em estudos prévios in vitro, um potencial antioxidante e também inibitório da enzima AChE. Porém ainda os mesmos não foram testados in vivo. Um dos modelos experimentais promissores, é o nematoide C.elegans. Suas cepas transgênicas expressam proteínas encontrados em mecanismos associados a doenças, como a DA. Uma das cepas utilizadas para o estudo da DA, é a GMC101 [unc-54p::A-beta-1 42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP], que expressa o A nas células musculares ao longo do corpo, quando exposta a temperatura de 25C e paralisa. O objetivo do estudo foi avaliar a potencial eficácia do composto de selenoester FA90 (Etil 6-((4-metilbenzoilselanil)metil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4 tetrahidropirimidina-5carboxilato) em C.elegans como modelo para o estudo da DA. Para isso os vermes, no estágio larval L1, foram submetidos a uma exposição aguda (30 minutos), as concentrações de 5, 10, 100 e 200µM do composto FA90. Após 48 horas do tratamento, foi mensurada a taxa de sobrevivência. Posteriormente 25 vermes de cada grupo, foram avaliados quanto a paralisia após a exposição por 72 horas a temperatura de 25C. Também nesta oportunidade, deu-se início o ensaio de longevidade. Onde os vermes da cepa GMC101 foram, após a mensuração da taxa de paralisia, transferidos para a temperatura normal de manutenção, a 20C. A fim de verificar se a temperatura de exposição, não seria um fator externo mais influente na redução da longevidade, em comparação com a expressão do A. Nesse ensaio também utilizamos a cepa N2 também como controle para a GMC101. Através da taxa de sobrevivência, em todas as concentrações testadas, o composto não se mostrou tóxico, já que não foi capaz de reduzir o número de vermes vivos. Já com relação a taxa de vermes não paralisados encontramos que as concentrações maiores auxiliaram na redução da taxa de paralisia. Onde as diferenças significativas foram observadas nas concentrações de 100 e 200µM, em relação ao grupo controle (*p

Palavras-chave: C.elegans Alzheimer Selenoester

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

EFEITO PROTETOR DE UM SELENOESTER EM C.ELEGANS: UMA POSSÍVEL TERAPIA PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

¹ Aluno de pós-graduação. flaviaoliper@gmail.com. Autor principal

² Professora adjunta da Universidade Federal do Pampa Brasil. avilads1@gmail.com. Co-autor

³ Professor Adjunto de química Geral e Orgânica da Universidade Federal do Pampa. julianoazeredo@unipampa.edu.br. Co-autor

⁴ Doutorando da Universidade Federal de Santa Catarina. flavioaugusto@gmail.com. Co-autor

⁵ Pós-Doutoranda em Bioquímica na Universidade Federal do Pampa. carolbquines@gmail.com. Co-orientador

⁶ Docente. simonepinton@unipampa.edu.br. Orientador

EFEITO PROTETOR DE UM SELENOESTER EM *C.ELEGANS*: UMA POSSÍVEL TERAPIA PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo neurologista Alois Alzheimer como sendo um distúrbio neurodegenerativo que acarreta no comprometimento da memória e capacidade cognitiva. Ao longo dos anos, várias teorias surgiram a respeito dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo aparecimento dos sintomas que caracterizam o quadro clínico da doença. Dentre esses, destaca-se a teoria colinérgica, dos metais, dos emaranhados neurofibrilares (pela hiperfosforilação da proteína tau), sendo as placas senis e a via colinérgica os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão desse distúrbio neurodegenerativo (DE FALCON et al., 2016). A primeira diz respeito a alteração na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), onde o aumento de sua atividade propicia uma alta taxa de hidrólise de acetilcolina (ACh) prejudicando assim a neurotransmissão (AYLLÓN et al., 2011). Além disso, a DA pode ser resultante de alterações da homeostase cerebral de metais de transição, como Ferro (Fe), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), uma vez que se sabe que esses são constituintes das placas senis ou amiloides (BUSH, 2012). Porém em sua maioria estas são formadas pelo acúmulo do peptídeo beta-amiloide (A β), resultante de uma clivagem errônea da proteína precursora amiloide (APP) pela alfa-secretase, o que culmina na formação de formas insolúveis deste peptídeo na forma de oligômeros que tendem a se aglomerar no espaço extracelular, contribuindo para o dano neuronal (MURPHY; LEVINE, 2010). Apesar dos mecanismos já elucidados sobre a DA e as relações entre ambos em sua fisiopatologia, nenhum fármaco ou medida terapêutica foi capaz de promover a cura da doença e contenção de seus agravos. Somente no ano de 2018 existem, ainda em fase de teste, aproximadamente 112 agentes candidatos a terapia da doença, onde muitos desses baseiam-se, e tem como alvo, apenas um mecanismo fisiopatológico. Sendo que o ideal, seria o desenvolvimento de uma droga multi-alvo, que pudesse conter os sinais e sintomas da doença, ao mesmo tempo em que fosse eficaz em evitar a sua progressão (CUMMINGS et al., 2018). Nesse contexto destacam-se os compostos a base de selênio, os selenoesteres, derivados de diidropirimidinonas, já demonstraram seu potencial em estudos prévios em vivo, como candidatos a terapia multi-alvo da DA. Isso porque, além de apresentarem uma atividade antioxidante, também se mostraram promissores em inibir a atividade da enzima AChE. Baseados nisso, é possível vislumbrar novos caminhos para posteriores estudos de seus potenciais farmacológicos também em organismos vivos (BARBOSA et al., 2016). Como um modelo promissor para o estudo da DA *in vivo*, tem-se o *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Este nematoide de vida livre apresenta inúmeras vantagens, o que destaca o seu amplo uso em estudos na área da genética. Isso pois o mesmo apresenta um alto grau de homologia com mamíferos (cerca de 60%). Com isso cepas transgênicas são capazes de expressar proteínas homólogas aos humanos, o permite nos utilizar ferramentas fenotípicas para se manifestar alterações comportamentais no verme, que estão associadas com a expressão e alteração de proteínas que são objetos de estudo para o entendimento de diversas doenças, como a DA, por exemplo. Para o estudo da DA, em *C.elegans* há a cepa GMC101 GMC101 [unc-54p::A-beta-1 42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP], que quando exposta a uma temperatura de 25°C expressa o peptídeo A β , que se agrega ao longo das células musculares de seu corpo, o que faz com que o verme paralise (STIERNAGLE, 2016; GAWAIN, 2013). Visando esse enfoque do potencial uso de selenoesteres para o tratamento da DA e utilizando um modelo promissor para estudos *in vivo*, o *C.elegans*, espera-se apresentar um composto com provável uso terapêutico para tratamento da DA, que possa ser testado em modelos mais complexos.

2 METODOLOGIA

- I) Cepas: foram utilizadas as cepas N2 [tipo selvagem] e GMC101 [unc-54p::A-beta-1 42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]. As mesmas foram obtidas do Centro Genético de *Caenorhabditis*, da Universidade de Minnesota nos EUA, mantidas a 20°C, em meio NGM (Nematode growth medium) e alimentadas com bactéria *Escherichia coli* OP50 (*E.coli* OP50).
- II) Sincronização: os vermes hermafroditas grávidos, quando chegaram no estágio adulto, foram submetidos ao processo de sincronização para a obtenção de todos os vermes no primeiro estágio larval (L1). Para isso a cutícula do verme foi rompida, através da utilização de uma solução de lise contendo 1mL de hidróxido de sódio 1M e 4mL de hipoclorito de sódio, o que propiciou a liberação dos ovos. Após 12-14 horas do processo de sincronização, os ovos eclodiram com a liberação das larvas no estágio L1.
- III) Tratamento: Um total de 2000 vermes no estágio larval L1 foram expostos ao tratamento agudo, por 30 minutos, com composto de selenoester FA90 [Etil 6-((4-metilbenzoilselanil)metil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5carboxilato] FA90 nas concentrações de 5, 10, 100 e 200µM. Já o grupo controle foi apenas submetido a uma concentração de 5% de DMSO. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.
- Após o tratamento com o composto os vermes foram mantidos em placas NGM previamente semeadas com 200µL de *E.coli* OP50 a 20°C.
- IV) Sobrevivência: Após 48 horas do tratamento, foi mensurada a taxa de sobrevivência dos vermes tratados, no estágio larval L4. Este procedimento consiste na contagem do número de vermes presentes em cada placa.
- V) Paralisia: Após a mensuração da taxa de sobrevivência os vermes, tanto da cepa N2, quando da GMC101 foram submetidos ao aumento da temperatura, onde foram expostos a 25°C. Com isso, a cepa GMC101 expressa o Aβ e tende a paralisar. Como controle foi utilizada a cepa N2, visando determinar se o aumento da temperatura não seria um fator isolado que contribuiria para a redução da taxa de locomoção dos vermes. Após 72 horas da exposição, sendo que diariamente os vermes eram transferidos para novas placas, foi mensurada a taxa de paralisia. Para isso, foram utilizados 25 vermes em cada grupo experimental, onde o procedimento foi realizado em duplicata.
- Foram considerados paralisados, os animais que não moviam-se após serem submetidos ao estímulo por toque. Sendo que para diferenciar estes dos animais mortos, foi observado o batimento da faringe dos vermes imóveis.
- VI) Longevidade: após 72 horas da exposição a 25°C, os vermes restantes nas placas foram transferidos novamente para 20°C. E durante os dias posteriores de vida do verme, diariamente, os mesmos eram transferidos diariamente para novas placas e o número de vermes vivos era contado, até que não restasse nenhum nematoide vivo. A cepa N2, a fim de verificar se a temperatura de exposição não foi a principal responsável pela redução do tempo de vida, foi utilizada com um controle para a GMC101.
- VII) Análise estatística: todos os dados foram plotados e analisados utilizando o programa GraphPad Prism7. Foram considerados dados estatisticamente significativos os que apresentaram valor de $p < 0.05$. Para a análise estatística de sobrevivência foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. A avaliação estatística da taxa de paralisia foi realizada em meio a análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey. Para a longevidade foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via, por medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni, para verificar a

diferença estatística em cada grupo experimental. Posteriormente os mesmos dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey para verificar a diferença estatística de cada dia, entre os grupos, ao longo do período do experimento.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O acúmulo do A β na DA é um dos fatores que propicia o desencadeamento de um dano oxidativo, o que favorece também a morte neuronal (MUKHIN; PAVLOV; KLIMENKO, 2017). Ao avaliarmos a toxicidade com composto FA90 (**figura 1**) através da taxa de sobrevivência em *C.elegans*, não encontramos mortalidade significativa em nenhuma concentrações testadas (5, 10, 100 e 200 μ M). Apenas observamos uma leve redução na taxa de sobrevivência, o que foi concomitantemente proporcional ao aumento da concentração, apesar de não apresentar nenhuma diferença estatística em relação ao grupo controle (**Gráfico 1**).

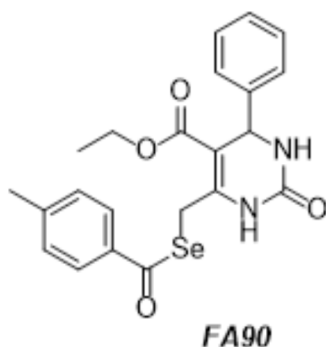


Figura 1- Estrutura química do composto Etil 6-((4-metilbenzoilselanil)metil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato.

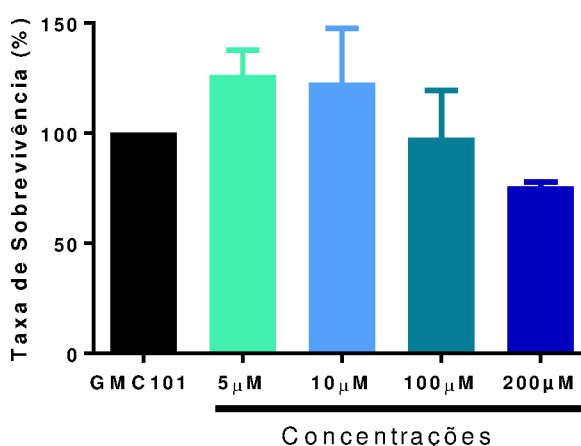


Gráfico 1- Representação da taxa de sobrevivência dos vermes da cepa GMC101 após 48 horas do tratamento com o composto FA90.

Assim, ao verificarmos que as concentrações testadas não apresentaram toxicidade, nós decidimos testar o potencial das mesmas em reduzir a taxa de paralisia nos vermes tratados. Com isso, nossos resultados demonstraram que o composto apresentou um efeito protetor, reduzindo a taxa de vermes paralisados, ao mesmo tempo em que houve um efeito aparentemente dose-dependente, ou seja, o número de vermes não paralisados reduziu concomitantemente ao aumento da concentração do composto. Porém apenas observamos diferenças significativas nas concentrações de 100 e 200 μ M em relação ao controle (**Gráfico 2**). Além disso, esse resultado benéfico do composto pode ser explicado devido ao potencial antioxidante que os compostos a base de selênio apresentaram em estudos prévios *in vitro* e *in vivo* (NOGUEIRA; ROCHA, 2011; BARBOSA et al., 2016). Sabe-se que a DA se caracteriza por um quadro neurodegenerativo e progressivo, o que culmina em danos irreparáveis e irreversíveis, favorecendo o processo de envelhecimento com morte celular e redução da expectativa de vida dos indivíduos acometidos, avaliamos também a influência dos compostos no tempo de vida dos vermes (WATTMO; LONDOS; MINTHON, 2014).

Nossos resultados demonstraram que o FA90 em todas as concentrações testadas, foi capaz de aumentar a longevidade nos vermes da cepa GMC101, que foi submetida ao tratamento. Além disso, destacamos que na concentração de 200 μ M o tempo de vida do verme foi estendido a até aproximadamente 21 dias. É importante ressaltar também que utilizamos a cepa N2 como controle, para confirmar que esse resultado não é dependente apenas temperatura de exposição das cepas. A cepa selvagem (N2) também apresentou uma redução de seu tempo de vida, o que era de se esperar, visto que ao leve estresse térmico a qual a mesma foi mantida por 72 horas, a longevidade dos animais é reduzida. Já essa diminuição foi ainda maior na GMC101, provavelmente pelo fato da mesma agregar o A β e desenvolver um movimento corporal limitado ou quase inexistente, tenha contribuído consideravelmente para este resultado (Gráfico 3 (GAWAIN et al., 2013)).

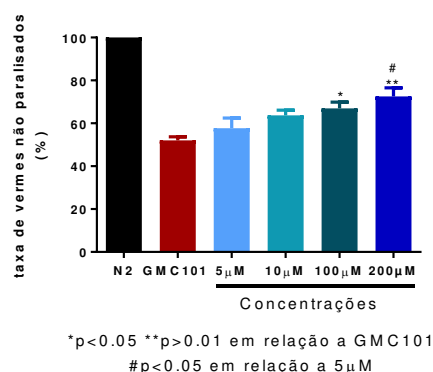


Gráfico 2- Representação da taxa de vermes não paralisados após 72 horas da exposição a 25°C

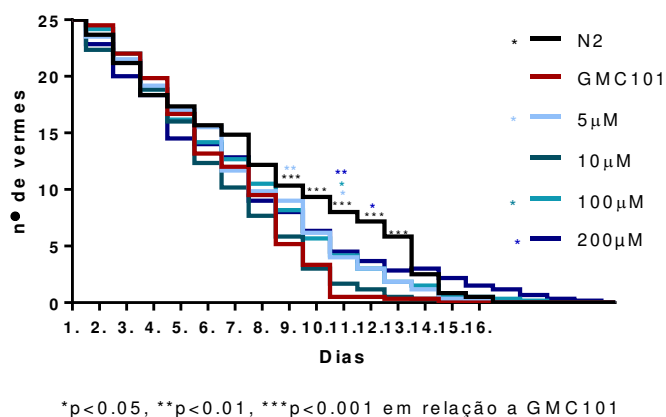


Gráfico 3- Os dados do presente gráfico correspondem ao acompanhamento do tempo de vida dos vermes tratados com o FA90 e controles. Os resultados estatisticamente significativos são demonstrados em asteriscos (*), correspondentes a cor encontrada na legenda do gráfico, no que diz respeito aos grupos pertencentes ao estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O composto de selênio derivado de diidropirimidinona, FA90, foi capaz de proteger parcialmente o *C. elegans* da paralisia causada pela expressão do peptídeo β -amilóide, além de estender o seu tempo de vida, possivelmente minimizando assim os efeitos do envelhecimento precoce. Entretanto, mais estudos são necessários em *C. elegans* para elucidar os mecanismos de ação do composto sobre o estresse oxidativo causado pelo A β e ainda na atividade da enzima AChE *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AYLLÓN, M.S.G et al. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β -Amyloid. **Frontiers Molecular Neuroscience**, v.22, n.4, p.1-9, 2011.

BARBOSA, F et al. Synthesis and evaluation of dihydropyrimidinone-derived selenoesters as multi-targeted directed compounds against Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n.22, v.24, nov.2016.

BUSH, Ashley. The Metal Theory of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.30, p.1-5, 2012.

CUMMINGS, J et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. **Alzheimer's & Dementia**, v.4, p.195-214, 2018.

DE FALCON, A et al. Alzheimer's disease: Etiological Hypothesis and Treatment Perspectives. **Química Nova**, São Paulo, v.39, n.1, p.63-80, 2016.

GAWAIN, M et al. Utility of an improved model of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, n.1, v.10, p.115-119, 2013.

MUKHIN, Valery Nikolaevitch.; PAVLOV, K.I.; KLIMENKO, Victor Matveevich. Mechanisms of Neuron Loss in Alzheimer's Disease. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v.47, n.5, p.508-516, jul.2017.

MURPHY, M. Paul.; LEVINE, Harry. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.19, n.1, p.1-17, 2010.

NOGUEIRA, Cristina W.; ROCHA, João B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Archives of Toxicology*, v.85, p.1313-1359, 2011.

STIERNAGLE, Theresa. **WormBook**: The Online Review of *C. elegans* Biology. 2016.

WATTMO, C.; LONDOS, E.; MINTHON, L. Risk Factors That Affect Life Expectancy in Alzheimer's Disease: A 15-Year Follow-Up. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.38, n.5-6, p.286-299, 2014