

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**EFEITO DO ÁCIDO SIRÍNGICO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
OXIDATIVAS INDUZIDAS POR CLORETO DE ALUMÍNIO EM *Drosophila*
*melanogaster***

**Uruguiana
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

G971e Gularte, Claudia Alves Ortiz

Efeito do ácido siríngico nas alterações comportamentais e oxidativas induzidas por cloreto de alumínio em *Drosophila melanogaster* / Claudia Alves Ortiz Gularte.

54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Robson Luiz Puntel".

1. neurotoxicidade. 2. estresse. 3. ácido siríngico. 4. antioxidante. 5. Alzheimer. I. Título.

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**EFEITO DO ÁCIDO SIRÍNGICO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
OXIDATIVAS INDUZIDAS POR CLORETO DE ALUMÍNIO EM *Drosophila
melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Robson Luiz Puntel

**Uruguaiana
2017**

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**EFEITO DO ÁCIDO SIRÍNGICO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
OXIDATIVAS INDUZIDAS POR CLORETO DE ALUMÍNIO EM
*Drosophilamelanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em: 23 de agosto de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu
(UTFPR - Campus Campo Mourão)

Prof. Dr. Elton L. G. Denardin
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador, prof. Robson, por toda sua compreensão com minhas dificuldades ao longo do trabalho.

Agradeço à Maia, colega de lab e irmã de luta, pela generosidade que me levou a concluir esse trabalho.

Agradeço ao Matheus, pelo companheirismo e por ter segurado a barra muitas vezes.

Agradeço às migas: Dandara e Geovana, por caminhar comigo desde sempre, Rita, pelos puxões de orelha e conselhos, Tate, por ter segurado as rédeas da minha vida, Flávia, pelas risadas e a todas por terem me ajudado, por estarem comigo o tempo todo e por terem me livrado dos embustes da vida.

Ao Rafa, pela amizade e pelo exemplo sempre, pelo empréstimo da câmera para os testes comportamentais, e por nos aguentar na alegria e na tristeza.

Ao Ivan, que chegou no quase fim dessa jornada mas viveu intensamente comigo os momentos mais complicados, por todo suporte emocional e incentivo imensurável e a toda sua família que me acolheu nesses tempos difíceis, principalmente aos pequenos Sophia, Venâncio e Isadora, que são motivos de boas risadas e boas histórias.

A todos os amigos e colegas do 403 e outros laboratórios, vizinhos do 405 que sempre dão uma mãozinha, galera do 423 que compartilha polenta e boas risadas e ao lab da prof. Daia que sempre se dispõe a ajudar.

Ao PPG Bioquímica, a todos os professores que me deram lições valiosas, à CAPES pela bolsa de estudos e à UNIPAMPA por proporcionar essa oportunidade.

Por fim, a todos aqueles, mesmo que brevemente, passaram por mim nesse período, sendo suas participações boas ou más, mas que fizeram com que eu superasse as dificuldades e construísse grandes aprendizados. Muito obrigada.

“Run, you fools!”.

Gandalf

RESUMO

O elemento químico alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre e sua utilização em larga escala tem aumentado a exposição humana. Nesse contexto, tem sido demonstrado que altas concentrações de Al apresentam efeitos tóxicos para mamíferos, afetando principalmente o SNC, e está correlacionado com o aumento na incidência de doenças neurodegenerativas. Embora o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o Al exerce toxicidade não esteja(m) completamente elucidado(s), tem sido sugerido que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos de toxicidade do Al, o qual também está associado a processos de neurodegeneração. Além disso, atualmente os tratamentos para a intoxicação por Al são escassos. No entanto, têm-se demonstrado os efeitos benéficos de antioxidantes de origem natural como forma de tratamento e prevenção aos danos oxidativos causados por agentes tóxicos, dentre os quais, destacamos o Al. O ácido siríngico é um ácido fenólico encontrado em cereais e possui efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e hepatoprotetores já descritos, porém, pouco explorados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com ácido siríngico, contra os efeitos tóxicos da exposição ao Al no modelo experimental da mosca-da-fruta (*D. melanogaster*). Os resultados mostram que a exposição ao Al (5 mM) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a mortalidade e reduziu a atividade locomotora ($p < 0,05$) das moscas. A indução também alterou marcadores de estresse oxidativo, aumentou os níveis de TBARS ($p < 0,05$), reduziu a atividade da catalase ($p < 0,05$) na cabeça e no corpo e reduziu ($p < 0,05$) os níveis de grupos SHNP no corpo. Além disso, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a atividade da AChE e a viabilidade celular (MTT) na da cabeça das moscas. Por sua vez, o tratamento com ácido siríngico (25 μ M) protegeu significativamente ($p < 0,05$) a mortalidade e o déficit locomotor causado pelo Al. O tratamento também reduziu os níveis de TBARS ($p < 0,05$) na cabeça e no corpo, preveniu a redução da atividade da catalase ($p < 0,05$) na cabeça e a redução dos grupos SHNP ($p < 0,05$) no corpo, além da redução na atividade da AChE ($p < 0,05$) e da viabilidade celular ($p < 0,05$) na cabeça das moscas. Tendo em vista estes resultados, sugere-se que o ácido siríngico possui efeito neuroprotetor contra os efeitos causados pela exposição ao Al. No entanto, mais estudos se fazem necessários para buscar um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis por estes efeitos, tanto do Al quanto do ácido siríngico, observados nesse estudo.

Palavras-Chave: neurotoxicidade, estresse, ácido sirínico, antioxidante, Alzheimer.

ABSTRACT

The chemical element aluminum (Al) is the most abundant metal in the Earth's crust and its use on a large scale has been increased human exposition. In this context has been demonstrated that Al presented toxic effects at high doses, affecting mainly the CNS and it is correlated with increased incidence of neurodegenerative diseases. Although the mechanism(s) by which Al exerts toxicity are not completely elucidated, it has been suggested oxidative stress as a mainly mechanisms of Al toxicity which also is associated with neurodegenerative process. Moreover, treatments to Al intoxication are still scarce. However, it has been beneficial effects of antioxidants from natural origins as way of treatment and prevention of oxidative damages caused by toxic agents among which we highlight the Al. Syringic acid is a phenolic acid found in cereals and has antioxidante, anti-inflammatory and hepatoprotective effects described but little explored. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of syringic treatment, a phenolic compound with antioxidante action, against toxic effects from the exposition to Al in a fruit fly *D. melanogaster* experimental model. Ours results shows that Al exposition (5mM) significantly increased ($P < 0,05$) mortality and reduced locomotor activity ($p < 0,05$) of flies. Treatment also changed oxidative stress markers, increased TBARS levels ($p < 0,05$), reduced catalase activity ($p < 0,05$) in heads and bodies and reduced ($p < 0,05$) NPSH groups levels in fruit flies head. Besides, reduced significantly ($p < 0,05$) AChE activity and cellular viability (MTT) in head. On the other hand, syringic acid treatment (25 μ M) significantly ($p < 0,05$) protected mostality and locomotor déficit caused by Al. Treatment also reduced TBARS levels ($p < 0,05$) in head and body, avoided the reduction of catalase activity ($p < 0,05$) in head and the reduction of NPSH groups levels ($p < 0,05$) in body, prevent the reduction of AChE activity ($p < 0,05$) and cellular viability ($p < 0,05$) in head's flies. In view of this results, it is suggested syringic acid has neuroprotective effect against Al exposure effects. However, more studies are necessary to search a better understanding of responsible mechanism(s) for these effects both Al and syringic acid observed in this study.

Keywords: neurotoxicity, stress, syringic acid, antioxidant, Alzheimer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido siríngico.....	20
Figura 2 – Figura esquemática do ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i>	23
Figura 3 – Figura esquemática do desenho experimental.....	27
Figura 4 – Figura esquemática do teste de geotaxia negativa.....	28
Figura 5 – Figura esquemática representando o teste de <i>open field</i>	29
Figura 6 –Mortalidade durante 10 dias de tratamento em <i>D. melanogaster</i>	32
Figura 7 – Geotaxia negativa de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	34
Figura 8 – <i>Open field</i> de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	34
Figura 9 – Alterações dos níveis de TBARS na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	35
Figura 10 – Alterações dos níveis de SH não-protéico na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	36
Figura 11 – Alterações dos níveis de SH total na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	37
Figura 12 – Alterações da atividade enzimática da catalase na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	38

Figura 13 – Atividade enzimática da superóxido dismutase na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	39
Figura 14 – Alterações da atividade enzimática da acetilcolinesterase na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	40
Figura 15 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT na cabeça (A) e no corpo (B) de <i>D. melanogaster</i> tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio.....	41
Figura 16 – Figura esquemática representando o resumo dos resultados obtidos.....	42
Figura 17 – Modelo descrito por Wu (2012) para explicar a formação cíclica de espécies reativas geradas pela toxicidade do alumínio.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al – Alumínio

AChE – acetilcolinesterase

CAT – catalase

D. melanogaster – *Drosophila melanogaster*

DTNB – ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico

ERs – espécies reativas

EROs – espécies reativas de oxigênio

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

GABA – ácido gama-aminobutírico

GSH – glutationa reduzida

GPx – glutationa peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

NO – óxido nítrico

O₂^{·-} – radical superóxido

OH[·] – radical hidroxil

OONO⁻ - peroxinitrito

SDS – dodecil sulfato de sódio

SH – grupos tióis/sulfidrila

SHNP –SH não-protéico

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TFK – tampão fosfato de potássio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 ALUMÍNIO.....	14
3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
4 ANTIOXIDANTES.....	18
5 ÁCIDO SIRÍNGICO.....	20
6 <i>Drosophila melanogaster</i>.....	22
7 JUSTIFICATIVA.....	25
8 OBJETIVOS.....	26
8.1 Objetivo Geral.....	26
8.2 Objetivos Específicos.....	26
9 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
9.1 Desenho experimental.....	27
9.2 Ensaio <i>in vivo</i>	28
9.2.1 Mortalidade.....	28
9.2.2 Geotaxia negativa.....	28
9.2.3 Open field.....	29
9.3 Ensaio <i>ex vivo</i>	29
9.3.1 Preparo de amostra.....	29
9.3.2 Avaliação da peroxidação lipídica.....	30
9.3.3 Dosagem dos níveis de grupos tióis (-SH).....	30
9.3.4 Atividade enzimática da catalase (CAT).....	30
9.3.5 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).....	31
9.3.6 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE).....	31
9.3.7 Avaliação da viabilidade celular (MTT).....	31
9.4 Análise estatística.....	32
10 RESULTADOS.....	33
11 DISCUSSÃO.....	42
12 CONCLUSÕES.....	48
13 PERSPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é um elemento químico abundante, compreende aproximadamente 8% da crosta terrestre e sua ampla presença no ambiente torna a não exposição a esse metal praticamente inexistente (Kumar, 2009). Embora a contaminação por Al seja inevitável, ele não possui ação fisiológica e se apresenta de forma cumulativa no organismo, desempenhando ação tóxica em altos níveis e por exposição prolongada. Os efeitos neurotóxicos do Al já são conhecidos há algum tempo, no entanto, seu(s) mecanismo(s) de ação e sua relação com doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer permanecem desconhecidos (Wu, 2012).

Entre um dos principais mecanismos propostos para a toxicidade do Al está o estresse oxidativo, uma situação de desequilíbrio entre a formação de espécies reativas (ERs) e as defesas antioxidantes do organismo. A produção de ERs ocorrem naturalmente dentro da célula, mas em excesso podem oxidar biomoléculas, desencadeando vários eventos envolvidos em processos patológicos, incluindo a neurodegeneração (Halliwell, 2007).

Estudos recentes têm demonstrado o papel benéfico de antioxidantes contra os danos deletérios do estresse oxidativo. Assim, a busca por agentes antioxidantes provenientes de produtos naturais, tem sido próspera, principalmente daqueles que advêm de plantas medicinais e produtos alimentícios comumente utilizados (Guimarães, 2009).

O ácido siríngico é um ácido fenólico presente principalmente em cereais e possui efeito antioxidante já relatado na literatura (Karthik, 2014). Apesar de ter apresentado efeitos benéficos contra processos oxidativos e inflamatórios (Itoh, 2009), seus efeitos biológicos ainda são pouco explorados.

D. melanogaster, a mosca-da-fruta, é um animal invertebrado que vem sendo utilizado há mais de um século como modelo experimental. A *D. melanogaster* possui diversas vantagens experimentais, inclusive para avaliação da toxicidade de metais (Rand, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um pré-tratamento com ácido siríngico associado à exposição ao alumínio em um modelo experimental da *D. melanogaster*.

2 ALUMÍNIO

O alumínio (Al) é o terceiro elemento químico mais presente na crosta terrestre, e o metal mais abundante, sendo considerado praticamente onipresente no ambiente (Bondy, 2010). Foi isolado em sua forma metálica pela primeira vez em 1925 pelo físico dinamarquês Hans Oersted (Bondy, 2014). Sólido em temperatura ambiente, não é encontrado em sua forma elementar, mas em forma de sais e óxidos. Seu estado de oxidação é +3 e não participa de reações de óxido-redução (Kumar, 2014).

Devido a sua abundância é um elemento de fácil acesso e suas características físico-químicas o faz amplamente utilizado em construções, transportes, armazenamento e processamento de alimentos, utensílios domésticos e cirúrgicos, produtos farmacêuticos, vacinas, cosméticos, no tratamento da água de consumo residencial entre outras aplicações (Gourier-Fréry, 2004).

Nos últimos anos, a chuva ácida provocada pela queima de combustíveis fósseis tem transformado os minerais de Al em sua forma mais solúvel, a forma iônica Al^{3+} , encontrado principalmente em reservatórios de água para consumo residencial. Associado a isso, a utilização em larga escala de produtos contendo Al tem aumentado significativamente o seu acúmulo no corpo humano. Estima-se que a ingestão diária seja de 3-30mg/dia. A maioria dos compostos de Al são insolúveis em pH fisiológico, limitando sua absorção às vias orais e inalatórias.

Independentemente da via de exposição, a absorção do Al é baixa (inferior a 1% para as vias oral e dérmica e até 3% para o trato respiratório). A exposição humana se dá principalmente por alimentos e pela água das redes de tratamento. O uso de desodorantes antitranspirantes também pode ser uma fonte significativa da absorção diária de Al. No entanto, as populações mais expostas são pacientes que necessitam de diálise, nutrição parenteral ou que se utilizam de antiácidos por longo prazo e profissionais da indústria do alumínio (Gourier-Fréry, 2004).

O Al não é um elemento essencial para a vida e comumente foi pensado como um mineral bastante inerte e insolúvel (Bondy, 2014). No entanto, diversas evidências indicam que o Al causa efeitos tóxicos severos. Geralmente, a intoxicação por Al resulta da exposição a componentes contendo altas concentrações ou inoculação direta via diálise, nutrição parenteral ou implantes cirúrgicos (Wang, 2016).

O Al tem se mostrado cumulativo nos tecidos de mamíferos e os efeitos tóxicos após exposição crônica se mostram basicamente neurológicos

(encefalopatias, perturbações psicomotoras), ósseos (osteomalacia), hematológicas (anemias microlíticas) e também reações imunológicas, além da suspeita de seu envolvimento na doença de Alzheimer (Gourier-Fréry, 2004; Kumar, 2014).

O Al possui forte atividade prooxidante apesar de seu comportamento não-redox. Fortes evidências sugerem que o Al se complexa com o ânion superóxido, formando um complexo oxidante mais potente que o próprio ânion superóxido, promovendo a formação de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, contribuindo para a formação de um ambiente oxidante (Kumar, 2009).

A possibilidade de o Al estar contribuindo para a promoção de doenças neurológicas deu-se a partir de diversos relatos clínicos de que a presença de Al no organismo não era tão inofensiva como parecia. Relatos da ocorrência de encefalopatia em pessoas após diálise foi acompanhada por níveis elevados de Al no cérebro. O desenvolvimento de encefalopatia é caracterizado por déficits cognitivos associado a tremores e neurodegeneração, ocorrendo principalmente em trabalhadores da indústria de Al. Sintomas neurológicos anormais também foram observados em pacientes que receberam vacinas via intramuscular, e o Comitê Global Consultivo sobre Segurança de Vacinas da Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu que pode existir um grupo de indivíduos predispostos à sensibilidade de adjuvantes baseados em Al (Bondy, 2010; Bondy, 2014).

Atualmente as opções de tratamento para a toxicidade do Al ainda são limitadas. A quelatação com deferoxamina tem sido utilizada para tratar pacientes intoxicados via nutrição parenteral. Essa terapia, no entanto, apresenta riscos. Há relatos nos quais esse tratamento causa hipocalcemia. Apesar de reduções na disponibilidade de Al, o tratamento não parece alterar o curso do desenvolvimento de encefalopatias. A prevenção da toxicidade, seja pela redução ou eliminação de fórmulas contendo Al continua sendo mais eficaz (Gura, 2010).

Apesar dos diversos estudos quanto a toxicidade e envolvimento do Al em processos neurodegenerativos, os exatos mecanismos de ação deste metal ainda não estão definidos (Kumar, 2009).

3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma situação de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes no organismo, em favor das espécies pró-oxidantes. Dano oxidativo pode ser caracterizado por qualquer dano biomolecular causado por espécies reativas a componentes dos organismos vivos (Halliwell, 2007).

Espécies reativas (ERs), ocorrem naturalmente nos organismos e atuam como importantes sinalizadores celulares. No entanto, em situações adversas, a sua produção pode ser exacerbada, acarretando em dano oxidativo, se não devidamente combatido pelas defesas antioxidantes. O motivo pelo qual as espécies reativas são altamente perigosas para a célula se dá pelo fato de sua natureza radicalar (ou, no caso de espécies reativas não radicalares, que se decompõem em espécies radicalares na presença de íons metálicos), com elétrons desemparelhados na camada de valência que interagem fortemente com as moléculas biológicas, podendo alterar suas características conformacionais e de função.

As espécies reativas podem ser principalmente de dois tipos: as Espécies Reativas de Oxigênio e as Espécies Reativas de Nitrogênio. Dentre as EROs, seus principais representantes são os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH^-), assim como espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já as ERNs são principalmente encontrados o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($OONO^-$) (El-Bahr, 2013).

O estresse oxidativo está associado a várias patologias e doenças degenerativas, como aterosclerose, câncer, acidente vascular cerebral, doenças cardíacas, processos inflamatórios, entre outras.

O cérebro é particularmente sensível ao estresse oxidativo (Kumar, 2014). É um órgão rico em lipídios de cadeias poliinsaturadas, que são especialmente sensíveis ao ataque de espécies reativas, seu metabolismo energético utiliza muito oxigênio para suprir suas necessidades energéticas, o que gera montantes consideráveis de espécies reativas. Seu sistema antioxidante é inadequado para a demanda e algumas regiões cerebrais são ricas em ferro (Halliwell, 1992; 2006).

O estresse oxidativo tem sido associado a doenças neurológicas como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, perda de memória, entre outros. Em processos neurodegenerativos, estudos clínicos e

experimentais demonstram o papel chave do estresse oxidativo na perda neuronal (Pham-Huy, 2008).

4 ANTIOXIDANTES

Para combater os efeitos nocivos do estresse oxidativo os organismos possuem frentes de defesas, chamadas antioxidantes. Antioxidantes são definidos como qualquer substância que, em baixas concentrações comparada ao substrato oxidável, reduz ou previne a oxidação deste substrato (Halliwell, 2007). Não existe, dessa forma, um antioxidante “melhor” que outro, mas sim depende do tipo de oxidação em questão.

Os organismos possuem diversos mecanismos de defesa antioxidantes que combatem ou reduzem os danos oxidativos, que neutralizam as espécies reativas e protegem as células. Os mecanismos endógenos de defesa antioxidante se dão por duas principais formas: não-enzimáticos e enzimáticos. Há também antioxidantes de fontes exógenas provenientes da alimentação (Pham-Huy, 2008).

Entre as defesas antioxidantes enzimáticas estão as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. A superóxido dismutase é uma metaloenzima, que faz a primeira defesa contra as espécies reativas, regulando os níveis de superóxido. A catalase é uma hemoenzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, protegendo a célula do estresse oxidativo causado pelo peróxido ou a consequente formação de radical hidroxil. A glutathione peroxidase é uma selenoenzima que neutraliza hidroperóxidos pela oxidação da glutathione reduzida. As defesas antioxidantes endógenas não-enzimáticas são pequenas moléculas que neutralizam as espécies reativas, como exemplo as vitaminas C e E e a glutathione reduzida (GSH) e atuam como antioxidantes celulares (El-Bahr, 2013). Os antioxidantes exógenos são aqueles provenientes dos alimentos ingeridos como vitaminas, (ex.: vitaminas E e C) e os compostos derivados do metabolismo secundário dos vegetais (ex.: flavonóides, ácidos fenólicos e carotenóides).

Há também antioxidantes sintéticos, porém, estes podem apresentar efeitos não desejados para a saúde humana. Embora considerados seguros para utilização pela indústria alimentícia, existem dados controversos que afirmam certa relação com carcinogenicidade (Carocho, 2013). Por outro lado, atualmente a demanda por antioxidantes de ocorrência natural tem aumentado. Isso tem incentivado a busca por fontes alternativas de antioxidantes, de preferência de origem natural, provavelmente mais segura e mais barata.

Recentemente, há um considerável interesse acerca da pesquisa dos efeitos antioxidantes e antiinflamatórios dos compostos fenólicos de fontes vegetais, principalmente daquelas já utilizadas pelas suas propriedades medicinais (Sun, 2010). Conseqüentemente, muitos compostos foram isolados e a maioria dos antioxidantes pertencente à família dos compostos fenólicos.

Geralmente, as funções biológicas dos compostos fenólicos têm sido atribuídas às características antioxidantes, que neutralizam espécies reativas e equilibram o estado redox celular. No entanto, especula-se que a atividade biológica desses compostos não ocorre apenas desta forma, especialmente no cérebro, onde suas concentrações são baixíssimas, indicando que estes podem desempenhar funções protetoras do sistema nervoso (Spencer, 2009). De fato, vários estudos demonstram numerosos efeitos neuroprotetores dos flavonóides, protegendo contra neurotoxinas, reduzindo neuroinflamação e promovendo melhoras em processos de memória, aprendizagem e funções cognitivas. Levando-se em conta que os processos neurodegenerativos podem se dar de diversas formas, seja por neuroinflamação, aumento dos níveis de ferro e/ou redução nas defesas antioxidantes, entre outros, os compostos fenólicos se mostram promissores na busca por soluções alternativas para a reversão desses quadros.

5 ÁCIDO SIRÍNGICO

O ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3, 5-dimetoxibenzóico) é um composto fenólico que ocorre naturalmente em diversas plantas (Figura 1). Foi descrito como abundante em cereais como cevada, milho, aveia, arroz, centeio, sorgo e trigo e em tubérculos como o rabanete e o gengibre (Srinivasan, 2014; Karthik, 2014) e no melaço de cana (Guimarães, 2007). Várias atividades biológicas são atribuídas ao ácido siríngico como: antioxidante, antiproliferativo, antiendotóxico e antineoplásico (Karthik, 2014).

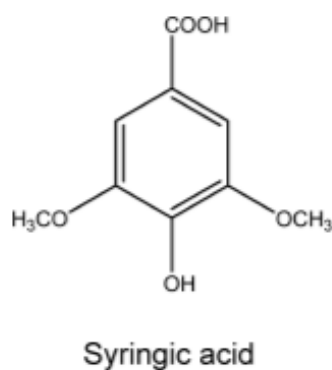


Figura 1. Estrutura química do ácido siríngico.

Estudos mostram que o ácido siríngico foi efetivo contra danos hepáticos e processos inflamatórios causados por hepatite viral, suprimindo citocinas inflamatórias e melhorando a resposta imune. Reduziu também os níveis de transaminases hepáticas elevadas por danos causados pelo tetracloreto de carbono. Apresentou atividade inibitória do radical DPPH elevada em comparação a outros compostos fenólicos, como a ácido vanílico, além de já ter apresentado efeitos antimicrobianos e protetores contra a oxidação do DNA. Os efeitos benéficos do ácido siríngico são atribuídos a suas propriedades antioxidantes (Itoh, 2009; 2010).

Mostrou-se também eficaz em reduzir a glicose de ratos diabéticos para níveis próximos aos normais pelo aumento da secreção de insulina plasmática, melhorar o funcionamento das células beta pancreáticas e aumentar a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose (Muthukumaran, 2013; Srinivasan, 2014) e inibir a catarata diabética, em modelos *in vitro* e *in vivo* (Wei, 2012).

Rekha (2014) demonstrou efeitos protetores do ácido siríngico frente à neurodegeneração nigroestriatal em um modelo de doença de Parkinson induzida pelo pesticida MPTP, em camundongos. Tais efeitos podem ter sido causados pelo aumento dos níveis de dopamina e seus metabólitos nessa região, aumentando a expressão de marcadores dopaminérgicos e reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias pela inibição do estresse oxidativo e assim, reduzindo alterações comportamentais. Nesse mesmo trabalho, o pré-tratamento com ácido siríngico reduziu os elevados níveis de TBARS, catalase e SOD nesse modelo, sugerindo que o ácido siríngico intervém no dano oxidativo presente. Sugere-se, também, que o ácido siríngico reduz o estresse oxidativo pelo aumento das defesas antioxidantes (principalmente GSH e GPx). O ácido siríngico se mostrou promissor candidato para a prevenção e tratamento do estresse oxidativo e processos inflamatórios relacionados a desordens neurodegenerativas, em especial a doença de Parkinson.

Apesar dos promissores efeitos benéficos apresentados, ainda poucos estudos sobre o ácido siríngico são encontrados na literatura.

6 *Drosophila melanogaster*

Em se tratando do estudo de efeitos neurotóxicos, o objetivo principal de pesquisa é identificar e caracterizar os mecanismos pelos quais os agentes químicos induzem seus efeitos prejudiciais, tanto na formação como no funcionamento do sistema nervoso (Rand, 2010).

Como modelo experimental *in vivo*, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* oferece diversas vantagens importantes em se tratando de *screening* toxicológico tais como: baixo custo e facilidade de manutenção, curto ciclo de vida, aspectos de comportamento e desenvolvimento que podem ser avaliados, facilidade de manipulação experimental em relação a modelos vertebrados, tanto em aspectos éticos quanto metodológicos, alta homologia genética com organismos superiores, facilidade de obtenção de fenótipos mutantes, por possuir estrutura genética relativamente simples e bem conhecida, entre muitos outros.

Além da fácil manipulação, que não necessita de aparatos sofisticados, em condições ideais de temperatura (em torno de 25°C) a mosca-da-fruta se reproduz e apresenta um ciclo de vida bem definido, compreendendo estágio distintos de ovo, larva, pupa e mosca adulta (Figura 2), o que torna possível avaliar o ciclo de vida completo do animal, do desenvolvimento à velhice, em um tempo relativamente curto quando comparado a modelos tradicionais.

Pioneira como modelo genético, é utilizada desde 1900 e faz parte de grandes achados nessa área, alguns dos quais estabeleceram os primeiros princípios da genética, como a teoria da hereditariedade de Mendel dos cromossomos e a mutagenicidade do raio-X. A estrutura genética, relativamente simples da mosca consiste em 4 cromossomos que codificam aproximadamente 13.600 genes, praticamente a metade do encontrado em humanos (Nichols, 2006; Rand, 2010).

Em comparação com mamíferos, o genoma da *D. melanogaster* possui uma estrutura mais simples, sendo viável a manipulação genética. *D. melanogaster* possui poucos genes, mas em sua maioria são homólogos aos humanos apresentando cerca de 75% de homologia com as doenças humanas (Pandey e Nichols, 2011), algumas compartilhando mais de 90% de semelhança na sequência de nucleotídeos. Na Internet, encontra-se bancos de dados abertos onde pode-se encontrar praticamente todos os dados disponíveis, principalmente genéticos, sobre a *Drosophila*. Podemos

citar como exemplos o Virtual Library: *Drosophila* pelo endereço: <http://ceolas.org/fly/> e o FlyBase pelo endereço: <http://flybase.org/>.

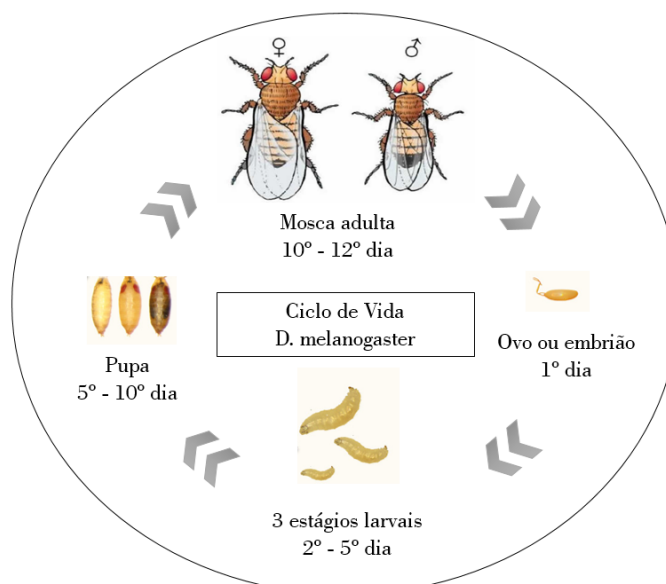


Figura 2.Figura esquemática do ciclo de vida da *D. melanogaster*.

Além disso, a *D. melanogaster* é versátil para estudos toxicológicos e recentemente foi atribuído a ela um novo termo que suporta a abertura de uma nova área de estudo: Drosophotoxicologia (do inglês: *drosophotoxicology*). A drosophotoxicologia abrange uma série de abordagens metodológicas abordando o uso da *D. melanogaster* como organismo modelo escolhido em estudos toxicológicos (Rand, 2010; Chifiriuc, 2016).

Em se tratando de estudos neurotóxicos, mais uma vez a *D. melanogaster* apresenta suas vantagens: a mosca adulta apresenta um sistema nervoso com aproximadamente 200.000 neurônios, formando circuitos funcionais distintos já detalhadamente mapeados. Tais circuitos medeiam processos fundamentais como locomoção e comportamento, aprendizado e memória, dentre vários. Entre os sistemas de neurotransmissão, estão aqueles que usam serotonina, dopamina, GABA, acetilcolina e outros. Em vista do alto nível de conservação de mecanismos moleculares entre moscas e humanos, o modelo da *D. melanogaster* se mostra promissor para o entendimento de mecanismos de toxicidade e degeneração do sistema nervoso central (Nichols, 2006).

O modelo experimental da *D. melanogaster* tem sido largamente proposto como organismo modelo para a avaliação da toxicidade de metais, principalmente, neurotoxicidade. Ensaio de sobrevivência, funções neuronais e comportamentos são relativamente simples de realizar nesse modelo. Também se mostra bastante simples a investigação de mecanismos de toxicidade mediada por metais, a nível molecular (Calap-Quintana, 2017). Muitos estudos são encontrados na literatura avaliando a toxicidade de metais em *D. melanogaster*, sejam eles metais essenciais como ferro (Zhu, 2016a), cobre (Bonilla-Ramirez, 2011) e manganês (Bianchini, 2016) ou metais não essenciais, como chumbo (Peterson, 2017), mercúrio (Paula, 2012) e alumínio (Wu, 2012). Kijak (2014) defende a *D. melanogaster* como um modelo sensível para a avaliação da neurotoxicidade do Al, pois ainda são escassos o entendimento do(s) mecanismo(s) de toxicidade deste metal, assim como poucos os estudos utilizando este modelo experimental.

Tendo em vista o exposto acima, consideramos as vantagens do uso do modelo experimental da mosca-da-fruta *D. melanogaster* para o desenvolvimento do nosso trabalho.

7 JUSTIFICATIVA

Considerando que: a) o Al se faz presente no nosso cotidiano, acarretando exposição cada vez maior do ser humano a esse metal; b) o Al está sendo considerado como potencial fator no desenvolvimento e progressão de algumas doenças neurodegenerativas; c) a *D. melanogaster* apresenta-se como organismo modelo para estudos referentes a toxicidade de metais em geral, com especial atenção ao Al; e d) o tratamento para os casos de intoxicação por esse metal não são plenamente satisfatórios, se faz necessário compreender de que forma este metal pode se apresentar neurotóxico e assim, buscar maneiras efetivas e viáveis de se prevenir seus efeitos danosos. Nesse contexto e considerando o envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade do Al, o uso de antioxidantes parece ser uma hipótese plausível. Diante disso, propõe-se esse estudo para testar a hipótese que o ácido siríngico, um conhecido antioxidante de origem natural, possa prevenir a toxicidade do Al em *D. melanogaster*.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do ácido siríngico nas alterações causadas pela exposição ao cloreto de alumínio em *D. melanogaster*.

8.2 Objetivos Específicos

Analisar os efeitos do tratamento com ácido siríngico seguido da exposição ao alumínio sobre:

- a longevidade e parâmetros de atividade locomotora em *D. melanogaster*,
- parâmetros de estresse oxidativo no corpo e na cabeça das moscas expostas;
- a atividade das enzimas antioxidantes e da enzima acetilcolinesterase na cabeça e no corpo das moscas tratados.
- a viabilidade celular na cabeça e no corpo das moscas tratadas.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Desenho experimental

D. melanogaster do tipo selvagem (Harwich) obtidas do National Species Stock Center (Bowling Green, OH, USA) foram mantidas sob condições padrões de temperatura e umidade ($22\pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% umidade) em um meio contendo 1% m/v de levedura, 2% m/v de sacarose comercial, 1% m/v de leite em pó, 1% m/v de ágar e 0,08% de metilparabeno como antifúngico.

Primeiramente, 100 moscas por grupo, de ambos os sexos, com 1-2 dias de vida (pós-eclosão) foram tratadas em dois grupos: 1) grupo controle e 2) grupo tratado com ácido siríngico na concentração de $25\ \mu\text{M}$, ambos em um meio de tratamento contendo 1% de agar, 1% de sacarose comercial, 1% de leite em pó e 0,08% de metilparabeno como antifúngico. Água destilada foi utilizada como veículo para todos os tratamentos e as doses utilizadas foram definidas com base em um estudo piloto.

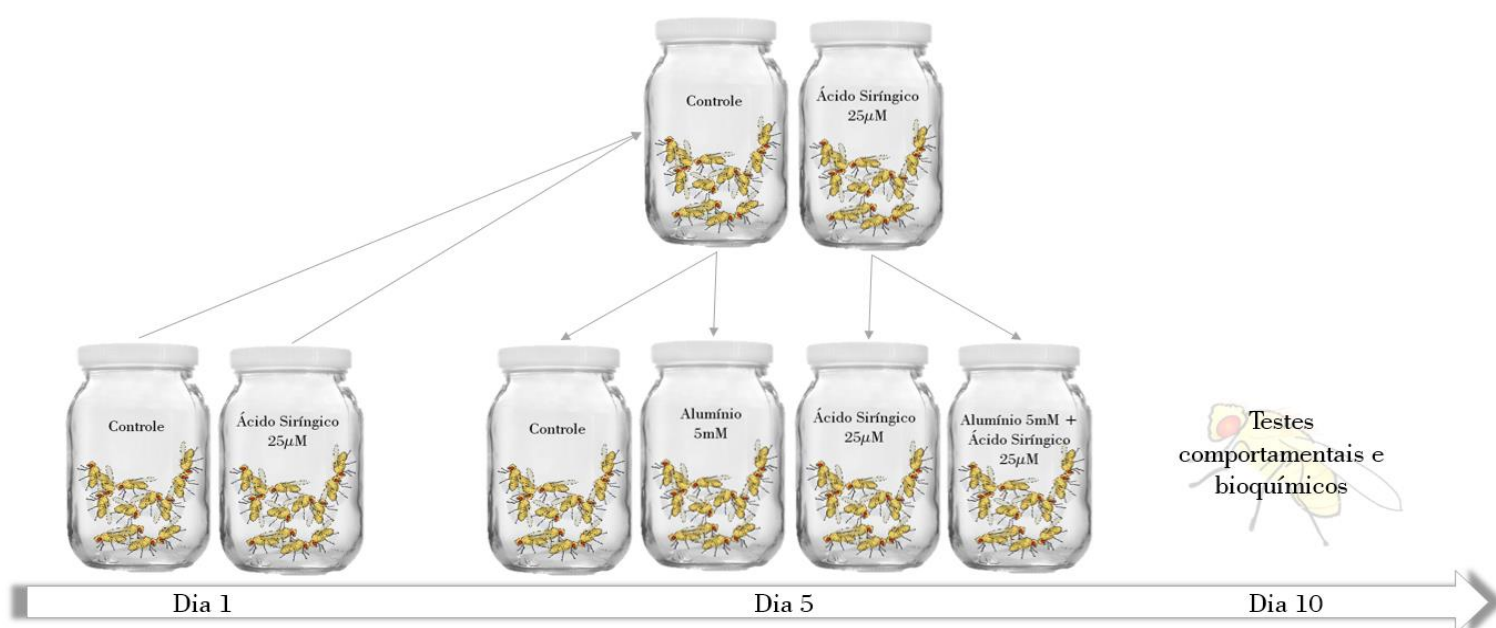


Figura 3. Figura esquemática do desenho experimental.

Após 5 dias, cada grupo tratado foi dividido em dois, formando ao final 4 grupos (Figura 3): o grupo controle foi dividido em 1) grupo controle e 2) grupo alumínio (contendo $5\ \text{mM}$ de cloreto de alumínio) e o grupo tratado com ácido siríngico foi

dividido em 3) grupo ácido siríngico (tratado com 25 μ M de ácido siríngico) e 3) grupo alumínio mais ácido siríngico (contendo 5mM de cloreto de alumínio e 25 μ M de ácido siríngico). Estes grupos foram tratados por mais 5 dias, perfazendo o total de 10 dias de tratamento. Após, foram realizados os testes comportamentais.

9.2 Ensaio *in vivo*

9.2.1 Mortalidade

Cada grupo contendo 100 moscas foram monitorados diariamente e o número de moscas mortas foram contadas durante todo o tratamento (10 dias). Foi realizada a média de cada dia e o teste foi repetido em cinco experimentos independentes.

9.2.2 Geotaxia negativa

O teste de geotaxia negativa avalia a atividade locomotora baseado na capacidade de escalada das moscas (descrito por Feany, 2000 e modificado por Sudati 2013). Dez moscas de cada grupo foram mantidas em uma coluna vertical medindo 10 cm de altura. As moscas foram forçadas ao fundo da coluna por leve choque mecânico e após 6 segundos as moscas que ultrapassaram a marca de 6 centímetros de altura foram contadas. O teste foi repetido em cinco experimentos independentes.

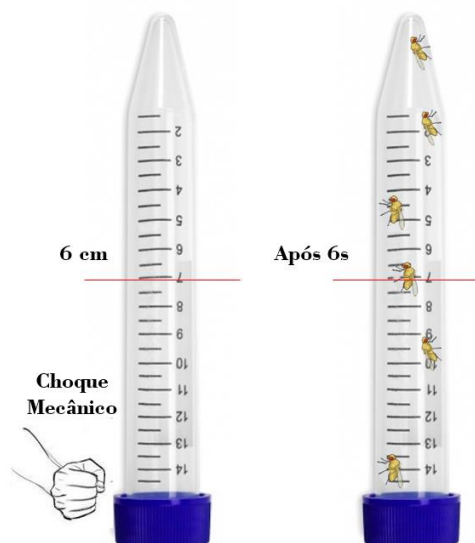


Figura 4. Figura esquemática do teste de geotaxia negativa.

9.2.3 Open field

Para o teste de *open field* (descrito por Hirt, 2010 e modificado por Sudati, 2013) três moscas de cada grupo foram mantidas em uma placa de petri posicionada em cima de um plano quadriculado de 1x1cm. A atividade locomotora foi gravada em vídeo por 30 segundos e posteriormente foram contados o número de quadrantes cruzados nesse período de tempo e o resultado expresso pela média de atividade das moscas avaliadas. O teste foi repetido em cinco experimentos independentes.

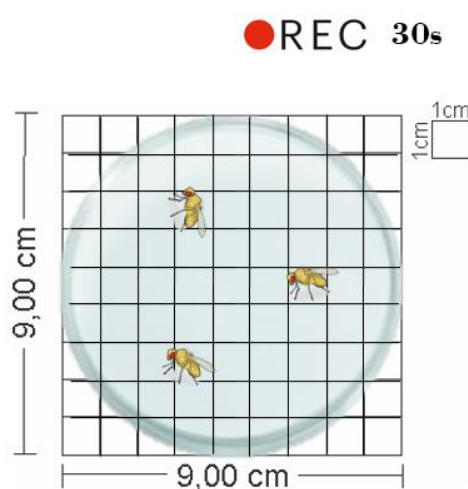


Figura 5. Figura esquemática representando o teste de *open field*.

9.3 Ensaios *ex vivo*

9.3.1 Preparo de amostra

As moscas foram anestesiadas em gelo, os corpos e as cabeças foram separados com bisturi e homogeneizados em tampão TFK 0,05 M pH 7,4, na proporção de 40 cabeças/corpos em 120 μ L de tampão para o ensaio de TBARS (amostra 1). Para todos os demais ensaios as amostras foram homogeneizadas na proporção de 10 cabeças para 250 μ L de tampão ou 10 corpos para 500 μ L de tampão (amostra 2).

9.3.2 Avaliação da peroxidação lipídica

A fim de se determinar marcadores de estresse oxidativo foi avaliada a peroxidação lipídica pelo ensaio das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Ohkawa (1979) com algumas modificações. Em um tubo de ensaio, 100 µL da amostra 1 foram incubados por 1 hora a 37°C em banho termostático. Após, foram adicionados 100 µL de tampão ácido acético p.H. 3,0 e 100 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,6%) e as amostras foram incubadas por 2 horas a 100°C em banho termostático. Foram então adicionados 20 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%), agitadas em vórtex por 10 segundos e então centrifugadas a 10 000 rpm por 20 minutos. Em placas de 96 poços, 200 µL do sobrenadante foram mensurados espectrofotometricamente em 532nm. Os resultados obtidos foram corrigidos pela dosagem de proteína e expressos em percentual de controle.

9.3.3 Dosagem dos níveis de grupos tióis (-SH)

A fim de avaliar as defesas antioxidantes não-enzimáticas foram determinados os níveis de grupos tióis -SH total e não-protéico pelo método descrito por Ellman (1959) com modificações. Para a dosagem de -SH total, foram adicionadas a uma placa de 96 poços 80 µL da amostra 2, 115 µL de água destilada, 100 µL de tampão TFK 1M e 20 µL de DTNB (20mM). Após 5 minutos, as amostras foram mensuradas espectrofotometricamente em leitora de placa a 412nm. Os resultados obtidos foram corrigidos por dosagem de proteína e expressos em percentual de controle. Para a dosagem de -SH não-protéico as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA, 10%, 1:4 v/v) e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm. Foi separado o sobrenadante e a amostra analisada como descrito acima.

9.3.4 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A avaliação da atividade enzimática da catalase foi determinada através da mensuração direta da redução do peróxido de hidrogênio a gás oxigênio e água como descrito por Aebi (1984) com modificações. Em uma cubeta de quartzo foram utilizados 960 µL tampão TFK (0,05 M, pH 7,0), 20 µL de peróxido de hidrogênio 1 M e 20 µL da amostra 2. As medidas foram realizadas a cada 15 segundos após o início

da reação durante 2 minutos em espectrofotômetro a 240nm. Os resultados obtidos foram corrigidos por dosagem de proteína e expressos em percentual de controle.

9.3.5 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada pelo método da oxidação da quercetina descrito por Kostyuk (1989) com modificações. Em uma placa de 96 poços foram pipetados 40 µL da amostra 2, 40 µL de água destilada, 200 µL de solução tampão (TFK 0,02 M; pH 7,4) e 10 µL de quercetina (150 µg/mL) para iniciar a reação. As leituras foram realizadas espectrofotometricamente a 412nm, assim que a reação foi iniciada e 20 minutos após. As médias foram calculadas a partir da diferença entre as duas leituras e os resultados corrigidos pela dosagem de proteína e expressos em percentual de controle.

9.3.6 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação da atividade enzimática da acetilcolinesterase foi realizada pelo método descrito por Ellman (1961) com modificações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de sistema (TFK 100 mM pH 7,4, DTNB 6 mM), 70 µL de água destilada, 10 µL da amostra 2 e a reação foi iniciada com a adição de 20 µL de acetiltiocolina (8 mM). As medidas foram realizadas a cada 30 segundos, durante 2 minutos, espectrofotometricamente em uma leitora de placa de 96 poços a 412 nm. Os resultados obtidos foram corrigidos pela dosagem de proteína e expressos em percentual de controle.

9.3.7 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

A avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT (Saberzadeh, 2016). Foram colocados 50 µL da amostra 2, 20 µL de MTT (1mg/mL) e 130 µL de tampão TFK-salina (100mM TFK, pH 7,4; 0,9% NaCl) em um tubo de ensaio e incubados por 30 minutos em banho termostático a 37°C. Após esse tempo, foram adicionados 200 µL de DMSO às amostras e incubado novamente em banho termostático a 37°C por 30 minutos. As amostras foram retiradas do banho termostático, foram adicionados

200 μ L de SDS 8,1% e centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi mensurado espectrofotometricamente a 630 e 545nm em uma placa de 96 poços. As médias foram calculadas pela diferença entre as leituras e corrigidas pela dosagem de proteína e expressos em percentual de controle.

9.4 Análise estatística

Para a análise estatística foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo post hoc de Tukey quando apropriado. Os dados estão expressos em média e desvio padrão a diferença entre elas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

10 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da avaliação diária dos tratamentos mostram que a exposição ao Al provoca aumento significativo ($p < 0,05$) da mortalidade das moscas expostas quando comparadas ao controle. Os dados mostram que o tratamento com o ácido siríngico foi capaz de proteger significativamente ($p < 0,05$) as moscas expostas ao Al do aumento de mortalidade quando comparado ao grupo que apenas foi exposto ao Al. Além disso, as moscas tratadas com ácido siríngico apresentaram mortalidade ligeiramente menor que o grupo controle, porém, sem alterações estatisticamente significativas (Figura 6).

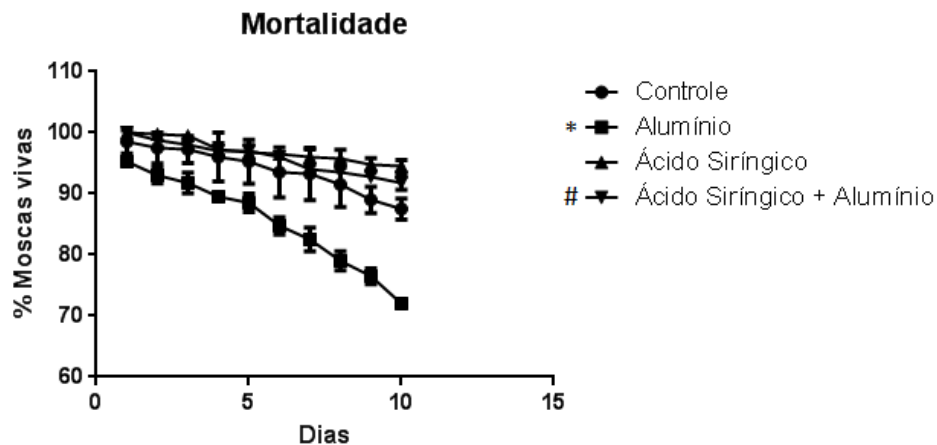


Figura 6. Mortalidade durante 10 dias de tratamento em *D. melanogaster*. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Os dados obtidos a partir da análise do teste de geotaxia negativa, que avalia a atividade locomotora das moscas através da sua capacidade de escalada, mostram que a exposição ao Al reduz significativamente ($p < 0,05$) a habilidade das moscas expostas quando comparado ao controle. O tratamento com o ácido siríngico protegeu significativamente ($p < 0,05$) o dano locomotor causado pelo Al (Figura 7).

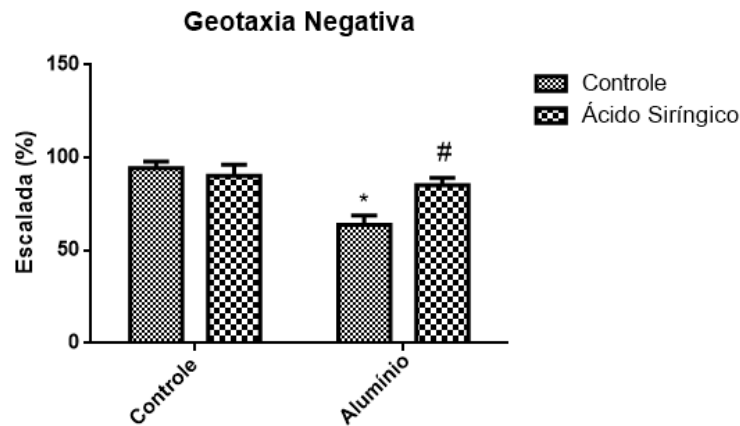


Figura 7. Geotaxia negativa de *D. melanogaster* tratadas com ácido síringico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Da mesma forma, a exposição ao Al afeta significativamente ($p < 0,05$) o comportamento das moscas no teste de *open field* (campo aberto), que avalia a atividade locomotora sobre um campo quadriculado com dimensões conhecidas. Nesse teste, não houve interação significativa entre os tratamentos. (Figura 8).

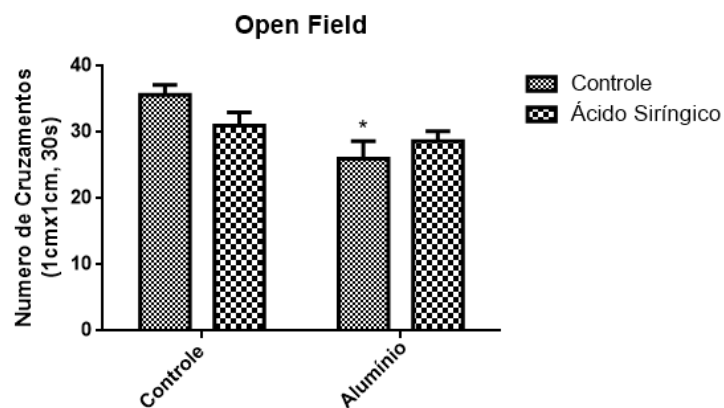


Figura 8. *Open field* de *D. melanogaster* tratadas com ácido síringico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle.

Os resultados da dosagem dos níveis de TBARS, que avalia os produtos da peroxidação lipídica, apresentam uma forte interação estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) com uma proteção pelo ácido siríngico ao aumento no TBARS, causado pelo Al (Figura 9).

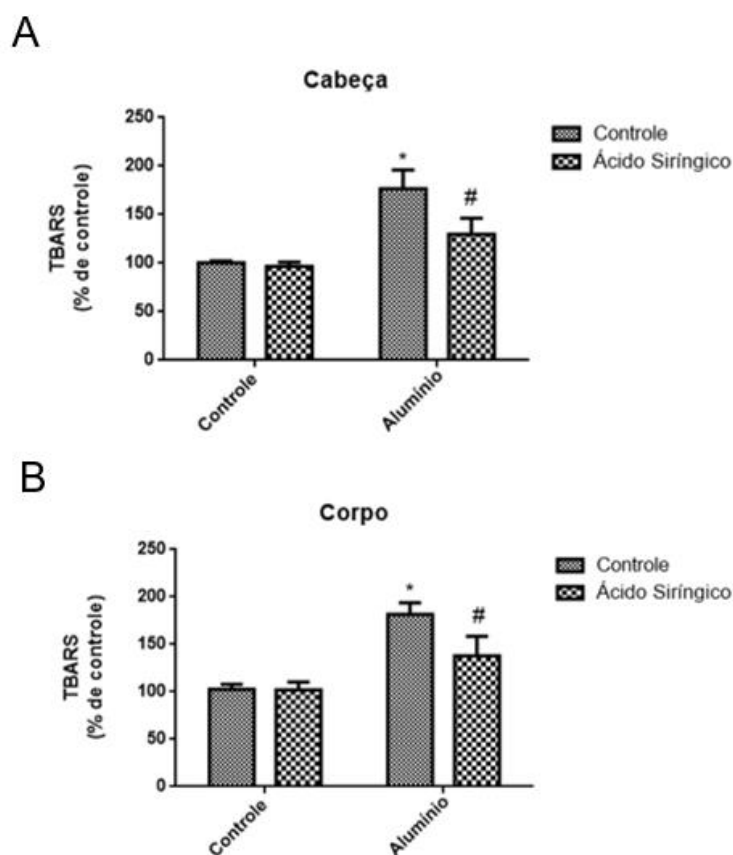


Figura 9. Alterações dos níveis de TBARS na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Os resultados da avaliação dos grupos SH mostram que a exposição ao Al reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de SH não-protéico e SH total nas regiões da cabeça e do corpo das moscas tratadas (Figuras 10 e 11). Por sua vez, o tratamento com ácido siríngico se mostrou capaz de prevenir significativamente ($p < 0,05$) a redução dos níveis de SH não-protéico na região do corpo (Figura 10B). Apesar de apresentar uma tendência ao aumento dos níveis de SH não-protéico e SH total na região da cabeça, os dados não foram estatisticamente significativos. Além

do mais, as moscas tratadas com ácido siríngico apresentaram níveis de SH total significativamente ($p < 0,05$) na região do corpo (Figura 11B).

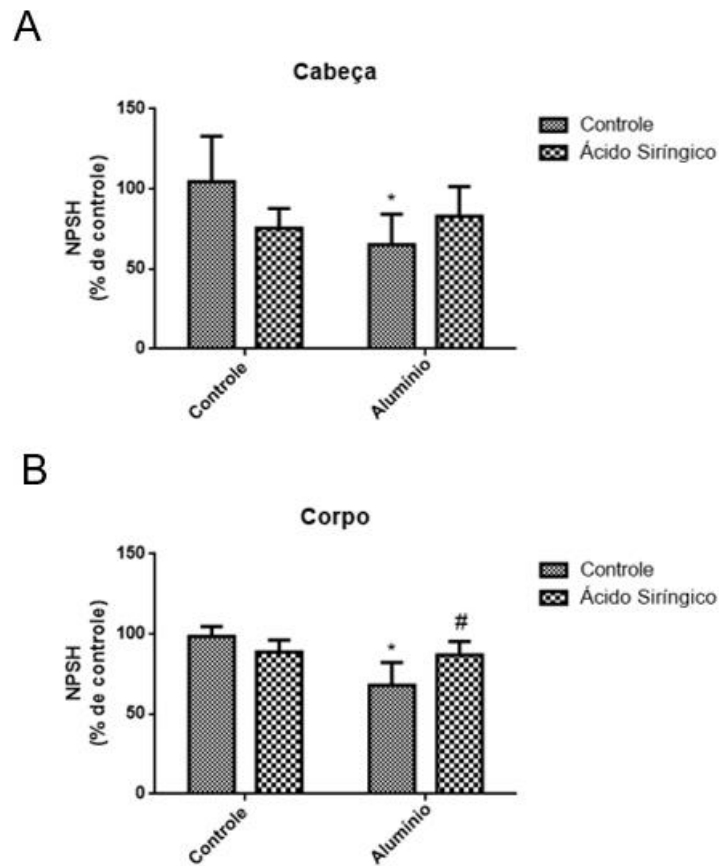


Figura 10. Alterações dos níveis de SH não-protéico na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

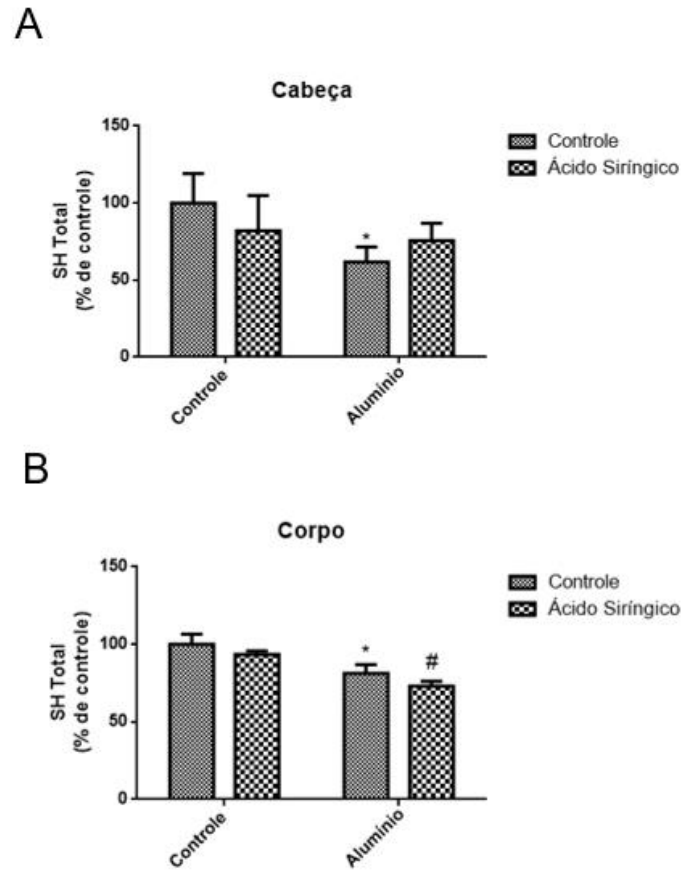


Figura 11. Alterações dos níveis de SH total na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido síringico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Os resultados da avaliação da atividade enzimática da catalase mostram uma forte interação, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, com o aumento da atividade da catalase no grupo tratado com ácido síringico na região da cabeça (Figura 12).

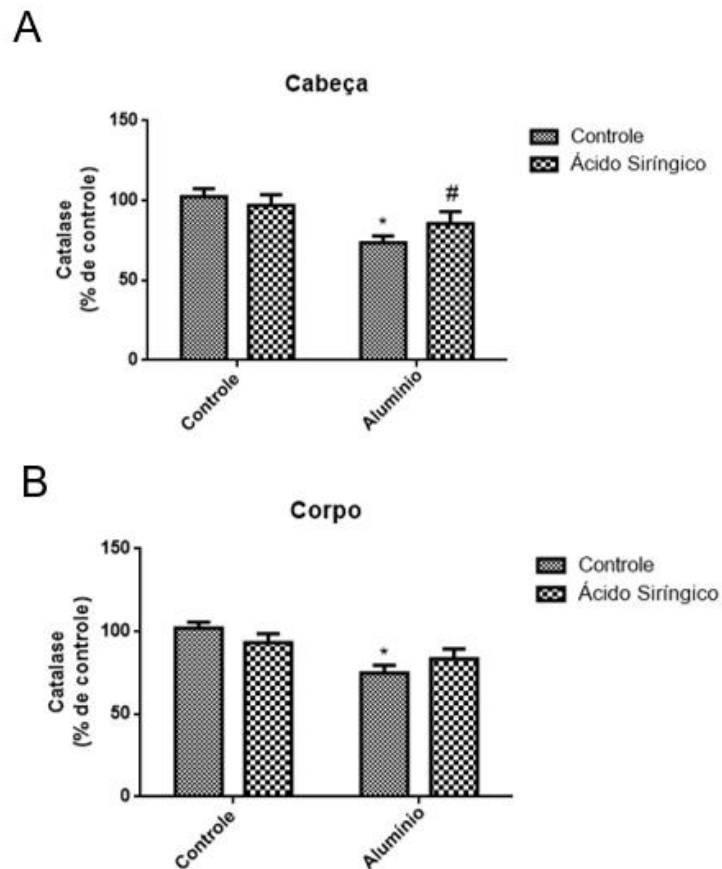


Figura 12. Alterações da atividade enzimática da catalase na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido síringico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Não houve interação significativa na atividade da SOD nos grupos tratados tanto na cabeça quanto no corpo das moscas (Figura 13).

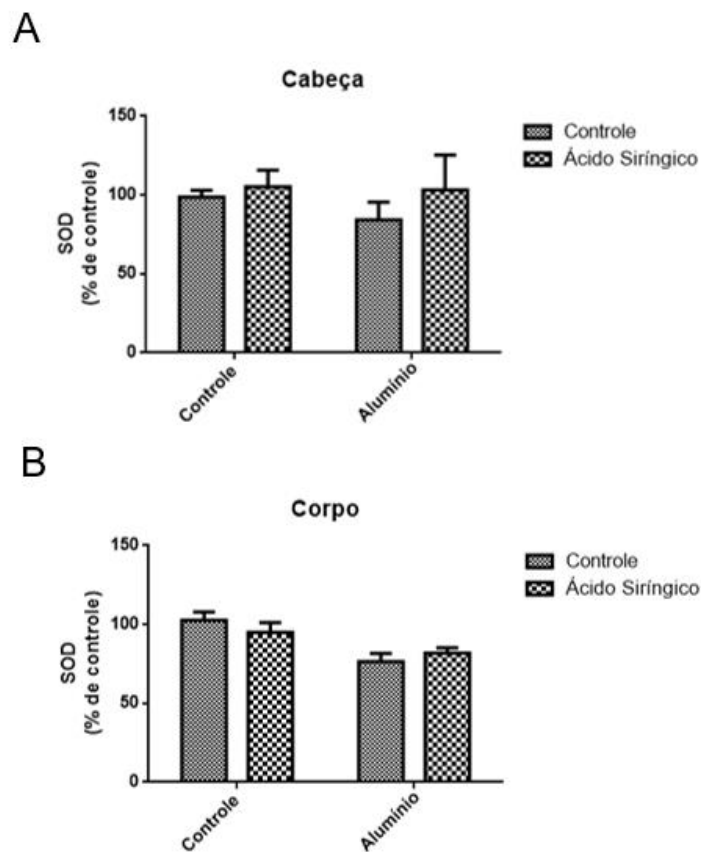


Figura 13. Atividade enzimática da superóxido dismutase na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido síringico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey e expressos em média \pm desvio padrão.

Na avaliação da atividade enzimática da acetilcolinesterase, os resultados mostram que a exposição ao Al reduz significativamente ($p < 0,05$) a atividade desta enzima na região da cabeça. Mais uma vez, o tratamento com ácido siríngico foi capaz de proteger significativamente a redução da atividade enzimática ($p < 0,05$). Para os resultados referentes à região do corpo não houve alterações significativas (Figura 14).

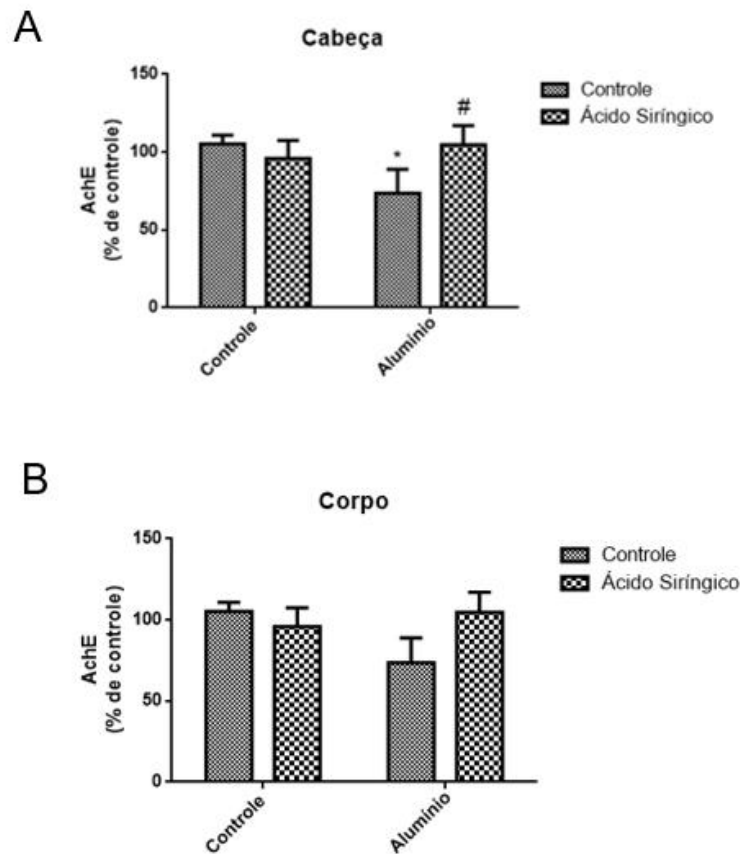


Figura 14. Alterações da atividade enzimática da acetilcolinesterase na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

Os resultados obtidos para o ensaio de MTT, que avalia a viabilidade celular, mostram que a exposição ao Al reduz significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular na região da cabeça e que o tratamento com ácido siríngico foi capaz de proteger significativamente ($p < 0,05$) esse efeito. Não foram encontrados resultados significativos para a região do corpo (Figuras 15).

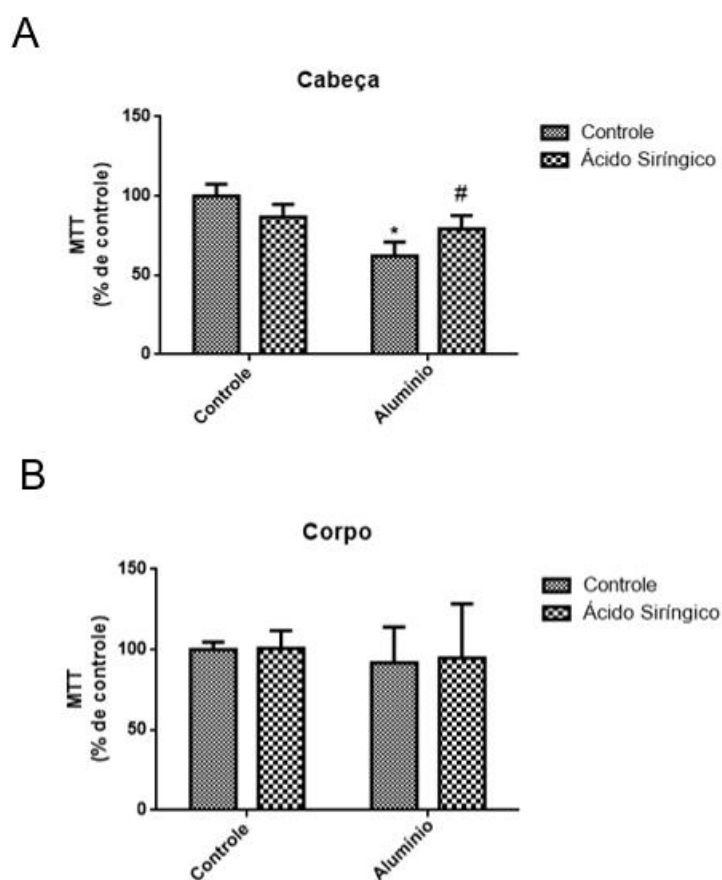


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT na cabeça (A) e no corpo (B) de *D. melanogaster* tratadas com ácido siríngico e expostas ao alumínio. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por *post hoc* de Tukey. $p < 0,05$ e expressos em média \pm desvio padrão. *Significativo comparado ao grupo controle; #Significativo comparado ao grupo alumínio.

11 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo mostram que o Al aumenta a mortalidade em *D. melanogaster*, além de reduzir sua atividade locomotora. Associado a isso, os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo se mostram alterados, com altos níveis de peroxidação lipídica e redução dos níveis de tióis nas regiões da cabeça e do corpo das moscas. A exposição ao Al também alterou atividades enzimáticas, reduziu a atividade da catalase nas regiões da cabeça e do corpo e da acetilcolinesterase na região da cabeça. Além disso, reduziu a viabilidade celular também na região da cabeça. Por sua vez, o tratamento com ácido siríngico protegeu as moscas dos efeitos tóxicos causados pelo Al, reduzindo a mortalidade e os danos locomotores. Também reduziu a peroxidação lipídica nas regiões da cabeça e do corpo e protegeu contra a depleção dos grupos tióis na região do corpo. Além disso, evitou que a atividade da catalase e da acetilcolinesterase fosse reduzida na região da cabeça, assim como protegeu da redução da viabilidade celular nessa região. Resumidamente, os resultados encontrados aqui podem ser visualizados, na forma esquemática, na Figura 16.

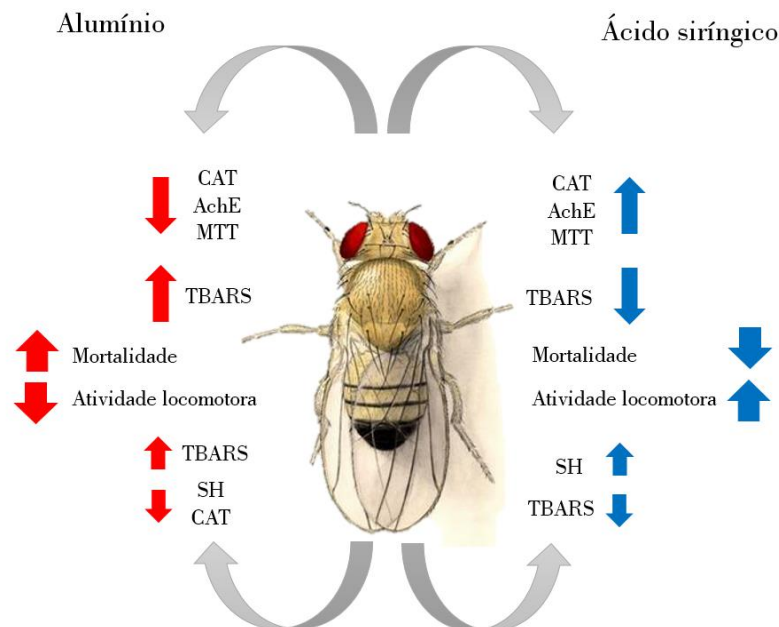


Figura 16. Figura esquemática representando o resumo dos resultados obtidos.

Há um consenso geral de que o Al provoca efeitos neurotóxicos, no entanto, os mecanismos pelos quais exerce tais efeitos ainda são controversos. Neste estudo, observamos que a exposição ao Al aumentou a mortalidade e reduziu a atividade locomotora das moscas tratadas. Similarmente, em um dos poucos estudos que utilizam a *D. melanogaster* como modelo para a avaliação de neurotoxicidade do Al, Wu (2012) descreveu que a exposição ao Al reduziu consideravelmente a longevidade das moscas e a sua habilidade de escalada em uma concentração média (5 mM) enquanto uma dose menor (2 mM) não apresentou alterações nesses parâmetros. O autor sugere que a toxicidade do Al se dá através da geração de EROs e desregulação homeostática do ferro, criando assim um ambiente altamente oxidativo. Kijak (2014) defende em seu estudo o uso da *D. melanogaster* como modelo para avaliar a toxicidade do Al e sua relação com o envelhecimento. Ao expor moscas de diversas idades a diferentes doses de Al, demonstrou que os efeitos apresentados são dependentes da idade, onde animais mais jovens apresentaram hiperatividade e animais mais velhos apresentaram declínio locomotor e alteração de seus ciclos diários. Além disso, demonstrou que o Al se acumula nos tecidos na razão da dose administrada. Outros modelos animais apresentam resultados semelhantes. Chamallamudi (2015), ao expor ratos Wistar ao Al por 60 dias (176mg/kg via oral), observou que os animais apresentaram alterações comportamentais acompanhada de danos cognitivos e disfunções bioquímicas nas regiões do hipocampo e córtex cerebral. Há diversos trabalhos que demonstram que a exposição ao Al causa déficits locomotores e cognitivos (Colomina, 2002).

No presente trabalho, a exposição ao Al aumentou os níveis de peroxidação lipídica tanto na cabeça quanto no corpo das moscas. Grande parte dos trabalhos envolvendo a toxicidade do Al encontrada na literatura indicam a presença da peroxidação lipídica. Lakshmi (2015) ao expor ratos a 100mg/kg por 21 dias, observou o aumento da peroxidação lipídica e o uso de antioxidantes já estabelecidos reduziram estes níveis. Semelhantemente, Khafaga (2017) utilizando a mesma dose de 100mg/kg/dia durante 8 semanas em ratos observou o aumento da peroxidação lipídica no cérebro desses animais.

Há consenso em dizer que a peroxidação lipídica é uma das principais causas do dano oxidativo e é utilizada como marcador da toxicidade do Al (Zakaria, 2017). Os efeitos tóxicos do Al no cérebro de mamíferos primeiramente afetam a membrana celular dos neurônios, que resulta na perda da fluidez e aumento da permeabilidade,

levando o neurônio à perda do potencial de membrana (Nalagoni, 2016). O aumento da peroxidação lipídica na cabeça das moscas pode estar associado a dano oxidativo e perda neuronal induzidos pela toxicidade do Al.

Quanto aos resultados das enzimas antioxidantes SOD e catalase nossos resultados mostram que não houveram alterações na atividade da SOD, no entanto, a atividade da catalase se mostrou significativamente reduzida no corpo e na cabeça das moscas. Em um estudo muito semelhante ao nosso Wu (2012) ao expor *D. melanogaster* a 5mM de cloreto de Al observou que há alterações na atividade da catalase, mas não da SOD. Da mesma forma, vários estudos mostram a redução da atividade da catalase após a exposição ao Al (Chamallamud, 2015; Eldemerdashi, 2004; Nalagoni, 2016).

As enzimas superóxido dismutase e catalase são os principais bloqueadores das espécies reativas geradas por agentes tóxicos (Nalagoni, 2016). Nossos resultados não mostram alterações na SOD, que é a enzima que faz a primeira linha de defesa antioxidante da célula, dismutando o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. No entanto, vimos a redução significativa da atividade da catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, na cabeça e no corpo das moscas expostas ao Al. Wu (2012) afirma em seu estudo que embora o Al provoque a produção superóxido, os danos primários causados não são causados por esse radical. De acordo com seus resultados, o aumento da expressão da catalase, sem alterações na SOD1 e/ou SOD2, é capaz de suprimir a toxicidade induzida pelo Al. Este autor teoriza, com base em seus resultados, que o Al interage com a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial gerando o radical superóxido, que é dismutado pela SOD a peróxido de hidrogênio. Por sua vez, o peróxido de hidrogênio, juntamente com o radical hidroxil, interage com o ferro gerando mais radicais a partir da reação de Fenton, formando um ciclo, levando ao aumento de espécies reativas e acúmulo de ferro, que reagem novamente, criando um ambiente altamente oxidante e levando a dano oxidativo (Figura 17).

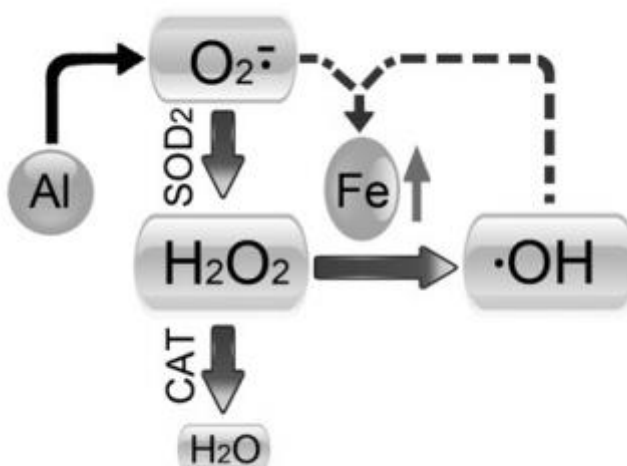


Figura 17. Modelo descrito por Wu (2012) para explicar a formação cíclica de espécies reativas geradas pela toxicidade do alumínio.

A exposição ao Al também reduziu os níveis de glutathiona reduzida (GSH) não proteica no corpo das moscas tratadas. Eldermedash (2004) demonstrou em seu estudo com ratos que a exposição ao Al reduz os níveis de grupos SH no plasma e em amostras de fígado, rins e cérebro dos animais tratados e que o uso de antioxidantes (vitamina E e selênio) evitam essa redução, decorrente do dano oxidativo. A glutathiona reduzida é a defesa antioxidante não enzimática mais abundante na célula e está diretamente envolvida na neutralização de radicais livres ou servindo como substrato para a enzima glutathiona peroxidase, que catalisa a detoxificação do peróxido de hidrogênio (Kumar, 2011). Tendo em vista que a redução de GSH no corpo das moscas ocorre paralelamente a redução da catalase e aumento da peroxidação lipídica, podemos sugerir que estes eventos estão intimamente relacionados, pois as defesas antioxidantes se mostram reduzidas permitindo assim a oxidação das membranas pelas espécies reativas. Outro resultado importante correlacionado a estes eventos é de que o pré-tratamento com ácido siríngico reduziu os níveis de TBARS e aumentou os de SH na região do corpo, sem prevenir a redução da catalase. Assim, podemos inferir que o ácido siríngico, por sua ação antioxidante, protegeu a depleção dos níveis de SH, a assim protegeu contra a peroxidação lipídica, apesar da atividade da catalase.

Os resultados para a avaliação da AChE mostram sua atividade reduzida na cabeça das moscas. Yellama (2010) demonstrou em seu estudo com ratos que a administração oral de Al afeta o sistema colinérgico em diversas regiões do cérebro

associado a distúrbios comportamentais, com reduzida atividade locomotora. Resultados semelhantes foram encontrados em outros diversos estudos independentemente da forma de administração (Chamallamudi, 2015). A AChE é sugerida como um marcador sensível para a toxicidade de xenobióticos e metais (Frasco, 2005).

Há um grande corpo de evidências que demonstram que a atividade colinérgica é necessária para aquisição e recuperação de várias habilidades de aprendizagem. Muitos trabalhos reforçam que a disfunção colinérgica no sistema nervoso central está correlacionada com desempenho prejudicado em várias tarefas cognitivas, enquanto a melhora no desempenho é associada ao aumento da função colinérgica. Estudos anteriores mostram que diferentes formas de exposição ao Al causam redução acentuada da atividade da AChE e detrimento de funções cognitivas em ratos (Sharma, 2013).

A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina e sua função é vital para o desempenho de funções cognitivas. Sua atividade é influenciada por alterações na membrana lipídica, o que a torna vulnerável ao estresse oxidativo (Xu, 2017). Estudos demonstram que a redução da catalase por ação tóxica de metais induzem alterações de potencial de membrana na célula e que esta pode ser a razão pela qual a atividade da AChE se apresenta reduzida nestes casos (Ani, 2006). Segundo Borai (2017) o Al além de colinotóxico provoca alterações funcionais nos sistemas colinérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.

Nossos resultados mostram a redução na viabilidade celular na região da cabeça das moscas expostas ao Al. Estudos conduzidos *in vitro* com células neuronais mostram que a exposição do alumínio reduz a viabilidade celular devido ao dano oxidativo resultante do aumento de EROs. Além disso, mostram a correlação entre a agregação proteica, similar à que ocorre em doenças neurodegenerativas, e a toxicidade induzida pelo Al nesse tipo celular (Saberzadeh 2016a; 2016b). Outros trabalhos *in vitro* apresentam resultados semelhantes para a toxicidade do Al em osteoblastos (Zhu, 2016b) e células epiteliais do intestino (Djouina, 2016), demonstrando que a toxicidade do Al via estresse oxidativo acontece da mesma forma nos demais tecidos. Trabalhos *in vivo* utilizando reconhecidos agentes neurotóxicos como rotenona (Sudati, 2013, Araújo, 2015) mostram que há a redução da viabilidade celular via estresse oxidativo e que o tratamento com agentes antioxidantes se mostra eficiente em reduzir este tipo de dano oxidativo em moscas.

O ácido siríngico é um flavonóide de ocorrência natural e tem sido associado a efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hepatoprotetor, além de apresentar efeitos neuroprotetores causados por MPTP (Itoh, 2009; 2010; Karthik, 2014; Rekha, 2014). No entanto, são raros os estudos que exploram os efeitos benéficos deste flavonóide.

Nossos dados mostram que o tratamento com ácido siríngico é eficaz contra os efeitos tóxicos causados pela exposição ao Al. Além disso, a melhora significativa nas avaliações de mortalidade, atividade locomotora e a melhora em parâmetros de estresse oxidativo e atividade de enzimas catalase e AChE na região da cabeça, indicam que seus efeitos podem ser neuroprotetores.

Em um estudo utilizando outro composto fenólico, o resveratrol, Nalagani (2016) mostra seus efeitos neuroprotetores em ratos tratados com Al, reduzindo a peroxidação lipídica e restaurando a atividade da catalase e da SOD. Tais resultados são atribuídos ao papel antioxidante desempenhado pelo resveratrol na inibição de radicais livres. Sharma (2013) realizando um pré-tratamento com quercetina em ratos que foram posteriormente expostos ao Al, demonstrou que o pré-tratamento com este polifenol reduziu o estresse oxidativo, a formação de EROs, a peroxidação lipídica, assim como aumentou os níveis de glutathiona e protegeu contra a redução da atividade da AChE, além de melhorar a atividade locomotora e reduzir o acúmulo de Al no cérebro, demonstrando poderosa ação neuroprotetora.

Já é bem documentado na literatura que compostos fenólicos exercem ação neuroprotetora, agindo contra neurotoxinas, inflamação e promovendo a melhora da memória e danos cognitivos e locomotores (Vauzour, 2008). Tendo em vista os efeitos tóxicos do Al e a necessidade de alternativas terapêuticas, o ácido siríngico se mostra promissor candidato, tendo em vista sua capacidade antioxidante já relatada na literatura e os resultados aqui apresentados.

12 CONCLUSÕES

Como apresentado, o ácido siríngico mostrou significativo efeito protetor contra:

- O aumento da mortalidade causada pela exposição ao Al;
- A perda da atividade locomotora - no teste de geotaxia negativa - no grupo tratado com Al;
- O aumento da peroxidação lipídica tanto na cabeça quanto no corpo das moscas e níveis de grupos –SH das moscas tratadas,
- A redução da atividade da enzima catalase, tanto na região da cabeça quanto na região do corpo, das moscas tratadas;
- A redução da atividade a enzima AChE na região da cabeça de moscas tratadas com Al,
- A redução da viabilidade celular na região da cabeça das moscas expostas ao Al.

O conjunto de resultados demonstram o efeito protetor do ácido siríngico frente aos danos causados em *D. melanogaster* expostas ao Al, principalmente na região da cabeça, sugerindo atuação neuroprotetora deste ácido fenólico. No entanto, mais investigações são necessárias para compreender tanto os mecanismos de toxicidade do Al, quanto a ação protetora do ácido siríngico.

13 PERSPECTIVAS

Para a continuidade do trabalho, pretende-se realizar mais testes que nos levem a uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da toxicidade do Al e o efeito protetor do ácido siríngico. Dentre os quais destacam-se:

- Dosagem de Al nas moscas expostas e tratadas com ácido siríngico, por absorção atômica;
- Dosagem de dopamina na cabeça das moscas, por CLAE;
- Dosar a expressão e quantificação das enzimas CAT, SOD e AChE, por RT-PCR e western blot, respectivamente,
- Avaliar se há perda de neurônios dopaminérgicos utilizando linhagens mutantes.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, 1984. v. 105, n. 1947, p. 121–126. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>>.
- ANI, M.; MOSHTAGHIE, A. A.; AGHADAVOOD, M. Protective effects of selenium and zinc on the brain acetyl cholinesterase activity in lead intoxicated rat. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 2006. v. 2, p. 80–84.
- ARAUJO, S. M. *et al.* Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **NeuroToxicology**, 2015. v. 51, p. 96–105. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.09.003>>.
- BIANCHINI, M. C. *et al.* *Peumus boldus* (Boldo) Aqueous Extract Present Better Protective Effect than Boldine Against Manganese-Induced Toxicity in *D. melanogaster*. **Neurochemical Research**, 2016. v. 41, n. 10, p. 2699–2707. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-016-1984-z>>.
- BONDY, S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **NeuroToxicology**, 2010. v. 31, n. 5, p. 575–581. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.009>>.
- _____. Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration. **Toxicology**, 2014. v. 315, n. 1, p. 1–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.10.008>>.
- BORAI, I. H. *et al.* Therapeutic impact of grape leaves polyphenols on certain biochemical and neurological markers in A β 1-3-induced Alzheimer's disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017. v. 93, p. 837–851. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.038>>.
- CALAP-QUINTANA, P. *et al.* *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017. v. 18, n. 7.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 2013. v. 51, n. 1, p. 15–25.
- CHAMALLAMUDI, M. *et al.* Sesamol, a lipid lowering agent, ameliorates aluminium chloride induced behavioral and biochemical alterations in rats. **Pharmacognosy Magazine**, 2015. v. 11, n. 42, p. 327. Disponível em: <<http://www.phcog.com/text.asp?2015/11/42/327/153086>>.
- COLOMINA, M. T. *et al.* Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. **NeuroToxicology**, 2002. v. 23, n. 6, p. 775–781.
- DJOUINA, M. *et al.* Toxicological consequences of experimental exposure to

aluminum in human intestinal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2016. v. 91, p. 108–116. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.008>>.

EL-BAHR, S.M. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. **Science International**, 2013. v. 1 (5) p. 111-117.

EL-DEMERDASH, F. M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2004. v. 18, n. 1, p. 113–121.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulphydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1959. v.82 p. 70–77.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 1961. v. 7, n. 2, p. 88–95. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>>.

FEANY, M. B.; BENDER, W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease. **Nature**, 2000. v. 404, n. 6776, p. 394–398. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/35006074>>.

FRASCO, M. F. *et al.* Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, 2005. v. 10, n. 5, p. 360–375. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13547500500264660>>.

GUIMARÃES, C. M. *et al.* Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. **Journal of food science**, 2007. v. 72, n. 1, p. 39–43.

GURA, K. M. Aluminum contamination in products used in parenteral nutrition: Has anything changed? **Nutrition**, 2010. v. 26, n. 6, p. 585–594. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.10.015>>.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, 1992. v. 59, n. 5, p. 1609–1623.

_____. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, 2006. v. 97, n. 6, p. 1634–1658.

_____. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical society Transactions**, 2007. v. 35 p. 1147-1150.

HIRTH, F. Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders -Drug Targets**, 2010. v. 9, p. 504–523.

ITOH, A.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; WATARI, A.; KOBAYASHI, M.; TAMESADA, M.; YAGI, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2010. v. 33, n. 6, p. 983–987.

_____; _____; _____; _____; _____; _____; _____; YAGE, K. Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄ - Induced Liver Injury. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2010. v. 33, n. 6, p. 983–987.

KARTHIK, G. *et al.* Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of

VEGF in zebrafish embryos. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, 2014. v. 4, n. 2, p. 203–208. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bionut.2014.01.007>>.

KHAFAGA, A. F. Exogenous phosphatidylcholine supplementation retrieve aluminum-induced toxicity in male albino rats. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017. v. 24, n. 18, p. 15589–15598.

KIJAK, E. *et al.* Drosophila melanogaster as a model system of aluminum toxicity and aging. **Insect Science**, 2014. v. 21, n. 2, p. 189–202.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochemistry international**, 1989. v. 19, n. 5, p. 1117–24.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; DOGRA, S. Neuroprotective effect of carvedilol against aluminium induced toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. **Pharmacological Reports**, 2011. v. 63, n. 4, p. 915–923.

KUMAR, V.; BAL, A.; GILL, K. D. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. **Brain Research**, 2008. v. 1232, p. 94–103.

_____; _____. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. **Toxicology**, 2009. v. 255, n. 3, p. 117–123.

_____; GILL, K. D. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. **NeuroToxicology**, 2014. v. 41, p. 154–166. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.02.004>>.

LAKSHMI, B. V. S.; SUDHAKAR, M.; PRAKASH, K. S. Protective Effect of Selenium Against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Alterations in Rats. **Biological Trace Element Research**, 2015. v. 165, n. 1, p. 67–74.

MUTHUKUMARAN, J. *et al.* Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. **Journal of Acute Disease**, 2013. v. 2, n. 4, p. 304–309. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221618913601493>>.

NALAGONI, C. S. R.; KARNATI, P. R. Original article. Protective effect of resveratrol against neuronal damage through oxidative stress in cerebral hemisphere of aluminum and fluoride treated rats. **Interdisciplinary Toxicology**, 2016. v. 9, n. 2, p. 78–82. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/intox.2016.9.issue-2/intox-2016-0009/intox-2016-0009.xml>>.

NICHOLS, C. D. Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, 2006. v. 112, n. 3, p. 677–700.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 1979. v. 95, n. 2, p. 351–358.

PAULA, M. T. *et al.* Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in D. melanogaster. **Environmental Toxicology**, 2012. Disponível em: DOI 10.1002/tox.21788.

PAULA, M. T. *et al.* Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and

antioxidant system in *D. melanogaster*. *Environmental Toxicology*, 2012. Disponível em: DOI 10.1002/tox.21788.

PETERSON, E. K. *et al.* Accumulation, elimination, sequestration, and genetic variation of lead (Pb²⁺) loads within and between generations of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, 2017. v. 181, p. 368–375. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.091>>.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science : IJBS**, 2008. v. 4, n. 2, p. 89–96. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

RAND, M. D. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, 2010. v. 32, n. 1, p. 74–83. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.06.004>>.

REKHA, K. R.; SELVAKUMAR, G. P.; SIVAKAMASUNDARI, R. I. Effects of syringic acid on chronic MPTP/probenecid induced motor dysfunction, dopaminergic markers expression and neuroinflammation in C57BL/6 mice. **Biomedicine and Aging Pathology**, 2014. v. 4, n. 2, p. 95–104. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomag.2014.02.004>>.

SABERZADEH, J.; ARABSOLGHAR, R.; TAKHSHID, M. A. Alpha synuclein protein is involved in Aluminum-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. **Brain Research**, 2016. v. 1635, p. 153–160. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.037>>.

_____; OMRANI, M.; TAKHSHID, M. A. Protective effects of nimodipine and lithium against aluminum-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 2016. v. 19, n. 11, p. 1251–1257.

SHARMA, D. R.; SUNKARIA, A.; *et al.* Aluminium induced oxidative stress results in decreased mitochondrial biogenesis via modulation of PGC-1 α expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2013. v. 273, n. 2, p. 365–380. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.012>>.

_____; WANI, W. Y.; *et al.* Quercetin protects against chronic aluminum-induced oxidative stress and ensuing biochemical, cholinergic, and neurobehavioral impairments in rats. **Neurotoxicity Research**, 2013. v. 23, n. 4, p. 336–357.

SPENCER, J. P. E. Flavonoids and brain health: Multiple effects underpinned by common mechanisms. **Genes and Nutrition**, 2009. v. 4, n. 4, p. 243–250.

SRINIVASAN, S. *et al.* Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, 2014. v. 4, n. 4, p. 595–602. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bionut.2014.07.010>>.

SUDATI, J. H. *et al.* Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **NeuroToxicology**, 2013. v. 37, p. 118–126.

SUN, A. Y. *et al.* Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, 2010. v. 41, n. 2–3, p. 375–383.

VAUZOUR, D. *et al.* The neuroprotective potential of flavonoids: A multiplicity of effects. **Genes and Nutrition**, 2008. v. 3, n. 3–4, p. 115–126.

WALTON, J. R. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. **NeuroToxicology**, 2006. v. 27, n. 3, p. 385–394.

WANG, Z. *et al.* Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience Letters**, 2016. v. 610, p. 200–206.

WEI, X. *et al.* Syringic acid extracted from *Herba dendrobii* prevents diabetic cataract pathogenesis by inhibiting aldose reductase activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. v. 2012.

WU, Z. *et al.* Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. **Neurobiology of Aging**, 2012. v. 33, n. 1, p. 1–12.

XU, P. *et al.* The Protective Effect of Lavender Essential Oil and Its Main Component Linalool against the Cognitive Deficits Induced by D-Galactose and Aluminum Trichloride in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2017. v. 2017.

YELLAMMA, K.; SARASWATHAMMA, S.; KUMARI, B. N. Cholinergic system under aluminium toxicity in rat brain. **Toxicology international**, 2010. v. 17, n. 2, p. 106–112.

ZAKARIA, M.M.H. *et al.* Anti-oxidative effect of resveratrol on aluminum induced toxicity in rat cerebral tissue. **Bratislava Medical Journal**, 2017. 118 (5) 269-272.

ZHU, Y. *et al.* Ginsenoside Rb1 alleviates aluminum chloride-induced rat osteoblasts dysfunction. **Toxicology**, 2016. v. 368–369, p. 183–188. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.014>>.

ZHU, Z. J. *et al.* Differential interaction between iron and mutant alpha synuclein causes distinctive Parkinsonian phenotypes in *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2016. v. 1862, n. 4, p. 518–525.