



Encontro
Científico
Brasil - Colômbia

Avaliação do potencial neurotóxico e reprodutivo do extrato etanólico de *Erythroxylum coca* em *Drosophila melanogaster*: uma abordagem in vivo e in silico

Autor

Xavier Clemente García Cevallos

Orientador:

Willian Orlando Castillo Ordóñez, PhD

Co-Orientador:

Nohelia Cajas Salazar, PhD



Projeto de Graduação

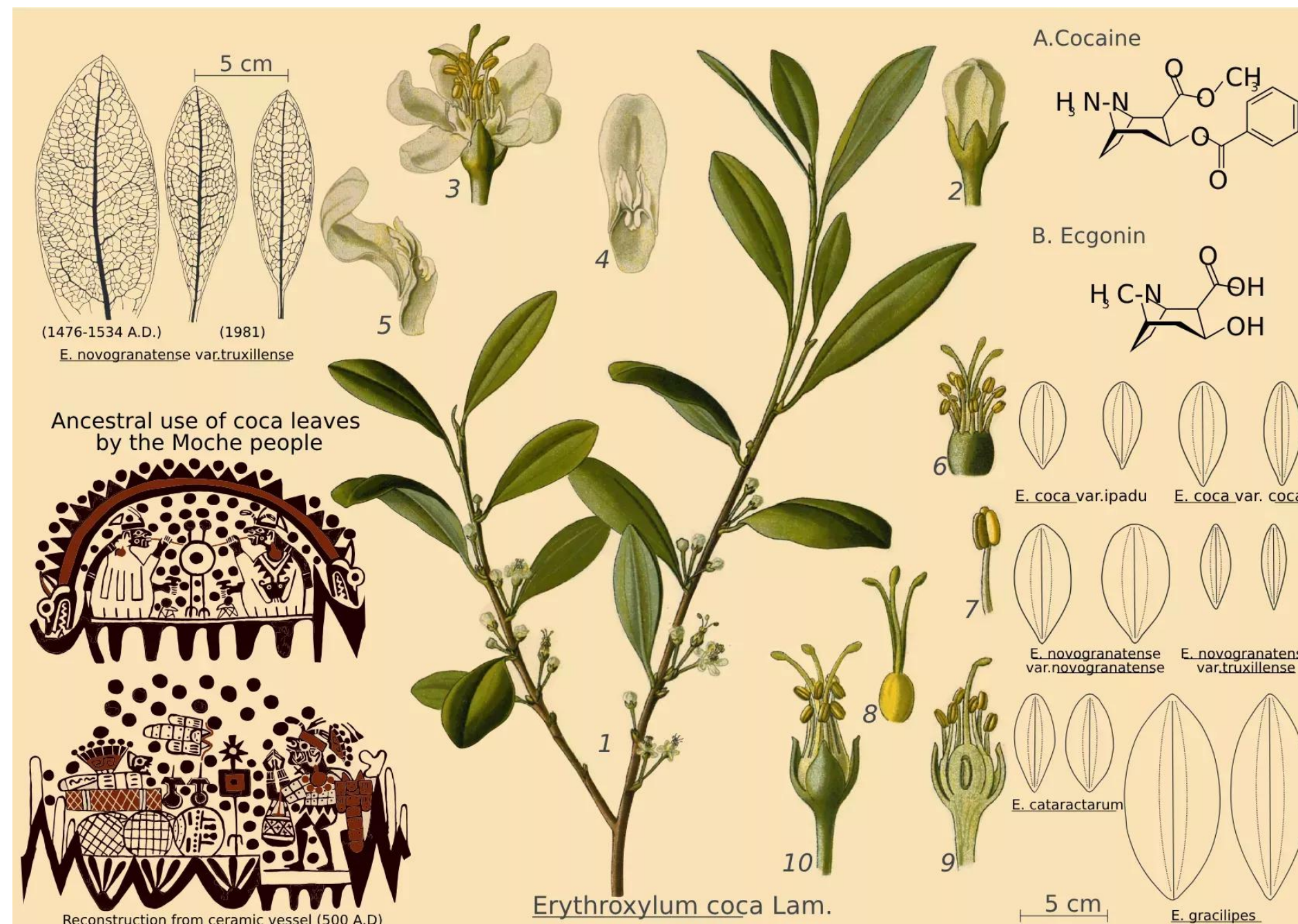
Grupo de Pesquisa em Microscopia e Análise de Imagens (GIMAI), Base de pesquisa para biologia do desenvolvimento e plasticidade neural, Universidade do Cauca

Introdução

Aspectos botânicos



Encontro Científico
Brasil - Colômbia



- ✓ Familia Erythroxylaceae
- ✓ Género *Erythroxylum*
- ✓ 250 espécies reconhecidas

Introdução



Encontro
Científico
Brasil - Colômbia

Distribuição do género *Erythroxylum*



Erythroxylum coca é relatada há mais de 8.000 anos na América do Sul



Na Colômbia existem três espécies distribuídas :

- *E. coca*,
- *E. coca var. coca*
- *E. novogranatense var. novogranatense*

Justificativa

Etnobotânica e farmacognosia



Encontro Científico
Brasil - Colômbia

Diminuição da fome e do frio. Diminuição da homeostase da glicose.



Chá de coca



Doenças gastrointestinais

Alivia dores de cabeça, dores de estômago, cólicas intestinais, náuseas, indigestão, diarreia



Cerimônias

Justificativa



Encontro
Científico
Brasil - Colômbia

Daina, A., *et al* (2017).

Taquicardia, hipertensão arterial, tremores, vasoconstrição, euforia, psicose, alucinações e paranoias.

Edema pulmonar, hemorragias alveolares, fibrose, taquipneia, acidose metabólica, hiperventilação, risco de infecções pulmonares

Exencefalia, microcefalia, redução de membros, parto anormal e prematura, aborto, descolocamento de placenta, teratógenos

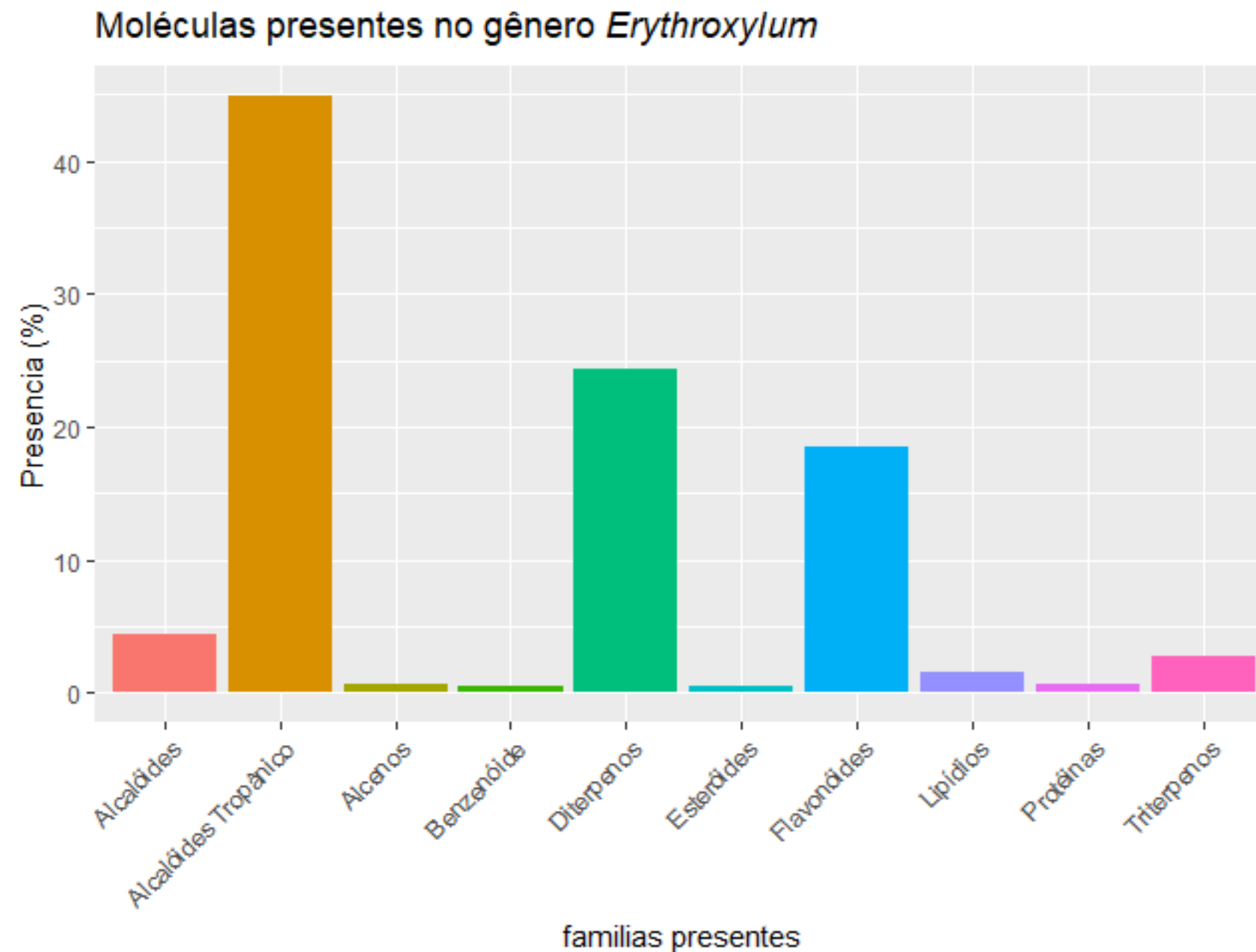
Efeitos Toxicológicos descritos

Justificativa

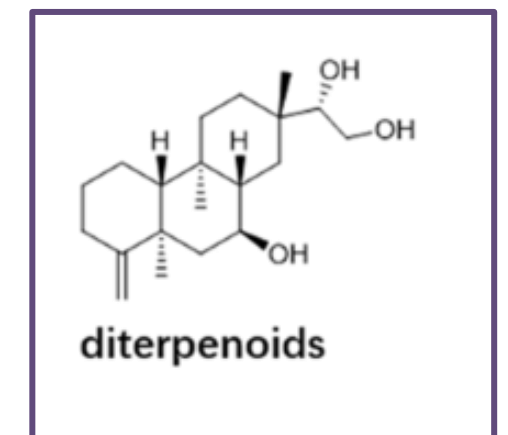
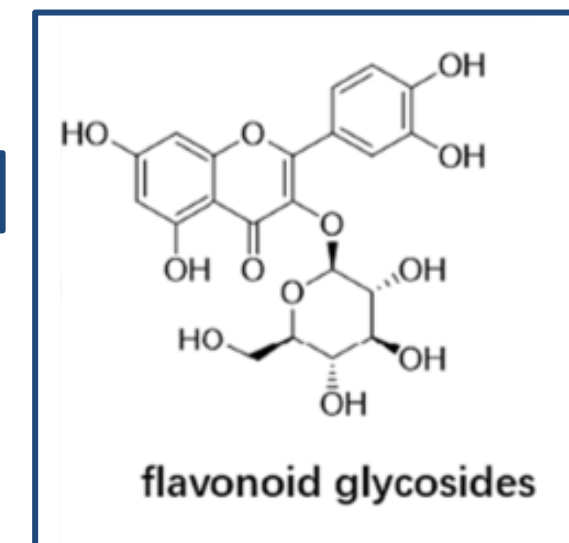
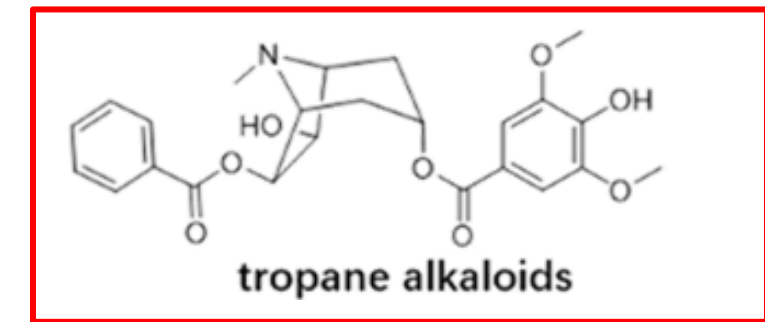
Embora existam outras espécies do gênero que possuem informações e atividade medicinal, os usos da *E. coca* são etnobotânicos ou hipotéticos.



Encontro Científico
Brasil - Colômbia



- Familias
- Alcalóides
 - Alcalóides Tropânico
 - Alcenos
 - Benzenóide
 - Diterpenos
 - Esteróides
 - Flavonóides
 - Lipídios
 - Protéinas
 - Triterpenos

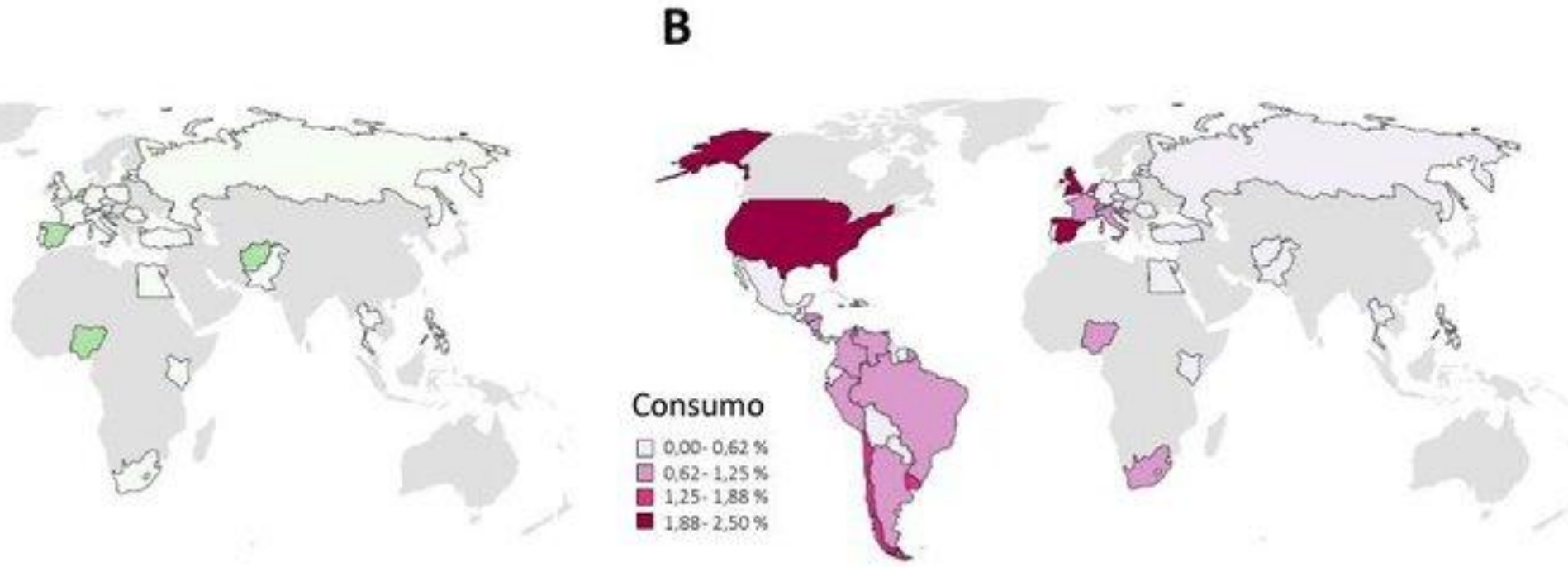


Os estudos disponíveis foram baseados no composto isolado "cocaína", portanto os efeitos combinados da folha não são conhecidos em nível toxicológico ou medicinal

Justificativa

Como es lá produção , consumo y comercio ilegal

A estigmatização e as políticas governamentais por narcotráfico têm sido uma das principais limitações na pesquisa sobre propriedades farmacológicas e toxicológicas.



Aumento de 53% nas plantações ilícitas de coca na Colômbia, correspondentes a 2.600 toneladas em 2023

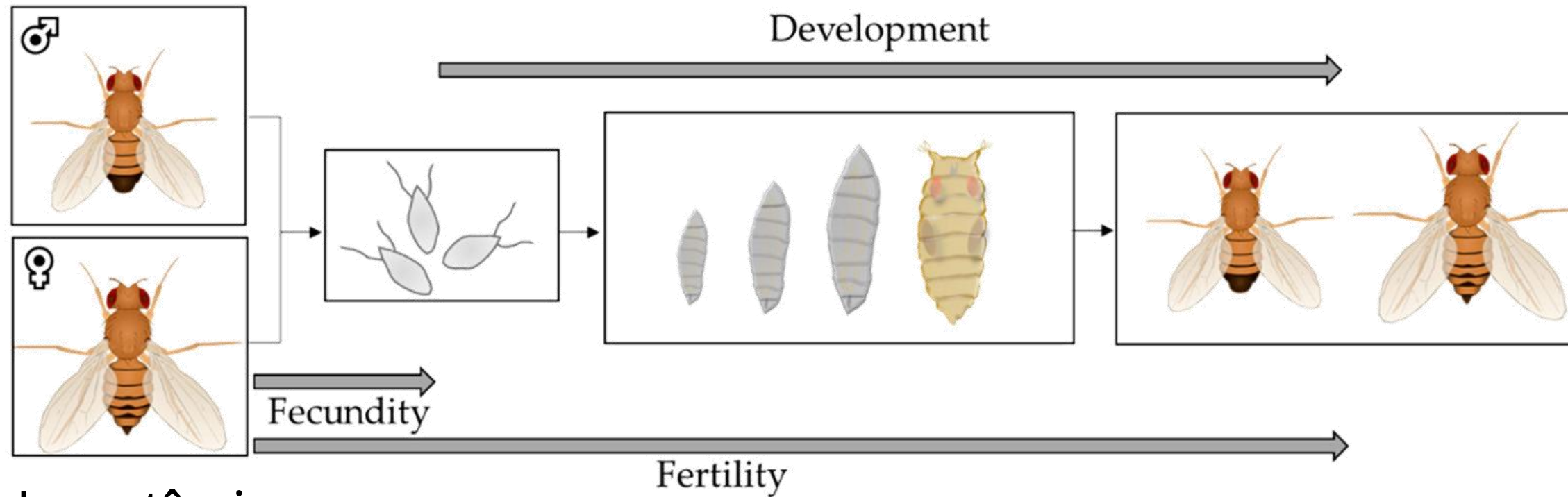
Justificativa

Drosophila melanogaster é útil devido à ampla disponibilidade de ensaios e aplicações relacionadas à neurociência e biologia do desenvolvimento.



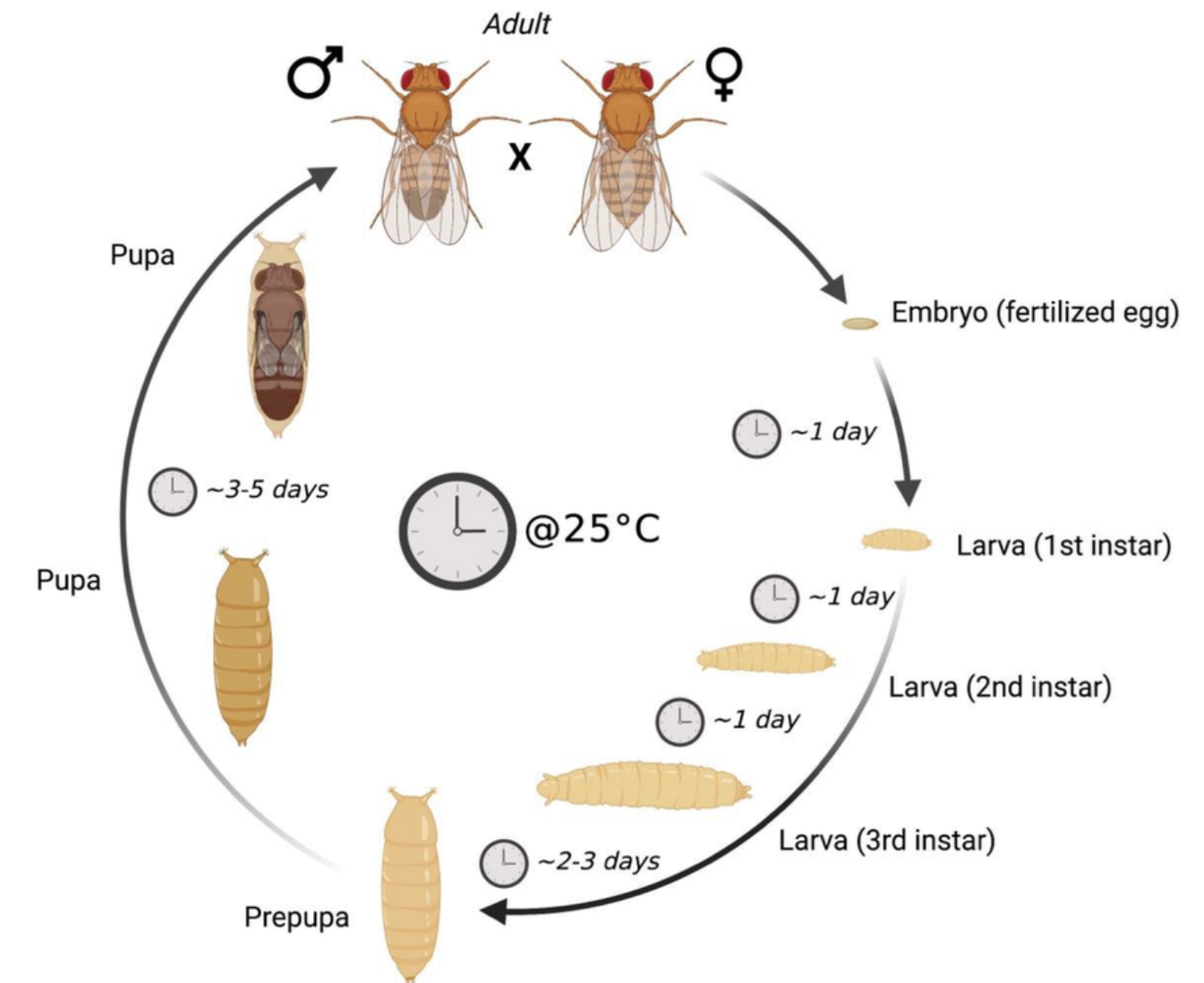
Encontro Científico
Brasil - Colômbia

Daina, A., et al (2017).



Importância

- Baixo custo
- Alta disponibilidade de cepas transgênicas específicas
- Homologia genética de aproximadamente 70% os humano
- Crescimento rápido
- Ampla disponibilidade de testes



Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Erythroxylum coca* sobre parâmetros neurotóxicos e reprodutivos em *Drosophila melanogaster*

Objetivos específicos

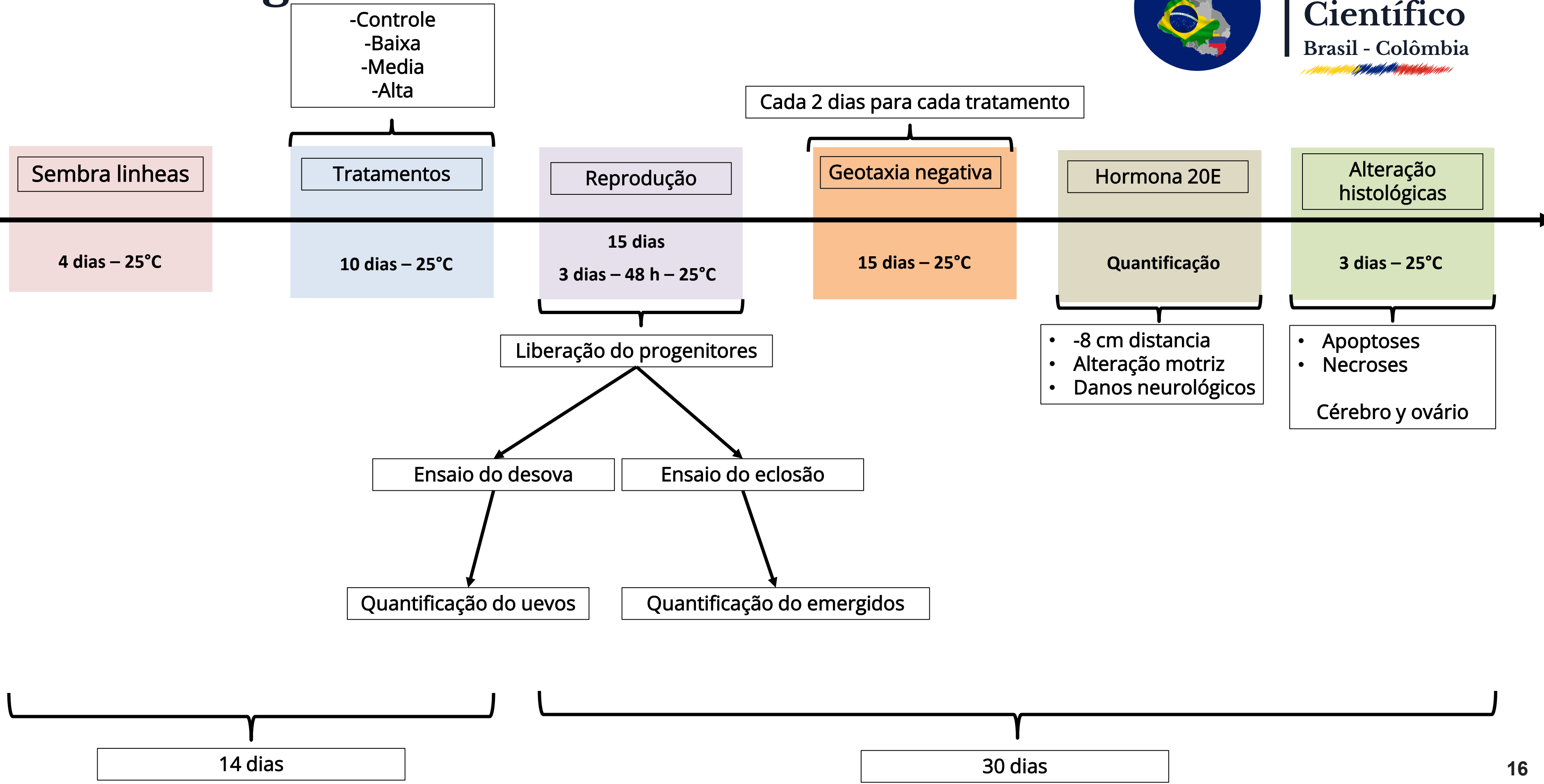
- Descrever os efeitos neurotóxicos em *Drosophila melanogaster* induzidos pela exposição ao extrato etanólico de *Erythroxylum coca*.
- Caracterizar as alterações histológicas em *Drosophila melanogaster* exposta ao extrato etanólico de *Erythroxylum coca*.
- Quantificar a atividade hormonal da 20-hidroxiecdisona (20E) em *Drosophila melanogaster* como um indicador de possíveis efeitos moduladores devido à exposição ao extrato de *Erythroxylum coca*.
- Analisar in silico a viabilidade terapêutica dos metabólitos presentes em *Erythroxylum coca*.



Metodologia



Encontro Científico
Brasil - Colômbia



Teste de desova (capacidade de produção de uevos)

Se transferem mosca a caixas Petri com médio de cultura do agar-agar contrastante para lá visualização do uevos.



Encontro Científico
Brasil - Colômbia



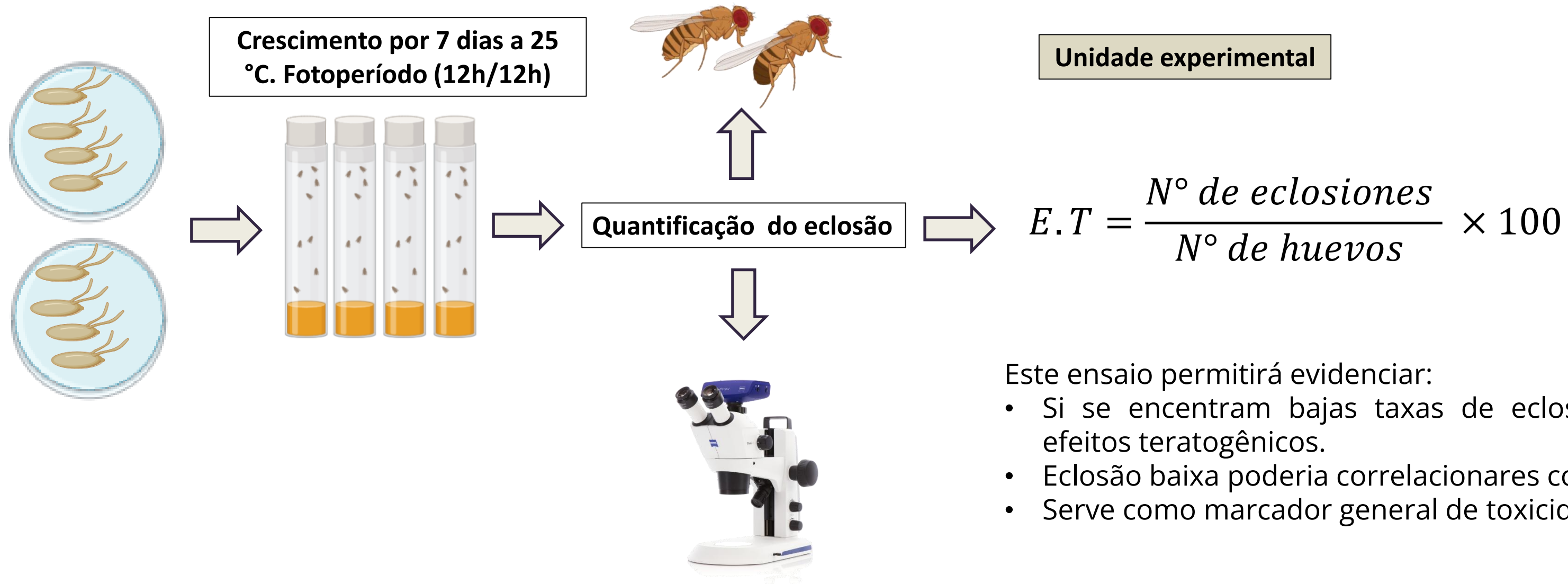
Este ensaio permitirá evidenciar:

- Câmbios em ele numero do uevos

Maneira indireta:

- Alterações no meio de incubação devido à toxicidade do tratamento.

Teste de eclosão



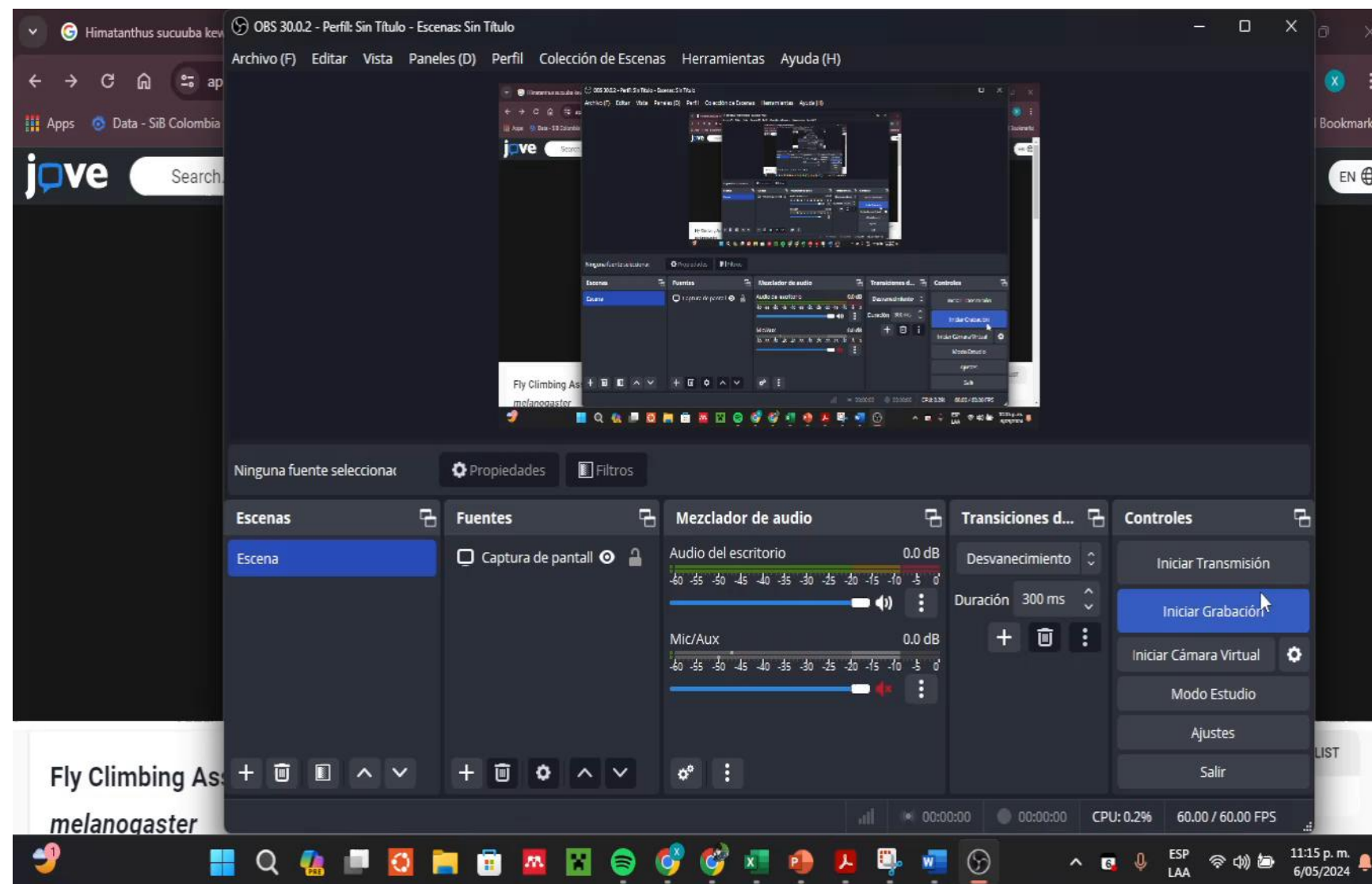
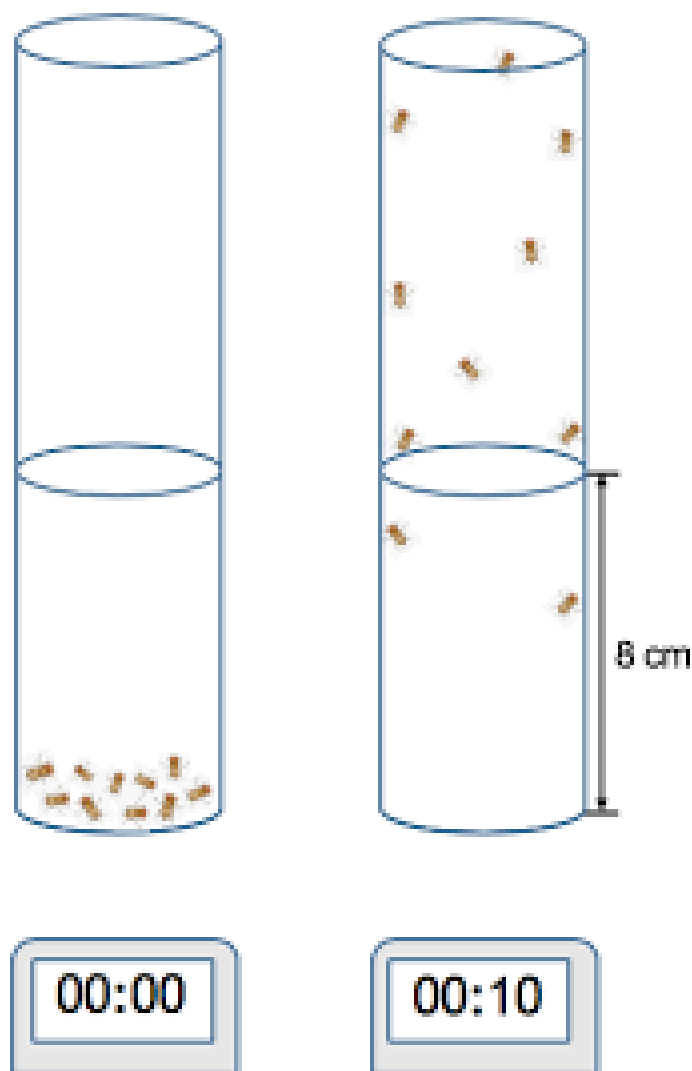
Este ensaio permitirá evidenciar:

- Si se encuentran bajas taxas de eclosão se poderia sugerir efeitos teratogênicos.
- Eclosão baixa poderia correlacionares com descenso em lá 20E.
- Serve como marcador general de toxicidade do extrato.

Ensaio de geotaxia negativo ou escalada com mosca



Encontro Científico
Brasil - Colômbia



¿Que se determina?

- % do moscas que passam 8 cm em 10 segundos.
- Tempo médio em alcançar essa altura

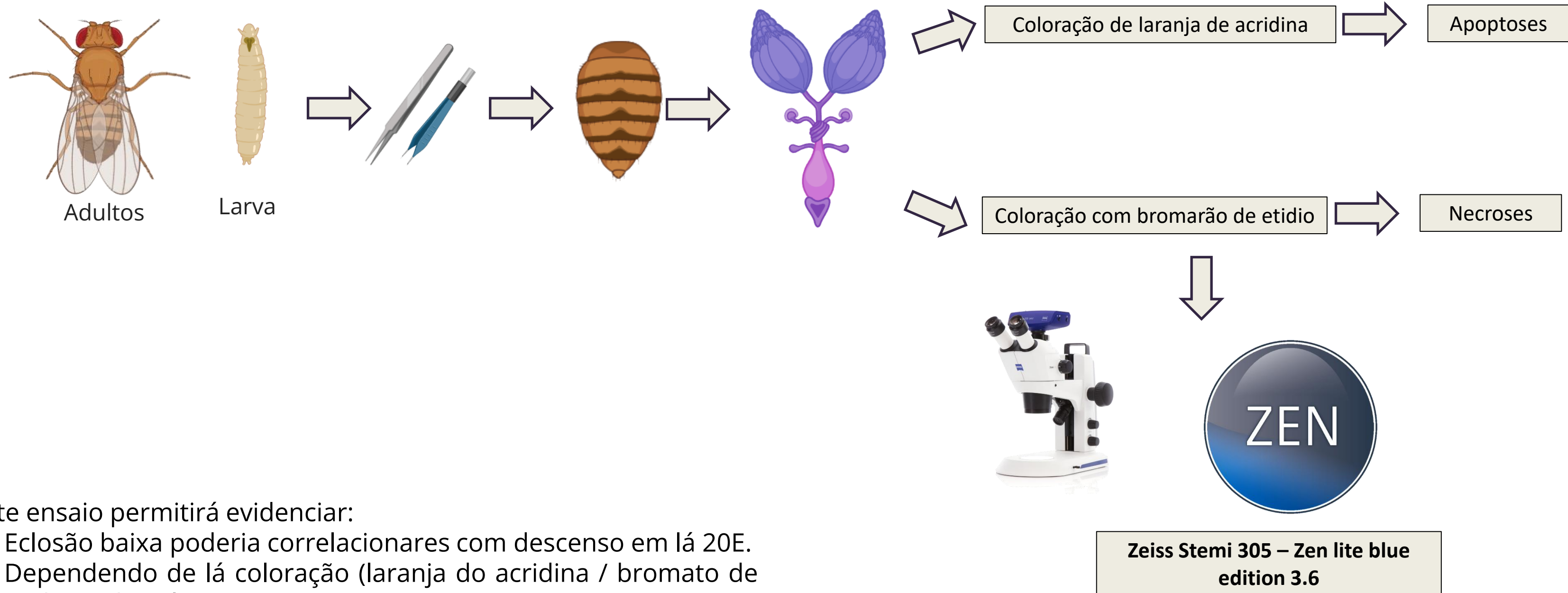
Al ser um ensaio de conduta serve para lá avaliação de capacidade motora y neuromuscular, funcionalidade adequada do sistema dopaminérgico, estresse oxidativo, alteração hormonal o acumulação de danos celulares de forma indireta.

Identificação e descrição de alterações histológicas



Encontro Científico
Brasil - Colômbia

Dissecção do ovários

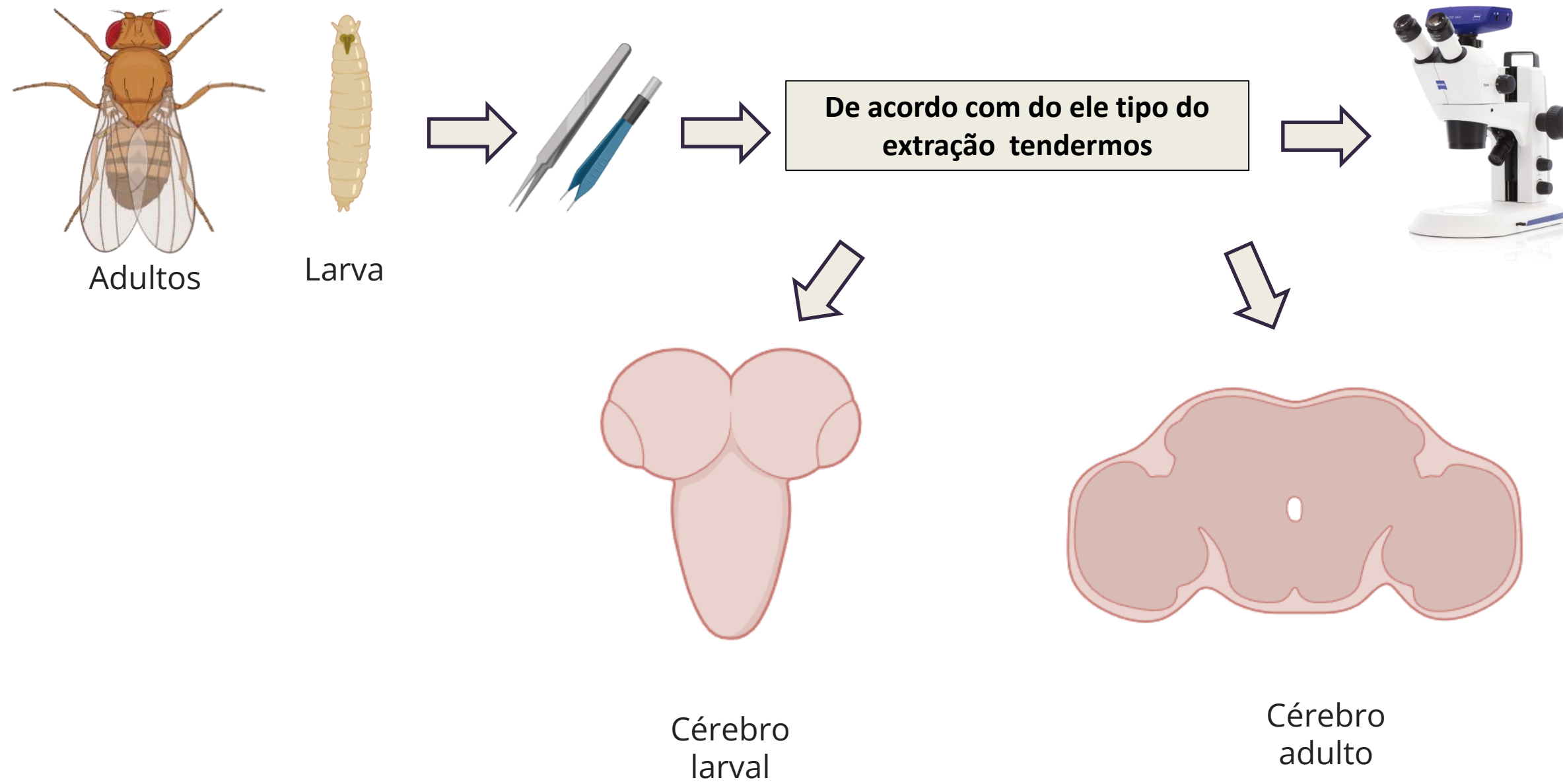


Este ensaio permitirá evidenciar:

- Eclusão baixa poderia correlacionares com descenso em lá 20E.
- Dependendo de lá coloração (laranja do acridina / bromato de etidio) indicará apoptoses o necroses.

Identificação e descrição de alterações histológicas

Dissecção do cérebro



Encontro Científico
Brasil - Colômbia

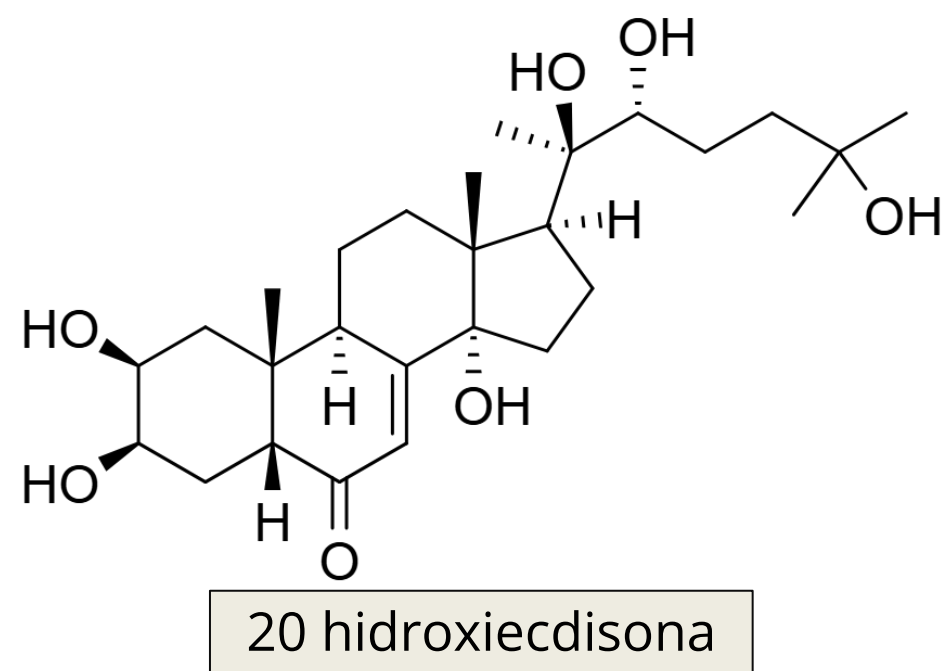


Zeiss Stemi 305 – Zen lite blue edition 3.6

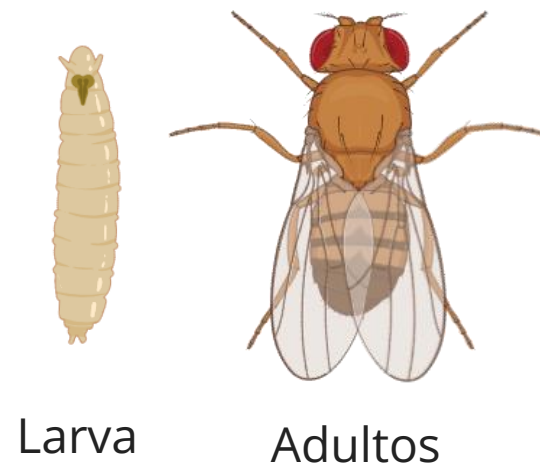
Teste de quantificação do a atividade hormonal da 20-hidroxicdisona (20E)



Encontro Científico
Brasil - Colômbia

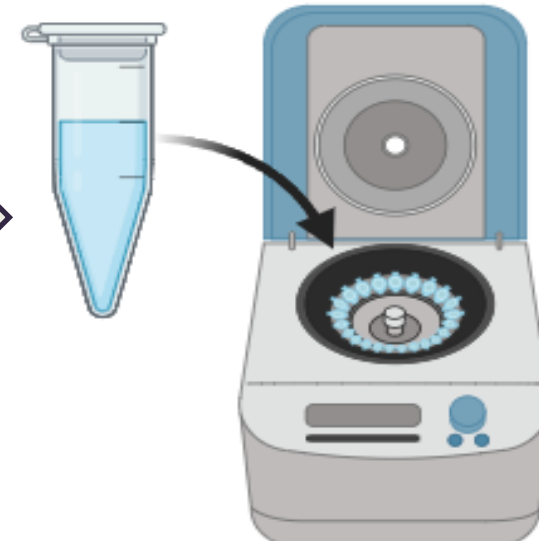


Recolecção

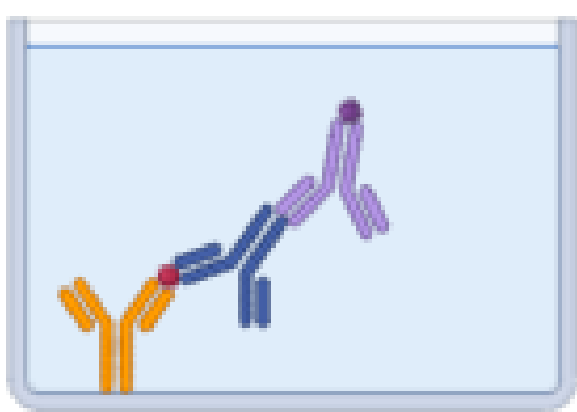


Larva Adultos

Homogeneização



Tomar sobrenadante



KIT Elisa para determinação



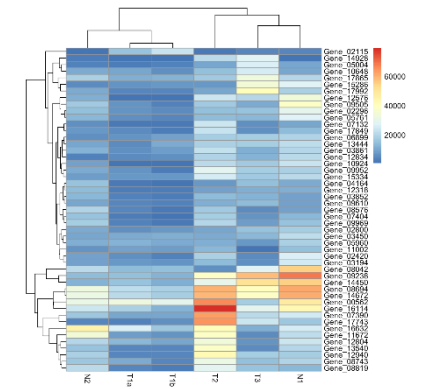
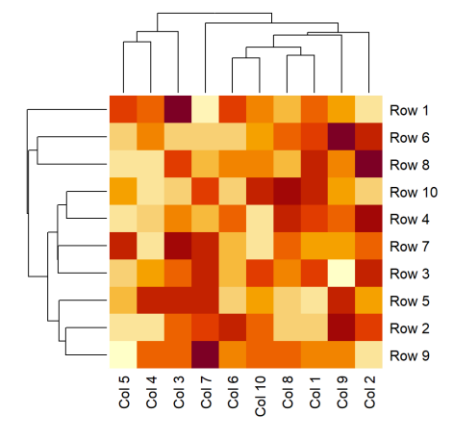
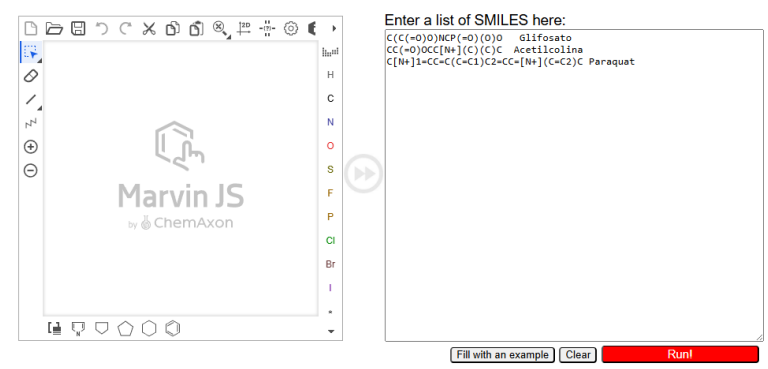
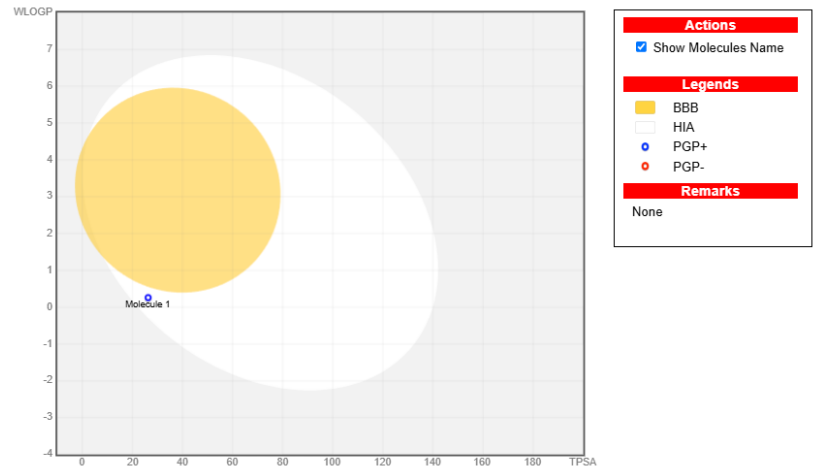
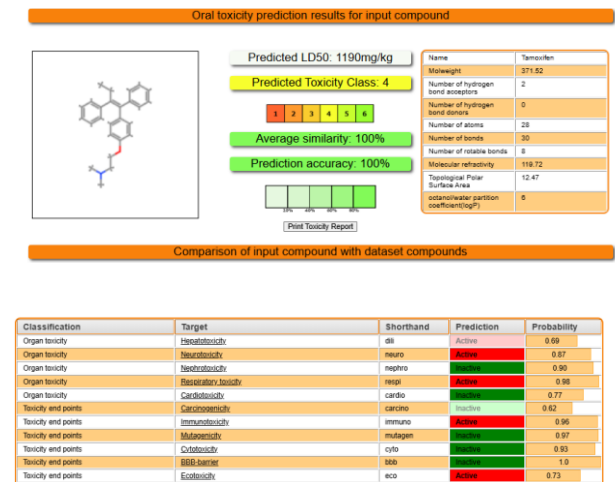
Espectrofotômetro

- La quantificação permitirá detectar si ele extrato tene efeitos como disruptor endócrino, afetando metamorfoses, reprodução, desarrollo, ovogêneses y tamanho de uevos.

Análise *in-silico* a viabilidade terapêutica de *Erythroxylum coca*.

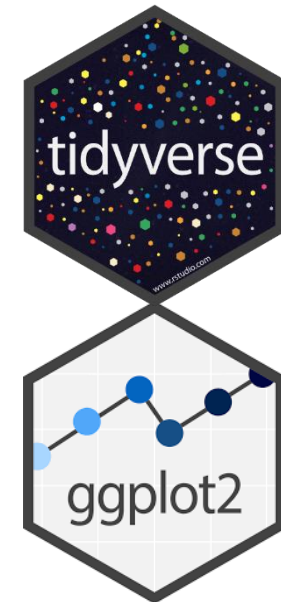
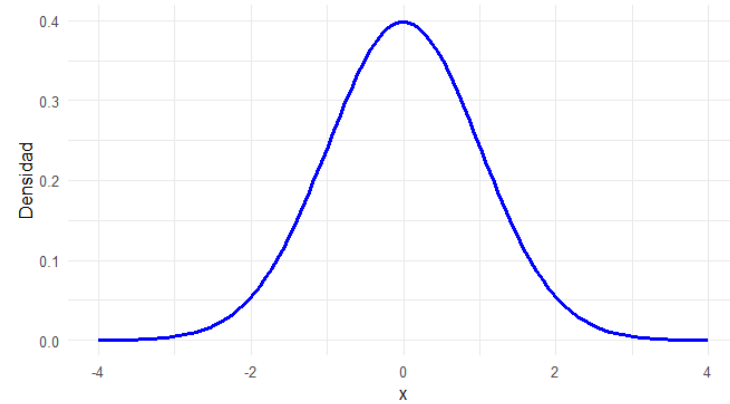


Encontro Científico
Brasil - Colômbia



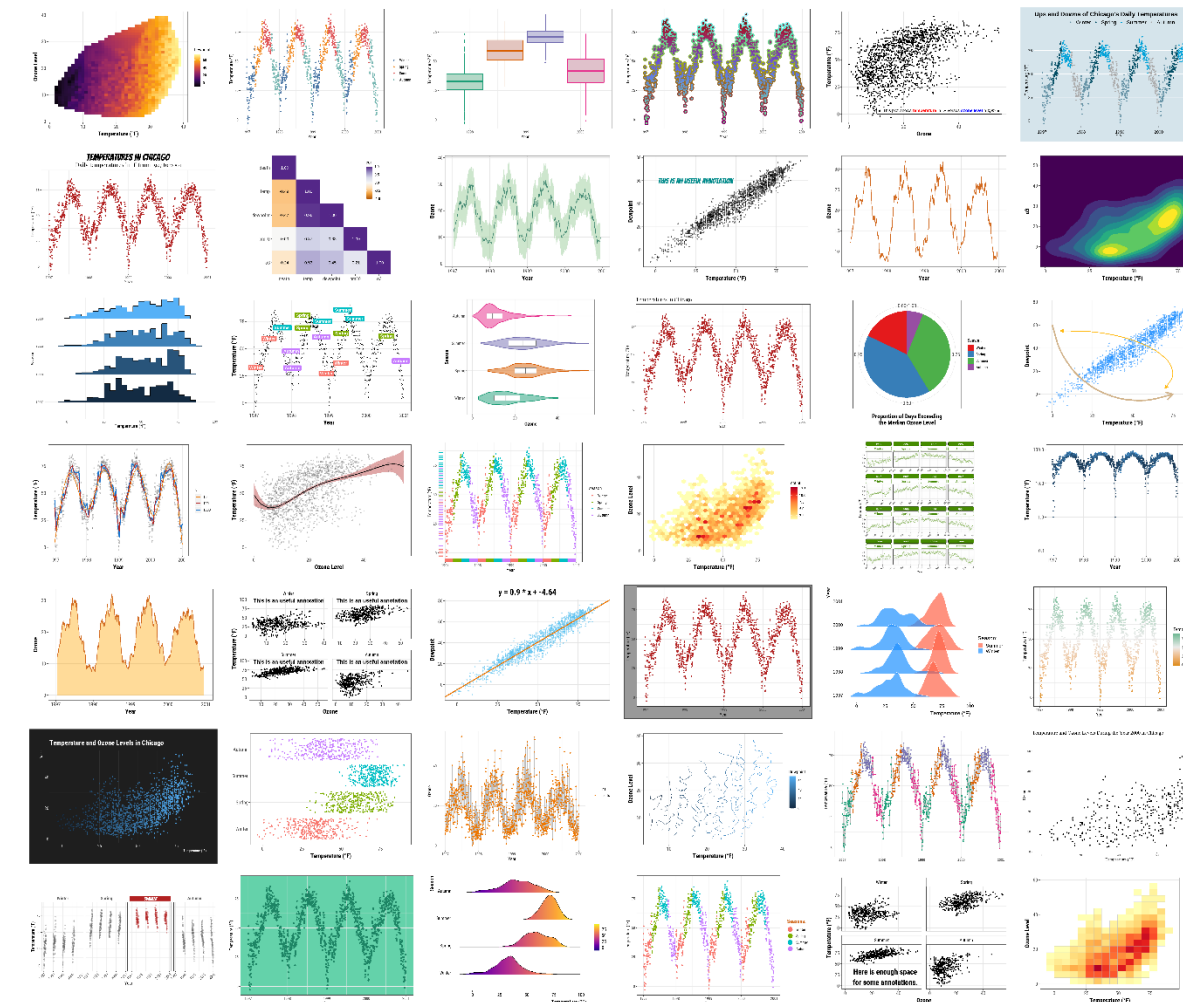
- Afinidade por alvos neuroendócrinos: como canais iônicos, colinesterases, receptores GABAérgicos.
- Avaliação do potencial tóxico (ADMET/Predição de Tox).
- Projeção de possíveis vias moleculares afetadas, reforçando hipóteses experimentais.

Análise estatística



Versão do R 4.4.0

- Teste de normalidade
- Teste de Homoscedasticidade
- Teste Paramétrico/Não Paramétrico
- Teste *post-hoc*





Resultados esperados

- ✓ Espera-se que a exposição ao extrato diminua tanto a taxa de oviposição quanto a taxa de eclosão, diminuição na capacidade locomotora em moscas tratadas.
- ✓ Também espera-se evidenciar neurodegeneração em áreas específicas do cérebro e apoptose nos ovários.
- ✓ Espera-se que uma mudança significativa nos níveis de 20E seja observada em larvas expostas ao extrato etanólico.
- ✓ Espera-se identificar metabólitos com potencial atividade em receptores nucleares de insetos (EcR, USP), colinesterases ou canais iônicos.



Perspectivas futuras

- ✓ Estabelecer a *Drosophila melanogaster* como um modelo eficaz para investigar os efeitos de extratos de plantas psicoativas ou medicinais na regulação hormonal e na neurobiologia.
- ✓ Explorar o impacto do uso crônico de coca (além do alcaloide da cocaína) no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) e seus potenciais efeitos neurotóxicos.
- ✓ Desenvolver bioensaios padronizados que permitam a avaliação sistemática dos efeitos reprodutivos e de desenvolvimento de extratos vegetais em modelos de insetos.
- ✓ Isolar e caracterizar metabólitos ativos identificados in silico, visando à avaliação experimental de seu potencial farmacológico ou toxicológico.

Agradecimientos



Encontro
Científico
Brasil - Colômbia



Universidad del Cauca

Grupo de investigación en microscopía y
análisis de imágenes (GIMAI)



Referências



Encontro
Científico
Brasil - Colômbia

Restrepo, D. A., Saenz, E., Jara-Muñoz, O. A., Calixto-Botía, I. F., Rodríguez-Suárez, S., Zuleta, P., Chavez, B. G., Sanchez, J. A., & D'Auria, J. C. (2019). *Erythroxyllum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. *Molecules*, 24(20), 3788. <https://doi.org/10.3390/molecules24203788>

Ochoa, V. & Pacco, G. R. (2017). Metabolitos en las hojas de *Erythroxyllum coca* Lam y *Erithroxyllum novogranatense* (Morris) Vieron y evaluacion de sus propiedades biologicas mediante bioensayos. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.24.70>

Scarpetta RamírezA, L. M. (2017). Reconocimiento Fitoquímico y etnobotánico de *Erythroxyllum coca* en la población Nasa del Departamento del Cauca – Colombia. *Criterio Libre Jurídico*, 14(1), 10-19. <https://doi.org/10.18041/1794-7200/criteriojuridico.2017.v14n1.1601>

Biondich, A. S., & Joslin, J. D. (2016). Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Emergency Medicine International*, 2016(1), 4048764. <https://doi.org/10.1155/2016/4048764>

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Banerjee, P., Siramshetty, V. B., Drwal, M. N., & Preissner, R. (2016). Computational methods for prediction of in vitro effects of new chemical structures. *Journal of Cheminformatics*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0162-2>

Meiselman, M., Lee, S. S., Tran, R.-T., Dai, H., Ding, Y., Rivera-Perez, C., Wijesekera, T. P., Dauwalder, B., Noriega, F. G., & Adams, M. E. (2017). Endocrine network essential for reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1620760114>

Spana, E. P., Abrams, A. B., Ellis, K. T., Klein, J. C., Ruderman, B. T., Shi, A. H., ... & May, S. (2020). speck, first identified in *Drosophila melanogaster* in 1910, is encoded by the arylalkalamine N-acetyltransferase (AANAT1) gene. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(9), 3387-3398.

Tu, Q., Deng, J., Di, M., Lin, X., Chen, Z., Li, B., ... & Zhang, Y. (2023). Reproductive toxicity of polystyrene nanoplastics in *Drosophila melanogaster* under multi-generational exposure. *Chemosphere*, 330, 138724.

Wu, J. S., & Luo, L. (2006). A protocol for dissecting *Drosophila melanogaster* brains for live imaging or immunostaining. *Nature protocols*, 1(4), 2110-2115.

Barbosa, C. de C., Silva, F. D., Santos, A. M. dos, Vaz, M. R. F., & Nóbrega, F. F. de F. (2014). ASPECTOS GERAIS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO ERYTHROXYLLUM. *REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.35572/rsc.v3i3.325>