

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA EM DROSOPHILA MELANOGASTER EXPOSTAS AOS FLAVONOIDES HESPERIDINA E HESPERITINA

Francielli Polet de Almeida¹

Stífani Araujo²

Vandreza Cardoso Bortolotto³

Luana Meichtry⁴

Marina Prigol⁵

Márcia Rósula Poetini⁶

Resumo:

Os flavonoides são compostos naturais presentes em diversos tipos de plantas, sendo que os compostos hesperidina (Hsd) e hesperitina (Hst) são flavonoides encontrados principalmente em frutas cítricas como a laranja e o limão. Possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais, hipolipidêmica, entre outras. A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) é um modelo bem utilizado em estudos envolvendo distúrbios cerebrais, como a doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos associados à exposição oral de *D. melanogaster* a diferentes concentrações dos flavonoides Hsd e Hst. As concentrações avaliadas de hesperidina e hesperitina foram 1, 10, 25, 50 e 100 M, expostas na dieta das moscas por 10 dias. Após o período experimental foram avaliadas a sobrevivência, a atividade locomotora e a atividade da acetilcolinesterase (AChE). A exposição das moscas aos compostos Hsd e Hst nas concentrações de 0, 1, 10, 25, 50 e 100 µM, não apresentou diferença significativa em relação a sobrevivência, quando comparadas ao grupo controle. No teste de avaliação da atividade motora das moscas pelo teste de geotaxia negativa somente na maior concentração de hesperidina, causou um déficit locomotor e no teste de campo aberto não apresentou diferença significativa entre as diferentes concentrações dos dois flavonoides em relação ao grupo controle. Na atividade da AChE na cabeça e no corpo, apenas a Hsd na maior concentração apresentou uma inibição na atividade da AChE em relação ao grupo controle. Com o presente estudo podemos concluir que os flavonoides hesperidina e hesperitina não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados, podendo serem utilizados em estudos posteriores usando um modelo como a mosca da fruta *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Antioxidantes. Mosca da fruta. Acetilcolinesterase.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA EM DROSOPHILA MELANOGASTER EXPOSTAS AOS FLAVONOIDES HESPERIDINA E HESPERITINA

¹ Aluno de graduação. fpolet.a@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. araujofani@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de pós-graduação. vandreza.bortolotto@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de pós-graduação. luanabm93@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. marinaprigol@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Aluno de pós-graduação. marciapoetini@gmail.com. Co-orientador



AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA EM *Drosophila melanogaster* EXPOSTAS AOS FLAVONOIDES HESPERIDINA E HESPERITINA

1. INTRODUÇÃO

Um número crescente de estudos tem sugerido que uma dieta com ingestão ou suplementação de produtos naturais podem prevenir e/ou atrasar o aparecimento de distúrbios neurodegenerativos (Hwang et al., 2012; Solanki et al., 2015). A hesperidina, é um flavonoide encontrado em frutas cítricas como limões e laranjas, que possui propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-hipertensivas, antivirais e antiinflamatórias (Garg et al., 2001; Parhiz et al., 2015). A hesperidina apresenta ainda, a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Youdim et al., 2003) e proteger os neurônios contra vários tipos de danos associados a doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer e Parkinson (Antunes et al., 2014; Roohbakhsh et al., 2015). Após a ingestão da hesperidina, esta é hidrolisada e absorvida em sua forma aglicona (hesperetina) para poder ser absorvida pelo trato gastrointestinal (Nielsen et al., 2006). Portanto, a hesperidina (Hsd) e sua aglicona hesperitina (Hst) são candidatos para intervenção de doenças neurodegenerativas. No entanto, os mecanismos subjacentes relacionados ao papel neuroprotetor destes flavonoides ainda precisam ser melhores estudados (Chang et al., 2015; Kiasalari et al., 2016).

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) é um modelo bem utilizado em estudos envolvendo distúrbios cerebrais, como a doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington. (Mackay & Anholt, 2006). A vantagem de estudar transtornos neurocomportamentais em *Drosophila* é a presença de genes que são semelhantes aos genes humanos para as funções normais cognitivas (Inlow & Restifo, 2004; Restifo, 2005). A mosca apresenta comportamentos complexos relevantes para os seres humanos, como aprendizagem e memória (Tully et al., 1994). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos associados à exposição oral de *Drosophila melanogaster* à diferentes concentrações dos flavonoides hesperidina e hesperitina.

2. METODOLOGIA

Desenho experimental

Após a eclosão de moscas expostas a dieta padrão, moscas de ambos os sexos com 3 a 4 dias foram separadas em grupos de 50 moscas cada. As concentrações finais avaliadas de hesperidina e hesperitina foram 1, 10, 25, 50 e 100 μ M expostas na dieta das moscas contendo açúcar, ágar, leite em pó e nipagin como controle fúngico, por um período de 10 dias. Após o período experimental foram avaliadas sobrevivência, a atividade locomotora e a atividade da AchE.

Sobrevivência e atividade locomotora

A taxa de sobrevivência das *D. melanogaster* foi avaliada por uma contagem diária da quantidade do número de moscas vivas em relação ao número total das

moscas até ao final do período experimental (10 dias). A atividade locomotora das moscas foram avaliadas através de dois testes, o ensaio de geotaxia negativa foi determinada de acordo com Jimenez Del-Rio et al., (2010) e o teste de campo aberto conforme descrito por (Hirth, 2010).

Atividade acetilcolinesterase (AChE) e determinação de proteína

A atividade de AChE foi determinada de acordo com o método de Ellmann (1961), sendo expressa em nmol de proteína / mg / min. A determinação de proteína foi medida pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A análise estatística utilizada foi análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. Foram consideradas significativas as diferenças entre os grupos quando $p < 0,05$, utilizando o programa Graph Pad Prism5. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A exposição das moscas aos compostos Hsd e Hst nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 μM , não apresentou diferença significativa em relação a sobrevivência, quando comparadas ao grupo controle. Comparando as concentrações, todas demonstraram aproximadamente o mesmo índice de sobrevivência após o período experimental, conforme demonstrado na figura 1. Na avaliação do comportamento pelo teste de escalada geotaxia negativa para as moscas expostas aos compostos (figura 2 A), mostrou que apenas o composto hesperidina na maior concentração apresentou diferença significativa em relação ao controle. De acordo com a figura 2 B, que representa a mobilidade das moscas através do teste locomotor de campo aberto, nenhuma concentração dos compostos Hsd e Hst apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle. Logo, constata-se que os compostos não causaram nenhuma alteração na mobilidade das moscas tratadas. Com relação à atividade da enzima AChE, tanto na cabeça quanto no corpo das moscas a concentração de 100 μM de Hsd apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, conforme demonstrado na figura 3 (A e B).

Hsd e Hst possuem um significativo potencial como agente terapêutico em doenças e distúrbios (Garg et al., 2001). Esses flavonoides de espécies cítricas apresentam várias propriedades biológicas (Roohbakhsh et al., 2015). No entanto, um grande número de estudos foram publicados desde então descrevendo as suas novas atividades farmacológicas e mecanismos de ação. Por exemplo, os efeitos de Hsd no sistema nervoso central tem sido um tema de pesquisa durante a última década, no entanto outros estudos precisam ser avaliados (Filho et al., 2013; Souza et al., 2014). Após a avaliação da curva de concentração dos compostos Hsd e Hst, demonstrou que podem ser utilizados em outros modelos como a *D. melanogaster*, sendo que recomendado até a concentração de 50 μM . Um composto como objetivo de ser utilizado com fins terapêuticos deve ter sua ação e nível tóxicos previamente avaliados em diferentes modelos animais, como por exemplo a mosca da fruta *D. melanogaster* a fim de se comprovar cientificamente, os critérios de segurança.

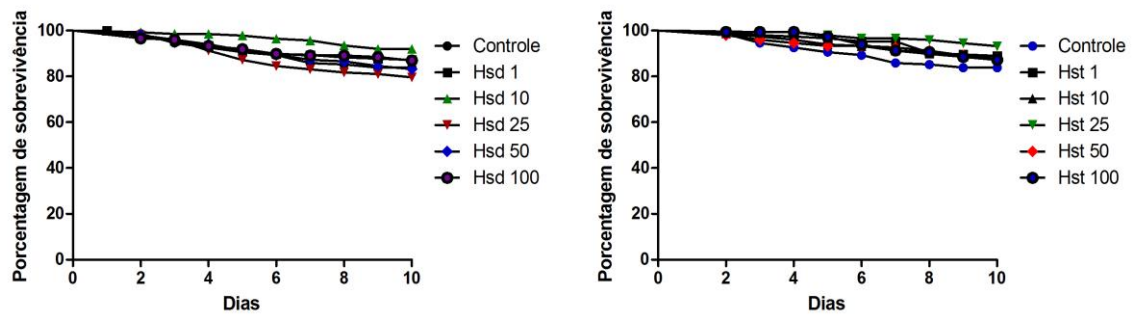


Figura 1: Efeito dos flavonoides hesperidina e hesperitina na sobrevivência de *D. melanogaster*

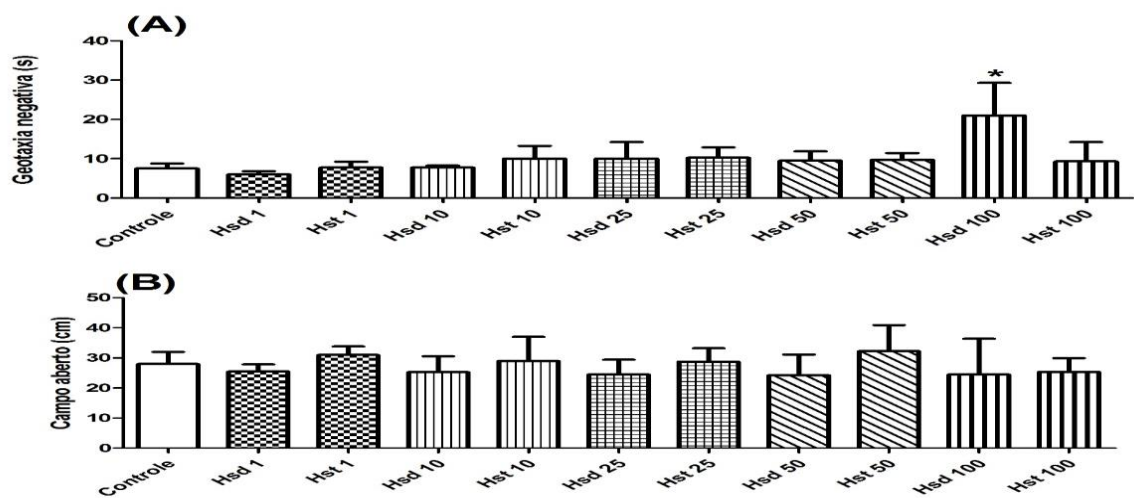


Figura 2: Efeito dos flavonoides hesperidina e hesperitina em *D. melanogaster*. (A) Teste geotaxia negativa e (B) teste de campo aberto. Os valores são média $\pm$ desvio padrão (n = 20 moscas, quatro tratamentos foram realizados). A significância foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

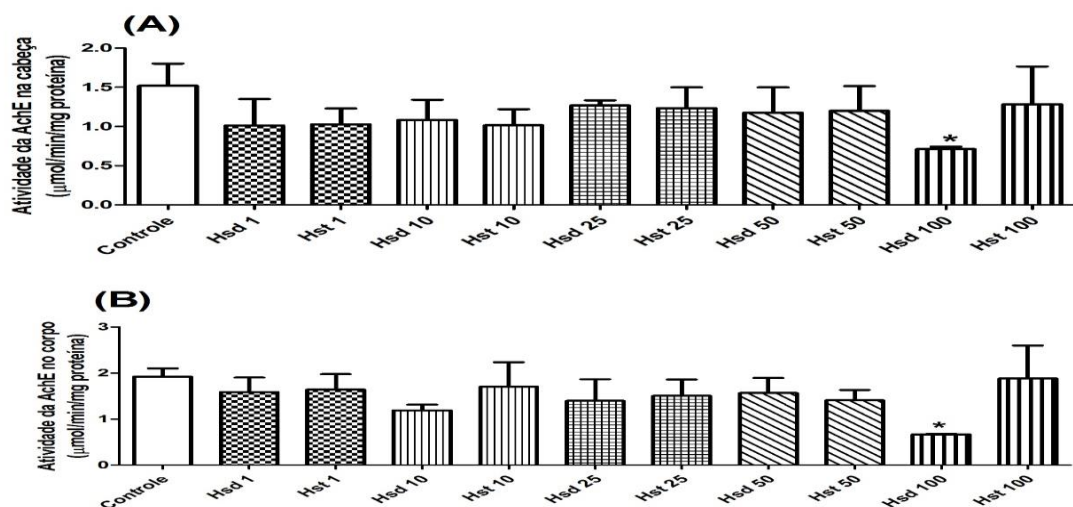


Figura 3: Efeito dos flavonoides hesperidina e hesperitina em *D. melanogaster*. (A) Atividade da Acetilcolinesterase na cabeça e (B) Atividade da Acetilcolinesterase no corpo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo podemos concluir que os flavonoides hesperidina e hesperitina não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados, podendo serem utilizados em estudos posteriores usando um modelo como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*.

5. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, M.S., GOES, A.T.R., BOEIRA, S.P., PRIGOL, M., JESSE, C.R., 2014. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. **Nutrition** 30, 1414–1422.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARLOS FILHO, B., DEL FABBRO, L., DE GOMES, M. G., GOES, A. T., SOUZA, L. C., BOEIRA, S. P., JESSE, C. R. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. **European journal of pharmacology**, v. 698, n. 1, p. 286-291, 2013.
- CHANG, C. Y., LIN, T. Y., LU, C. W., HUANG, S. K., WANG, Y. C., CHOU, S. S. P., WANG, S. J. Hesperidin inhibits glutamate release and exerts neuroprotection against excitotoxicity induced by kainic acid in the hippocampus of rats. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 157-169, 2015.
- CHEN, M. C., YE, Y. Y., JI, G., LIU, J. W. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3330-3335, 2010.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharmacol*7: 88–95. **Find this article online**, 1961.
- GARG, A., GARG, S., ZANEVELD, L. J. D., SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.
- HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 9, n. 4, p. 504-523, 2010.
- HWANG, S.L., SHIH, P.H., YEN, G.C., 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 60, 877–885.
- INLOW, J. K.; RESTIFO, L. L. Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics**, v. 166, n. 2, p. 835-881, 2004.
- JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 2, p. 227-238, 2010.

KAUR, K., SIMON, A. F., CHAUHAN, V., CHAUHAN, A. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior—A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. **Behavioural brain research**, v. 284, p. 77-84, 2015.

KIASALARI et al.; Protective Effect of Oral Hesperetin Against Unilateral Striatal 6-Hydroxydopamine Damage in the Rat. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 4, p. 1065-1072, 2016.

MACKAY, Trudy FC; ANHOLT, Robert RH. Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 7, p. 339-367, 2006.

NIELSEN, I. L.; CHEE, W. S. S. POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S. E.; FREDERIKSEN, H.; ENSLEN, M.; BARRON, D.; HORCAJADA, M. N.; WILLIAMSON, G. Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus Flavonoid Hesperidin in Humans: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. **Journal of Nutrition**, v. 136, n.2, p. 404-408, 2006.

PARHIZ, H., ROOHBAKHSH, A., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanism and experimental models. *Phytother. Res.* 29, 323–331.

RESTIFO, L. L. Mental retardation genes in *Drosophila*: New approaches to understanding and treating developmental brain disorders. **Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 11, n. 4, p. 286-294, 2005.

ROOHBAKHSH, A., PARHIZ, H., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. **Life sciences**, v. 124, p. 64-74, 2015.

SOLANKI, I., PARIHAR, P., MANSURI, M.L., PARIHAR, M.S., 2015. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Adv. Nutr.* 6, 64–72.

SOUZA, L. C., DE GOMES, M. G., GOES, A. T., DEL FABBRO, L., CARLOS FILHO, B., BOEIRA, S. P., JESSE, C. R. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT 1A receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 40, p. 103-109, 2013.

TULLY, T., PREAT, T., BOYNTON, S. C., DEL VECCHIO, M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. **Cell**, v. 79, n. 1, p. 35-47, 1994.

YODIM, K.A., DOBBIE, M.S., KUHNLE, G., PROTEGGENTE, A.R., ABBOTT, N.J., RICE-EVANS, C., 2003. Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. **J. Neurochem.** 85, 180–192.