TRATAMENTO COM APOCININA E DIAPOCININA PARA DOENÇA DE PARKINSON, INDUZIDA POR PARAQUAT EM DROSOPHILAS MELANOGASTER

Alex Geovane da Silveira Pereira [1]

Mauricio Viana Garcia [2]

Camila Coelho Rodrigues [3]

Elton Luis Gasparotto Denardin [4]

Mayara Batú Gonçalves [5]

Favero Reisdorfer Paula [6]

Resumo:

A doença de Parkinson (DP), é uma doença degenerativa que caracteriza-se pela presença de rigidez muscular, tremor, instabilidade postural, bradicinesia, juntamente com sintomas não-motorizados. Entre estes últimos se destacam o comprometimento da memória, depressão, alterações do sono e distúrbios do sistema nervoso autônomo. Do ponto de vista patológico, a DP é causada pela deficiência da dopamina na região da substância nigra no cérebro, sendo esta substância um neurotransmissor importante na coordenação motora. O esgotamento da dopamina estriatal, é devido à degeneração dos neurônios dopaminérgicos, e formação de Corpos de Lewis, composto principalmente de proteína alfa-sinucleina. Compostos que possam atuar como inibidores da formação de corpos de Lewis, através da modulação da alfa-sinucleína, se apresentam como promissores para o desenvolvimento de agentes terapêuticos novos. A apocinina (AP) e seu dímero, a diapocinina (DI), são compostos com ação antiparkinsoniana potencial e são objetivos de estudos em área de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos. O uso do herbicida paraquat (PQ) em modelos animais de toxicologia, como a Drosophila melanogaster (DM), ocasiona a degeneração de neurônios dopaminérgicos, o que resulta em disfunção conhecida como síndrome parkinsoniana. Neste trabalho, AP e DI foram submetidos à avaliação da inibição de sintomas de DP usando neurotoxicidade in vivo induzida por paraquat em DM com a finalidade de se obter informações que permitam o desenvolvimento de compostos derivados candidatos a fármacos antiparkinsonianos novos.

Palavras-chave: Apocinina, diapocinina, paraquat, Drosophilas melanogaster

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

TRATAMENTO COM APOCININA E DIAPOCININA PARA DOENÇA DE PARKINSON, INDUZIDA POR PARAQUAT EM DROSOPHILAS MELANOGASTER

[1] Aluno de graduação. geovanealex96@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de iniciação científica. mvgitaqui@gmail.com. Co-autor

[3] Mestre. milaccr@gmail.com. Co-autor

[4] Docente . eltondenardin@unipampa.edu.br. Co-autor

[5] Aluno de iniciação científica. mayarabatu@gmail.com. Co-autor

[6] Docente. faveropaula@unipampa.edu.br. Orientador

TRATAMENTO COM APOCININA E DIAPOCININA PARA DOENÇA DE PARKINSON, INDUZIDA POR PARAQUAT EM *DROSOPHILAS MELANOGASTER*

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP), é uma doença degenerativa que caracteriza-se pela presença de rigidez muscular, tremor, instabilidade postural, bradicinesia, juntamente com sintomas não-motorizados. Entre estes últimos se destacam o comprometimento da memória, depressão, alterações do sono e distúrbios do sistema nervoso autônomo (STOKES, 2000; MONTEIRO, 2007).

Do ponto de vista patológico, a DP é causada pela deficiência da dopamina na região da substância nigra no cérebro, sendo esta substância um neurotransmissor importante na coordenação motora (O´SULLIVAN *et al*., 1993). O esgotamento da dopamina estriatal, é devido à degeneração dos neurônios dopaminérgicos, e formação de Corpos de Lewis, composto principalmente de proteína alfa-sinucleina (GHOSH *et al.,* 2012).

Compostos que possam atuar como inibidores da formação de corpos de Lewis, através da modulação da alfa-sinucleína, se apresentam como promissores para o desenvolvimento de agentes terapêuticos novos. A apocinina (AP) e seu dímero, a diapocinina (DI), são compostos com ação antiparkinsoniana potencial e são objetivos de estudos em área de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (GHOSH *et al.,* 2012).

O uso do herbicida paraquat (PQ) em modelos animais de toxicologia, como a *Drosophila melanogaster* (DM), ocasiona a degeneração de neurônios dopaminérgicos, o que resulta em disfunção conhecida como síndrome parkinsoniana (PARK *et al*., 2012; JAHROMI *et al*., 2013). Neste trabalho, AP e DI foram submetidos à avaliação da inibição de sintomas de DP usando neurotoxicidade *in vivo* induzida por paraquat em DM com a finalidade de se obter informações que permitam o desenvolvimento de compostos derivados candidatos a fármacos antiparkinsonianos novos.

2. METODOLOGIA

A AP foi adquirida comercialmente da Sigma Aldrich (99%) e a DI foi sintetizada por Rodrigues (2018) e mantida no Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos do Campus Uruguaiana da UNIPAMPA.

Para a avaliação dos sintomas da DP em DM foi realizado primeiramente a cultura e o tratamento de indivíduos machos, com 3 dias de vida, em um meio padrão de alimentação com um ciclo claro/escuro de 12:12 h mantida a 22 ± 1ºC e 60-70% de umidade relativa.

A partir desta etapa, foi realizado um estudo preliminar para verificação da curva de sobrevivência para fins de determinação das concentrações dos compostos estudados a serem estudadas em presença do paraquat (PQ). Nesta etapa, foram realizados ensaios com três grupos distintos: PQ, AP e DI. Um conjunto de 30 indivíduos foi separado para cada ensaio a ser realizado em triplicata. As moscas foram alimentadas com a solução de alimentação (1g açúcar, 1g leite em pó, 100 mL água destilada) e com as soluções do PQ na faixa de concentração de 0,05 – 0,20 μM, DI nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,15 μM, e AP nas concentrações 0,05; 0,1; 0,15; 5; 25 e 50 μM pelo período de 4 dias. O controle negativo foi constituído de solução de alimentação sem a presença de compostos e PQ. Neste cenário, foi avaliado o número de moscas sobreviventes nos ensaios realizados.

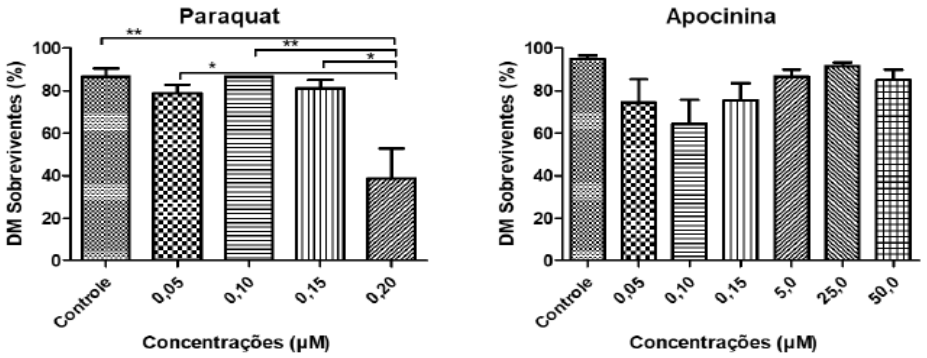
Em etapa posterior, realizou-se novo ensaio para avaliação da inibição de toxicidade do PQ pela AP e DI, onde foram administrados as DM o herbicida em presença dos dois compostos. Neste procedimento foi considerando sempre a mesma concentração de PQ e dos compostos AP e DI. Após exposição ao PQ e compostos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo.

A próxima etapa envolveu a realização de ensaio de geotaxia negativa para fins de avaliação dos efeitos dos compostos sobre os sintomas de DP causados pelo PQ. Este ensaio, usado parra determinar a função locomotora das DM, foi realizado em uma proveta de 50 mL, onde se adicionou 10 moscas sobreviventes de cada avaliação realizada na etapa anterior, controle negativo e PQ em presença de AP e DI. Neste ensaio, realizou-se o treinamento das DM no sistema e após verificou-se quantas passaram a marca de 50 mL da proveta no tempo de 8 segundos. O procedimento foi repetido seis vezes para cada análise.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

No ensaio da curva de sobrevivência de machos de DM, expostos ao PQ e aos compostos isolados, obteve-se o número de moscas sobreviventes após o período de quatro dias, e os resultados estão expressos na figura 1. Como observado nos resultados, o PQ exerce uma maior ação tóxica na concentração 0,20 μM, diminuindo a sobrevida em cerca de 40%. Já na faixa de concentração 0,05 – 0,15 μM as mesmas causam porcentagem reduzida de mortes de indivíduos de DM em relação ao controle negativo, sendo esta faixa de concentração escolhida para avaliação dos efeitos deletérios do herbicida, responsáveis por promover os sintomas de síndrome parkinsoniana sem causar a morte dos indivíduos estudados. Após o ensaio de sobrevivência, onde as DM foram alimentadas com AP foi observado que a todas as concentrações testadas estão próximas ao controle negativo. Em caso de uso para os testes de avaliação de inibição dos efeitos tóxicos do PQ as concentrações mais baixas como a de 0,15 μM se apresentam como adequados para investigação de efeito de inibição de sintomas da DP. Os ensaios realizados até o presente momento com a DI, em concentração de 0,05 μM, permitiu verificar uma similaridade de até 98% com o controle negativo o que habilita o uso da DI na continuidade dos ensaios.

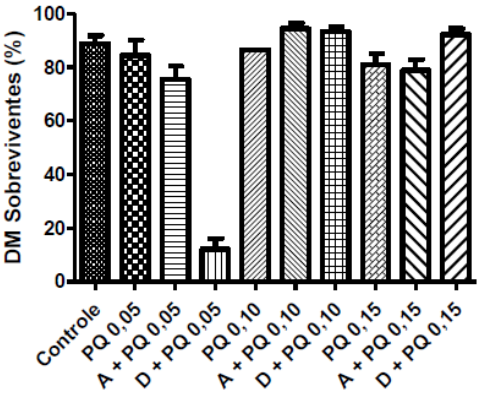
Figura 1 - Número de indivíduos machos de DM sobreviventes quando expostas ao PQ e a AP.



Na avaliação da toxicidade do PQ nas concentrações 0,05, 0,1 e 0,15 μM, as moscas foram alimentadas com o herbicida e com os compostos e comparadas com o controle negativo (solução de alimentação). Os resultados deste ensaio estão expressos na figura 2, e permitem se verificar que o efeito protetor da AP e DI contra os danos causados nas DM

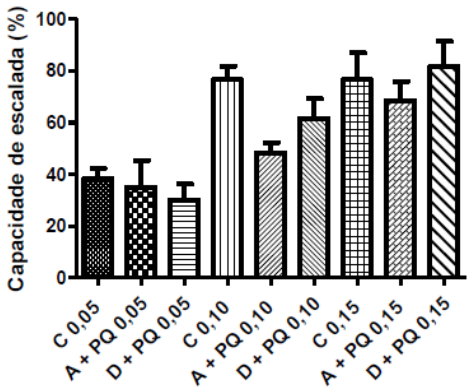
quando expostas ao PQ. Quando as moscas foram tratadas simultaneamente com os compostos e PQ em concentração de 0,05 µM, a AP e a DI não conseguiram proteger as DM contra os efeitos deletérios do herbicida. No entanto, a taxa de mortalidade foi significativamente menor quando tratadas na concentração 0,10 µM de ambos os compostos e 0,15 µM da DI. Assim, observamos que uma concentração baixa não reduz a toxicidade do PQ.

Figura 2 - Resultado do ensaio de toxicidade da apocinina e diapocinina expostos ao PQ.



No ensaio de geotaxia negativo observou-se que em as concentrações mais baixas, como 0,05 µM houve uma significativa redução no desempenho de escalada. Na concentração de 0,10 µM, em comparação com o grupo controle negativo, observou-se a ocorrência de deficiência na função locomotora provocada pelo PQ quando ensaiadas em presença da AP e da DI. Já na concentração mais alta, de 0,15 µM, houve o indicativo de resultados similaridade de resultados em comparação ao controle negativo (considerando grau de significância $p < 0,001$ em Teste de Bonferroni). Neste cenário, para as concentrações de 0,10 e 0,15 µM, observou-se que a DI se mostrou mais eficaz em comparação a AP, onde, na última concentração, pouco mais de 80% das DM ultrapassaram a linha de 50 mL da proveta no tempo de 8 segundos.

Figura 3 - Capacidade de escalada do controle e dos compostos nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,15 µM quando expostos ao Paraquat.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta estudo verificou-se que a AP seu dímero DI se apresentaram como compostos promissores na avaliação da atividade frente aos sintomas da doença de Parkinson *in vivo,* resultado demonstrado através de ensaio sobrevivência, toxicidade e comportamento com *Drosophila melanogaster*. A DI apresentou melhores resultados de inibição dos sintomas causados por PQ em relação a AP. Ambos compostos AP e DI se apresentam como candidatos para o estudo e o desenvolvimento de agentes terapêuticos, com atividade neuroprotetora.

REFERÊNCIAS

GHOSH, A.; KANTHASAMY, A.; JOSEPH, J.; ANANTHARAM, V.; SRIVASTAVA, P.; DRANKA, B. P.; KALYANARAMAN, B.; KANTHASAMY, A. G. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. **J. Neuroinflam.**, Ames, v. 9, n. 241, 2012.

JAHROMI, S. R.; HADDADI, M.; SHIVANANDAPPA, T.; RAMESH, S. R. Neuroprotective effect of Decalepis hamiltonii in paraquat-induced neurotoxicity in Drosophila melanogaster: biochemical and behavioral evidences. **Neurochem. Res.**, v. 38, n. 12, p. 2616–2624, 2013.

MONTEIRO, I. J. S. **Doença de parkinson:** as suas bases bioquímicas. Portugal, 2007.

O´SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia:** avaliação e tratamento. 2 ed. São Paulo: Manole, 1993.

PARK, J. H.; JUNG, J. W.; AHN, Y. J.; KWON, H. W. Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in Drosophila melanogaster. **Pesticide Bioch. Physiol.**, v. 104, n. 2, p. 118–125, 2012.

RODRIGUES, C. C. Estudo da apocinina, diapocinina e derivados: síntese, modelagem molecular, avaliação da atividade aceptora de radicais e neuroprotetora frente a sintomas da doença de Parkinson. Dissertação de Mestrado PPGCF-UNIPAMPA, 2018.

STOKES, M. **Neurologia para fisioterapeutas**. São Paulo: Ed. Premier, 2000.