

AÇÃO DA LUTEÍNA NANOENCAPSULADA SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL TIPO DOENÇA DE PARKINSON EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Eliana Jardim Fernandes ¹

Magna Sotelo Barrientos ²

Elize Aparecida Santos Musachio ³

Vandreza Cardoso Bortolotto ⁴

Márcia Rósula Poetini ⁵

Gustavo Petri Guerra ⁶

Resumo:

Doenças neurodegenerativas causam a destruição progressiva e irreversível das células do sistema nervoso central (SNC), provocando perda gradativa das funções motoras, fisiológicas e capacidade cognitiva. A doença de Parkinson (DP), segunda doença neurodegenerativa mais comum em pessoas com idade acima dos 60 anos. Observa-se uma crescente procura por compostos bioativos com atividade terapêutica capaz de modificar a evolução e sintomas da DP, sem efeitos colaterais e com maior biodisponibilidade e absorção. A luteína é um possível candidato, um carotenoide com ação antioxidante, já elucidados na literatura, protegendo neurônios dopaminérgicos, estresse oxidativo e dano mitocondrial. Apesar de todos os estudos já existentes sobre carotenoides e doenças neurodegenerativas, o efeito de nanopartículas de luteína sobre a prevenção da DP, ainda não tem sido investigado. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da luteína nanoencapsulada em alterações locomotoras e na atividade da acetilcolinesterase (AChE) sobre o modelo experimental tipo doença de Parkinson em *Drosophila melanogaster*. Foram utilizadas moscas de ambos os sexos, com idade de 1 a 3 dias, divididas em 4 grupos: controle, luteína nanoencapsulada (6 μ M), rotenona (500 μ M) e luteína nanoencapsulada (6 μ M) + rotenona (500 μ M) (coexposição). Ao final do 7º dia de tratamento, foram realizados os testes comportamentais de geotaxia negativa e ensaio de campo aberto, e então anestesiadas em gelo e eutanasiadas para a avaliação da atividade da AChE em amostras de cabeça. Os dados foram analisados por Análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida de análise post hoc de Bonferroni. Foi utilizado o programa GraphPad Prism5, sendo considerado diferença significativa do grupo controle p

Palavras-chave: Compostos bioativos, Biodisponibilidade, Neurônios dopaminérgicos

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

AÇÃO DA LUTEÍNA NANOENCAPSULADA SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL TIPO DOENÇA DE PARKINSON EM DROSOPHILA MELANOGASTER

¹ Aluno de pós-graduação. elianajf14@yahoo.com.br. Autor principal

² Iniciação científica. magnasotelo@gmail.com. Co-autor

³ Mestrado. elizemusachio@gmail.com. Co-autor

⁴ Doutorado. vandreza.bortolotto@gmail.com. Co-autor

⁵ Doutorado. marciapoetini@gmail.com. Co-autor

⁶ Docente. petriguerra@gmail.com. Orientador

ACÇÃO DA LUTEÍNA NANOENCAPSULADA SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL TIPO DOENÇA DE PARKINSON EM *Drosophila melanogaster*

1 INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas causam a destruição progressiva e irreversível das células do sistema nervoso central (SNC), provocando, ao paciente, gradativa perda das funções motoras, fisiológicas e capacidade cognitiva (Przedborski et al, 2003). A doença de Parkinson (DP), segunda doença neurodegenerativa mais comum em pessoas com idade acima dos 60 anos, afeta cerca de 1-2% da população mundial (Sprenger and Poewe, 2013).

A DP é caracterizada pela degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos na região compacta da substância negra, e pelo acúmulo de Corpos de Lewy (Gao and Wu, 2016). Assim, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas capazes de modificar a evolução natural da doença e dos sintomas, sendo mais eficazes, seguros e que diminuam os efeitos colaterais, consiste em um dos objetivos do cenário científico internacional. Neste sentido, evidências crescentes apontam para o importante papel dos compostos bioativos, constituintes extranutricionais presentes, principalmente, nos alimentos de origem vegetal, que atuam na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças, sem o surgimento de efeitos colaterais como no caso de algumas drogas farmacêuticas (Rein et al, 2013).

Algumas linhas de evidências demonstram que a luteína é um dos carotenoides envolvidos nos processos da DP e um possível candidato no tratamento de doenças neurodegenerativas. A luteína é o principal carotenoide encontrado no cérebro humano, com cerca de 70% da concentração total de carotenoides, além de apresentar capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, com captação preferencial sobre a maioria dos outros carotenoides e correlação positiva entre os níveis do soro e do cérebro (Vishwanathan et al, 2014). A luteína protege neurônios dopaminérgicos por aumentar as defesas antioxidantes e diminuir a disfunção mitocondrial (Nataraj et al, 2016). Assim, um possível mecanismo de ação para os efeitos da luteína sobre a DP, pode envolver, proteção antioxidante e alterações na atividade da acetilcolinesterase (AChE). Apesar de todos os estudos já existentes sobre carotenoides e doenças neurodegenerativas, o efeito de nanopartículas de luteína sobre a prevenção da DP, ainda não tem sido investigado.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da luteína nanoencapsulada em alterações locomotoras e na atividade da acetilcolinesterase (AChE) sobre o modelo experimental tipo doença de Parkinson em *Drosophila melanogaster*.

2 METODOLOGIA

Foram utilizadas moscas da fruta (*Drosophila melanogaster* – linhagem Harwich) de ambos os sexos, com idade de 1 a 3 dias, mantidas em frascos na incubadora BOD, em temperatura de 25°C, 60 % de umidade e em ciclo 12 horas claro/escuro, alimentadas com 5 ml de meio padrão (a base de 1% de ágar; 1% de levedura; 2% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de Metilparabenoe. A luteína foi obtida na forma de nanopartículas. Todos os outros produtos químicos foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Modelo experimental de DP: O modelo de DP induzido por rotenona provoca a morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta em associação com a formação de corpos de Lewy. Este modelo contribui para elucidar mecanismos patogênicos da neurodegeneração na DP (Bové and Perier, 2012). A rotenona (dissolvido em etanol 98%) foi adicionada na dieta na concentração de 500 μ M, durante 7 dias de exposição (Sudati et al, 2013). O meio alimentar total conteve um volume de 0,5% de etanol.

Prevenção da DP: Para verificar o efeito da luteína sobre a prevenção da DP, as moscas foram divididas em 4 grupos: controle, luteína nanoencapsulada (6 μ M), rotenona (500 μ M) e luteína nanoencapsulada (6 μ M) + rotenona (500 μ M) (coexposição), durante 7 dias. Após as moscas foram avaliadas nas tarefas comportamentais e posteriormente utilizadas para o preparo de amostras de cabeça para a realização da atividade da AChE.

Avaliação comportamental

Geotaxia negativa: A atividade locomotora das moscas foi avaliada com a tarefa de geotaxia negativa como descrito por Feany e Bender (2000). As moscas foram anestesiadas com gelo e colocadas em uma coluna vertical (comprimento: 10 cm, diâmetro: 1,5 cm / 5 moscas cada). Após a recuperação da anestesia, as moscas que atingiram o topo da coluna (6 cm) e as que permaneceram na parte inferior foram contadas separadamente durante 6 s. Os escores representam a média do número de moscas no topo como porcentagem do número total de moscas.

Campo aberto: Para avaliação da atividade motora e exploratória a tarefa de campo aberto foi realizada com 10 moscas de cada grupo, de acordo com o método descrito por Hirth (2010), com algumas modificações. Cada mosca foi mantida em uma placa de Petri dividida por quadrados (1 cm x 1 cm) e durante 60 s foi determinado o número de cruzamentos.

Determinações bioquímicas: As moscas foram anestesiadas, homogeneizadas e centrifugadas. O teor de proteína foi colorimetricamente pelo método de Bradford (1976).

Atividade da AChE medida pelo método descrito por Ellman et al. (1961).

Os dados analisados por Análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida de análise post hoc de Bonferroni. Foi utilizado o programa GraphPad Prism5, sendo consideradas significativas as diferenças entre os grupos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

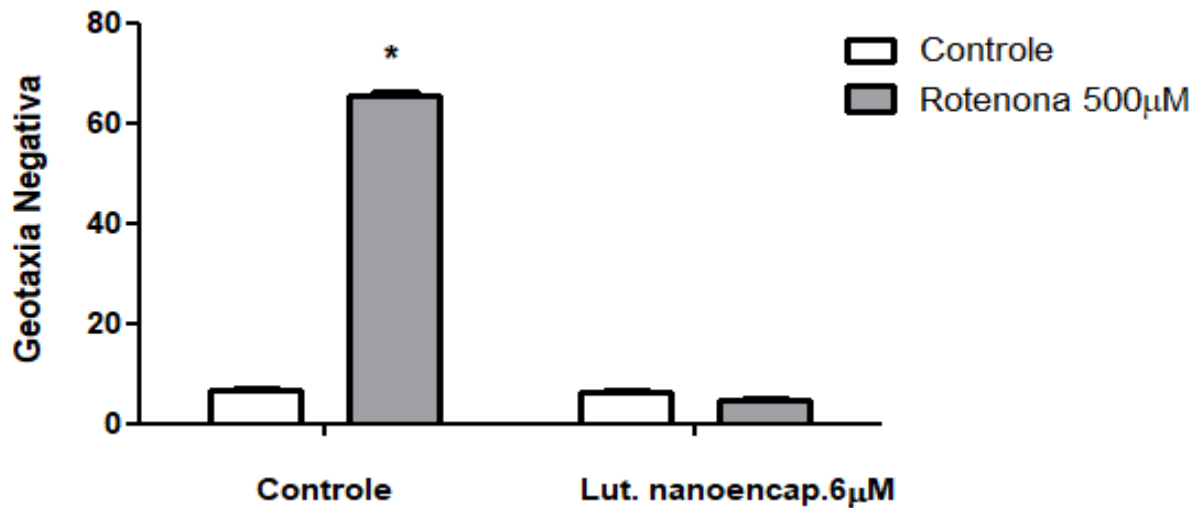
A figura 1 apresenta o resultado da exposição de *Drosophila melanogaster* à rotenona, onde induziu déficits locomotores severos, na atividade locomotora no teste de Geotaxia negativa, aumentou o tempo de escalada das moscas e na atividade motora e exploratória, diminuiu o número de cruzamentos na tarefa de campo aberto. A co-exposição com Lut. nanoencap. 6 μ M foi capaz de evitar os déficits induzidos por rotenona, retornando ao nível do controle. A DP caracteriza um progressivo e permanente distúrbio motor, sinalizado por rigidez muscular, bradicinesia, tremor e instabilidade (Lewis et al, 2011). Portanto, pode-se afirmar que a administração durante 7 dias de Lut. nanoencap. 6 μ M preservou consideravelmente a atividade locomotora e exploratória das moscas.

A figura 2 mostra que a rotenona aumentou a atividade da AChE na cabeça das moscas. Já co-exposição Lut. nanoencap. 6 μ M mais rotenona, preveniu a nível de controle, foi eficiente contra o modelo de DP Induzida pela rotenona em *Drosophila melanogaster*. A Enzima AChE já é bem descrita e utilizada para pesquisar a eficácia do tratamento na DP e outras doenças neurodegenerativas (Dalpiaz et al, 2007). A expressão da AChE é proposta para induzir a morte dos neurônios dopaminérgicos, afetando a função motora.

Devido seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, os carotenoides, recebem uma atenção especial nos estudos relacionados com a DP (Kim et al, 2017). A biodisponibilidade é outro fator importante que deve ser considerado em relação aos efeitos da luteína. A solubilização da luteína em óleo do germen de trigo melhora sua biodisponibilidade em camundongos (Gorusupudi and Baskaran, 2013). Nesse sentido, nanopartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas visando aumentar a biodisponibilidade, absorção e facilitar a entrada de drogas ou compostos bioativos através de barreiras biológicas, maximizando o potencial terapêutico e ao mesmo tempo minimizando os efeitos colaterais (Rein et al, 2013;

Xie et al, 2011). Assim, nanoemcapsulação da luteína pode representar um aumento na sua biodisponibilidade e absorção, sendo uma alternativa para o tratamento de doenças.

(A)



(B)

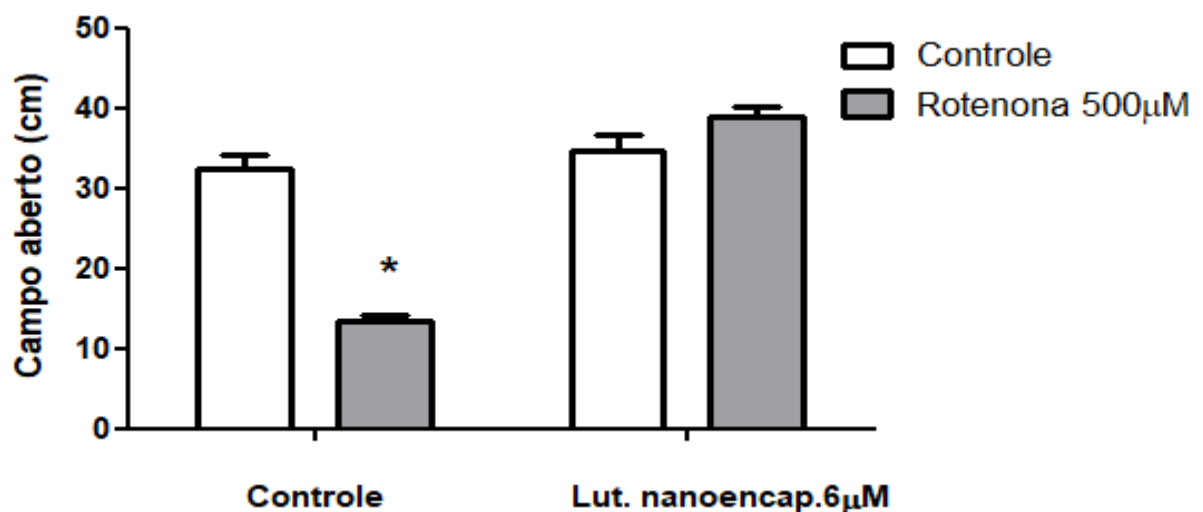


Figura 1. Efeito da Lut. nanoencap. 6 µM na resposta da atividade locomotora Geotaxia negativa (Tempo de escalada) e (motora e exploratória) na tarefa de campo aberto de moscas expostas à (ROT) 500 µM por de 7 dias. (A) Geotaxia negativa; (B) Campo aberto. Quinze moscas por grupo foram incluídas para os testes. Significância determinada por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni * Diferença significativa comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

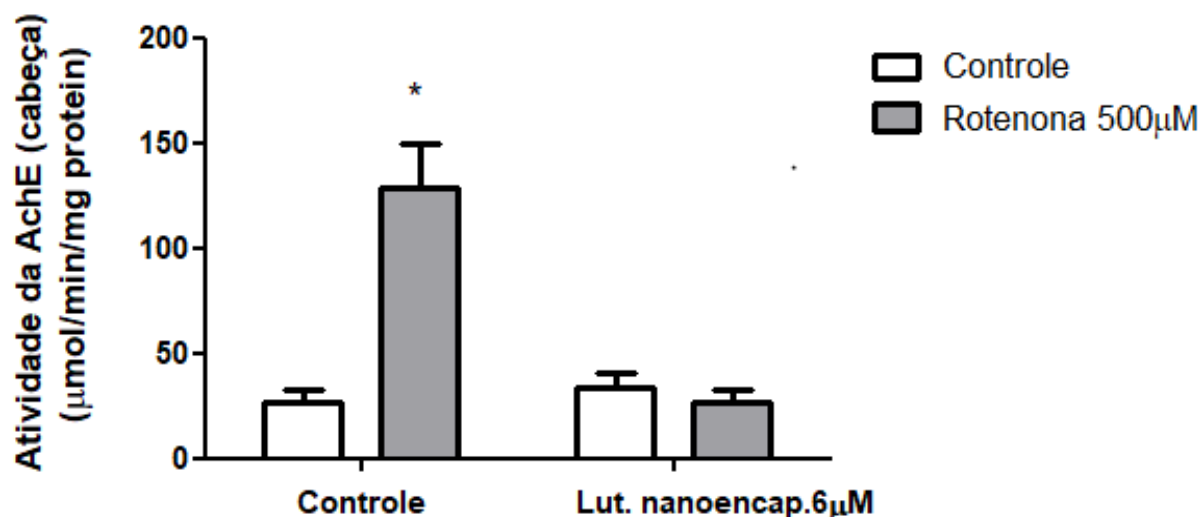


Figura 2. Efeito da Lut. nanoencap. 6 μ M nas alterações induzidas pela rotenona 500 μ M (ROT) na atividade da AChE (μ mol / min / mg proteína) na amostra de cabeça de *Drosophila melanogaster* adultas. Significância determinada pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. * Diferença significativa comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho a luteína nanoencapsulada mostrou-se efetiva, preservou os danos locomotores e na atividade da AChE induzida por rotenona em *Drosophila melanogaster*. Tal efeito pode ser devido à sua ação antioxidantes e sua nanoencapsulação.

REFERÊNCIAS

- BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**. v. 211, n. 1, p. 51–76. Jun. 2012.
- BRADFORD, M, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, n.1, p. 248-254, May. 1976.
- DALPIAZ, A, K.; FILOSA, P.; CAPRARIIS, G.; CONTE, F.; BORTOLOTTI, C.; BIONDI, B. Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycosyl conjugate, Int. **J. Pharm**. v. 336, p. 133–139, 2007.
- ELLMAN, A. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**. v. 82, p.70–77, 1961.
- FEANY, M, B.; BENDER, W,W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v.404, p. 394–398, Mar. 2000.
- GAKI, G, S.; PAPAVALASSILIOU, A, G. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neuro Molecular Med**, v.16, n. 2, p. 217–230, Jun. 2014.
- GAO, L.; WU, T. The study of brain functional connectivity in Parkinson's disease. **Transl Neurodegener**, v. 5, p. 18, Oct. 2016.

GORUSUPUDI, A.; BASKARAN, V. Wheat germ oil: a potential facilitator to improve lutein bioavailability in mice. **Nutrition**, v. 29, p. 790–5, 2013.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 9, n.3, p. 504–23, Aug. 2010.

KIM, J, H.; HWAN, J.; SHIM, E.; CHUNG, E.; JANG, S, H.; KOH, S. Association of serum carotenoid , retinol , and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. **Nutr Res Pract**, v. 11, p. 114–120, 2017.

LEWIS, M, M.; DU, G.; SEM, S.; KAWAGUCHI, A.; TRUONG, Y.; LEE, S, ET AL. Differential involvement of striato- and cerebello-thalamo-cortical pathways in tremor- and akinetic/rigid-predominant Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 177, p. 230–239, 2011.

NATARAJ, J.; MANIVASAGAM, T.; THENMOZHI, A, J. Lutein protects dopaminergic neurons against MPTP-induced apoptotic death and motor dysfunction by ameliorating mitochondrial disruption and oxidative stress. **Nutr Neurosci**, v. 19, p. 237–246, 2016.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration : What is it and where are we . **J Clin Invest**, v. 111, p. 3–10, 2003.

REIN, M, J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S, K.; SILVA, P, M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, p. 588–602, 2013.

SPRENGER, F.; POEWE, W. Management of Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson`s Disease. **CNS Drugs**, v. 27, p. 259–272, 2013.

SUDATI, J, H.; VIEIRA, F, A.; PAVIN, S, S.; DIAS, G, R, M.; SEEGER, R, L.; GOLOMBIESKI, R, ET AL. Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**, v. 37, p.118-126, 2013.

VISHWANATHAN, R.; KUCHAN, M, J.; SEM, S.; JOHNSON, E, J. Lutein is the Predominant Carotenoid in Infant Brain: Preterm Infants Have Decreased Concentrations of Brain Carotenoids. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.59, n. 5, p. 659-65, Nov, 2014.

XIE, X.; TAO, Q.; ZOU, Y.; ZHANG, F.; GUO, M.; WANG, Y, ET AL. PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: Characterizations and mechanisms. **J Agric Food Chem**, v. 59, p. 9280–9289, 2011.

ZHANG, X.; LU, L.; LIU, S.; YE, W.; WU, J.; ZHANG, X. Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxina model of Parkinson's disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 45, p. 265–272, 2013.