

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOELMUSÕES FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ROTENONA ATRAVÉS DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

OSMAR VIEIRA RAMIRES JÚNIOR<sup>1</sup>; GABRIELA DE MORAES SOARES ARAUJO<sup>2</sup>; BARBARA DA SILVA ALVES<sup>3</sup>; PAULA ALICE BEZERRA BARROS<sup>4</sup>; CRISTIANA LIMA DORA<sup>5</sup>; MARIANA APPEL HORT<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande - FURG – junior.vieira.ramires@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande - FURG – gabrieladmsaraugo@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande FURG – bsilvaalves89@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal do Rio Grande - FURG – alicebarros.pb@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande - FURG – cristianadora@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal do Rio Grande - FURG – marianaappel@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na população mundial, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer. A estimativa é que no mundo todo cerca de 6-10 milhões de pessoas convivam com a DP, sendo predominante o sexo masculino o mais acometido (VERMA et al., 2015). No Brasil acredita-se que existam mais de 630 mil pessoas portadoras dessa doença. A previsão é que em 2030 a prevalência de indivíduos com a DP na população mundial em geral duplique, juntamente com o aumento da expectativa de vida (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016).

Clinicamente a DP é caracterizada por um conjunto de sintomas denominados parkinsonismo, o qual inclui: rigidez muscular, bradicinesia e/ou tremor em repouso, podendo ainda ocorrer a disfunção da marcha e instabilidade postural. Além desses, também ocorrem sintomas não motores como: alterações sensoriais, distúrbios do sono, comprometimento cognitivo, distúrbios autonômicos e demência (NIEDZIELSKA et al., 2016). Patologicamente, a doença é caracterizada pela perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos, principalmente na região da substância negra na parte compacta (SNc) e também pela formação e agregação tóxica de α-sinucleína (αS) que formam os corpos de Lewy (CL) (VERMA et al., 2015).

Dados da literatura demonstram que o estresse oxidativo apresenta-se como uma das principais causas da neurodegeneração na DP, possuindo importante papel na morte dos neurônios dopaminérgicos, redução de dopamina e inclusões citoplasmáticas de αS. Além disso, sabe-se que a inibição do complexo I mitocondrial associada ao estresse oxidativo está presente na DP (CHERAN, 2013). A disfunção mitocondrial pode comprometer células nervosas, levando às alterações comportamentais e a aceleração do processo neurodegenerativo (ZEEVALK et al., 2005).

Atualmente o tratamento da DP é apenas sintomático. A levodopa (l-Dopa) é o fármaco mais utilizado, no entanto possui efeitos adversos graves e não reduz a progressão da doença. Alternativamente, compostos fenólicos com propriedades antioxidantes vêm sendo estudados devido às suas propriedades benéficas, que podem contribuir para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas (SOLANKI et al., 2015).

A curcumina (CUR) é um composto polifenólico extraído das raízes do açafrão (*Curcuma longa*), que possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Estudos têm demonstrado que a CUR possui efeito

neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, especificamente na DP (HAMAGUCHI; YAMADA, 2010). Entretanto o uso desse composto antioxidant como agente terapêutico pode estar limitado à sua, reduzida absorção, baixa biodisponibilidade e rápida eliminação do organismo (MYTHRI; BHARATH, 2012).

Pesquisas têm utilizado a nanotecnologia como uma ferramenta para melhorar a permeabilidade, solubilidade, estabilidade, além de aumentar a entrega de compostos bioativos em locais alvos, incluindo o cérebro (PODSÉDEK et al., 2014). Além disso, os sistemas de entrega de fármacos na escala nanométrica são altamente benéficos, pois podem aumentar a distribuição de compostos bioativos, permearem às membranas celulares e elevar o tempo de meia vida de diversas moléculas (YAO et al., 2014). Recentemente, estudos feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que nanopartículas lipídicas de CUR foram capazes de reduzir o estresse oxidativo e causar neuroproteção em modelos experimentais de neurotoxicidade induzida por rotenona, sugerindo que o uso destes nanocarreadores é promissor na prevenção e tratamento da DP (KUNDU et al., 2016).

Levando em consideração que dados da literatura demonstram um potencial preventivo e terapêutico da CUR para a DP, e que o uso de nanopartículas demonstra ser uma estratégia promissora no aprimoramento dos efeitos farmacológicos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor de nanoemulsões contendo CUR (NC) e da CUR isolada em um modelo experimental da DP em camundongos. Para isso foram avaliados os efeitos das NC e da CUR sobre as alterações bioquímicas (marcadores de estresse oxidativo e atividade do complexo I mitocondrial) após a exposição crônica dos animais à rotenona.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos Swiss, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Pelotas - UFPEL (Pelotas, RS, Brasil). Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas brasileiras ditadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental (nº 23116.004990/2015-48) foi aprovado junto à Comissão de Ética de Uso em animal da Universidade Federal de Rio Grande – FURG, sob o parecer nº P056/2015.

As NC foram preparadas pelo método de difusão de solvente a quente associado à temperatura de inversão de fases. Os camundongos foram tratados com veículo (carboximentilcelulose, CMC 0,5%), nanoemulsões brancas (NB), CUR (C25, 25 mg/kg; C50, 50 mg/kg) ou NC (NC25, 25 mg/kg; NC50, 50 mg/kg) por via oral por 30 dias. No oitavo dia foram expostos à rotenona (1 mg/kg) por via intraperitoneal até o 30º dia. O grupo controle (C) recebeu CMC 0,5% por via oral e veículo da rotenona por via intraperitoneal. Após o tratamento, foram eutanasiados e o cérebro foi removido para análise de lipoperoxidação sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ACAP (a capacidade antioxidante contra radicais peroxil) e atividade do complexo I da cadeia respiratória.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito anteriormente, a DP está associada à presença de estresse oxidativo no tecido cerebral. Assim, alguns parâmetros de estresse oxidativo foram investigados no cérebro dos animais submetidos aos tratamentos

previamente descritos. Os camundongos tratados com CMC ou NB e ROT apresentaram um aumento significativo nos níveis de TBARS em comparação ao grupo controle ( $p<0,001$  CMC + ROT;  $p<0,01$  NB + ROT), indicando que a ROT foi capaz de causar peroxidação lipídica no tecido cerebral. O tratamento com CUR e NC nas duas doses testadas reduziu significativamente a peroxidação lipídica ( $p<0,05$  C25 + ROT;  $p<0,01$  C50 + ROT;  $p<0,05$  NC25 + ROT e NC50 + ROT) quando comparados aos grupos CMC + ROT e NB + ROT, respectivamente. No entanto, apesar de ter reduzido significativamente este parâmetro, o tratamento com NC não foi significativamente diferente da CUR, tais resultados corroboraram com os achados de JAVED et al., (2016).

A capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) não foi afetada pelo tratamento com ROT. No entanto, o grupo tratado com CUR nanoemulsionada dose de 50 mg/kg, apresentou um aumento significativo na capacidade antioxidante quando comparado com o grupo tratado com NB + ROT ( $p<0,01$ ) e o grupo CUR 50 + ROT ( $p<0,05$ ). Estes dados indicam que a NC na dose mais alta testada foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante da CUR quando comparada à sua forma livre. Tais resultados corroboram com o estudo de KUNDU et al., (2016) que verificou que nanopartículas contendo curcumina e piperina foram capazes de reduzir a neutotoxicidade da rotenona.

A disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, particularmente o complexo I e o subsequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) contribui para a DP. Nesta análise foi verificado que os animais que receberam CMC e NB juntamente com a rotenona tiveram uma redução significativa na atividade do complexo I, quando comparados ao grupo controle ( $p<0,001$ ). O tratamento com CUR, na dose de 25 mg/kg, previu de forma significativa ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo CMC + ROT. Além disso, o tratamento com NC em ambas as doses (25 e 50 mg/kg) também previu a inibição da atividade do complexo I ( $p<0,001$ ) em relação ao grupo NB + ROT. Ainda foi possível verificar nesta análise que o tratamento com NC nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi mais efetivo em prevenir a inibição da atividade do complexo I ( $p<0,001$ ), comparado com o tratamento com CUR, nestas mesmas doses. Esses resultados indicam que a CUR na forma nanoemulsionada apresentou melhor efeito que a CUR sobre a inibição da atividade do complexo I da cadeia respiratória induzido pela rotenona. Nossos resultados vão de acordo com o estudo feito por KHATRI; JUVEKAR, (2016) onde foi avaliado o papel neuroprotetor da curcumina contra o comprometimento da disfunção mitocondrial em camundongos tratados cronicamente com rotenona.

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi identificado nesse estudo que as NC podem ser um sistema promissor para o tratamento da DP, pois melhoraram os efeitos da CUR. Os efeitos sobre a inibição do complexo I e os marcadores de estresse oxidativo, eventos chave da degeneração dopaminérgica, confirmam o potencial neuroprotetor destes nanocarreadores.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOVOLENTA, T.; FELÍCIO, A. O doente de Parkinson no contexto das Políticas Públicas de Saúde no Brasil. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 3, p. 7-9, 2016.

CHERAN. Neuroprotective effect of aquandous extract of *Selaginella delicatula* as evidenced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative dysfunctions, e neurotoxicity in mice. **Cellular e molecular neurobiology**, v. 33, n. 7, p. 929-942, 2013.

HAMAGUCHI, T., ONO, K., & YAMADA, M. Curcumin e Alzheimer's disease. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 285-297, 2010.

JAVED, H., AZIMULLAH, S., HAQUE, M. E., & OJHA, S. K. Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress e neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of Parkinson's disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, p. 321, 2016.

KHATRI, D. K., & JUVEKAR, A. R. Archana Ramesh. Propensity of *Hyoscyamus niger* seeds methanolic extract to allay stereotactically rotenone-induced Parkinson's disease symptoms in rats. **Oriental Pharmacy e Experimental Medicine**, v. 15, n. 4, p. 327-339, 2015.

KUNDU, P., DAS, M., TRIPATHY, K., & SAHOO, S. K. Delivery of Dual Drug Loaded Lipid Based Nanoparticles across the Blood–Brain Barrier Impart Enhanced Neuroprotection in a Rotenone Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. **ACS chemical neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1658-1670, 2016.

MYTHRIB. R.; SRINIVAS M BHARATH, M. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 1, p. 91-99, 2012.

NIEDZIELSKA, Ewa et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094-4125, 2016.

PODSĘDEK, A., REDZYNIA, M., KLEWICKA, E., & KOZIOŁKIEWICZ, M. Matrix effects on the stability e antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SOLANKI, I., PARIHAR, P., MANSURI, M. L., & PARIHAR, M. S. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Advances in nutrition**, v. 6, n. 1, p. 64-72, 2015.

VERMA, A. K., RAJ, J., SHARMA, V., SINGH, T. B., SRIVASTAVA, S., & SRIVASTAVA, R. Plasma prolidase activity e oxidative stress in patients with Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2015, 2015.

YAO, M., XIAO, H., & MCCLEMENTS, D. J. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, e reassembly of lipid nanoparticles. **Annual review of food science e technology**, v. 5, p. 53-81, 2014.

ZEEVALK, G.; BERNARD, L.; SONG, C.; GLUCK, M.; EHRHART, J. Mitochondrial inhibition e oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 2005.