

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CURCUMINA LIVRE E NANOENCAPSULADA EM MODELO DE AMNÉSIA EM CAMUNDONGOS E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS OXIDATIVO

DIELEN BENEVENTANA LUDTKE<sup>1</sup>; KARLINE DA COSTA RODRIGUES<sup>2</sup>;  
MELIZA DA CONCEIÇÃO OLIVEIRA<sup>3</sup>; MANOEL RODRIGUES DA SILVA  
NETO<sup>4</sup>; SANDRA ELISA HASS<sup>5</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [dielenludtke@gmail.com](mailto:dielenludtke@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [line.karline@hotmail.com](mailto:line.karline@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [melizacoliveira@hotmail.com](mailto:melizacoliveira@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal do Pampa – [manoelrodrigues.aluno@unipampa.edu.br](mailto:manoelrodrigues.aluno@unipampa.edu.br);

<sup>5</sup>Universidade Federal do Pampa – [sandra.haas@gmail.com](mailto:sandra.haas@gmail.com);

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [cristiane\\_luchese@yahoo.com.br](mailto:cristiane_luchese@yahoo.com.br) (orientadora)

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa de alta prevalência e uma das principais causas de demência, manifestando sintomas como perda de memória e dificuldades em atividades diárias complexas (RASKIN et al., 2015). Ademais, uma via frequentemente afetada em distúrbios como a DA é o aumento do estresse oxidativo em pacientes com a doença (PENNISI et al., 2016). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (ER) e sua neutralização pelo sistema antioxidante, uma de suas consequências resulta em um desequilíbrio em macromoléculas do organismo, como no caso dos lipídeos (CHIAPINOTTO SPIAZZI et al., 2015).

Neste sentido, o tecido cerebral que apresenta alto teor lipídico e alto consumo de oxigênio, torna-se suscetível ao processo de peroxidação lipídica (SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2013). Todavia, a fisiopatologia da DA não está totalmente esclarecida e, dado que os tratamentos disponíveis atualmente não impedem completamente a progressão da doença, é importante investigar possíveis alternativas terapêuticas, como no caso de compostos naturais.

Assim, a Curcumina (Cur) exibe propriedades antioxidantes que podem estar envolvidas em uma promissora opção terapêutica para impedir a progressão da DA, entre outras atividades benéficas (YAVARPOUR et al., 2019). No entanto, a biodisponibilidade reduzida da Cur limita sua aplicação terapêutica e formulações nanotecnológicas emergem como alternativa promissora, podendo gerar melhorias na entrega da Cur (DUSKEY et al., 2017).

Neste estudo, empregou-se duas formulações de nanocápsulas (Nc) poliméricas carregadas com Cur: uma catiônica (Eudragit-EUD) e uma aniônica (Policaprolactona - PCL). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Cur livre e nanoencapsulada em um modelo de amnésia induzido por escopolamina (ESC) em camundongos. Como teste comportamental foi realizado o teste da esQUIVA inibitória avaliando a memória aversiva de longo prazo, bem como foram analisados os níveis de ER e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex cerebral e hipocampo dos animais, como parâmetros oxidativos *ex vivo*.

### 2. METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido em conformidade com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 038773/2021-50). As formulações de Cur com polímero EUD (catiônica) e PCL

(aniônica) foram realizadas na Universidade Federal do Pampa – Uruguaiiana, baseado em método previamente descrito (SANTOS et al., 2021).

Para avaliar o efeito dos tratamentos com Cur livre e Nc de Cur, foram utilizados dois protocolos de tratamentos. Um protocolo correspondia a administração diária dos tratamentos (Protocolo 1) e outro correspondia a tratamentos em dias alternados (Protocolo 2). Os camundongos machos adultos da raça Swiss (25-30g) foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (8 animais/grupo) para ambos os protocolos: Grupo I (controle); Grupo II (Nc Cur PCL); Grupo III (Nc Cur EUD); Grupo IV (Cur livre); Grupo V (ESC). Os grupos I e V receberam uma solução de Tween 2% (10 ml/kg, via intragástrica (i.g.) por gavagem, veículo de diluição do composto). O grupo II foi tratado com Nc Cur PCL, o grupo III com Nc Cur EUD, e o grupo IV com Cur livre, todos a 10 mg/kg (i.g. por gavagem). Trinta minutos depois, os grupos II, III, IV e V receberam ESC (0,4 mg/kg, intraperitonealmente (i.p)), enquanto o grupo I recebeu solução salina a 0,9% (5 ml/kg, i.p., veículo de diluição da ESC).

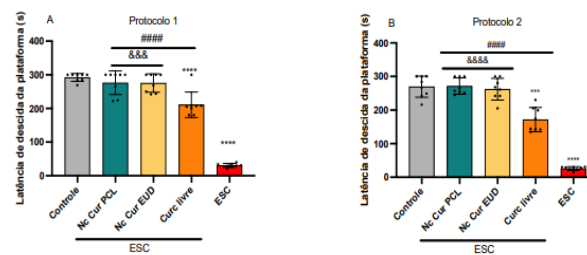
Trinta minutos após a indução, os animais foram submetidos a testes comportamentais, incluindo o teste de esQUIVA inibitória para avaliar a memória aversiva que será apresentada neste trabalho. O teste ocorreu nos dias 10 e 11 do protocolo experimental e consistiu em duas seções. Primeiramente, foi realizado o treino, onde os animais foram submetidos a estímulos elétricos de 0,5 mA por 2 segundos até que os animais permanecessem por 1 min na plataforma segura. Vinte e quatro horas após o treino foi realizado o teste, sendo cronometrado a latência de descida do animal da plataforma, mas sem a exposição ao estímulo elétrico (SAKAGUCHI et al., 2006).

Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados e eutanasiados por meio de inalação de isoflurano. Em seguida, os córtices cerebrais e hipocampus foram removidos para avaliar os níveis de TBARS (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979) e de ER (LOETCHUTINAT et al., 2005). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguidos pelo teste de Tukey, quando apropriado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

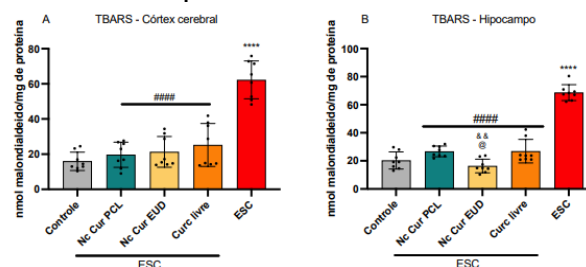
As Figuras 1A e 1B apresentam os resultados obtidos no teste da tarefa de esQUIVA inibitória. Foi possível observar que todos os tratamentos preveniram de maneira significativa a redução no tempo de latência de descida da plataforma, causado pela indução com ESC, quando comparados com os controles. Este efeito foi observado em ambos os protocolos de tratamentos, diários e em dias alternados (Fig 1A e Fig 1B).

Vale destacar que os camundongos tratados com Nc Cur PCL ou Nc Cur EUD apresentaram um efeito mais significativo na atenuação na latência de descida da plataforma reduzida pela ESC, em comparação com o grupo da Cur livre. Com isto, constata-se que o tratamento proposto parece atenuar danos cognitivos como do tipo amnésico, verificado no atual modelo.



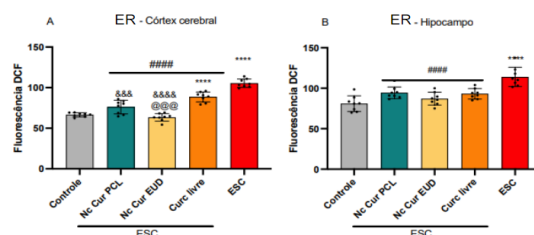
**Figura 1.** Efeito dos tratamentos no modelo induzido por escopolamina (ESC) na esQUIVA inibitória de redução. No primeiro protocolo (1A), latência(s) para cair da plataforma na fase de teste, e no segundo protocolo (1B), latência(s) para cair da plataforma na fase de teste. Os dados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. (\*) denota  $p < 0,05$ ; (\*\*) denota  $p < 0,01$ ; (\*\*\*\*) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle; (####) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo ESC; (&&&) denota  $p < 0,001$  em comparação com o grupo PCL Cur (análise de variância unidirecional/teste de Tukey).

A Figura 2 apresenta os resultados referentes aos níveis de TBARS no córtex cerebral (Figura 2A) e no hipocampo (Figura 2B) de camundongos. Ressalta-se que todos os tratamentos foram eficazes em proteger contra o aumento dos níveis de TBARS causados pela indução por ESC, em ambas as estruturas cerebrais. No que se refere ao hipocampo (Figura 2B), é relevante destacar que as Nc Cur EUD apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Nc Cur PCL e Cur livre. Desta forma, a indução com ESC causou uma peroxidação lipídica no córtex cerebral e hipocampo dos camundongos, enquanto os tratamentos modularam o desequilíbrio oxidativo.



**Figura 2.** Os tratamentos tiveram um efeito sintomático benéfico contra o aumento do comportamento do malondialdeído causado pela escopolamina (ESC) em (2A) córtices cerebrais, (2B) hipocampus. Os valores de atividade enzimática são expressos em nmol de malondialdeído/mg de proteína. Os dados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. (\*\*\*\*) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle; (####) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo ESC; (@) denota  $p < 0,05$  em comparação com o grupo Cur livre; (&&) denota  $p < 0,01$ ; em comparação com a análise de variância unidirecional do grupo PCL Cur/teste de Tukey).

A Figura 3 apresenta os níveis de ER no córtex cerebral (Figura 3A) e no hipocampo (Figura 3B) dos camundongos. Todos os tratamentos realizados foram eficazes em proteger frente o aumento dos níveis de ER, causado pela administração de ESC, em ambas as estruturas cerebrais. No córtex cerebral (Figura 3A), é importante ressaltar que ambas Nc apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo Cur livre, e que além disso, o grupo Nc Cur EUD também foi diferente estatisticamente do grupo Nc Cur PCL. Portanto, observa-se um aumento de estresse oxidativo a nível de ER após a indução com ESC nas estruturas cerebrais, e os tratamentos atenuaram esse desequilíbrio oxidativo.



**Figura 3.** Os tratamentos tiveram um efeito sintomático benéfico contra o aumento dos níveis de RS causados por escopolamina (ESC) nos (9A) córtices cerebrais, (9B) hipocampus. Os valores da atividade enzimática são expressos em fluorescência DCF. Os dados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. (\*\*\*\*) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle; (####) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo ESC; (@@@) denota  $p < 0,001$  em comparação com o grupo Cur livre; (&&&&) denota  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo PCL Cur (análise de variância unidirecional/teste de Tukey).

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que há indícios que os tratamentos com Cur livre e Nc de Cur em ambas as formulações propostas desempenham um efeito protetor frente aos parâmetros oxidativos e cognitivos no modelo de amnésia induzida por ESC em camundongos. Especificamente, nestes parâmetros aqui demonstrados as Nc demonstraram um efeito mais significativo, em relação a Cur livre, resultado esperado, uma vez que Nc tendem a aumentar a biodisponibilidade de moléculas. Entretanto, é fundamental aprofundar as pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação desses compostos em processos cognitivos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALMUS, I.-M.; CIOBICA, A. Main Plant Extracts' Active Properties Effective on Scopolamine-Induced Memory Loss. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 32, n. 7, p. 418–428, 1 nov. 2017.
- CHIAPINOTTO SPIAZZI, C. et al. Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 976908, 2015.
- DUSKEY, J. T. et al. Current Strategies for the Delivery of Therapeutic Proteins and Enzymes to Treat Brain Disorders. p. 1–28, 1 jan. 2017.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.
- PENNISI, M. et al. Inflammasomes, hormones, and antioxidants in neuroinflammation: Role of NLRP3 in Alzheimer disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 7, p. 1360–1372, 8 nov. 2016.
- RASKIN, J. et al. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. **Current Alzheimer. Research**, v. 12, n. 8, p. 712–722, 11 set. 2015.
- SAKAGUCHI, M. et al. Effects of systemic administration of  $\beta$ -casomorphin-5 on learning and memory in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, n. 1-2, p. 81–87, jan. 2006.
- SANTOS, R. B. DOS et al. Curcumin-loaded nanocapsules: Influence of surface characteristics on technological parameters and potential antimalarial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111356, jan. 2021.
- SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid Peroxidation Triggers Neurodegeneration: A Redox Proteomics View into the Alzheimer Disease Brain. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 157–169, 1 set. 2013.
- YAVARPOUR-BALI, H.; GHASEMI-KASMAN, M.; PIRZADEH, M. Curcumin-loaded nanoparticles: a novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 4449–4460, jun. 2019.
- LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, fev. 2005.