Avaliação do efeito motor do extrato de *Passiflora alata* em um modelo animal de Doença de Parkinson

Thaynara Fernandes da Silva (PIBIC/FA), e-mail: thayfds2015@gmail.com, Edmar Miyoshi (Orientador), e-mail do orientador: edmiyoshi@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEFAR-SEBISA

Área: Farmacologia - 2.10.00.00-0

Subárea: Neuropsicofarmacologia - 2.10.03.00-9

1. **Palavras-chave:** Antioxidante, modelos comportamentais, prejuízos Motores

2. Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente. Um dos agentes ambientais comumente correlacionada com a DP é o paraquat, um herbicida que tem como mecanismo a ação de estresse oxidativo pela alteração na cadeia mitocondrial. Plantas da espécie *Passiflora alata* possuem caráter antioxidante e podem ser uma fonte de substâncias neuroprotetoras. O objetivo desse trabalho consistiu em avaliar o possível efeito motor do extrato hidroalcoólico de *P. alata* no modelo de Doença de Parkinson que utiliza *Drosophila melanogaster* exposta ao paraquat. Inicialmente foi realizado a padronização do teste de intoxicação por paraquat. As moscas foram expostas a concentração de paraquat (20 mM). Foi avaliada a taxa de sobrevivência durante sete dias e a atividade motora das moscas no sétimo dia através do teste RING. Posteriormente, foi avaliado o efeito protetor das concentrações do extrato de *P. alata* (200 e 500 mg/mL) na taxa de sobrevivência e atividade motora pós-exposição ao paraquat. Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível perceber que o tratamento, durante 7 dias, com o extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata* promoveu um efeito protetor, tanto na porcentagem de sobrevivência das moscas quanto no comportamento motor avaliado, no modelo de doença de Parkinson.

3. Introdução

A Doença de Parkinson (DP), que é uma doença neurológica de caráter crônico e progressivo (LENKA; PADMAKUMAR; PAL, 2017).

Dentre as toxinas ambientais relacionadas com o desenvolvimento de DP, destaca-se o paraquat, que consiste em um herbicida de baixo custo e um rápido tempo de ação e por isso, é amplamente utilizado em ambiente agrícola. Seu mecanismo de ação reside na formação de espécies reativas de oxigênio e, posteriormente, estresse oxidativo (HUTSON, 2010). Moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, têm sido um poderoso organismo para modelar doenças neurodegenerativas humanas, visto que possuem um alto índice de conservação biológica entre seus genomas e o genoma humano (BILEN; BONINI, 2005).

Devido à baixa disponibilidade de tratamentos para a doença, tem se buscado outros métodos, como a utilização de plantas do gênero *Passiflora* que possui compostos com caráter antioxidante. A Farmacopéia Brasileira apresenta as espécies *Passiflora alata* e a *Passiflora edulis* (ANVISA, 2010). Rudnicki (2005) cita que o

extrato hidroalcoólico das folhas das espécies *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* apresentam atividade antioxidante significativa, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*".

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar um possível efeito neuroprotetor do extrato de *Passiflora alata* em um modelo de DP em *Drosophila melanogaster* expostos ao Paraquat.

4. Material e Métodosoo

4.1 Coleta da planta e preparação do extrato

A planta (*Passiflora alata*) foi coletada em Curitiba – PR, e após a coleta foi levada a estufa a 37ºC para secagem. A preparação do extrato da *P. alata* foi realizada utilizando as folhas e pecíolos secos em aparelho de Soxhlet usando o Etanol 5% como solvente.

4.2 Animais

Foram utilizadas moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, que foram mantidas em incubadora BOD à 24ºC, ciclo claro/escuro de 12h, umidade de 60% e alimentadas com dieta padrão (farinha de milho, açúcar, sal, leite em pó, gérmen de trigo, levedura e ágar). Os espécimes progenitores ficaram neste meio até o casalamento e postura de ovos, após os adultos foram removidos e as moscas que eclodiram foram utilizadas nos tratamentos (2-3 dias de idade).

As moscas foram divididas em 6 grupos, sendo eles: Grupo 1 sacarose; Grupo 2 extrato *P. alata* 200mg; Grupo 3 extrato *P. alata* 500mg; Grupo 4 paraquat 20mM; Grupo 5 extrato *P. alata* 200mg + paraquat 200mg; Grupo 6 extrato *P. alata* 500mg + paraquat 20mM.

4.3 Teste de sobrevivência

As moscas foram expostas a concentração de 20mM de paraquat durante seis dias, para que no sétimo dia pudesse ser feita a taxa de mortalidade das mesmas.

4.4 Teste RING

O teste de RING (Rapid Interative Negative Geotaxis) primeiramente descrito por Gargano et al (2005) baseia-se na avaliação do desempenho locomotor de *Drosophila melanogaster* através da capacidade de escalada. No 7º dia, moscas (fêmeas e machos) foram coletadas e transferidas para os tubos de vidro do aparato RING. O ensaio é iniciado com a estimulação da resposta de geotaxia negativa das moscas através de rápidas batidas do aparato contra a bancada por três vezes consecutivas. É avaliado o tempo que as moscas levam para subir, no tubo, uma altura de 8 cm.

5. Resultados

5.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS RESULTANTES DO TRATAMENTO COM OS EXTRATOS

5.1.1 Porcentagem de sobrevivência das moscas

No decorrer dos sete dias foi possível perceber que o grupo paraquat 20mM apresentou menor porcentagem de sobrevivência das moscas quando comparado

com o grupo sacarose (controle) (P<0,05), demonstrando a sua toxicidade. Enquanto que o grupo controle e o grupo tratado com extrato de *P. alata* 200mg/mL e 500mg/ml mantiveram uma linha constante de sobrevivência. Isto demonstra que o extrato de *P. alata*, nas concentrações testadas, não produz um aumento de mortalidade das moscas.

Já no grupo tratado com paraquat 20mM + extrato de *P. alata* com concentração de 500 mg/mL foi possível observar aumento na porcentagem de sobrevivência das moscas quando comparado com o grupo tratado apenas com o paraquat 20mM (P<0,01). O tratamento com extrato de *P. alata* com concentração de 200 mg/mL aumentou a taxa de sobrevivência, entretanto, não houve diferença estatisticamente significante (P>0,05).

5.1.2 Teste RING

Para a análise de dados do teste RING foi realizado o teste de ANOVA de duas vias seguidas de teste post-hoc de Newman Keuls, onde o valor de P<0,0001 demonstou que o paraquat aumenta o tempo de locomoção das moscas quando comparado com o grupo controle, fazendo uma correlação com prejuízo da atividade motora em pacientes com DP.

O tratamento com as concentrações de extratos per se não influencia na atividade motora das moscas. Enquanto que nos grupos extrato de *P. alata* (200 e 500) + paraquat, houve uma reversão do prejuízo motor causado pelo paraquat, sendo que a concentração de 500 mg/mL pode ser considerada mais eficiente que a concentração de 200mg/mL.

6. Discussão

Os efeitos tóxicos do paraquat geralmente se baseiam pela reação de oxidação-redução, ou seja, pela transferência de um elétron para o NADP, formando o NADPH e formas oxidadas potencialmente tóxicas como o radical superóxido (SCHMITT et al., 2006a). Desta forma, a exposição ao paraquat 20mM causou a morte de 55% das moscas. Estudos mostram que o paraquat possui efeitos neurotóxicos, porém ainda não se tem muito conhecimento sobre os mecanismos que levam a esses efeitos.

O prejuízo motor observado no teste RING pode ser devido ao efeito neurotóxico do paraquat nas moscas. No ano de 2002, Manning e colaboradores realizaram um estudo, onde foi possível perceber que a exposição de roedores ao paraquat, causaram características patólogicas semelhantes à Doença de Parkinson, incluindo uma seletiva degeneração de neurônios dopaminérgicos tendo como consequência comprometimentos motores (MANNING-BOG et al., 2002).

Pesquisas envolvendo os extratos de frutas e plantas medicinais ricas em polifenóis vêm ganhando muito interesse por parte da comunidade científica (CHIDAMBARA et al, 2002; ZAINOL, 2003; BANERJEE et al, 2005). No presente estudo, pode-se observar que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. alata* 500 mg/mL produziu um efeito benéfico sobre o modelo animal de DP, submetido ao paraquat, demonstrando assim, o seu efeito neuroprotetor. É possível que o consumo de polifenóis, os quais são conhecidos por possuírem compostos antioxidantes, e a redução de riscos de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (ARTS e HOLLMAN, 2005; HERTOG et al, 1995; KNEKT et al, 2002).

7. Conclusão

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível perceber que o tratamento, durante 7 dias, com o extrato hidroalcoólico de *P. alata* promoveu um efeito neuroprotetor, tanto na porcentagem de sobrevivência das moscas quanto no comportamento motor avaliado pelo teste RING, no modelo de doença de Parkinson.

8. Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Profº Dr Edmar Miyoshi, pela orientação, apoio, confiança e empenho dedicado à elaboração desse projeto. A Pós Doutoranda Marissa G. Schamne pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos. A Universidade Estadual de Ponta Grossa por oferecer o devido suporte para a realização desse projeto, e também à Fundação Araucária, CAPES e CNPq que auxiliaram financeiramente nesse trabalho.

9. Referências

ANVISA, **Farmacopéia Brasileira**, 5ª Edição, 904p., vol. 2, 2010. ARTSARTS IC, HOLLMAN PC. 2005. **Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.** Am J Clin Nutr 81:317S-325S.

BANERJEEBANERJEE A, DASGUPTA N, De B. 2005. **In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit.** Food Chem. 90:727-733.

CHIDAMBARA MURTHY KN, JAYAPRAKASHA GK, Singh RP. 2002a. **Studies on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel extract using in vivo models.** J Agric Food Chem 50:4791-4795.

GARGANO, J. W., I. MARTIN, et al. (2005). **"Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila."** Experimental Gerontology 40(5): 386-395.

HERTOG MG, KROMHOUT D, ARAVANIS C, BIACKBURN H, BUZINA R, FIDANZA F, GIAMPOLI S, JANSEN A, MENOTTI A, NEDELJKOVIC S, . 1995. **Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study.** Arch Intern Med 155:381-386.

HUTSON, C.B; LAZO, C.R. et al. **Traumatic Brain Injury in Adults Rats Causes Progressive Nigrostriatal Dopaminergic Cell Loss and Enhaced Vulnerability to the Pesticide Paraquat**. Journal of Neurotrauma. V.28. p.1783-1801, 2010.

KNEKT P, KUMPULAINEN J, JARVINEN R, RISSANEN H, HELIOVAARA M, REUNANEN A, HAKULINEN T, AROMAA A. 2002**. Flavonoid intake and risk of chronic diseases.** Am J Clin Nutr 76:560-568.

MANNING-BOG, A. B. et al. **The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α-synuclein in mice: paraquat and α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, ASBMB**, v. 277, n. 3, p. 1641– 1644, 2002.

RUDNICKI, Martina. **Propriedades antioxidantes de extratos de Passiflora alata Dryander e de Passiflora edulis Sims.** Porto Alegre, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SCHMITT, G. C. et al**. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat.** J. bras. patol. med. lab, SciELO Brasil, v. 42, n. 4, p. 235–243, 2006.