



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Anacardium occidentale* E DO ÁCIDO ANACÁRDICO NO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

CYBELLE FAÇANHA BARRETO MEDEIROS LINARD

Recife

2014

CYBELLE FAÇANHA BARRETO MEDEIROS LINARD

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Anacardium occidentale* E DO ÁCIDO ANACÁRDICO NO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa.Dra. Simone Sette Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Recife

2014

2

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L735e Linard, Cybelle Façanha Barreto Medeiros.
Efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de anacardium occidentale e do ácido anacárdico no modelo experimental animal da doença de parkinson induzido por rotenona / Cybelle Façanha Barreto Medeiros Linard. – Recife: O autor, 2014.
121 f: il.; fig.; 30 cm.

Orientadora: Simone Sette Lopes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Anacardium occidentale. 2. Estresse oxidativo. 3. Rotenona. 4. Compostos fenólicos. 5. Superóxido dismutase. I. Lopes, Simone Sette (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-203)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 30 de outubro de 2014.

Defesa de Tese de Doutorado de Cybelle Façanha Barreto Medeiros Linard APROVADA, por decisão unânime, em 30 de outubro de 2014 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Saúde, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

Assinatura: _____

ORIENTADOR E PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Simone Sette Lopes
(Depto de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Marcelo C A Rodrigues (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: *Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte*
(Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

Assinatura: _____

QUARTO EXAMINADOR EXTERNO: *Profa. Dra. Ângela Amâncio dos Santos*
(Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

Assinatura: _____

SUPLENTE INTERNO: Prof. Dr. Pedro Rolim Neto
(Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

Assinatura: _____

SUPLENTE EXTERNO : Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti Albuquerque
(Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Recife - UFPE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

DEDICATÓRIA

A Deus por permitir a realização deste trabalho;

Aos meus pais, Raul de Abreu Medeiros e Maria Erileide Façanha Barreto Medeiros, pela dedicação de uma vida em prol dos meus estudos;

Ao meu esposo Roberto Sérgio Sobreira Linard pelos momentos de ausência compreendidos, pelas contribuições, pelas revisões, mas, sobretudo pelo carinho, companheirismo e incentivo em todos os momentos difíceis dessa jornada;

Às minhas filhas Júlia Teresa Medeiros Linard e Laura Teresa Medeiros Linard que tanto alegam meus dias;

Aos meus irmãos, Raul Jr., Rômulo Façanha e Régis Façanha pelo carinho e incentivo indispensáveis para o cumprimento desse percurso.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Simone Sette, pela oportunidade, confiança, respeito, incentivo, amizade, alegria e principalmente, pela enorme dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela co-orientação, disponibilidade e atenção.

À Profa. Dra. Belmira Lara pelo apoio técnico, orientação científica, disponibilidade, atenção, incentivo, amizade e principalmente, pela enorme dedicação na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Teresa Trevisan pela disponibilidade, sugestões e imensa contribuição, mesmo a distância.

Ao Prof Dr. Filipe Duarte pelas contribuições científicas e as palavras amigas;

A todos os meus familiares por serem sempre tão presentes e tão estimuladores do meu sucesso.

Aos animais que tiveram suas vidas ceifadas em prol da ciência.

A amiga Juciene Rodrigues com quem iniciei o aprendizado experimental do trabalho desta tese.

A Adriana Pastre, mais que uma companheira nessa jornada, pelo incentivo, amizade, ajuda na execução dos experimentos, sugestões, conselhos e críticas;

Ao meu amigo “irmão” Adriano Ramos que muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho;

À amiga Germana Freire pelo apoio técnico, disponibilidade, atenção e orientação;

Aos queridos amigos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clinica de Produtos Bioativos Alice Valença, Arthur Amorim, Eliadna Lemos, Hyago Texeira, Juliano, Marjorie Denti, Paulo, Rebeca, Renata Ribas, Samara, Shirliane Nayane, Thaynne, Vitor Carvalho, Vitor Sales pelo companheirismo e auxílio durante o tempo em que trabalhamos juntos.

Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Farmacologia e de Biofísica pela colaboração, especialmente Aline, Dyjanah, Eraldo, Luana, Ricielle, Sr. Fredson, Bruna, Patricia, Rose e Silvana pela amizade e por serem sempre tão solícitos.

Ao corpo docente e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marcelo Cairão, Prof. Dr. Filipe Duarte, Profa. Dra. Ângela Amâncio, Prof. Dr. José Lamartine, Profa. Dra. Julianna Ferreira por terem aceitado o convite, pela análise e colaboração deste trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que apesar de não citados, ajudaram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído.

“Não confunda jamais conhecimento com
sabedoria.

Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir
uma vida.”

Sandra Carey

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ácido anacárdico	22
Figura 2 - Efeito do Ácido anacárdico e do extrato de <i>Anacardium occidentale</i> na variação da massa corporal (g) no teste da toxicidade aguda.	44
Figura 3 - Efeito do tratamento com extrato de <i>Anacardium occidentale</i> no teste do campo aberto	46
Figura 4 - Efeito do tratamento com extrato de <i>Anacardium occidentale</i> no teste do <i>rotarod</i>	47
Figura 5 - Efeito do tratamento com extrato de <i>Anacardium occidentale</i> no teste do labirinto em T elevado	48
Figura 6 - Efeito do tratamento com extrato de <i>Anacardium occidentale</i> no teste da catatonia	49
Figura 7 - Efeito do tratamento com extrato <i>Anacardium occidentale</i> na peroxidação lipídica	50
Figura 8 - Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do Ácido anacárdico e do butil-hidroxi-tolueno	51
Figura 9 - Efeito do tratamento com Ácido anacárdico no teste do campo aberto	53
Figura 10 - Efeito do tratamento com Ácido anacárdico no teste do <i>rotarod</i>	54

Figura 11 - Efeito do tratamento com Ácido anacárdico no teste do labirinto em T	55
Figura 12 - Efeito do tratamento com Ácido anacárdico na peroxidação lipídica	56
Figura 13: Efeito do tratamento com Ácido anacárdico na atividade da superóxido dismutase total	58
Figura 14: Fotografias com microscopia de epifluorescência mostrando seções sagitais do cérebro no nível da substância negra processadas por coloração com Fluoro-Jade C	59

RESUMO

O aumento da população idosa tem levado a uma crescente incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. O consumo de alimentos de origem vegetal e o uso das propriedades terapêuticas de muitas plantas destacam-se desde os primórdios da humanidade. *Anacardium occidentale* Linn, conhecido popularmente como cajueiro, é uma árvore nativa do Norte e Nordeste do Brasil. Seu pseudofruto possui elevado teor de vitamina A, do complexo B, C e compostos fenólicos. O ácido anacárdico, composto fenólico obtido a partir do *Anacardium occidentale*, possui propriedades terapêuticas tais como: antimicrobiana, gastroprotetora, anticarcinogênica e anti-inflamatória. Evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram que tanto o *Anacardium occidentale* quanto o ácido anacárdico possuem baixa toxicidade e efeitos antioxidantes, sugerindo potencial uso terapêutico. Entretanto, nenhum desses estudos foi realizado para testar o efeito antioxidante da administração sistêmica do *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico no sistema nervoso central em modelo experimental de doença de Parkinson. Neste estudo hipotetizamos que *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico podem exercer neuroproteção no córtex cerebral e no sistema nigroestriatal contra o estresse oxidativo induzido pela rotenona. Ratos adultos foram tratados por via oral com extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* (150 e 600 mg/kg), ácido anacárdico (1-100 mg/kg) ou veículo, 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg) por via subcutânea durante 5 dias consecutivos. O comportamento dos animais foi avaliado nos testes do campo aberto, *rotarod*, catatonía e labirinto em T. Os sinais de neurodegeneração na substância negra, lipoperoxidação no sistema nigroestriatal e córtex cerebral e dosagem da enzima superóxido dismutase total também foram avaliados. Os grupos tratados com *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico melhoraram a neuromotricidade nos testes comportamentais e, nas doses de 150 e 600 mg/kg de *Anacardium occidentale* no córtex, diminuíram a lipoperoxidação, provocados pela rotenona, em 47 e 62%, respectivamente; no estriado, em 32 e 56%, respectivamente; e na substância negra, na dose de 600 mg/kg, em 76%. O aumento da atividade da enzima superóxido dismutase total foi detectada usando ácido anacárdico 25-100 mg/kg em todas as regiões analisadas. Este aumento variou de acordo com a região, correspondendo a cerca de 80% na substância negra, 53% no córtex cerebral e de 230% no corpo estriado. O ácido anacárdico também diminuiu sinais de neurodegeneração provocados pela rotenona na substância negra. A administração oral de *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico impediram a neurotoxicidade induzida pela rotenona em ratos, em parte, devido à sua ação moduladora sobre a enzima superóxido dismutase total, reduzindo neurodegeneração no sistema nigroestriatal e no córtex cerebral.

Palavras chaves: *Anacardium occidentale*. Estresse oxidativo. Rotenona. Compostos fenólicos. Superóxido dismutase

ABSTRACT

The increase in the elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide. The consume of vegetable source foods and the use of the therapeutic properties of many plants excel from the dawn of humanity. *Anacardium occidentale* Linn, popularly known as cashew tree is a tree native of the North and Northeast region of Brazil. Its pseudofruit has high level of vitamin A, B, C and phenolics compounds. The anacardic acid, a phenolic compound obtained from *Anacardium occidentale*, possesses therapeutic properties such as antimicrobial, gastroprotective, anticarcinogenic and anti-inflammatory. Evidences *in vitro* and *in vivo* showed that both *Anacardium occidentale* as anacardic acid have low toxicity and antioxidant effects, suggesting potential therapeutic use. However, none of these studies was accomplished to test the antioxidant effect of the systemic administration of *Anacardium occidentale* and anacardic acid in the central nervous system in experimental model of Parkinson's disease. At this study we hypothesized that *Anacardium occidentale* and anacardic acid may exert neuroprotection in the cerebral cortex and in the nigrostriatal system against oxidative stress induced by rotenone. Adult rats were treated orally with *Anacardium occidentale* hydroethanolic extract (150 and 600 mg/kg), anacardic acid (1-100 mg/kg) or vehicle, 1 hour before administration of rotenone (3 mg/kg) subcutaneously for 5 consecutive days. The animals behavior was assessed in the open field test, *rotarod*, catatonia and maze T. The neurodegeneration signs in the nigra substance, lipid peroxidation in the nigrostriatal system and cerebral cortex and superoxide dismutase total enzyme dosage were also evaluated. The groups treated with *Anacardium occidentale* and anacardic acid improved their neuromotricity in the behavioral tests and, when using doses of 150 and 600 mg/kg of *Anacardium occidentale* in the cortex, reduced the lipid peroxidation, caused by rotenone, by 47 and 62%, respectively; in the striatum, by 32 and 56%, respectively; and in the nigra substance, when using doses of 600 mg/kg, by 76%. The increase in the superoxide dismutase total enzyme activity was detected using anacardic acid 25-100 mg/kg in all regions analised. This increase varied according to the region, corresponding to approximately 80% in the nigra substance, 53% in the cerebral cortex and 230% in striatum. Anacardic acid also decreases neurodegeneration signs caused by rotenone in the nigra substance. The oral administration of *Anacardium occidentale* and anacardic acid prevented the neurotoxicity induced by rotenone in rats, part due to their modulating action on the superoxide dismutase total enzyme, reducing neurodegeneration in the nigrostriatal system and cerebral cortex.

Key words: *Anacardium occidentale*. Oxidative stress. Rotenone. Phenolic compound. Superoxide dismutase.

SUMÁRIO

1 Introdução	17
2 Revisão bibliográfica	20
2.1 <i>Anacardium occidentale</i> Linn	21
2.2 Ácido anacárdico	22
2.3 Estresse oxidativo	24
2.4 Doença de Parkinson	26
2.5 Modelo animal de doença de Parkinson induzido por rotenona	28
3 Objetivos	30
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 Materiais e métodos	32
4.1 Processamento e obtenção do extrato hidroetanólico de <i>Anacardium occidentale</i>	33
4.2 Processamento e obtenção do ácido anacárdico	34
4.3 Drogas e reagentes	34
4.4 Animais	35
4.5 Grupos experimentais	35
4.6 Avaliação da Toxicidade Aguda	36
4.7 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do ácido anacárdico	36
4.8 Testes comportamentais	37
4.8.1 Teste do campo aberto	37
4.8.2 Teste do <i>rotarod</i>	38
4.8.3 Teste do labirinto em T elevado	38
4.8.4 Teste da catatonia	39
4.9 Ensaios bioquímicos do córtex, substância negra e estriado	39
4.9.1 Dissecção da área cerebral e homogeneização dos tecidos para dosagens bioquímicas	39
4.9.2 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> – lipoperoxidação	40
4.9.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase	41
4.10 Avaliação da neuroproteção pelo Fluoro Jade C	41
5 Análise estatística	42
6 Resultados	43
6.1 Avaliação da Toxicidade Aguda	44

6.2 <i>Anacardium occidentale</i>	45
6.2.1 Efeito do tratamento com <i>Anacardium occidentale</i> no teste do campo aberto	45
6.2.2 Efeito do tratamento com <i>Anacardium occidentale</i> no teste do <i>rotarod</i>	47
6.2.3 Efeito do tratamento com <i>Anacardium occidentale</i> no teste do labirinto em T elevado	48
6.2.4 Efeito do tratamento com <i>Anacardium occidentale</i> no teste da catatonia	49
6.2.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> (lipoperoxidação) do <i>Anacardium occidentale</i>	50
6.3 Ácido anacárdico	51
6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do Ácido anacárdico	51
6.3.2 Efeito do Ácido anacárdico no teste do campo aberto	52
6.3.3 Efeito do tratamento com Ácido anacárdico no teste do <i>rotarod</i>	54
6.3.4 Efeito do tratamento com Ácido anacárdico no teste do labirinto em T elevado	55
6.3.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> (lipoperoxidação) do Ácido anacárdico	56
6.3.6 Efeito do tratamento com Ácido anacárdico na atividade da superóxido dismutase total	57
6.3.7 Efeito do Ácido anacárdico na neuroproteção pelo Fluoro Jade C	59
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69
Apêndice A	80
Apêndice B	88
Anexos	115
Anexo A	116
Anexo B	117
Anexo C	118
Anexo D	119

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL – Micrograma por mililitro

ANOVA - Análise de variância

BHT – Hidroxi tolueno butilado

DMSO - Dimetil sulfoxide

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH⁺ - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

EPM – Erro padrão da média

i.p. – Intraperitoneal

IC₅₀ - Concentração da amostra necessária para inibir 50 % do radical

LCC – Líquido da casca da castanha do caju

mg – Miligrama

mM – Milimolar

nMol – Nanomole

p.v. – Peso por volume

pH – Concentração hidrogeniônica

SOD - Superóxido dismutase

v.o. – Via oral

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população idosa tem levado a uma crescente incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. Com isso, o interesse por estudos que visem a prevenção e cura destas enfermidades é de grande valia. Várias evidências têm demonstrado que muitas destas afecções estão relacionadas com a produção excessiva de radicais livres e de substâncias pro-inflamatórias. Assim, constituintes naturais derivados de plantas medicinais possuem grande importância, uma vez que esses compostos apresentam uma gama de atividades biológicas, dentre elas, atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória com potencialidades terapêuticas (MANDEL e YODIM, 2004).

A utilização de alimentos de origem vegetal e o uso das propriedades terapêuticas de muitas plantas se destacam desde os primórdios da humanidade. No Brasil, encontra-se uma flora muito extensa e com potencial terapêutico a ser investigado. O *Anacardium occidentale*, conhecido popularmente como cajueiro, é uma árvore originária do Norte e Nordeste do Brasil. Seu pseudofruto ou polpa do caju (pedúnculo) é consumido pelo seu sabor e seu alto valor nutritivo, principalmente pelo teor elevado de vitaminas A, B e C, sais minerais como cálcio, fósforo e ferro e por compostos fenólicos, dentre eles destaca-se o ácido anacárdico. Este ácido é obtido, em maior quantidade, a partir da casca da castanha do caju. Aos compostos fenólicos são atribuídas propriedades antioxidantes (BROINIZI et al., 2007, 2008), as quais estão associadas à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ROMANO et al., 2013). Pesquisas constataram que o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (BEHL, 1998), Huntington (ALEXI et al., 2000; ROSENSTOCK et al., 2004) e Parkinson (ZHANG et al., 2000) estão vinculadas a níveis elevados de estresse oxidativo, alterações mitocondriais e apoptose. O estresse oxidativo pode ser definido como um evento resultante do desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante e a geração de substâncias oxidantes como as espécies reativas de oxigênio, onde os oxidantes são favorecidos podendo levar a danos celulares (NORAZIT et al., 2012).

A doença de Parkinson é um distúrbio neurológico progressivo, caracterizado histopatologicamente pela degeneração dopaminérgica nigroestriatal, via

responsável pela produção de dopamina (SHERER et al., 2003; OBESO et al., 2000). A dopamina é um neurotransmissor que está relacionado principalmente com a função de coordenação dos movimentos, atividade cognitiva e límbica (WATTS et al., 1997; LANG e LOZANO, 1998). Sabe-se que a própria degradação espontânea da dopamina resulta em estresse oxidativo, com produção de ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (HAUSER and HASTINGS, 2013). Ocorre ainda um processo neuroinflamatório com ativação de células da glia e liberação de óxido nítrico (RODRÍGUEZ et al., 2013). A presença de estresse oxidativo na doença de Parkinson está associada ao aumento da oxidação de lipídios, de ácido desoxirribonucleico e de proteínas e com a geração de espécies reativas de oxigênio, que são espécies químicas instáveis (ZHANG et al., 1999; SUBRAMANIAM e ELLIS, 2013^a).

A doença de Parkinson continua a ser umas das principais causas de deficiência neurológica e sua prevalência ocorre em todo o mundo, em todos os grupos raciais e étnicos, o que justifica os esforços destinados a melhorar o seu tratamento. Entretanto, até o momento não foi encontrado uma terapêutica definitiva que cure ou impeça, de forma efetiva, a progressão desta doença, sendo que, as drogas utilizadas atualmente no tratamento da doença de Parkinson são apenas sintomáticas, uma vez que nenhuma delas faz desaparecer a degeneração neuronal (HALLIWELL, 2006). Desta forma, substâncias naturais e de baixo custo que possam atuar protegendo as células do estresse oxidativo, minimizando as alterações mitocondriais, da inflamação e apoptose, são fortes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da cura e da prevenção. O *Anacardium occidentale* e o ácido anacárdico possuem várias atividades farmacológicas, mas não é conhecido ainda os efeitos destes compostos em um modelo experimental da doença de Parkinson. Com isso, este trabalho hipotetiza que o *Anacardium occidentale* e o ácido anacárdico possam exercer atividade neuroprotetora no córtex cerebral e no sistema nigroestriatal contra estresse oxidativo induzido pela rotenona, um modelo animal de doença de Parkinson.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização de espécies vegetais com atividades biológicas antecede a história humana escrita. As primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham princípios ativos, os quais, ao serem experimentados no combate às doenças, revelaram empiricamente seu poder curativo. Sua utilização, portanto, pode ser uma estratégia terapêutica na prevenção e cura de doenças neurodegenerativas.

2.1 *Anacardium occidentale* Linn

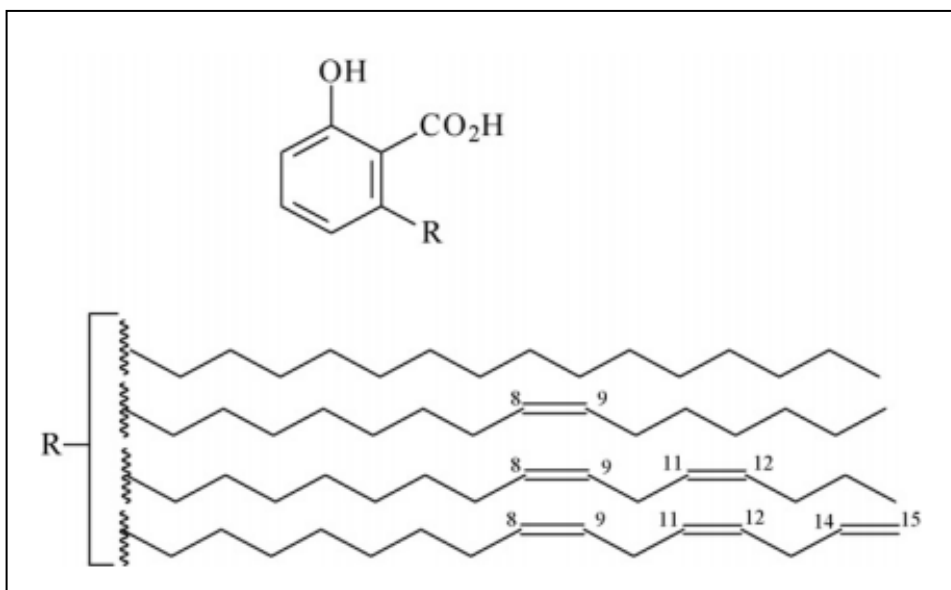
A família das Anacardiaceae, à qual pertence o cajueiro, envolve o gênero *Anacardium* com várias **espécies** diferentes. A variedade mais comum, o *Anacardium occidentale* L., é uma árvore originária do norte e nordeste do Brasil, sendo particularmente bem conhecida pelo comércio de sua castanha. O cajueiro é a cultura de maior importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil. (CORRÊA, 1984).

A casca do caule é utilizada na medicina popular africana no tratamento de artrite, febre, dores e em inflamações de extremidades. Possui propriedades antiinflamatórias por meio da diminuição da produção de citocinas bem como bloqueando a expressão gênica da óxido nítrico sintase e da ciclooxigenase 2 pelo bloqueio de proteínas quinases ativadas por mitógenos (OLAJIDE et al., 2013). O pseudofruto ou polpa do caju (pedúnculo) é consumido pelo sabor especial e pelo alto valor nutritivo, relacionado, principalmente, ao teor elevado de vitamina C. O pedúnculo contém ainda vitamina A, do complexo B e compostos fenólicos e é rico em proteínas, lipídios e carboidratos. O pseudofruto é uma boa fonte de sais minerais como cálcio, fósforo e ferro além de zinco, magnésio, fibras e gordura insaturada (ABREU et al., 2013). A castanha do caju, de sabor muito apreciado, bem como um líquido produzido a partir da casca da castanha do caju (LCC) constituem os principais produtos de exportação (AGOSTIN-COSTA et al., 2004).

O LCC tem sido utilizado na medicina tradicional como um analgésico na lepra e na psoríase, na cicatrização de feridas, no tratamento de úlceras e abscessos dentários (HIMEJIMA e KUBO 1991). O LCC também é utilizado na conservação de

alimentos e na estabilização de tintas, de cimentos e da gasolina, o que aumenta o interesse deste produto para a exportação (GEDAM e SAMPATHKUMARAN, 1986). Ele constitui uma das fontes mais ricas de compostos fenólicos alquílicos do *Anacardium occidentale*, sendo constituído pelos cardóis, de uma pequena proporção de 2-metilcardóis, pelos cardanóis, de material polimérico e pelos ácidos anacárdicos (TREVISAN et al., 2006). Aos compostos fenólicos são atribuídas propriedades antioxidantes (TREVISAN et al., 2006) e, segundo Moraes e colaboradores (2010), a capacidade antioxidante do extrato do caju está relacionada principalmente à presença do ácido anacárdico. O ácido anacárdico é constituído por quinze átomos de carbono com uma, duas ou três insaturações (AGOSTINI-COSTA et al., 2005) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura química ácido anacárdico de acordo com Carvalho et al., (2011)



2.2 Ácido anacárdico

Apenas as plantas e micro-organismos são capazes de sintetizar compostos fenólicos. Eles servem também como pigmentos de flores, agem na proteção constitutiva contra pragas e doenças, funcionam como moléculas sinais e atuam

como compostos alelopáticos, sendo componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo (SIQUEIRA et al., 1991). Os compostos fenólicos são estruturas químicas que representam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere poder antioxidante (ANGELO E JORGE, 2007). A estes compostos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos são atribuídos vários efeitos benéficos, tais como modular a homeostase celular, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica e de atravessar a barreira hematoencefálica (GUSMAN, MALONNE, ATASSI, 2001; CANTOS, ESPÍN, TOMÁS-BARBERÁN, 2002; DE BEER, 2003; FARIA et al., 2014). Possuem propriedades neuroprotetoras, em parte, devido a sua capacidade de eliminar radicais livres e de modular sinais intracelulares (VAUZOUR et al., 2007), sendo úteis na prevenção de danos teciduais cerebrais provocados pelo estresse oxidativo (ANNAPURNA et al., 2013).

O ácido anacárdico é um composto fenólico de interesse devido a sua ampla bioatividade, dentre elas podemos destacar: propriedade inibitória da lipoxigenase (KUBO et al., 2008), parasitocida (CUI et al., 2008), antimicrobiana (CASTILLO-JUÁREZ 2007), gastroprotetora (MORAIS et al., 2010), anti *Helicobacter pylori* (KUBO et al., 2003), anticarcinogênica e anti-inflamatória (SUNG et al., 2008; TAN et al., 2012). Além disso, é um potente inseticida e moluscicida (KUBO et al., 2003) e também um inibidor das enzimas α -glucosidase, da invertase e da aldose redutase, da tirosinase, da xantina oxidase, da lipooxigenase (GRAZZINI et al., 1991; KUBO et al., 2006; OMANAKUTTAN et al., 2012) e da ciclooxigenase, possuindo também atividade antimutagênica e antioxidante (MASUOKA e KUBO, 2004, TREVISAN et al., 2006).

As propriedades antioxidantes do ácido anacárdico são capazes de proteger as células humanas do estresse oxidativo (TREVISAN et al., 2006; MORAIS et al., 2010). Essa atividade é promovida pela cadeia alquenil estando associada com a ligação hidrofóbica da xantina oxidase (MASUOKA e KUBO, 2004). Ela pode ocorrer de várias formas incluindo a inibição de enzimas pró-oxidativas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio, a conversão da maioria das espécies reativas de oxigênio na presença de íons metálicos e a quelatação dos íons divalentes tais como o Fe^{+2} e o Cu^{+2} (LODOVICI et al., 2001; KUBO et al., 2006). Quando a

célula não consegue neutralizar completamente as espécies reativas de oxigênio, estas causam ruptura do balanço redox dentro da célula (CARDOSO et al., 2012)

2.3 Estresse oxidativo

Os radicais livres são espécies químicas, altamente instáveis e extremamente reativas, que, por terem um número ímpar de elétrons na seu orbital externo, são ávidos por interagir com outras substâncias em busca de um elétron para atingir a estabilidade. Em sistemas biológicos, a maioria destes radicais são espécies reativas de oxigênio, sendo as mais comuns o radical aniônico superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; COTINGUIBA et al., 2013).

No organismo humano, a formação de espécies reativas de oxigênio é decorrente de vários processos metabólicos fisiológicos gerados no citoplasma, na mitocôndria ou na membrana celular como: a fagocitose, o metabolismo do ácido araquidônico, a ovulação, a fertilização e a respiração mitocondrial (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SINGH et al., 2004). Embora as espécies reativas de oxigênio possam ser formadas em vários níveis no interior das células, a principal fonte é a cadeia respiratória mitocondrial. Esta faz parte do processo de fosforilação oxidativa e catalisa o transporte de elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo e da ubiquinona para o oxigênio, que resulta na liberação de energia para a produção de adenosina trifosfato. As espécies reativas de oxigênio são formadas como passos intermediários deste processo que termina com a redução completa do oxigênio, devido à entrada de quatro elétrons na reação e formação de água (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; URBANSKA et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio estão particularmente aumentadas em situações patológicas, e podem ser induzidas por fatores exógenos, tais como a exposição a produtos químicos, tabagismo, radiações ionizantes e solares, consumo de gorduras, estresse e poluentes. Em excesso, estes agentes oxidantes podem interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA) das células, promovendo alterações gênicas e estimulando a proliferação celular desordenada. Elas também podem interagir com proteínas, promovendo inativação e alterações enzimáticas, bem como interagir com os lipídios da membrana plasmática (lipoperoxidação), promovendo

mudanças na estrutura e na permeabilidade da membrana e assim induzir a morte celular (HALLIWELL, 2002; PANIERI et al., 2013).

Embora múltiplos fatores possam precipitar o estresse oxidativo nas células, o neurotransmissor excitatório glutamato é o maior indutor deste processo no sistema nervoso central. O glutamato é um neurotransmissor excitatório essencial que ativa diferentes receptores, entre os quais o receptor n-metil-d-aspartato. Este é um receptor ionotrópico e cuja estimulação provoca a abertura do canal de cálcio e consequentemente aumento do cálcio intracelular. Em situações em que há aumento excessivo deste íon devido à estimulação do receptor n-metil-d-aspartato, pode ocorrer um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e o processo conhecido por excitotoxicidade (GILGUN et al., 2001; GAO et al., 2014). Além disso, o metabolismo do neurotransmissor dopamina é também de extrema importância para a produção das espécies reativas de oxigênio. A degradação espontânea da dopamina resulta na produção de radicais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ânion hidroxila e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (ASANUMA et al., 2004; BISAGLIA et al., 2014). Essas espécies reativas poderiam atacar facilmente o DNA mitocondrial, por ser este desprovido de histonas protetoras, resultando em alteração desta estrutura (ZHANG et al., 1999).

As espécies reativas de oxigênio são fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos por participarem de processos de defesa, entretanto, seu excesso pode produzir danos celulares irreversíveis. As células possuem sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos, que tem por finalidade catalisar reações para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e radicais livres, produzidos durante o metabolismo da respiração aeróbica e oxidação de substrato. A primeira linha de defesa da célula contra o excesso das espécies reativas de oxigênio tem a ação detoxificadora dos agentes oxidantes, antes que eles causem lesões. É constituída pela superóxido dismutase, que catalisa a reação de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, e a catalase, a glutathione reduzida e a glutathione peroxidase, que catalisam a degradação de peróxido de hidrogênio em água. Essas enzimas são capazes de neutralizar os agentes oxidantes e mantê-los em níveis adequados no organismo (TRABER, 1997; BYSTROM et al., 2014; URBANSKA et al., 2014). Durante o envelhecimento fisiológico do cérebro ocorre uma diminuição interativa das enzimas

superóxido dismutase e catalase, levando a um aumento dos radicais livres e apoptose dos neurônios dopaminérgicos (CARDOSO et al., 2012).

O sistema nervoso central possui uma quantidade reduzida de antioxidantes e altas quantidades de lipídeos, tornando-o propenso a ataque de radicais livres. Os principais causadores de danos ao sistema nervoso central são as espécies reativas de oxigênio. As superóxidos dismutases foram descobertas em 1969 por McCord e Fridovich. São metaloenzimas abundantes em células aeróbicas e das mais importantes enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase é uma excelente marcadora do estresse oxidativo e alterações no seu funcionamento estão relacionadas com várias doenças neurodegenerativas, entre elas a doença de Parkinson, onde sua atividade se encontra diminuída (TOKUDA et al., 1993; AVILEZ et al., 2008). A superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase são enzimas cerebrais importantes e o aumento da atividade dessas enzimas pode melhorar a doença de Parkinson devido à ação antioxidante (MANSOURI et al., 2013).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está intimamente associado ao processo da morte celular por apoptose. As espécies reativas de oxigênio têm sido consideradas como pré-requisito para o processo autóptico e o estresse oxidativo teria assim um papel central neste processo (CHANDRA, SAMALI e ORRENIUS, 2000; SINHA et al., 2013). O envolvimento das espécies reativas de oxigênio na progressão da doença de Parkinson levou a investigação sobre a utilização potencial de antioxidantes no tratamento dessa doença (ZHOU et al., 2008).

2.4 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é um distúrbio neurológico progressivo causado pela degeneração de neurônios nigroestriatais responsáveis pela produção de dopamina. Este é o neurotransmissor relacionado principalmente com a função de coordenação dos movimentos (LANG e LOZANO, 1998; DEUMENS, BLOKLAND e PRICKAERTS, 2002; YAN et al., 2013). As características motoras da doença de Parkinson relacionam-se com tremor em repouso; bradicinesia (lentidão na execução de movimentos), rigidez (hipertonia plástica, acometendo a musculatura flexora, determinando alterações típicas de postura) e distúrbio de equilíbrio (decorrente da perda de reflexos de readaptação postural) (LEWIS et al., 2011).

O achado patológico mais consistente nos pacientes com doença de Parkinson é a perda das células pigmentadas da substância negra par compacta. Apesar dos avanços recentes na neurociência, as bases moleculares para diversas doenças neurológicas ainda não estão totalmente compreendidas. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os eventos que culminam com a morte neuronal nas doenças neurodegenerativas (GAO E HONG, 2008; SUBRAMANIAM e CHESSELET 2013^b). Dentre os principais mecanismos estão àqueles relacionados com a excitotoxicidade mediada por aminoácidos excitatórios (glutamato), a formação de agregados protéicos (corpos de Lewy), as alterações da função mitocondrial e a diminuição do metabolismo energético com aumento intraneuronal de cálcio (ORRENIUS, ZHIVOTOVSKI e NICOTERA, 1997; CAUDLE e ZHANG 2009). Além de proteínas pró-apoptóticas, mutações no DNA mitocondrial, acúmulo de ferro em áreas específicas do cérebro, bem como inibição da succinato desidrogenase e da ubiquinona, dos complexos II, III (56%) e IV (33%) da cadeia respiratória mitocondrial, no caso da doença de Huntington, e do complexo I e II, no caso da doença de Parkinson (GU et al., 1996; MANDEL e YODIM, 2004; HALLIWELL, 2006; WHITTON, 2007). Além disso, o envolvimento de processo neuroinflamatório com ativação de células da glia e liberação de citocinas e óxido nítrico (NO), também têm sido frequentemente mencionados em pacientes portadores de doenças neurodegenerativas (WHITTON, 2007; RODRÍGUEZ et al., 2013; LEE et al., 2014). Estes resultados indicam claramente que o processo de neurodegeneração é multifatorial. Não é conhecido ainda qual o evento inicial determinante deste processo e segundo Halliwell (2001, 2002 e 2006), estes eventos constituem um ciclo vicioso que poderia ser iniciado por qualquer um deles tendo como resultado final a morte neuronal.

Existem várias drogas que podem ser usadas para o tratamento das doenças neurodegenerativas. No caso da doença de Parkinson, podem ser utilizados precursores da dopamina (levodopa), anticolinérgicos (biperideno), inibidores da monoamina oxidase tipo B (selegilina) e agonistas dopaminérgicos (bromocriptina) com o intuito de aumentar a estimulação dopaminérgica e diminuir a colinérgica (BÉDARD, 2001). A suplementação com óleo de peixe pode ser uma estratégia eficaz em amenizar os danos celulares característicos da doença de Parkinson por amenizar eventos inflamatórios e oxidativo (CARDOSO et al., 2012). A introdução da

levodopa revolucionou o tratamento da doença de Parkinson (LANG e OBESO, 2004), contudo flutuações motoras e discinesias complicam o tratamento com a levodopa, na maioria dos pacientes, dentro de 5-10 anos do início do tratamento (AHLSKOG e MÜENTER, 2001; BISAGLIA et al., 2014). Além disso, agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolide, lisuride, pramipexole) também apresentam eficácia reduzida após anos de tratamento (LANG e OBESO, 2004). A levodopa e a dopamina são tóxicas para uma variedade de neurônios em modelos *in vitro*. Quando os neurônios são expostos a esses compostos observa-se fragmentação do DNA, encolhimento da célula e alterações no citoesqueleto que caracterizam a apoptose. Esses efeitos podem ser neutralizados com proteína antiapoptótica Bcl₂ e por antioxidante (STERN, 2001). Porém a levodopa ainda é a droga mais eficaz para o controle sintomático da doença de Parkinson.

Não obstante, até o momento não foi encontrada uma terapêutica definitiva que cure ou impeça, de forma efetiva, a progressão destas doenças neurodegenerativas. Assim, as drogas utilizadas no tratamento são apenas sintomáticas, uma vez que nenhuma delas faz desaparecer a degeneração neuronal. Dessa maneira, as pesquisas desenvolvidas nesta área são de extrema importância, pois permitirão o conhecimento mais detalhado da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, levando ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da cura e prevenção.

2.5 Modelo animal de doença de Parkinson induzido por rotenona

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas entre os quais alguns modelos transgênicos e outros farmacológicos. A 6-hidroxidopamina, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina e a rotenona são alguns dos modelos farmacológicos de indução da doença de Parkinson. É nas mitocôndrias que o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina e a rotenona produzem a intoxicação, levando, em modelos animais, a sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson observados em seres humanos (BETARBET et al., 2002).

O modelo da rotenona foi proposto por Alam & Schmidt (2002). A rotenona é um potente membro dos rotenóides, pertencentes à família dos isoflavonóides

obtidos de plantas leguminosas tropicais e comumente usada como pesticida em plantações (MAPOPE e DAKORA, 2013). Atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e acumula-se em organelas intracelulares como as mitocôndrias (PERIER et al., 2003; KARUPPAGOUNDER et al., 2013). O modelo da rotenona promove uma inibição sistêmica do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, pois inibe a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (PERIER et al., 2003; CANNON et al., 2009; KARUPPAGOUNDER et al., 2013). Esta inibição contribui para o aumento da habilidade deste pesticida produzir as espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, gerar estresse oxidativo, pois reagem e formam radicais hidroxilados, altamente tóxicos, com subsequente aumento na peroxidação lipídica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto celular. Na presença deste inseticida, os elétrons provenientes do nicotinamida adenina dinucleotídeo não podem entrar na cadeia de transporte de elétrons, o que resulta na incapacidade de produzir adenosina trifosfato a partir da oxidação do nicotinamida adenina dinucleotídeo (BERNDT et al., 2013). Devido ao dano mitocondrial ocorre entrada excessiva de cálcio e escape de citocromo-C mitocondrial. O acúmulo de radicais também produz inflamação, reação microglial e finalmente apoptose (LEE et al., 2014). Estudos realizados por Sherer e colaboradores (2003) mostrou que a exposição subcutânea à rotenona (2-3 mg/kg) causa lesões seletivas nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, com a formação de agregados de α -sinucleína no citoplasma dos neurônios da substância negra, não sendo observado degeneração em outras regiões cerebrais. O mecanismo pelo qual a α -sinucleína está relacionada à doença de Parkinson e a morte de neurônios dopaminérgicos ainda não foi completamente elucidado, porém evidências de estudos prévios indicam que a vulnerabilidade destes tipo de célula pode estar relacionada ao potencial oxidativo e citotóxico da dopamina (PEREZ et al., 2002).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

♦ Investigar o efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico em modelo experimental da doença de Parkinson;

3.2 Objetivos específicos

♦ Investigar a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico;

♦ Analisar a atividade antioxidante *in vivo* do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*;

♦ Estimar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do ácido anacárdico;

♦ Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico sobre parâmetros comportamentais em modelo experimental da doença de Parkinson;

♦ Verificar o efeito do ácido anacárdico no sistema antioxidante pela quantificação da enzima superóxido dismutase;

♦ Quantificar a neuroproteção do ácido anacárdico pela metodologia do Fluoro Jade C.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Processamento e obtenção do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*

A obtenção do extrato foi feita pela professora Dra Maria Teresa Salles Trevisan da Universidade Federal do Ceará. Os pseudofrutos utilizados são da variedade comercial CCP-76 e tem uma amostra mantida no germoplasma da EMBRAPA. Resumidamente, os pseudofrutos foram colhidos na estação experimental da EMBRAPA agroindústria tropical situada na cidade de Paraipaba, Ceará (s 3° 26'20", o 39° 8'52") durante a safra de 2010, submetidos a um tratamento especial de acordo com o protocolo desenvolvido pela EMBRAPA, descrito por Broinizi e colaboradores (2007) e foram liofilizados e armazenados a - 20°C para análise posterior.

O extrato hidroalcoólico foi preparado de acordo com o método descrito por Krygier e colaboradores (1982), com algumas modificações. O pseudofruto de caju foi inicialmente submetido à extração com éter etílico, a uma proporção de 1:5 (g de amostra: mL de solvente) durante uma hora em um agitador magnético (Modelo RO15 poder IKA® Staufen, Alemanha). O éter é um solvente orgânico, apolar, inerte em reações orgânicas. As moléculas apolares são praticamente insolúveis em água, mas esses compostos tendem a se dissolver em outros compostos orgânicos. Em seguida a solução foi filtrada a vácuo por meio de um funil de Büchner. O resíduo resultante foi extraído novamente com álcool etílico (90%), que é um solvente polar, nas mesmas proporções anteriores, seguindo o mesmo processo, obtendo-se assim o extrato hidroalcoólico. Para administração nos animais, o extrato foi rota evaporado (B525, Micronal), foi extraído a vácuo, a 30 °C, a fim de remover todo o etanol residual, em seguida, ressuspenso em água filtrada. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O extrato obtido possuía em torno de 22% de ácido anacárdico em sua constituição (Anexo C).

4.2 Processamento e obtenção do ácido anacárdico

A obtenção do ácido anacárdico foi feita pela professora Dra Maria Teresa Salles Trevisan da Universidade Federal do Ceará. Resumidamente as castanhas do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn) foram separadas manualmente dos frutos e foram gentilmente cedidas pelo doutor Edy Souza de Brito (EMBRAPA, Fortaleza, Brasil).

Para extração do ácido anacárdico, cascas da castanha do caju foram cortadas em pequenos fragmentos e exaustivamente extraídas com aquecimento brando para obtenção do LCC. Duzentos grama do LCC foi dissolvido em metanol aquoso 5% (1200 mL) e 100 g de hidróxido de cálcio foi adicionado enquanto se agitava a mistura. Essa mistura foi mantida a 50 °C por três horas. O precipitado formado por anacardato de cálcio foi filtrado e lavado com metanol. A mistura de anacardato de cálcio foi dissolvida em água destilada acidificada com ácido clorídrico 1 M, que teve por função remover impurezas básicas, e mantida sob agitação durante uma hora. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o filtrado foi transferido para um funil de separação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila, lavada com água destilada (essa lavagem teve a função de remover materiais altamente polares como sais orgânicos, ácidos ou bases fortes, moléculas de pequeno peso molecular e substâncias polares) e seca com sulfato de sódio anidro, concentrada no evaporador rotatório para fornecer um óleo escuro, caracterizado como uma mistura de ácidos anacárdicos. Em seguida foi concentrado sob pressão reduzida e obtido 120 g de ácido anacárdico (PARAMASHIVAPPA et al., 2003) (Anexo D).

4.3 Drogas e reagentes

Acetato de etila, ácido acético, ácido clorídrico, ácido tiobabitérico, ácido tricloroacético, álcool etílico, álcool n-butílico, BHT, cloreto de sódio, DMSO, DPPH, EDTA, hidróxido de cálcio, epinefrina, éter etílico, hidróxido de sódio, metanol, nonidet, paraformaldeído, permanganato de potássio, phenylmethanesulfonyl fluoride, ortovanadato, rotenona, sacarose, sulfato de sódio, tampão carbonato, tampão fosfato, tetrametoxipropano, tris base, Tween 80, xileno foram adquiridos da

Sigma (St. Louis, MO, USA). Fluoro jade C foi adquirido da Merck Millipore. Óleo de girassol foi adquirido Salada (Bunge).

4.4 Animais

Ratos Wistar machos foram utilizados, pesando entre 280-350 g, entre 3-4 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE e camundongos Swiss machos, pesando entre 40-45 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com acesso livre à ração e água. Dois dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos para o laboratório experimental. Os experimentos foram realizados em sala com controle de temperatura, na fase clara do ciclo.

Todos os protocolos experimentais do projeto de pesquisa foram submetidos à aprovação da comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco mediante processo protocolado sob o número 23076.027073/2010-41 e foram aprovados. (ANEXO A)

4.5 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados da seguinte maneira:

- ◆ Grupo 1 – Controle. Os animais foram tratados com veículo (solução aquosa a 2% Tween 80) por via oral (v.o.) e uma hora após receberam, por via subcutânea (s.c.) solução de óleo de girassol a 10% de DMSO, durante cinco dias consecutivos. Cada animal recebeu um volume fixo de 0,1 mL para cada 100 g de peso corporal;
- ◆ Grupo 2 – Rotenona. Os animais foram tratados com veículo (solução aquosa a 2% Tween 80, v.o.) e, uma hora depois, receberam rotenona 3 mg/kg (s.c.), durante cinco dias consecutivos;
- ◆ Grupos 3 a 10 – Os animais foram divididos em subgrupos, onde cada subgrupo foi tratado por via oral com uma dose diferente de extrato *Anacardium occidentale* (grupo 3 e 4: 150 e 600 mg/kg) ou de ácido anacárdico (grupo 5 a 10: 1,

3, 10, 25, 50 e 100 mg/kg) e uma hora após esse tratamento receberam, rotenona 3 mg/kg (s.c.), durante cinco dias consecutivos.

♦ Grupo ácido anacárdico – Os animais receberam ácido anacárdico (v.o.), 100 mg/kg, durante cinco dias consecutivos. Esse grupo só foi utilizado para a dosagem enzimática.

No dia seguinte foram realizados os testes comportamentais. No final uma parte dos animais foi anestesiada e sacrificada para a realização dos testes bioquímicos e outra parte foi anestesiada e perfundida para a realização da metodologia do fluoro jade C.

4.6 Avaliação da Toxicidade Aguda

Para avaliação da toxicidade aguda do extrato de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico, foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 40 a 45 g, 2 meses de idade, em jejum de 12 horas, com água a vontade. Em cada grupo foram utilizados 3 animais machos e 3 fêmeas. Os camundongos foram tratados com uma dose única de 5 g/kg de peso corporal do extrato *Anacardium occidentale* ou de ácido anacárdico por via oral, preparados imediatamente antes da administração. O grupo controle recebeu igual volume do veículo que é composto por água e Tween 80 a 2%. Após 2 horas de tratamento foi disponibilizada ração aos animais e estes foram observados durante 6 horas e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Parâmetros comportamentais tais como aparência geral, contorção, tremores, piloereção, micção, convulsão, salivação, diarreia, letargia, sono, coma foram observados e registrados em tabela adaptada da descrita por Malone (1977) (ANEXO B). A possível mortalidade e o peso de cada animal, em cada grupo, também foram observados diariamente. No final do período de observação os animais foram pesados e, em seguida sacrificados.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do Ácido anacárdico

A atividade antioxidante do ácido anacárdico foi determinada por ensaio de captura de radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH⁺), desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand - Williams (1995). Esse ensaio tem por base a redução

do radical DPPH⁺, que ao fixar um H⁺ (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir o radical DPPH⁺.

Para avaliação da atividade antioxidante do ácido anacárdico, alíquotas de 1 mL de solução etanólica de DPPH⁺ (3×10^{-2} M) foram adicionadas a 2,5 mL de solução contendo diferentes concentrações do ácido anacárdico. Para realização da curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de butil-hidroxi-tolueno (BHT). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm, após 30 minutos do início da reação. As determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem o antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH⁺, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ proteção} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}$$

Foi calculado o valor da IC₅₀ (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical).

4.8 Testes comportamentais

Os itens a seguir descrevem os testes comportamentais realizados no desenvolvimento deste trabalho.

4.8.1 Teste do campo aberto

A atividade motora foi mensurada no teste do campo aberto. O aparelho usado constitui numa arena circular (uma caixa de madeira com 100 cm de diâmetro e 40 cm de altura). O chão do aparato é dividido com linhas pretas em 20 pequenos segmentos (10x10 cm aproximadamente). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Durante a observação foram avaliados parâmetros como frequência de

locomoção (penetrar em uma unidade com as quatro patas), levantar (apoio sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena), tempo de imobilidade (ausência de atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e patas) e tempo de latência para o início do movimento (tempo que o animal levou para deixar o primeiro quadrante no centro do aparelho). Os tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados por meio de cronômetros, e a limpeza da arena, após a retirada de cada animal, foi realizada com solução de álcool a 5%. Este procedimento é similar aquele descrito por Broadhurst (1957) e Bernardi e Palermo-Neto (1979).

4.8.2 Teste do *rotarod*

O teste do *rotarod* é uma metodologia utilizada para avaliar a coordenação motora do animal, por meio do tempo de permanência deste em uma barra giratória (DUNHAM e MIYA, 1957).

Para execução deste protocolo, o animal foi colocado com as quatro patas sobre uma barra giratória com 7,0 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, em uma rotação de 14 rpm. Cada animal foi submetido a duas sessões de 180 segundos de treinamento, antes do início do tratamento, para aclimatização, conforme descrito por Dunham e Miya (1957). Só foram utilizados no experimento os animais que conseguiram ficar mais de 60 s. Após o tratamento os animais foram colocados na barra giratória e o tempo de permanência foi registrado. Foi utilizado como tempo de corte 180 segundos (KULKARNI, 1999).

4.8.3 Teste do labirinto em T elevado

O teste foi realizado de acordo com Kumar e colaboradores (2006) que utiliza este teste, a fim de avaliar o desempenho da memória límbica e cognitiva em modelos experimentais de neurodegeneração em núcleos basais.

O labirinto em T é composto de um braço aberto oposto (50x10 cm) e dois braços fechados com as mesmas dimensões, com paredes de 40 cm de altura, voltadas uma para a outra e uma zona central (10x10 cm) conectando os braços. Os ratos foram colocados individualmente no final do braço aberto com a face voltada

para a da área central. O tempo levado pelo animal para se mover a partir do braço aberto e entrar em um dos braços fechados foi registado 24 horas após o último dia de tratamento e foi chamado de latência inicial. Os ratos foram permitidos explorar o labirinto por 30 segundos após o registro inicial da aquisição de latência e, em seguida eles foram colocados em suas gaiolas. A retenção de latência foi avaliada novamente no dia seguinte (latência de repetição). O percentual de retenção da memória foi calculado por meio da seguinte fórmula.

$$\frac{(\text{latência inicial} - \text{latência de repetição}) \times 100}{\text{latência inicial}}$$

Imediatamente após o teste de labirinto em T elevado, os animais foram anestesiados e sacrificados para ensaios bioquímicos.

4.8.4 Teste da catatonia

A barra de ensaio padrão foi utilizada para determinar a intensidade da catatonia. A barra foi feita de madeira e tinha um diâmetro de 1,2 cm e uma altura do chão ao topo da barra de 9 cm. Ambas as patas dianteiras do rato foram colocadas suavemente sobre a barra horizontal e o animal foi cronometrado (em segundos, máximo de 180 s) até ele retirar uma das patas dianteiras e ela tocarem o chão. Cada animal foi utilizado para a experiência em uma única vez (Hauber et al., 2001).

4.9 Ensaios bioquímicos do córtex, substância negra e estriado

Os itens a seguir descrevem os ensaios bioquímicos realizados em algumas regiões arquitetônicas do sistema nervoso central.

4.9.1 Dissecção da área cerebral e homogeneização dos tecidos para dosagens bioquímicas

Após as avaliações comportamentais, os animais foram anestesiados, sacrificados por decapitação, os cérebros removidos e os cerebelos descartados.

Estriado, córtex e substância negra foram dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados. Parte das regiões cerebrais analisadas foram homogeneizadas (10% p/v) em solução salina com tampão fosfato 1% com adição de hidroxil tolueno butilado (BHT) 0,004% para a avaliação da peroxidação lipídica e parte das regiões foram homogeneizadas em um coquetel antiprotease (tampão TRIS base – 1 mM, em pH 7,4, ácido etilenodiamino tetra acético – 1 mM, fenilmetanesulfonil fluoride – 2 mM, ortovanadato – 1 mM, nonidet 1%) para a dosagem enzimática. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 22,932 g por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes congelados em freezer à -80 °C para posterior avaliações.

4.9.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* - lipoperoxidação

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica na substância negra, córtex e estriado foram mensurados empregando a metodologia para detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, cuja técnica foi modificada do método de Buege e Aust (1978).

Para a determinação do ácido tiobarbitúrico 1 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (0,375% p/v de ácido tiobarbitúrico, solubilizado em 25 mL de ácido clorídrico 1 N; 0,04% p/v de BHT etanólico e 15% p/v de ácido tricloroacético) foi adicionada a tubos de ensaio contendo 0,5 mL do homogeneizado. A seguir a solução foi agitada em *vortex*, colocada em banho fervente por 15 minutos e resfriada em banho de gelo. Em seguida foram acrescentados 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair a porção lipídica. Os tubos foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 1.010 g. Por último, o produto corado foi retirado, sendo feita então sua leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. O branco continha apenas n-butanol. Para realização dos cálculos, foi feita uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano 1 mM. Os resultados foram expressos em nanomole (nMol) de equivalentes de malonaldeído /mg de proteína. A determinação do conteúdo de proteínas nos homogenatos foi realizada segundo o método de Bradford (1976).

4.9.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método Misra e Fridovich (1972). 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 880 µL (0,05 M, pH 10,2, 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra acético) de tampão carbonato. Foram adicionados 20 µL de epinefrina 30 mM (em 0,05% ácido acético) à mistura e analisada espectrofotometricamente a 480 nm. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da epinefrina em 50%, a qual é igual a uma unidade, por mg de proteína. A determinação do conteúdo de proteínas nos homogenatos foi realizada segundo o método de Bradford (1976).

4.10 Avaliação da neuroproteção pelo Fluoro Jade C

A fim de analisarmos a neurodegeneração, outro conjunto de experimento, foi realizado utilizando Fluoro Jade C de acordo com a Ehara e Ueda (2009). Animais dos grupos experimentais controle, rotenona e grupos tratado com ácido anacárdico com 25 e 100 mg/kg (n=3), foram anestesiados e perfundidos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, seguido pelo fixador paraformaldeído a 4% em solução salina com tampão fosfato, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados no mesmo fixador durante 2 horas, lavados em tampão fosfato, e, subsequentemente, crioprotetidos em soluções de 10, 20, e 30% de sacarose em tampão fosfato.

Blocos cerebrais foram seccionados serialmente em micrótomo de congelação (Leitz Wetzlar) em seções com espessura de 50 microns no plano parasagital. Todas as seções foram coletadas em série com tampão fosfato e dispostos em seis séries. O atlas de Paxinos e Watson (1986) foi utilizado para delimitar a substância negra (antero-posterior -5,2, mesolateral -2,2, profundidade -8,4), região citoarquitectônicas de interesse. As seções de uma série por animal foram montadas em lâminas revestidas com gelatina, secas ao ar e submetidas à coloração Fluoro Jade C.

As lâminas foram imersas numa solução de hidróxido de sódio a 1% (em etanol a 80%) durante 5 min. Lavadas durante 2 minutos em etanol a 70% e durante 2 minutos, em água destilada. Em seguida, as lâminas foram incubadas numa solução de permanganato de potássio 0,06%, durante 5 min. Depois lavadas com

água destilada por 2 minutos, as lâminas foram imersas numa solução Fluoro Jade C (0,0001%, em 0,1% de ácido acético) durante 10 min, seguido novamente de lavagem em água destilada. As lâminas foram secas ao ar em uma estufa a 50 °C durante 30 min, mergulhadas em xileno e depois cobertas com uma lamínula contendo Entellan.

5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando Graph Pad Prism® 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 EUA). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância (ANOVA) seguida, quando necessário, pelo teste de comparação múltipla/post-hoc de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p \leq 0,05$)

RESULTADOS

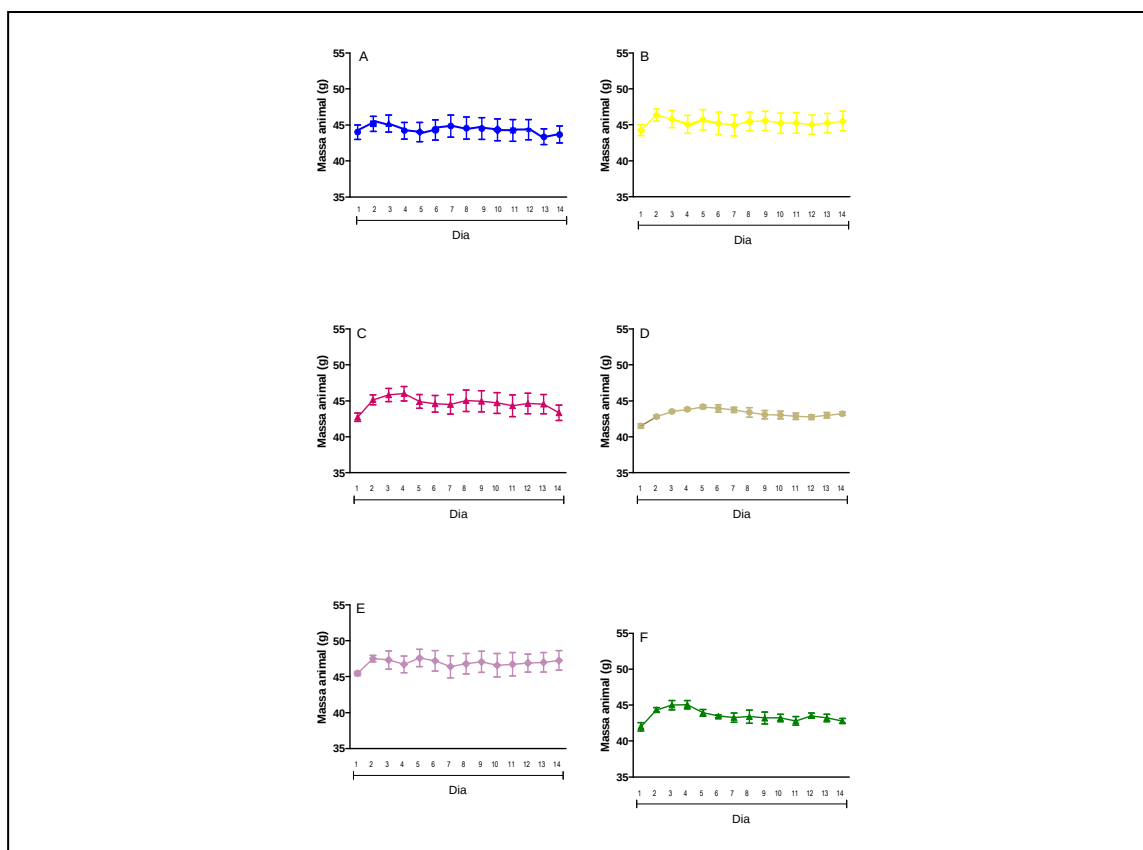
6 RESULTADOS

Os resultados a seguir correspondem aos tratamentos com *Anacardium occidentale* (150 e 600 mg/kg) e ácido anacárdico (1-100 mg/kg).

6.1 Avaliação da Toxicidade Aguda

Durante os 14 dias, nenhuma morte, sinais tóxicos ou sintomas negativos, tais como contorção, piloereção, salivação, diarreia, letargia, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção, tônus muscular, força de agarrar, tremores, convulsão, hipnose, sono, coma (MALONE 1977) foram observados em quaisquer camundongos, após o tratamento agudo, por via oral, com o ácido anacárdico e com o extrato de *Anacardium occidentale*, em uma dose única de 5000 mg/kg. Não foram observadas alterações significativas no consumo de comida e de água (dados não mostrados) ou no peso corporal (Figura 2). A dose letal 50% não pode ser estimada, mas, por isso, foi considerada superior a 5000 mg/kg.

Figura 2: Efeito do ácido anacárdico e do extrato de *Anacardium occidentale* na variação da massa corporal (g) no teste da toxicidade aguda. (A) Grupo controle machos, (B) Grupo ácido anacárdico machos, (C) Grupo extrato de *Anacardium occidentale* machos, (D) Grupo controle fêmeas, (E) Grupo ácido anacárdico fêmeas, (F) Grupo extrato de *Anacardium occidentale* fêmeas na dose de 5000 mg/kg (n = 3 por grupo).



6.2 *Anacardium occidentale*

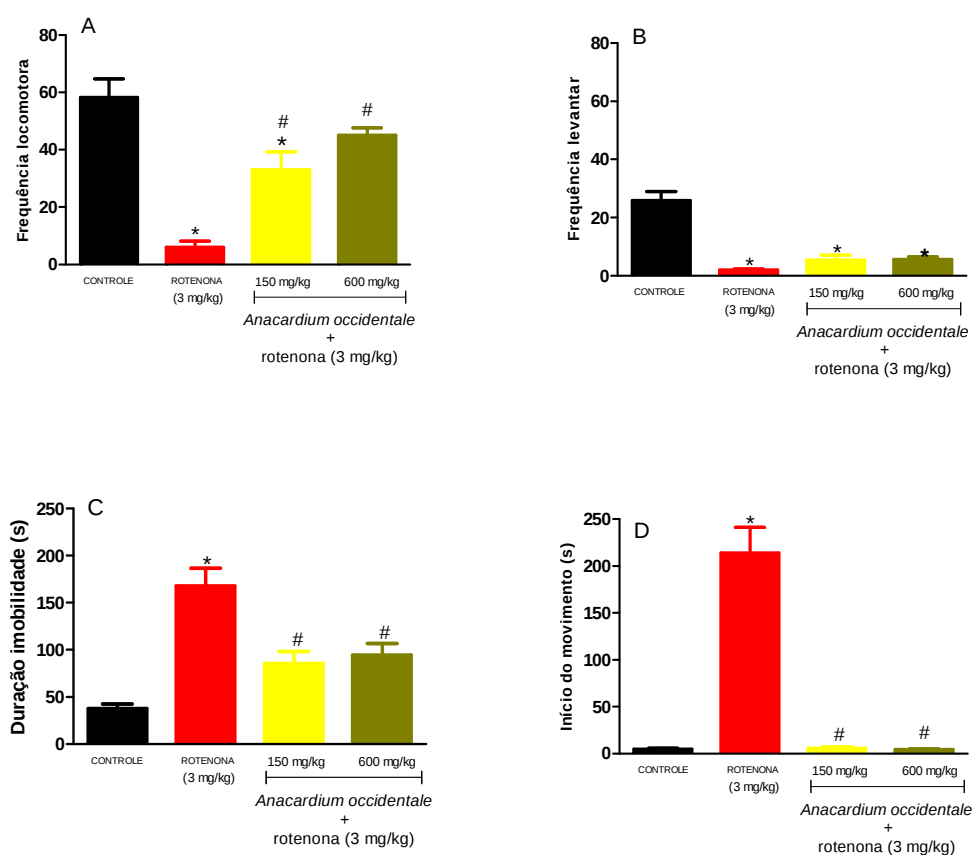
Os resultados a seguir correspondem aos efeitos do tratamento com *Anacardium occidentale* seguido, uma hora após da administração de rotenona.

6.2.1 Efeito do tratamento com *Anacardium occidentale* no teste do campo aberto

A rotenona promoveu uma redução significativa da frequência locomotora de $89\% \pm 2,49$ e da atividade exploratória, quantificada pela frequência de levantar, de $93\% \pm 0,91$, quando comparada aos dos respectivos grupos controle. O tratamento com extrato de *Anacardium occidentale*, nas doses de 150 e 600 mg/kg, por cinco dias, uma hora antes do tratamento com rotenona, aumentou significativamente a atividade locomotora, em aproximadamente $440 \pm 6,23$ e $638\% \pm 5,94$, respectivamente, quando comparado ao grupo rotenona (Figura 3 A). Este mesmo tratamento com extrato não foi capaz de aumentar a frequência de levantar, em relação ao grupo de animais que recebeu somente a rotenona (Figura 3 B).

A duração da imobilidade e a latência no grupo rotenona, aumentaram, significativamente, em relação ao grupo controle. O tratamento com o extrato de *Anacardium occidentale*, nas doses de 150 e 600 mg/kg, favoreceu uma diminuição significativa de $49\% \pm 12,89$ e $44\% \pm 12,37$, no tempo de imobilidade e $97\% \pm 1,29$ e $98\% \pm 0,94$ no tempo para o início do movimento, em relação aos animais do grupo rotenona não sendo diferentes do grupo controle (Figura 3 C e D).

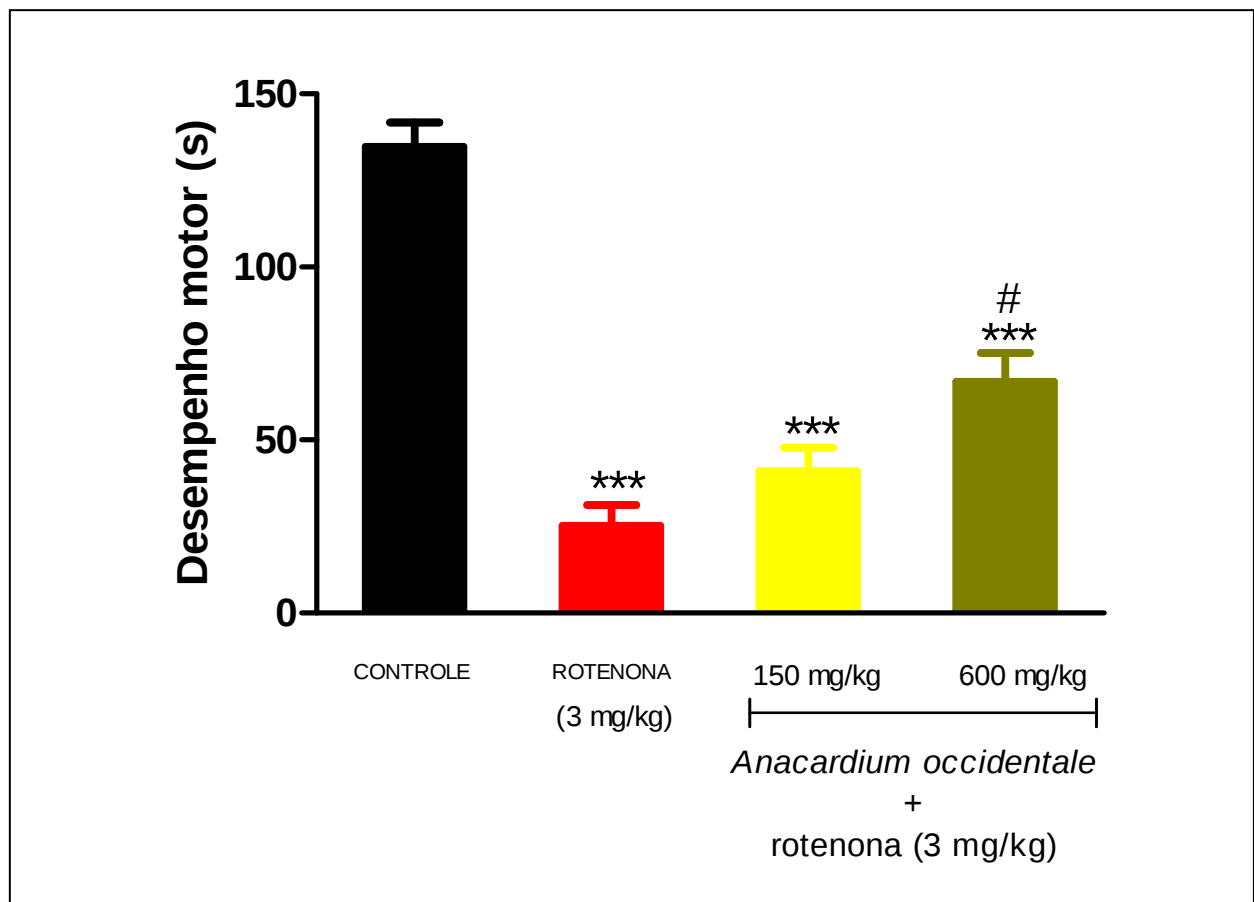
Figura 3: Efeito do tratamento com extrato de *Anacardium occidentale* no teste do campo aberto. (A) Frequência locomotora, (B) frequência de levantar, (C) duração da imobilidade, (D) tempo do início do movimento. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls; *Estatisticamente significativo em relação ao controle (* $p < 0,05$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona (# $p < 0,05$).



6.2.2 Efeito do tratamento com *Anacardium occidentale* no teste do rotarod

A quantificação do desempenho motor foi realizada pelo teste do *rotarod*. A administração de rotenona, durante cinco dias, promoveu uma diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória em $81,28\% \pm 5,95$ no grupo rotenona. Ao passo que o tratamento com o extrato de *Anacardium occidentale* na dose de 600 mg/kg propiciou um aumento significativo de $165\% \pm 8,30$, no tempo de permanência na barra giratória comparado ao grupo rotenona. Na dose de 150 mg/kg houve aumento de $63\% \pm 6,84$ embora não seja significativo (Figura 4).

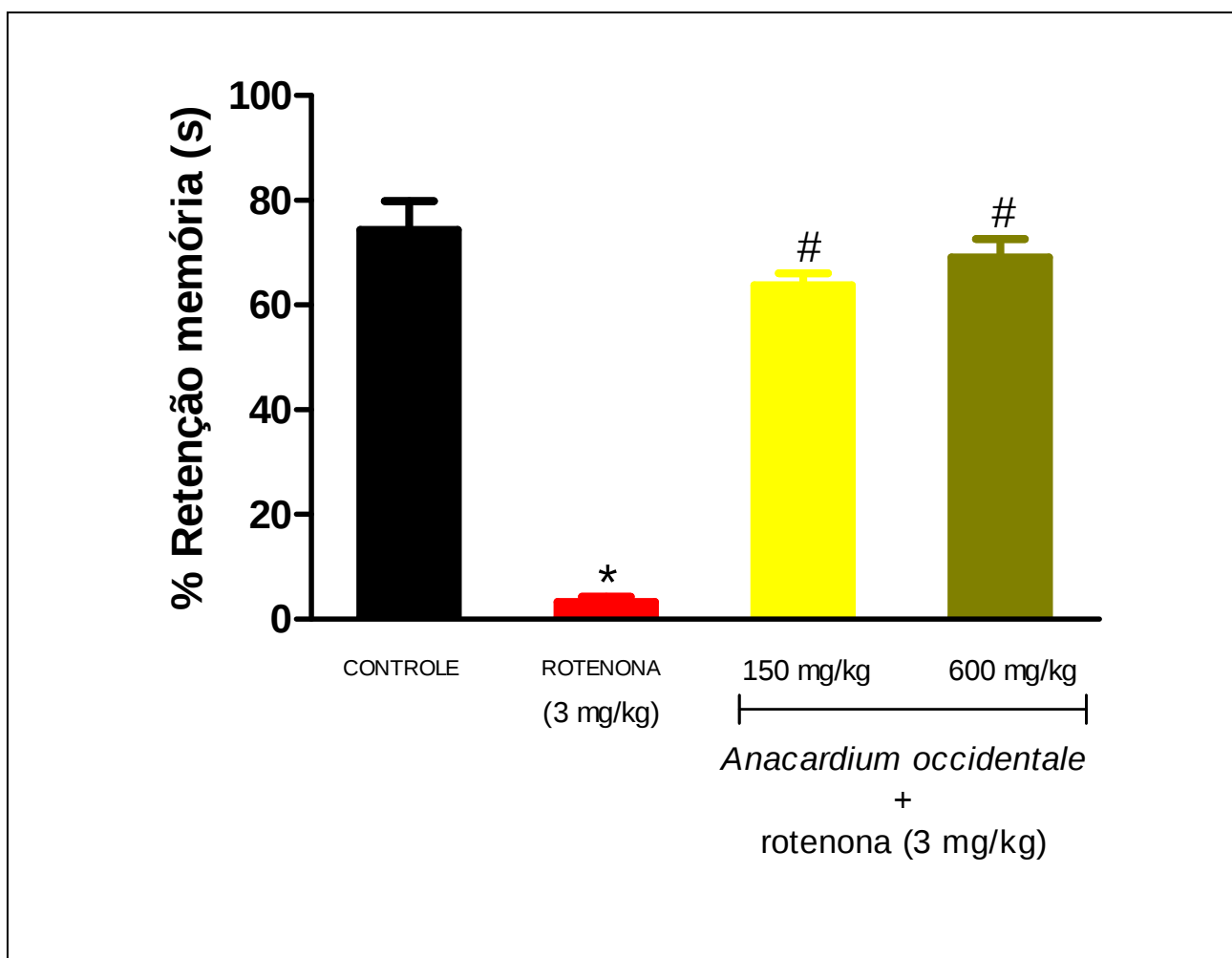
Figura 4: Efeito do tratamento com extrato de *Anacardium occidentale* no teste do *rotarod*. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls; *Estatisticamente significativo em relação ao controle (* $p < 0,05$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona (# $p < 0,05$).



6.2.3 Efeito do tratamento com *Anacardium occidentale* no teste do labirinto em T elevado

A administração de rotenona, por cinco dias, reduziu significativamente o percentual de retenção de memória dos animais em $96\% \pm 1,04$, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com o extrato de *Anacardium occidentale* propiciou um aumento significativo da retenção de memória chegando quase a 100% do valor do controle com ambas as doses de *Anacardium occidentale* utilizadas (Figura 5).

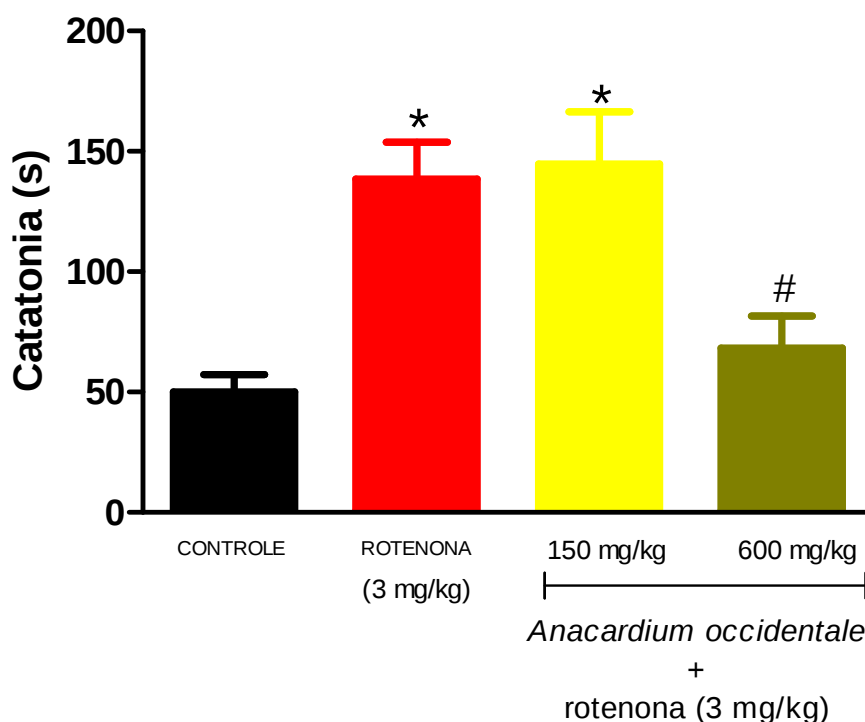
Figura 5 Efeito do tratamento com extrato de *Anacardium occidentale* no teste do labirinto em T elevado. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona ($p < 0,05$).



6.2.4 Efeito do tratamento com *Anacardium occidentale* no teste da catatonia

O modelo da doença de Parkinson induzida pela rotenona provocou um aumento significativo da condição catatônica em torno de 177%, em relação ao grupo controle. O tratamento com extrato de *Anacardium occidentale*, na dose de 600 mg/kg conseguiu reverter significativamente o estado catatônico provocado pela rotenona (Figura 6).

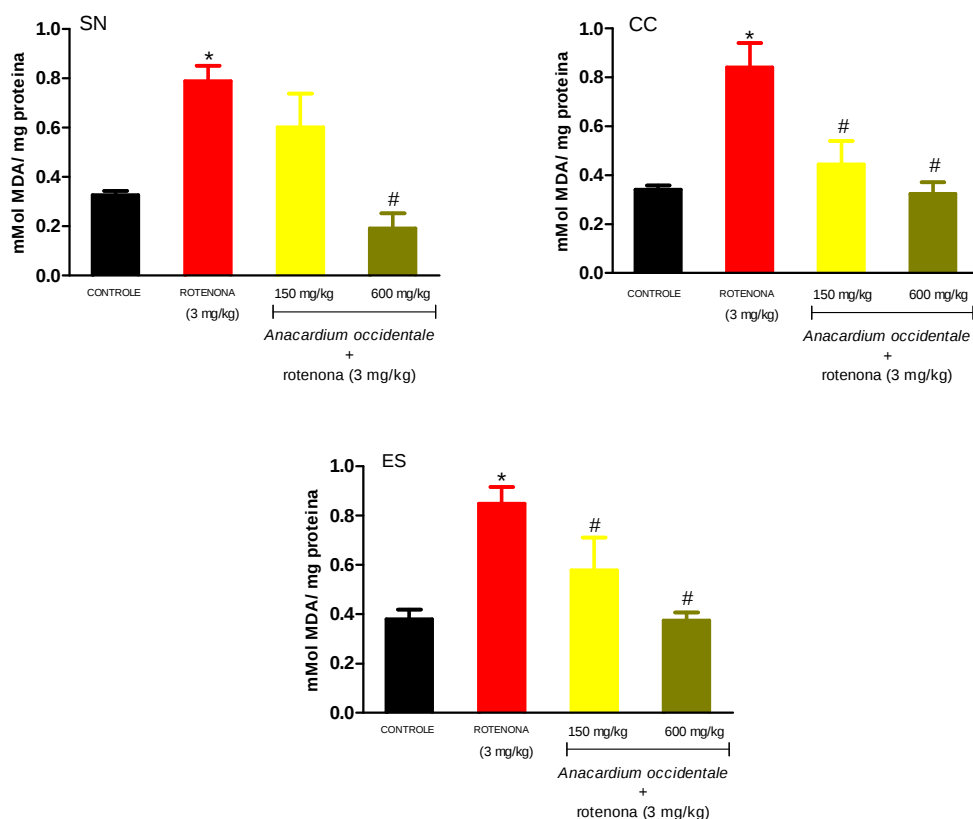
Figura 6: Efeito do tratamento com extrato de *Anacardium occidentale* no teste da catatonia. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativo em relação ao controle (* $p < 0,05$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona ($^{\#}p < 0,05$).



6.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* (lipoperoxidação) do *Anacardium occidentale*

A peroxidação lipídica nos animais do grupo rotenona aumentou de maneira significativa, em relação ao controle na substância negra, no córtex cerebral e no estriado. Nos animais tratados com o extrato de *Anacardium occidentale*, a peroxidação lipídica nas doses de 150 e 600 mg/kg, diminuiu significativamente em relação ao grupo rotenona no córtex, de $47\% \pm 0,09$ e $62\% \pm 0,04$, no estriado, de $32\% \pm 0,13$ e $56\% \pm 0,03$ e na substância negra, na dose de 600 mg/kg, de $76\% \pm 0,06$ (Figura 7 SN, CC e ES).

Figura 7: Efeito do tratamento com extrato *Anacardium occidentale* na peroxidação lipídica. (SN) Peroxidação lipídica na substância negra, (CC) Peroxidação lipídica no córtex, (ES) Peroxidação lipídica no estriado. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). #Estatisticamente significativa em relação à rotenona ($p < 0,05$).



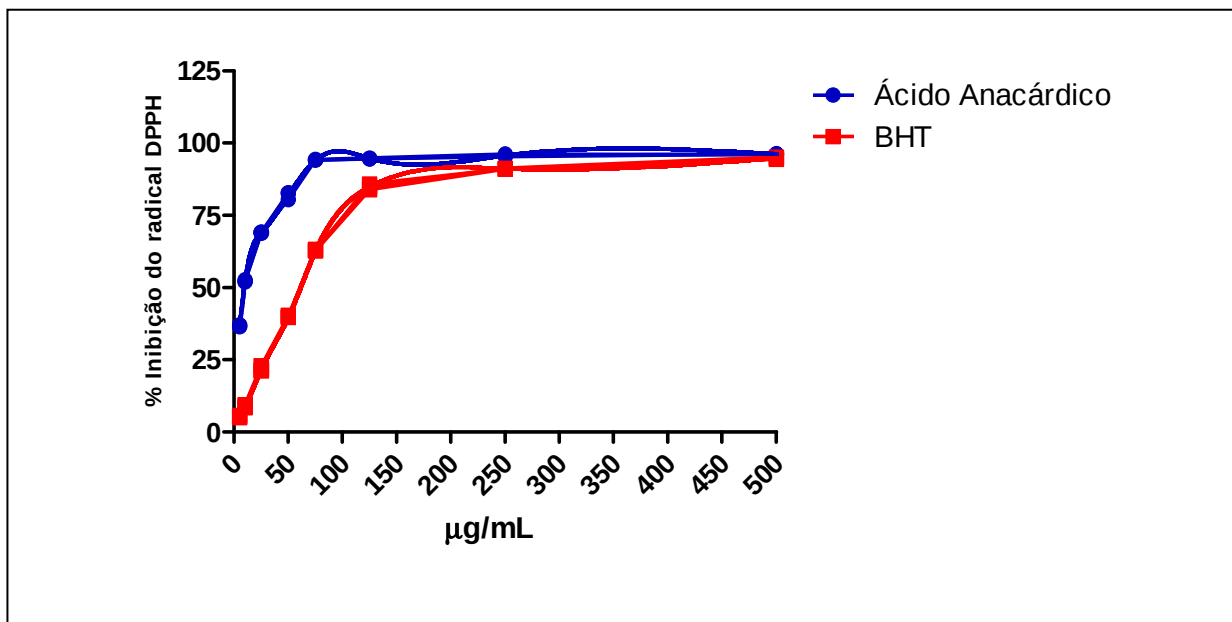
6.3 Ácido anacárdico

Os resultados a seguir correspondem ao efeito da administração de ácido anacárdico uma hora antes da administração de rotenona.

6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do ácido anacárdico

O ácido anacárdico apresentou atividade antioxidante expressiva no teste de captura do radical DPPH^+ demonstrando a capacidade deste composto em combater os radicais livres. A IC_{50} para o ácido anacárdico foi de 9,10 $\mu\text{g/mL}$ enquanto o do padrão BHT foi de 61,10 $\mu\text{g/mL}$. O ácido anacárdico possui uma atividade antioxidante 85% maior que o padrão BHT. (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do ácido anacárdico e do BHT. Variação da concentração de 5-500 mg/mL.

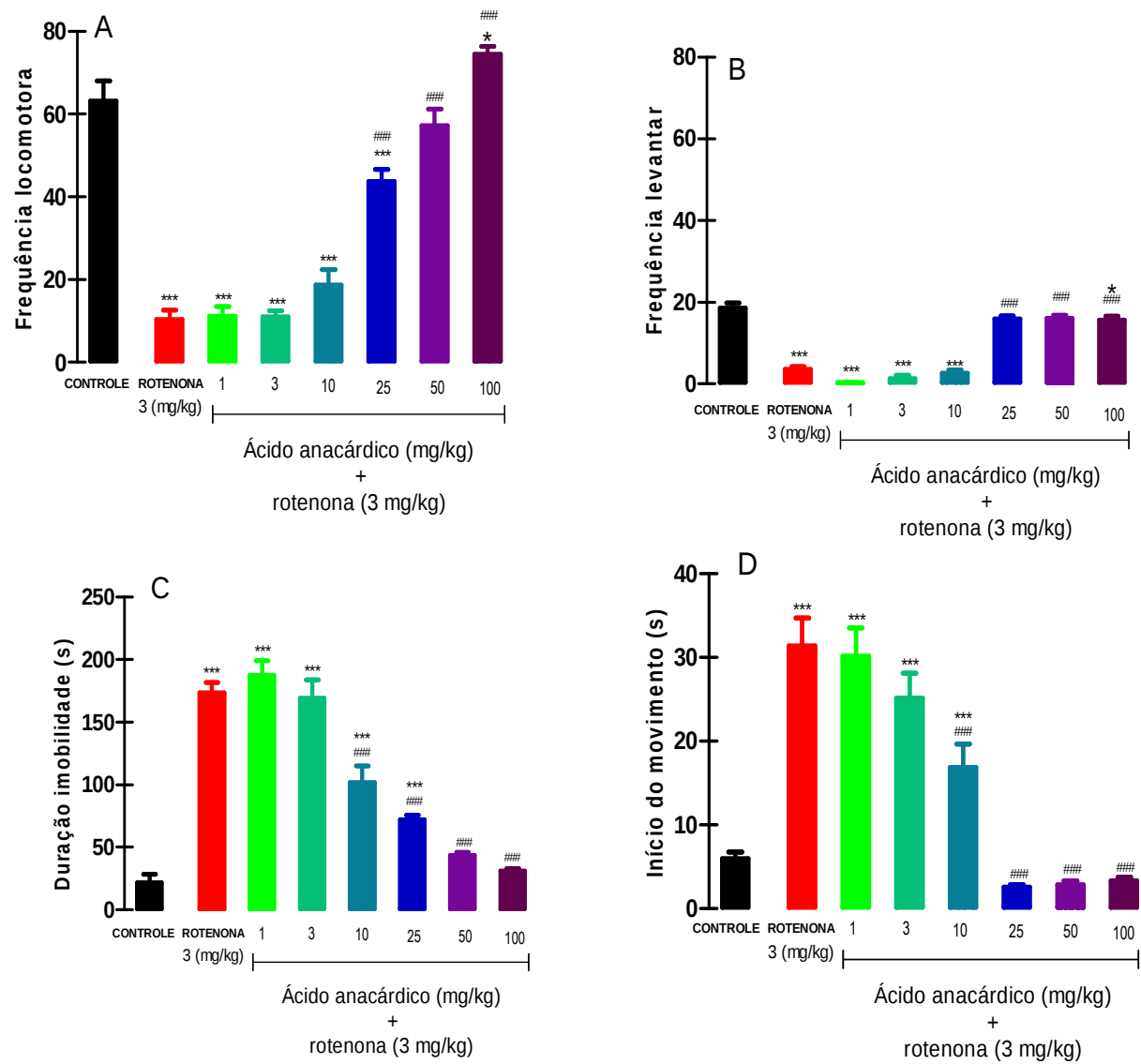


6.3.2 Efeito do ácido anacárdico no teste do campo aberto

O modelo da doença de Parkinson induzida pela rotenona promoveu uma redução significativa da frequência locomotora de $83\% \pm 2,19$ e da atividade exploratória, quantificada pela frequência de levantar, acima de $81\% \pm 0,64$, quando comparada aos animais dos respectivos grupos controle. O tratamento com ácido anacárdico, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg aumentou significativamente a atividade locomotora, em aproximadamente $420\% \pm 2,92$, $548\% \pm 4,06$ e $715\% \pm 1,78$, respectivamente, quando comparado ao grupo rotenona (Figura 9A). Este mesmo tratamento, nas mesmas doses anteriores, foi capaz de aumentar a frequência de levantar, em aproximadamente $440\% \pm 0,74$, $446\% \pm 0,71$ e $432\% \pm 0,93$ em relação ao grupo de animais que recebeu somente a rotenona (Figura 9B).

O tempo de imobilidade e o tempo para o início do movimento no grupo rotenona, aumentaram, significativamente, em relação ao grupo controle. O tratamento com ácido anacárdico, nas doses de 10, 25, 50 e 100 mg/kg, favoreceu uma diminuição significativa de $41\% \pm 13,19$, $58\% \pm 3,39$, $74\% \pm 2,34$ e $82\% \pm 1,95$, respectivamente, no tempo de imobilidade e $46\% \pm 2,78$, $92\% \pm 0,28$, $91\% \pm 0,46$ e $90\% \pm 0,46$ no tempo para o início do movimento, em relação aos animais do grupo rotenona (Figura 9C e D).

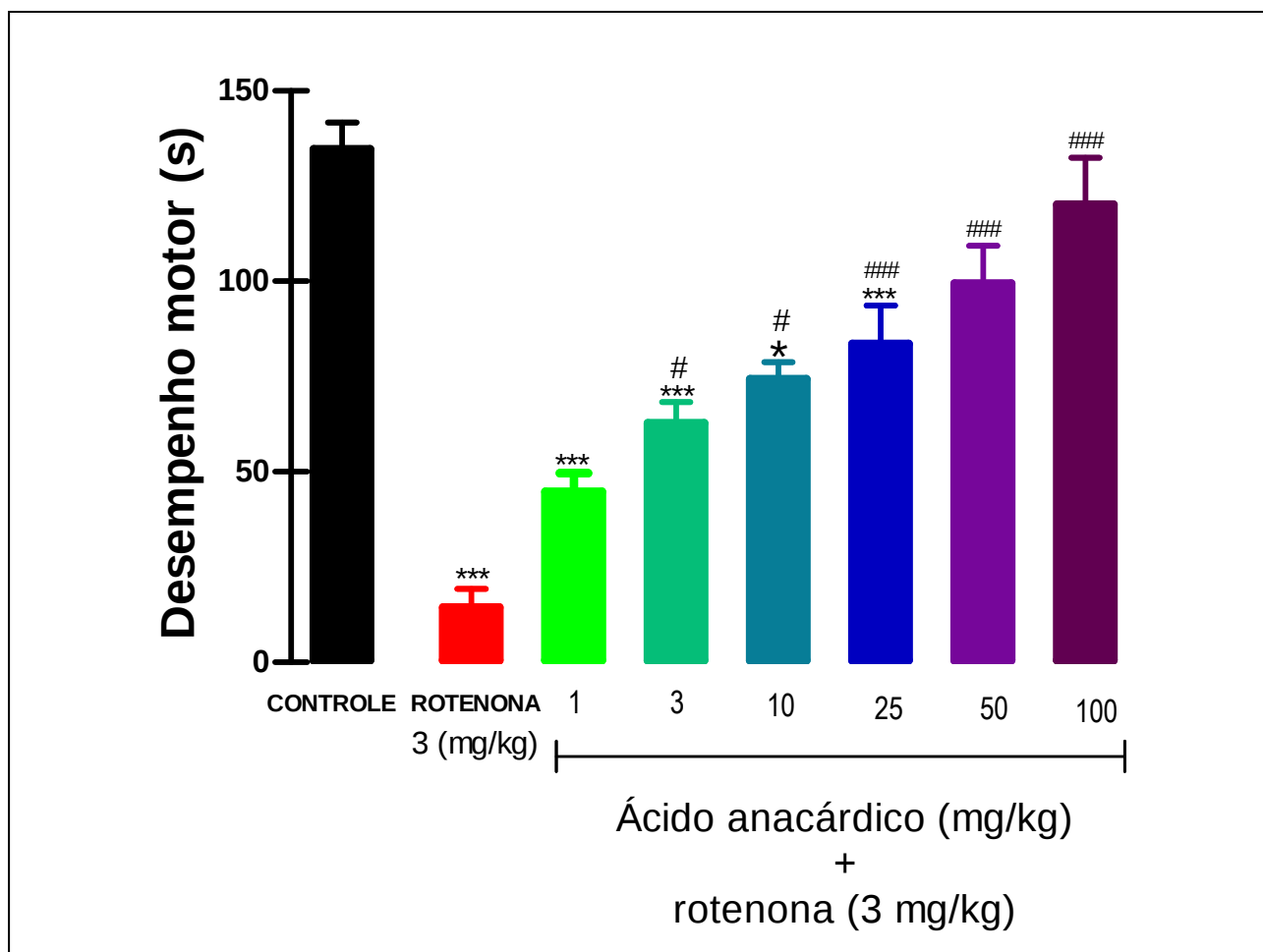
Figura 9: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no teste do campo aberto. (A) Frequência locomotora, (B) frequência de levantar, (C) duração da imobilidade, (D) tempo do início do movimento. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativa em relação ao controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). #Estatisticamente significativa em relação à rotenona (# $p < 0,05$, ### $p < 0,001$).



6.3.3 Efeito do tratamento com ácido anacárdico no teste do *rotarod*

A quantificação do desempenho motor foi realizada pelo teste do *rotarod*. A administração de rotenona promoveu uma diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória em $89\% \pm 4,89$ no grupo rotenona em relação ao grupo controle. Enquanto o tratamento com ácido anacárdico nas doses de 3, 10, 25, 50 e 100 mg/kg propiciou um aumento significativo no tempo de permanência na barra giratória em relação ao grupo rotenona. A dose de 100 mg/kg foi a que apresentou o maior aumento em torno de $834\% \pm 12,20$, no tempo de permanência na barra giratória em relação ao grupo rotenona (Figura 10).

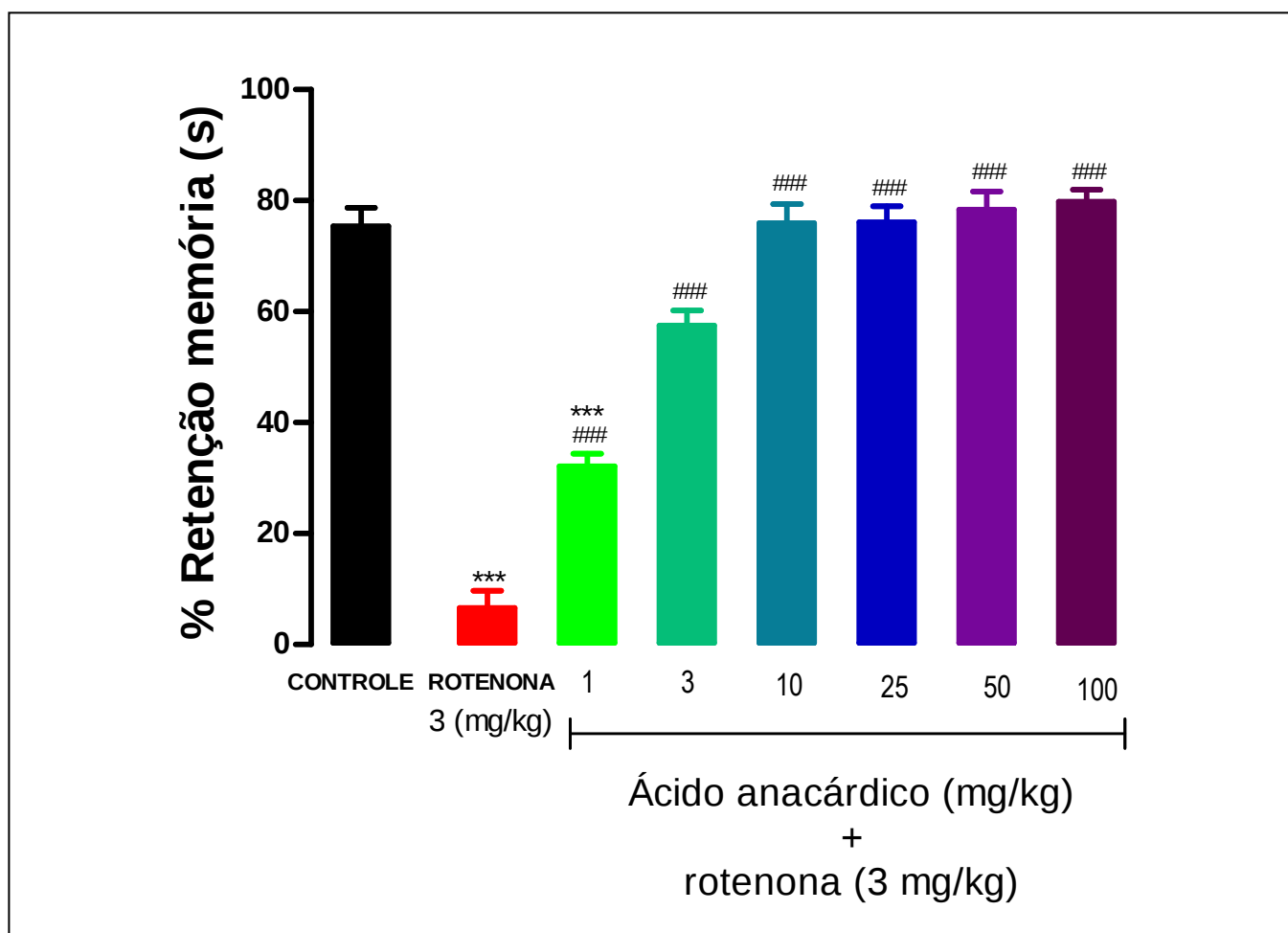
Figura 10: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no teste do *rotarod*. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativa em relação ao controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). #Estatisticamente significativa em relação à rotenona (# $p < 0,05$, ### $p < 0,001$).



6.3.4 Efeito do tratamento com ácido anacárdico no teste do labirinto em T elevado

A administração de rotenona provoca uma perda significativa na retenção de memória dos animais em $91\% \pm 3,10$, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com ácido anacárdico desempenhou um aumento significativo da retenção de memória em todas as doses analisadas em relação ao grupo rotenona. Sendo que, a partir da dose de 10 mg/kg o ácido anacárdico foi capaz de reverter totalmente a perda de memória produzida pela rotenona, retornando ao nível do controle. (Figura 11).

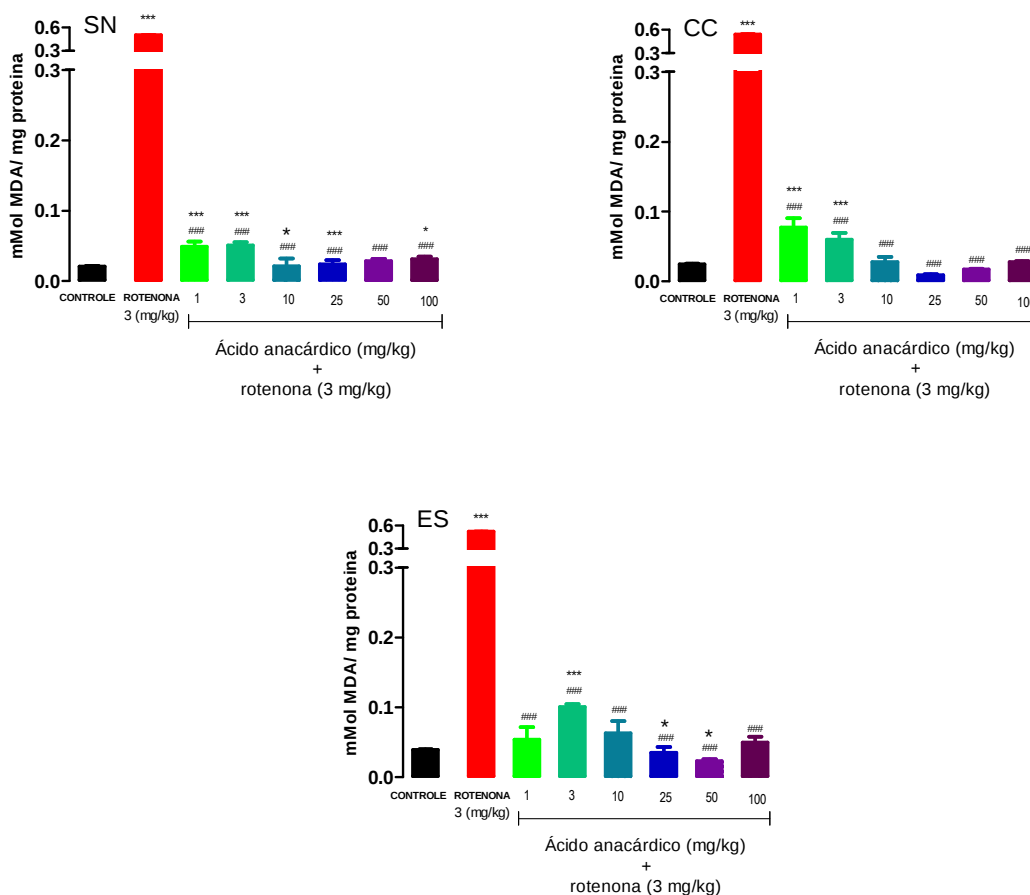
Figura 11: Efeito do tratamento com ácido anacárdico no teste do labirinto em T. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativo em relação ao controle (** $p < 0,001$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona (### $p < 0,001$).



6.3.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* (lipoperoxidação) do ácido anacárdico

A peroxidação lipídica nos animais do grupo rotenona aumentou de maneira significativa em relação ao controle na substância negra, no córtex e no estriado. Esse efeito foi vultuosamente revertido pelo tratamento com o ácido anacárdico nas doses de 1, 3, 10, 25, 50 e 100 mg/kg (Figura 12 SN, CC e ES).

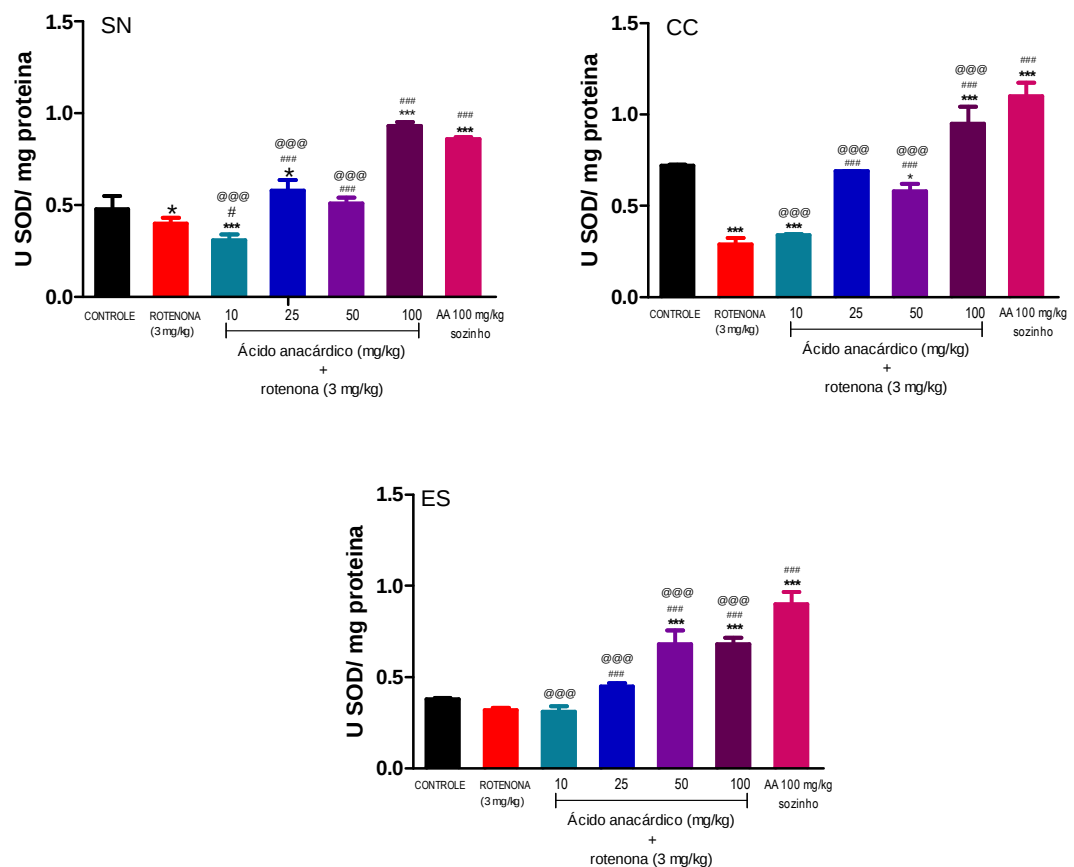
Figura 12: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na peroxidação lipídica. (SN) Peroxidação lipídica na substância negra, (CC) Peroxidação lipídica no córtex, (ES) Peroxidação lipídica no estriado. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativo em relação ao controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona (# $p < 0,05$, ### $p < 0,001$).



6.3.6 Efeito do tratamento com ácido anacárdico na atividade da superóxido dismutase total

A administração de rotenona diminuiu a atividade da superóxido dismutase total comparado com o grupo controle na substância negra (Figura 13 A) e no córtex cerebral (Figura 13 CC), mas não no estriado (Figura 13 ES). O tratamento com ácido anacárdico (25, 50 e 100 mg/kg) mais rotenona aumentou significativamente a atividade desta enzima antioxidante em todas as regiões analisadas. As doses de 25 e 50 mg/kg de ácido anacárdico foram igualmente eficazes na atividade de elevação superóxido dismutase total na substância negra e córtex cerebral, enquanto que 100 mg/kg, aumentou significativamente em comparação com o efeito de doses mais baixas. No estriado, um efeito dependente da dose foi detectado entre ácido anacárdico 25 e 50 mg/kg, mas nenhum aumento adicional foi induzido por ácido anacárdico 100 mg/kg. De modo a esclarecer os mecanismos envolvidos neste efeito, um grupo de animais foi tratado com ácido anacárdico 100 mg/kg na ausência de rotenona. Ácido anacárdico sozinho também foi capaz de aumentar a atividade superóxido dismutase total, em comparação com o controle. Este aumento variou de acordo com a região, correspondendo a cerca de $80\% \pm 0,009$ na substância negra, $53\% \pm 0,074$ no córtex cerebral e de $230\% \pm 0,067$ no corpo estriado (Figura 13 SN, CC e ES).

Figura 13: Efeito do tratamento com ácido anacárdico na atividade da superóxido dismutase total. (SN) Atividade da superóxido dismutase na substância negra, (CC) Atividade da superóxido dismutase no córtex, (ES) Atividade da superóxido dismutase no estriado. Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A diferença entre grupos foi determinada por análise de uma via da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. *Estatisticamente significativo em relação ao controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). #Estatisticamente significativo em relação à rotenona (# $p < 0,05$, ### $p < 0,001$). @Estatisticamente significativo em relação ao ácido anacárdico 100 mg/kg sozinho (@ $p < 0,05$, @@@ $p < 0,001$).

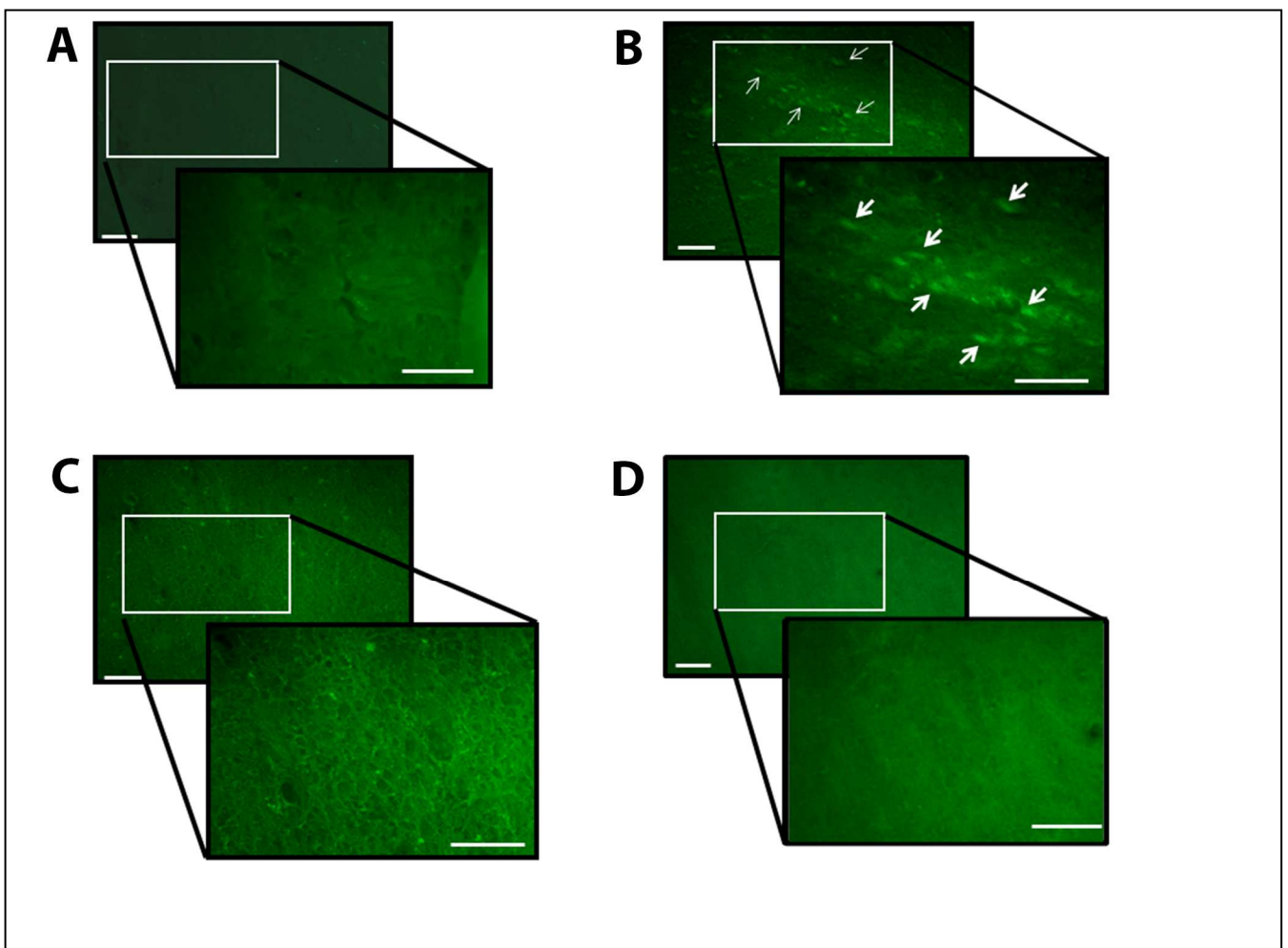


6.3.7 Efeito do ácido anacárdico na neuroproteção pelo Fluoro Jade C

C

Os animais que receberam a rotenona, isoladamente, apresentaram sinais de neurodegeneração na substância negra detectado como células Fluoro Jade C positivas (Figura 14 B), em relação ao controle que não apresentaram essas células (Figura 14 A). No grupo tratado com ácido anacárdico (25 e 100 mg/kg), seguido de rotenona, nenhuma célula Fluoro Jade C positiva fora detectada na substância negra (Figura 14 C e D).

Figura 14: Fotografias com microscopia de epifluorescência mostrando seções sagitais do cérebro no nível da substância negra processadas por coloração com Fluoro-Jade C. Imagens de pequeno e grande aumento de animais representativos do controle (A), que receberam apenas rotenona (B) e tratados com ácido anacárdico, mais rotenona nas doses de 25 mg/kg (C) ou ácido anacárdico 100 mg/kg (D). Barras de escala: 40 μ m.



DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Este trabalho testou a hipótese de que o extrato do *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico teriam uma ação antioxidante e neuroprotetora potencial sobre o sistema nigroestriatal de ratos e córtex cerebral quando administrados sistemicamente. O tratamento sistêmico com rotenona por cinco dias, utilizado como modelo experimental de doença de Parkinson, foi capaz de induzir neurodegeneração na substância negra e aumentar os níveis de lipoperoxidação em todas as regiões analisadas. Esse modelo provoca estresse oxidativo que é a causa da morte neuronal dopaminérgica (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). A administração deste pesticida produz alterações anatômicas, neuroquímicas e neuropatológicas semelhantes às aquelas observadas na doença de Parkinson humana, decorrente da produção de apoptose por inibição do complexo I mitocondrial e aumentos das espécies reativas de oxigênio (BETARBET et al., 2000). No entanto, na maioria dos ratos este tratamento não induziu mortalidade. Não foram observadas alterações no consumo de ração e água ou do peso corporal do grupo tratado apenas com rotenona, quando comparado com todos os outros grupos.

A administração oral de extrato do *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico foram capazes de prevenir a mortalidade induzida pela rotenona, especialmente quando a dose era igual ou superior a 150 mg/kg para o *Anacardium occidentale* e 10 mg/kg para o ácido anacárdico (dados não mostrados), sugerindo um efeito sistêmico benéfico do extrato e deste composto fenólico. A avaliação da toxicidade aguda em ratos com uma dose única de extrato do *Anacardium occidentale* e de ácido anacárdico 5000 mg/kg mostra pela primeira vez que até mesmo em doses elevadas, estes compostos não provocam sinais tóxicos. De acordo com Kennedy e colaboradores (1986), as substâncias que apresentam uma dose letal 50% mais elevadas do que 5000 mg/kg, por via oral, podem ser consideradas praticamente não tóxicas. Por conseguinte, os nossos resultados reforçam esta ideia em relação ao ácido anacárdico, adicionando a informação de evidências anteriores de que a administração oral sucessiva de ácido anacárdico, usando 300-1000 mg/kg ou uma dose única de 2000 mg/kg, não era tóxica (CARVALHO et al., 2011).

Alguns estudos vêm demonstrando evidências de que o estresse oxidativo contribui para a etiologia da doença de Parkinson (SANDERS e GREENAMYRE, 2013), onde a disfunção mitocondrial é considerada um dos mecanismos responsáveis pela morte neuronal (ANWAR et al., 2012). Também estão aumentados vários marcadores da peroxidação lipídica no cérebro de pacientes com doença de Parkinson (DEXTER et al., 1989). Da mesma forma o dano oxidativo cumulativo é o mecanismo primário pelo qual a exposição à rotenona leva a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e degeneração dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (SHERER et al., 2003). Foi demonstrado que vários tipos de antioxidantes podem atenuar a toxicidade promovida pela rotenona (BROWN 1992; SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Por esta razão, esta abordagem foi utilizada no presente trabalho.

A rotenona modifica vários aspectos do comportamento motor e cognitivo, incluindo atividade motora reduzida, postura flexionada, rigidez e catalepsia correlacionada com a degeneração das células dopaminérgicas (BETARBET et al., 2000; ALAM e SCHMIDT 2002 ; CANNON et al., 2009; YING-JUI et al., 2011) e neuroinflamação (SHERER et al., 2003). O teste do campo aberto foi utilizado como uma medida do comportamento exploratório e da atividade geral relacionada com vários circuitos neuronais associados à função dos núcleos da base (ROESLER et al., 1999; GOULD et al., 2009). A análise da frequência locomotora objetiva avaliar o movimento ambulatorial: a frequência de levantar, o comportamento exploratório; e, o tempo para o início do movimento; a motivação (ROESLER et al., 1999). Tais parâmetros são geralmente prejudicados na doença de Parkinson e este declínio da função neuromotora foi reproduzido usando a rotenona. O extrato do *Anacardium occidentale* foi capaz de prevenir significativamente os efeitos induzidos pela rotenona sobre a frequência locomotora, duração da imobilidade e o tempo para o início do movimento nas duas doses testadas. Ao passo que, o ácido anacárdico a partir da dose de 25 mg/kg foi eficiente em proteger os efeitos induzidos pela rotenona sobre todos estes parâmetros, inclusive, também sobre a frequência de levantar. O efeito benéfico deste composto fenólico não foi alterado mesmo em doses mais elevadas. Esses resultados são consistentes com a ação neuroprotetora destes compostos nos parâmetros bioquímicos analisados neste trabalho.

A análise comparativa dos efeitos do extrato do *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico em melhorar o desempenho motor e cognitivo foi analisada pelo teste do *rotarod* e pelo labirinto em T elevado. O teste do *rotarod* é utilizado para avaliar a coordenação motora, a aprendizagem de competências e o equilíbrio em roedores, que são os indicativos básicos da função motora normal (BROOKS et al., 2012). Essa função motora normal é dependente da interação de vários neurotransmissores em diversas regiões cerebrais, tais como o córtex motor, o estriado, o tronco cerebral e o cerebelo (WICHMANN e DELONG, 2002). O extrato do *Anacardium occidentale*, na dose de 600 mg/kg, promoveu eficácia terapêutica em aumentar o tempo de permanência no *rotarod*, que foi reduzido pela rotenona. Prejuízos na memória e aprendizagem estão presentes na doença de Parkinson (DA CUNHA et al., 2003). As doses de extrato do *Anacardium occidentale*, 150 e 600 mg/kg, praticamente reverteram a diminuição da retenção de memória provocada pela rotenona. O ácido anacárdico aumentou a porcentagem de tempo de permanência no *rotarod* e a retenção de memória, que foram reduzidos em cerca de 90% pela rotenona. Nesse caso, as doses de 3, 10, 25, 50 e 100 mg/kg foram suficientes para melhorar os parâmetros do desempenho motor e da retenção de memória. Tais resultados sugerem que os efeitos benéficos do extrato do *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico ocorrem em duas vias diferentes relacionadas com o sistema dopaminérgico do mesencéfalo: em primeiro lugar, o sistema mesocorticolímbico envolvido na memória de trabalho, aqui avaliados pelo labirinto em T (YING-JUI et al., 2011) e em segundo lugar o sistema nigroestriatal, principalmente associados ao desempenho motor, especialmente em condições que exigem um equilíbrio (teste “*rotarod*”) (GRAYBIEL 2000; GROENEWEGEN 2003; MONVILLE et al., 2006).

A catatonia é uma condição patológica caracterizada pela imobilidade motora neurogênica e anormalidade comportamental, devido à rigidez muscular. É afetada pelos níveis de dopamina e por prevenção do declínio em seus níveis. Atualmente não é descrita como um transtorno separado, mas associada a distúrbios psiquiátricos, abuso de drogas e doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (SUNDARARAJAN 2007). Em nosso trabalho a administração de rotenona ocasionou um aumento do estado catatônico em torno de 277% do valor do controle. Este estado foi revertido pelo extrato do *Anacardium occidentale* na

dose de 600 mg/kg. De acordo com Northoff (2002), uma modulação de cima para baixo dos núcleos da base devido a uma deficiência de ácido gama-aminobutírico cortical, o neurotransmissor inibidor principal do cérebro, pode explicar os sintomas motores da catatonia. Osman e Khurasani (1994) sugeriram que a catatonia seja causada por um bloqueio repentino e massivo de dopamina. De fato, ao exacerbar a deficiência de dopamina a doença de Parkinson realmente contribui para o estado catatônico, o extrato de *Anacardium occidentale* por evitar a apoptose neuronal melhora esse estado (KARUPPAGOUNDER et al., 2013).

A taxa de rotatividade dos fosfolípídeos de membrana no cérebro é lenta e afeta a habilidade dos neurônios em responder ao estresse oxidativo (ROSS et al., 1998). O cérebro é altamente suscetível ao estresse oxidativo devido à sua alta taxa metabólica e capacidade regeneradora limitada (ANDERSEN, 2004). O metabolismo de carboidratos pelas mitocôndrias cerebrais é diferenciado. Elas têm grande capacidade de produzir peróxido de hidrogênio, mas curiosamente tem poucas enzimas antioxidantes clássicas, por isso os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio geralmente são irreversíveis (KARUPPAGOUNDER et al., 2013). O malonaldeído é um marcador específico da lipoperoxidação, seus níveis podem ser predominantemente dependentes de espécies reativas de oxigênio. A lipoperoxidação é um dos principais mecanismos de ataque das espécies reativas de oxigênio, iniciando-se pelo ataque das espécies reativas de oxigênio as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados (MANSOURI et al., 2013). No nosso trabalho, a administração de rotenona, por via subcutânea, promoveu aumento dos níveis de malonaldeído, na substância negra, estriado e córtex cerebral em comparação com o grupo controle. Ao mesmo tempo, os níveis mais baixos de atividade superóxido dismutase total foram observados, mostrando que este protocolo foi eficaz na indução de estresse oxidativo em todas estas regiões. Tratamento com extrato do *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico foram capazes de bloquear quase completamente a lipoperoxidação ocasionada pela rotenona. Provavelmente devido à capacidade antioxidante deste extrato (BROINIZI et al., 2007 e 2008) e deste composto fenólico (TREVISAN et al., 2006). Este efeito foi semelhante em ordem de grandeza entre substância negra, córtex cerebral e corpo estriado (92, 87 e 90% de redução, respectivamente) no tratamento com ácido anacárdico na dose de 100 mg/kg. É importante mencionar que esse efeito protetor

do ácido anacárdico ocorreu usando até 100 mg/kg, sugerindo a ausência de uma modulação bifásica antioxidante na faixa de dose entre 1-100 mg/kg. Os efeitos do ácido anacárdico na lipoperoxidação foram, pelo menos em parte, devido a um aumento da atividade da superóxido dismutase total, semelhante ao descrito por Moraes e colaboradores (2010) utilizando modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, após o pré-tratamento com 30 mg/kg de ácido anacárdico. O ácido anacárdico foi capaz de elevar a atividade da superóxido dismutase total mesmo na ausência de rotenona. Esta é a primeira vez que se demonstra um efeito modulador deste composto fenólico sobre esta enzima, sugerindo que este poderia ser um dos mecanismos de ação do ácido anacárdico. Além desta atividade na superóxido dismutase total, não se pode descartar que a ação antioxidante do ácido anacárdico seja devido à presença de cadeias laterais de alquilo, as quais lhe conferem a capacidade de inibir fortemente a geração de ânions superóxido e de ácido úrico pela xantina oxidase (TREVISAN et al., 2006). Outro aspecto importante é a ação farmacológica do ácido anacárdico como um inibidor não seletivo da histona acetiltransferase. Alguns estudos têm demonstrado que a administração de rotenona e a produção de espécies reativas de oxigênio podem aumentar a acetilação das histonas, como um mecanismo envolvido no dano celular (CHOUDHURY et al., 2010). Além disso, em um modelo de cultura de células da doença de Parkinson, tem sido mostrado que a inibição de histona acetiltransferase por ácido anacárdico protege a morte da célula dopaminérgica induzida pelo pesticida paraquat (SONG et al., 2011). Tem sido proposto que a capacidade citoprotetora de uma molécula antioxidante seria crucial para definir uma potencial atividade terapêutica neuroprotetora. Neste aspecto, o uso de compostos fenólicos seria vantajoso uma vez que estas moléculas são capazes de inibir a ação de várias enzimas e ativar os sinais de sobrevivência para além da eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (DAJAS et al., 2003).

Foi estabelecido que a coloração Fluoro Jade C cora todos os neurônios em degeneração, especialmente sob condições que induzem estresse oxidativo (KENNEDY et al., 1986; ALAM e SCHMIDT 2002; , EHARA e UEDA 2009; CARVALHO et al., 2011). Os efeitos do ácido anacárdico foram investigados no que diz respeito à sua capacidade de reduzir os sinais de neurodegeneração pela rotenona na substância negra. Nossos resultados utilizando uma coloração de

Fluoro Jade C demonstraram que o ácido anacárdico em doses de 25 a 100 mg/kg evitam totalmente os sinais de danos celulares. Este dado reforça evidências anteriores obtidas *in vitro* (SONG et al., 2010; SONG et al., 2011), e que mostram uma ação citoprotetora do ácido anacárdico ocorrendo mesmo quando ele é administrado sistemicamente. Na faixa de doses utilizado no presente trabalho, ácido anacárdico parece ser mais protetor do que o ácido ascórbico, por exemplo, que induziu efeitos pró-oxidantes no córtex cerebral quando administrado por via oral em doses de 60 e 120 mg/kg (DUTHIE e CROZIER 2000; MENDES-DA-SILVA et al., 2014) e a “epigallocatechin gallate” que pode induzir efeitos pró-oxidantes quando utilizada em altas concentrações (MARTINOTTI et al., 2014).

Este trabalho demonstra o efeito neuroprotetor do ácido anacárdico, afirmando assim sua correlação com o efeito observado no extrato do *Anacardium occidentale*. As atividades relatadas neste estudo indicam que o extrato *Anacardium occidentale* e ácido anacárdico constituem agentes promissores para o tratamento da doença de Parkinson por apresentarem potencial atividade neuroprotetora.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O extrato de *Anacardium occidentale* e o ácido anacárdico possuem baixa toxicidade e ação antioxidante quando administrados por via oral.

O presente resultado demonstra pela primeira vez que o extrato de *Anacardium occidentale* e o ácido anacárdico, administrados sistemicamente por via oral, podem exercer ação neuroprotetora no modelo experimental da doença de Parkinson. Sob esta condição, tanto o extrato de *Anacardium occidentale* quanto ácido anacárdico são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central em quantidades suficientes para ter um efeito positivo, indicando uma biodisponibilidade adequada. Os efeitos benéficos do extrato de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico foram evidentes, considerando sua capacidade de reduzir danos comportamentais e estresse oxidativo. Além disso, sinais de neuroproteção, na substância negra, foram promovidos pelo ácido anacárdico. Os nossos resultados também mostram um novo mecanismo de ação do ácido anacárdico indicando que a atividade da enzima superóxido dismutase é um alvo farmacológico potencial deste composto fenólico. Assim, devem ser consideradas novas perspectivas sobre o uso de ácido anacárdico na terapêutica da doença de Parkinson, bem como outros distúrbios neurológicos relacionados à dopamina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.P; DORNIER, M; DIONISIO, A.P; CARAIL, M; CARIS-VEYRAT, C; DHUIQUE-MAYER, C. **Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids.** Food Chemistry, v. 138, p. 25-31, 2013.
- AGOSTINI-COSTA, T.S; JALES, K.A; OLIVEIRA, M.E.B; GARRUTI, D.S. **Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanhas de caju.** Comunicado Técnico122, EMBRAPA, Brasília, 2005.
- AGOSTINI-COSTA, T.S; JALES, K.A; GARRUTI, D.S; PADILHA, V.A; LIMA, J.B; AGUIAR, M.J; PAIVA, J.R. **Anacardic acid content in cashew apples from *Anacardium microcarpum* and eight clones of *Anacardium occidentale* from Northeastern Brazil.** Ciência Rural, v. 34, p. 1075-1080, 2004.
- ALAM, M; SCHMIDT, W.J. **Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats.** Behav Brain Res, v. 136, p. 317–24, 2002.
- ALEXI, T; BORLONGAN, C.V; FAULL, R.L.F; WILLIAMS, C.E; CLARK, R.G; GLUCKMAN, P.D; HUGHES, P.E. **Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.** Progresse in Neurobiology, v. 60, p.409-470, 2000.
- ANDERSEN, J.K. **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** Nature Medicine, v. 10, p. 18-25, 2004.
- ANGELO, P.M; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão.** Ver. Inst. Adolfo Lutz, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ANNAPURNA, A; ANSARI, M.A; MANJUNATH, P.M. **Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v 17, p. 491-500, 2013.
- ANWAR, N; GEORGE, M; ADRIAN, C.B.M. **Oxidative stress in Parkinson's disease; parallels between current animal models, human studies and cells, oxidative stress and diseases,** Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0552-7, InTech, 2012.
- AHLSSKOG, J.E; MUENTER, M.D. **Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature.** Movement Disorders, v. 16, p.448-458, 2001.
- ASANUMA, M; MIYAZAKI, I; DIAZ-CORRALES, F.J; OGAWA, N. **Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced Parkinsonism.** Acta Medica Okayama, v. 58 (5), p. 221-233, 2004.
- AVILEZ, I.M; HORI, T.S.F; DE ALMEIDA, L.C; HACKBARTH, A; NETO, J.C. B; BASTOS, V.L.F.C; MORAES, G. **Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 148, p. 136–142, 2008.
- BÉDARD, P.J. **The Pros and Cons of Treating Parkinson's Disease.** The Canadian Journal of CME, p. 77-86, 2001.
- BEHL, C. **Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches.** Progresse in Neurobiology, v.57, p.301-323, 1998.

- BERNARDI, M.M; PALERMO-NETO, J. **Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats.** Psychopharmacology, v. 65, p. 247-250, 1979.
- BETARBET, R; SHERER, T.B; GREENAMYRE, J.T. **Animal models of Parkinson's disease.** BioEssays., v. 24, p.308-318, 2002.
- BETARBET, R; SHERER, T.B; MACKENZIE, G; GARCIA-OSUNA, M; PANOV, A.V; GREENAMYRE, J.T. **Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease.** Nature Neuroscience, v. 3, p. 1301-1306, 2000.
- BERNDT, N; HOLZHÜTTER, H.G; BULIK, S. **Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: a model-based analysis.** FEBS Journal, v. 280, p. 5080-5093, 2013.
- BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, Campinas, v. 12 (2), p. 123-130, 1999.
- BISAGLIA, M; FILOGRANA, R; BELTRAMINI, M; BUBACCO, L. **Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease?** Ageing Research Reviews, v. 13, p. 107-114, 2014.
- BLOIS, M.S. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** Nature, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E; BREST, C. **Use of free radical method evaluate antioxidant activity.** Lebensm-Wiss. Technol., v. 28 (1), p. 25-30, 1995.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.
- BROADHURST, P.L. **Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors.** Br J Psychol, v. 49, p. 12-20, 1957.
- BROINIZI, P.R.B; ANDRADE-WARTHA, E.R.S; SILVA, A.M.O; NOVOA, A.J.V; TORRES, R.P; AZEVEDO, H.M.C; ALVES, R.E; MANCINI-FILHO, J. **Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.).** Ciência Tecnol. Aliment., v. 27(4), p.902-908, 2007.
- BROINIZI, P.R.B; ANDRADE-WARTHA, E.R.S; SILVA, A.M. de O; TORRES, R.P; AZEREDO, H.M.C; ALVES, R.E; MANCINI-FILHO, J. **Antioxidant properties in cashew apple byproduct (*Anacardium occidentale* L.): effect on lipoperoxidation and on the polyunsaturated fatty acids profile in rats.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44 (4), p.773-781, out-dez 2008.
- BROOKS S.P; TRUEMAN R.C; DUNNETT S.B. **Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests.** Curr Protoc Mouse Biol, v. 2, p. 37-53, 2012.
- BROWN, L.L. **Somatotopic organization in rat striatum: evidence for a combinational map.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, p. 7403-7, 1992.
- BUEGE, J.A; AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods in Enzymology, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BYSTROM, L.M; GUZMAN, M.L; RIVELLA, S. **Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells?** Antioxidants & Redox Signaling, v. 20(12), p. 1917-1924, 2014.

- CANNON, J.R; TAPIAS, V; NA, H.M; HONICK, A.S; DROLET, R.E; GREENAMYRE, J.T. **A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease.** *Neurobiology of disease*, v. 34, p. 279-290, 2009.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. **Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5691-5696, 2002.
- CARDOSO, H.D; PASSOS, P.P; LAGRANHA, C.J; FERRAZ, A.C; JÚNIOR, E.F.S; OLIVEIRA, R.S; OLIVEIRA, P.E.L; SANTOS, R.C.F; SANTANA, D.F; BORBA, J.M.C; ROCHA-DE-MELO, A.P; GUEDES, R.C.A; NAVARRO, D.M.A.F; SANTOS, G.K.N; BORNER, R; PICANÇO-DINIZ, C.W; BELTRÃO, E.I; SILVA, J.F; RODRIGUES, M.C.A; ANDRADE DA COSTA, B.L.S. **Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids.** *Front Hum Neurosci.*, v.6, p. 249, 2012.
- CARVALHO, A.L.N; ANNONI, R; SILVA, P.R.P; BORELLI, P; FOCK, R.A; TREVISAN, M.T.S. **Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 135, p. 730-736, 2011.
- CASTILLO-JUÁREZ, I; RIVERO-CRUZ, F; CELIS, H; ROMERO, I; **Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacárdico acids from *Amphipterygium adstringens*.** *J. Ethnopharmacol*, v. 114, p. 72-77, 2007.
- CHANDRA, J; SAMALI, A; ORRENIUS, S. **Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29 (3-4), p. 323-333, 2000.
- CHOUDHURY, M; PARK, P.H; JACKSON, D; SHUKLA, S.D. **Evidence for the role of oxidative stress in the acetylation of histone H3 by ethanol in rat hepatocytes.** *Alcohol*, v. 44(6), p. 531-40, 2010.
- CAUDLE, W.M; ZHANG, J. **Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in parkinson disease.** *Experimental Neurology*, v. 220, p. 230–233, 2009.
- COTINGUIBA, G.G; SILVA, J.R.N; AZEVEDO, R.R.S. **Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review.** *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v.15(3), p. 231-7, 2013.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis e das exóticas cultivadas.** Empresa Gráfica Gutenberg LTD A, Rio de Janeiro, RJ, 1ª edição, p. 400-402, 1984.
- CUI, L; MIAO, J; FURUYA, T; FAN, Q; LLI, X; RATHOD, P. K; SU, X. Z; CUI, L; **Histone acetyl-transferase inhibitor anacárdico acid causes changes in global gene expression during *in vitro Plasmodium falciparum* development.** *Eukaryot. Cell*, v. 7, p. 1200-1210, 2008.
- DA CUNHA, C; WIETZIKOSKI, S; WIETZIKOSKI, E; FERRO, M.M; MIYOSHI, E; ANSELMO-FRANCI, J.A; CANTERAS, N.S. **Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system.** *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 79, p. 236-242, 2003.
- DAJAS, F; RIVERA-MEGRET, F; BLASINA, F; ARREDONDO, F; ABIN-CARRIQUIRY, J.A; COSTA, G; ECHEVERRY, C; LAFON, L; HEIZEN, H; FERREIRA, M; MORQUIO, A. **Neuroprotection by flavonoids.** *Braz J Med Biol Res.* v. 36, p. 1613-20, 2003.
- DE BEER, D; JOUBERT, E; GELDERBLUM, WC; MANLEY, M. **Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 902-909, 2003.

- DEUMENS, R; BLOKLAND, A; PRICKAERTS, J. **Modeling Parkinson's disease in rats: an evolution of 6-OHDA lesions of the nigrastraital pathway.** Exp Neurol, v. 175, p. 303–317, 2002.
- DEXTER, D.T; CARTER, C.J; WELLS, F.R; JAVOY-AGID, F; AGID, Y; LEES, A; JENNER, P; MARSDEN, C.D. **Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease.** Journal of Neurochemistry, v. 52, p. 381–9, 1989 doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x.
- DUNHAM, N.W; MYIA, T.S. **A Note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice.** J. Amer. Pharm. Associ., v. 46, p. 208-210, 1957.
- DUTHIE, G, CROZIER, A. **Plant derived phenolic antioxidants.** Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, v. 3, p. 457-471, 2000.
- EHARA, A; UEDA, S. **Application of fluoro-jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences.** Acta Histochem Cytochem, v. 42, p. 171–9, 2009.
- FARIA, A; MEIRELES, M; FERNANDES, I; SANTOS-BUELGA, C; GONZALEZ-MANZANO, S; DUEÑAS, M; FREITAS, V; MATEUS, N; CALHAU, C. **Flavonoid metabolites transport across a human BBB model.** Food Chemistry, v. 149 p. 190-196, 2014.
- FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev. Ass. Med. Brasil., v. 43, p. 61-68, 1997.
- GAO, H.M; ZHOU, H; HONG, J.S. **Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration.** Neuroinflammation and neurodegeneration, p. 81-104, 2014.
- GAO, H.M; HONG, J.S. **Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression.** Trends in Immunology, v. 29, p. 357-365, 2008.
- GEDAM, P.H; SAMPATHKUMARAN, P.S. **Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications.** Progress in Organic Coatings, v. 14, p. 115-157, 1986.
- GILGUN-SHERKI, Y; MELAMED, E; OFFEN, D. **Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier.** Neuropharmacology, v. 40, p. 959-975, 2001.
- GOULD, T.D; DAO, D.T; KOVACSICS, C.E. **The open field test. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice.** Neuromethods, v. 42, p. 1-20 chapter 1, 2009.
- GRAYBIEL, A.M. **The basal ganglia.** Current Biology, v. 10(14), p. 509-511, 2000.
- GROENEWEGEN, H.J. **The Basal Ganglia and Motor Control.** Neural Plasticity, v. 10, p. 107- 120, 2003.

- GRAZZINI, R; HESK, D; HEININGER, E; HILDENBRANDT, G; REDDY, C.C; COX-FOSTER, D; MEDFORD, J; CRAIG, R; MUMMA, R. O. **Inhibition of lipoxigenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids.** Biochem Biophys Res Commun, v. 176, p. 775–780, 1991.
- GU, M; GASH, M.T; MANN, V.M; JAVOY-AGID, F; COOPER, J.M; SCHAPIRA, A.H.V. **Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus.** Ann. Neurological, v. 39, p. 385-389, 1996.
- GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. **A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol.** Carcinogenesis, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.
- HALLIWELL, B. **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?** Journal of Neurochemistry, v. 97, p. 1634–1658, 2006.
- HALLIWELL, B. **Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?** Free Radical Biology & Medicine, v. 32, p. 968–974, 2002.
- HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment.** Drugs & Aging, v. 18 (9), p. 685-716, 2001.
- HAUBER, W; NEUSCHELER, P; NAGEL, J; MÜLLER, C.E. **Catalepsy induced by a blockade of dopamine D₁ or D₂ receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen of rats.** European Journal of Neuroscience, v.14, p. 1287-1293, 2001
- HAUSER, D; HASTINGS, T. **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism.** Neurobiology of Disease, v. 51, p. 35-42, 2013.
- HIMEJIMA, M; KUBO, I.J. **Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil.** Agric Food Chem, v. 39, p. 418-421, 1991.
- KARUPPAGOUNDER, S.S; MADATHIL, S.K; PANDEY, M; HAOBAM, R; RAJAMMA, U; MOHANAKUMAR, K.P. **Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats.** Neuroscience, v. 236, p. 136-148, 2013.
- KENNEDY, G. L. Jr; FERENZ, R.L, BURGESS, B.A. **Estimation of acute oral toxicity in rates by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀.** Journal of Applied Toxicology, v. 6, p. 145–8, 1986. doi: 10.1002/jat.2550060302.
- KUBO, I; HA, T.J; TSUJIMOTO, K; TOCOLI, F.E; GREEN, I.R. **Evaluation of lipoxigenase inhibitory activity of anacardic acids.** Z Naturforsch, v. 63, p. 539-546, 2008.
- KUBO, I; MASUOKA, N; HA, T.J; TSUJIMOTO, K. **Antioxidant activity of anacardic acids.** Food Chemistry, v. 99, p. 555-562, 2006.
- KUBO, L; NIHEI, K; TSUJIMOTO, K. **Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** J. Agric. Food Chemical, v. 51, p. 7624-7628, 2003.

- KULKARNI, S.K. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 3rd ed. Vallabh Parkashan, New Delhi – India; 1999.
- KRYGIER, K; SOSULSKI, F; HOGGE L. **Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Extraction and purification procedure.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.30, p.330-334, 1982.
- KUMAR, P; PADI, S. S. V; NAIDU, P. S; KUMAR, A. **Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms.** Behavioral Pharmacology, v.17, p.485–92, 2006.
- LANG A.E; LOZANO, A.M. **Medical Progress: Parkinson's Disease.** N Engl J Med, v.339, p.1030–1043, 1998.
- LANG, A.E; OBESO, J.A. **Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough.** The lancet Neurology, v. 3, p. 309-316, 2004.
- LEE, J.E; PARK, J.H; JANG, S.J; KOH, H.C. **Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 278, p.159–171, 2014.
- LEWIS, M.M; DU, G; SEM, S; KAWAGUCHI, A; TRUONG, Y; LEE, S; MAILMAN, R.B; HUANG, X. **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.
- LODOVICI, M; GUGLIELMI, F; MEONI, M; DOLARA, P. **Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*.** Food and Chemical Toxicology, v. 39, p. 1205-1210, 2001.
- MALONE, R.A. **Pharmacological approach to natural products screening and avaliation In: New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity** (Ed. By H. Warner and P. Wolf.), p. 24 -53, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- MANDEL, S; YODIM, M.B.H. **Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases.** Free Radical Biology & Medicine, v.37 (3), p.304–317, 2004.
- MANSOURI, M.T; FARBOOD, Y; SAMERI, M.J; SARKAKI, A; NAGHIZADEH, B; RAFEIRAD, M. **Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats.** Food Chemistry, v.138, p. 1028–1033, 2013.
- MAPOPE, N; DAKORA, F.D. **Role of Flavonoid and Isoflavonoid Molecules in Symbiotic Functioning and Host-Plant Defence in the Leguminosae.** Chemistry for Sustainable Development in Africa, p. 33-48, 2013.
- MARTINOTTI, S; RANZATO, E; PARODI, M; VITALE, M; BURLANDO, B. **Combination of ascorbate/epigallocatechin-3-gallate/gemcitabine synergistically induces cell cycle deregulation and apoptosis in mesothelioma cells.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 274 (1), p.35-41, 2014.
- MASUOKA, N; KUBO, I. **Characterization of xantine oxidase inhibition by anacárdico acids.** Biochim. Biophys. Acta, v. 1688, p. 245-249, 2004.

- MENDES-DA-SILVA, R.F; LOPES-DE-MORAIS, A.A; BANDIM-DA-SILVA, M.E; CAVALCANTI, G.D; RODRIGUES, A.R; ANDRADE-DA-COSTA, B.L; GUEDES, R.C. **Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis.** *Neuropharmacology*. v. 86C, p. 155-160, 2014.
- MISRA, H.P; FRIDOVICH, I. **The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 3170-3175, 1972.
- MORAIS, T.C; PINTO, N.B; CARVALHO, K.M.M. B; RIOS, J.B; RICARDO, N.M.P.S; TREVISAN, M.T.S; RAO, V.S; SANTOS, F.A. **Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice.** *Chemico-Biological Interactions*, v.183, p. 264-269, 2010.
- MONVILLE, C ; TORRES, E.M ; DUNNETT, S.B. **Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model.** *Journal of Neuroscience Methods*, v. 158, p. 219–223, 2006.
- NORAZIT, A; MELICK, G; MEEDENIYA, A.C.B. **Oxidative Stress in Parkinson's Disease; Parallels Between Current Animal Models, Human Studies and Cells.** *Oxidative Stress and Diseases*, Capitulo 17, p. 387-412, 2012.
- NORTHOFF, G. **What catatonia can tell us about 'top-down modulation': a neuropsychiatric hypothesis.** *Behavioural and Brain Sciences*, v. 25, p. 555–577, 2002.
- OBESO, J.A; RODRIGUEZ-OROZ, M.C; RODRIGUEZ, M; LANCIEGO, J.L; ARTIEDA, J; GONZALO, N; OLANOW, W. **Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease.** *Trends in neurosciences*, v. 23, p. S8-S19, 2000.
- OLAJIDE, O.A; ADEROGBA, M.A; FIEBICH, B.L. **Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: Inhibition of NF- κ B and MAPK signaling in the microglia.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145, p. 42-49, 2013.
- OMANAKUTTAN, A; NAMBIAR, J; HARRIS, R.M; BOSE, C; PANDURANGAN, N; VARGHESE, R. K; KUMAR, G.B; TAINER, J.A; BANERJI, A; PERRY, J.J.P; NAIR, B.G. **Anacardic Acid Inhibits the Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9.** *Molecular Pharmacology*, v. 82, p. 614- 622, 2012.
- ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKI, B; NICOTERA, P. **Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.** *Nature*, v. 4, p.85-99, 1997.
- OSMAN, A.A; KHURASANI, M.H. **Lethal catatonia and neuroleptic malignant syndrome. A dopamine receptor shutdown hypothesis.** *British Journal of Psychiatry*, v. 165, p.548–550, 1994.
- PANIERI, E; GOGVADZE, V; NORBERG, E; VENKATESH, R; ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKY, B. **Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence.** *Free Radical Biology and Medicine*, v.57, p.176–187, 2013.
- PARAMASHIVAPPA, R; PHANI KUMAR, P; SUBBA RAO, P.V; SRINIVASA RAO, A. **Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.13, p.657–660, 2003.

- PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, Academic Press Inc, California, 1986.
- PEREZ, R.G., WAYMIRE, J.C., LIN, E., LIU, J.J., GUO, F., ZIGMOND, M.J. A role for alfa-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of Neuroscience* 22(8):3090-3099, 2002.
- PERIER, C; BOVÉ, J; VILA, M; PRZEDBORSKI, S. **The rotenone model of Parkinsons disease**. *Trends in Neurosciences*, v. 26, p. 345-346, 2003.
- RODRÍGUEZ, S; UCHIDA, K; NAKAYAMA, H. **Striatal TH-immunopositive fibers recover after an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in golden hamsters treated with prednisolone: Roles of tumor necrosis factor- and inducible nitric oxide synthase in neurodegeneration**. *Neuroscience Research*, v. 76, p. 83-92, 2013.
- ROESLER, R; WALZ, R; QUEVEDO, J; DE-PARIS, F; ZANATA, S.M; GRANER, E; IZQUIERDO, I; MARTINS, V.R; BRENTANI, R.R. **Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^c**. *Molecular Brain Research*, v. 71, p. 349–353, 1999.
- ROMANO, B; PAGANO, E; MONTANARO, V; FORTUNATO, A.F. **Novel insights into the pharmacology of flavonoids**. *Phytotherapy Research*, v. 27, p. 1588-1596, 2013.
- ROSENSTOCK, T.R; CARVALHO, A.C.P; JURKIEWICZ, A; FRUSSA-FILHO, R; SMAILI, S.S. **Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induce by 3-nitropropionic acid**. *Journal of Neurochemistry*, v.88, p.1220-1228, 2004.
- ROSS, B.M; MOSZCZYNSKA, A; ERLICH, J; KISH, J. **Low activity of key phospholipid catabolic and anabolic enzymes in human substantia nigra: possible implications for Parkinson's disease**. *Neuroscience*, v. 83(3), p. 791–798, 1998
- SANDERS, L.H, GREENAMYRE, J.T. **Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model**. *Free Radic Biol Med*, v. 62, p. 111–20, 2013.
- SINGH, R.P; SHARAD, S; KAPUR, S. **Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants**. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, v. 5 (3), July-September, 2004.
- SHERER, T.B; KIM, J.H; BETARBET, R; GREENAMYRE, J.T. **Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and α -Synuclein Aggregation**. *Experimental Neurology*, v.179, p. 9–16, 2003.
- SIQUEIRA, J.O; NAIR, M.G; HAMMERSCHMIDT, R; SAFIR, G.R. **Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems**. *Crit. Rev. Plan Sci.*, v. 10, p. 63-121, 1991.
- SINHA, K; DAS, J; PAL, P.B; SIL, P.C. **Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis**. *Archives of Toxicology*, v. 87, p.1157-1180, 2013.
- SONG, C; KANTHASAMY, A; JIN, H; ANANTHARAM, V; KANTHASAMY, A.G. **Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration**. *NeuroToxicology*, v. 32, p. 586-595, 2011.

- SONG, C; KANTHASAMY, A; ANANTHARAM, V; SUN, F; KANTHASAMY, A.G. **Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration.** Mol Pharmacol., v. 77(4), p. 621-32, 2010.
- STERN, M.B. **The early treatment of Parkinson's disease: levodopa, dopamine agonists or both.** Parkinsonism and Related Disorders, v. 7, p. 27-33, 2001.
- ^a SUBRAMANIAM, S.R; ELLIS, E.M. **Neuroprotective Effects of Umbelliferone and Esculetin in a Mouse Model of Parkinson's Disease.** Journal of Neuroscience Research, v. 91, p. 453-461, 2013.
- ^b SUBRAMANIAM, S. R; CHESSELET, M.F. **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease.** Progress in Neurobiology, v. 106-107, p. 17-32, 2013.
- SUNDARARAJAN, R. **Catatonia.** Adv. Psychiatr. Treat, v. 13, p. 51-59, 2007.
- SUNG, B; PANDEY, M.K; AHN, K.S; YI, T; CHATURVEDI, M.M; LIU, M; AGGARWAL, B.B. **Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappa B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappa B alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis.** Blood, v. 111, p. 4880-4891, 2008.
- TAN, J; CHEN, B; HE, L; TANG, Y; JIANG, Z; YIN, G; WANG, J; JIANG X. **Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling.** Chin J Cancer Res., v. 24(4), p. 275-283, 2012.
- TOKUDA, Y; UOZUMI, T; KAWASAKI, T. **The superoxide dismutase activities of cerebral tissues, assayed by the chemiluminescence method, in the gerbil focal ischemia/reperfusion and global ischemia models.** Neurochemistry International, v. 23(2), p. 107-114, 1993.
- TRABER, M.G. **Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants.** Mineral and Electrolyte Metabolism, Basel, v. 23 (3-6), p. 135-139, 1997.
- TREVISAN, M.T; PFUNDSTEIN, R; HAUBNER, R; WÜRTELE, G; SPIEGELHALDER, B; BARTSCH, H; OWEN, R.W. **Characterization of alkyl phenols in cashew (Anacardium occidentale) products and assay of their antioxidant capacity.** Food Chem. Toxicol., v. 4, p.188-197, 2006.
- URBANSKA, A.M; ZOLLA, V; VERZANI, P; SANAMBROGIO, L. **Physiological and Pathological Role of Reactive Oxygen Species in the Immune Cells.** Immunology of Aging, p. 309-321, 2014
- VAUZOUR, D; VAFEIADOU, K; RICE-EVANS, C; WILLIAMS, R.J; SPENCER, J.P. **Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons.** J. Neurochem. v. 103, p. 1355-1367, 2007.
- WATTS, R.L; SUBRAMANIAN, T; FREEMAN, A; GOETZ, C.G; PENN, R.D; STEBBINS, G.T; KORDOWER, J.H; BAKAY, R.A. **Effect of stereotaxic intrastriatal cogafts of autologous adrenal medulla and peripheral nerve in Parkinson's disease: two-year follow-up study.** Exp Neurol, v. 147, p. 510-7, 1997.

- WICHMANN, T; DELONG, M.R. **Neurocircuitry of Parkinson's disease**. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress. American College of Neuropsychopharmacology. p. 1761–1779, 2002.
- WHITTON, P. S. **Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease**. British Journal of Pharmacology, v.150, p.963-976, 2007.
- YAN, M.H; WANG, X; ZHU, X. **Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease**. Free Radical Biology and Medicine, v. 62, p. 90–101, 2013.
- YING-JUI, H; SHIH-CHUN, H; CORNELIUS, R.P; KUEI-YING, Y. **Effects of d-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: Potential for treatment of Parkinson's disease dementia**. Behavioural Brain Research v. 219, p. 280–290, 2011.
- ZHANG, Y; DAWSON, V.L; DAWSON, T.M. **Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease**. Neurobiology Disease, v.7, p.240-250, 2000.
- ZHANG, J; PERRY, G; SMITH, M.A; ROBERTSON, D; OLSON, S.J; GRAHAM, D.G; MONTINE, T. J. **Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons**. Am J Pathol., v.152, p.1423-1429, 1999.
- ZHOU, C; HUANG, Y; PRZEDBORSKI, S. **Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance**. Ann N Y Acad Sci, v. 1147, p.93–104, 2008.

APÊNDICE A



Received on 20 May, 2014; received in revised form, 11 September, 2014; accepted, 20 September, 2014; published 01 January, 2015

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF EXTRACT OF *ANACARDIUM OCCIDENTALE* LINN ON A ROTENONE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Cybele Facanha Barreto Linard-Medeiros¹, Victor de Albuquerque Wanderley Sales², Adriano Costa Ramos¹, Adriana Sereñiki¹, Maria Teresa Salles Trevisan², Almir Gonçalves Wanderley^{1,2} and Simone Sette Lopes Lafayette^{1,2*}

Department of Pharmaceutical Sciences¹, Department of Physiology and Pharmacology², Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

Department of Organic and Inorganic Chemistry², Federal University of Ceará, Campus do Pici, Bloco 940 Bairro Pici CEP 60431-970, Fortaleza, CE, Brazil.

Keywords:

Anacardium occidentale,
Neuroprotection, Antioxidant,
Peroxidation, Locomotor Activity,
Memory

Correspondence to Author:

Simone Sette Lopes Lafayette

Department of Physiology and
Pharmacology, CLB, University
Federal of Pernambuco, Av. Prof.
Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901 –
Cidade Universitária, Recife, PE,
Brazil

E-mail: cybelledinard@yahoo.com.br

ABSTRACT: In this study the neuroprotective activity extract hydroalcoholic of AO against behavioral and biochemical parameters induced by subcutaneous injection of rotenone was evaluated, important for the understanding of Parkinson's disease, which is the most common neurodegenerative disorder affecting movement. Rotenone is a potent hydrophobic pesticide and a highly selective inhibitor of complex I in the electron transport chain. *Anacardium occidentale* (AO), popularly known as cashew, is a tropical tree native to north and northeast Brazil. Peduncles (pseudofruit) and nuts can be eaten raw or converted into various nutritional products (juice, tea, jam, and beverages). AO has been studied for its anti-inflammatory, antimicrobial, antitumor, molluscicidal and antidiabetic activity. Behavior evaluations were performed using the models of open-field, rotated, on horizontal bar and elevated T-maze. The in vivo antioxidant activity was evaluated in the substantia nigra (SN), cortex and striatal region by lipid peroxidation after behavioral tests. Systemic administration of rotenone produced hypolocomotion, muscle incoordination and memory deficit. AO administration (150 and 600 mg/kg, p.o.) improved rotenone induced dysfunctional behavior (locomotor, musculature coordination and memory retention). Biochemical analysis of the SN, cortex and striatum revealed that systemic rotenone administration significantly increased lipid peroxidation which was attenuated by daily treatment with AO. These results suggest that there are protective effects of AO on oxidative stress caused by rotenone mediated through its antioxidant activity.

INTRODUCTION: The increase in the elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide. Thus, interest in studies aimed at the prevention and cure of these diseases is very important.

Natural constituents derived from plants are important to investigate, since studies have shown that these compounds exhibit a range of biological activities, with therapeutic potential, among them antioxidant and/or anti-inflammatory.

The *Anacardium occidentale* (AO), popularly known as cashew, is a tree native to north and northeast of Brazil, well known for its trade in cashew nuts and fruit. The peduncle (pseudofruit) has high nutritional value, especially vitamins A, B, C and is rich in proteins, lipids, carbohydrates,

QUICK RESPONSE CODE 	DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(1).1000-07
	Article can be accessed online at: www.ijpsr.com
DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(1).1000-07	

minerals, fiber, unsaturated fat and phenolic compounds¹. The phenolic compounds present in the pulp of the cashew have antioxidant properties². These properties are associated with the prevention of chronic diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's (PD) are characterized by excessive neuronal atrophy and death in focal regions of the brain³. PD results from deficiency of the nigrostriatal dopaminergic system that is responsible for movement⁴. PD is defined by the presence of four cardinal signs: tremor when resting, rigidity, slowness of movement and shifting of balance. The main mechanisms proposed to explain the events culminating in neuronal death in PD are associated with mitochondrial changes, apoptosis and elevated levels of oxidative stress⁵. There is also a neuroinflammatory process with activation of glial cells and release of cytokines and nitric oxide⁶. Therefore, the process of degeneration is multifactorial. These events are a vicious cycle and could be initiated by any of them with neuronal death results⁷.

Rotenone is a potent hydrophobic pesticide and exposure to rotenone mimics the clinical and pathological features of PD, such as neurochemical, behavioral and neuropathological changes, providing an animal model for PD⁸. It causes neurodegeneration via multiple mechanisms that include inhibition of complex I, induction of apoptosis, activation of microglia and oxidative stress⁹. It has been reported that the rotenone model is highly reproducible and may provide an excellent tool for testing new neuroprotective strategies¹⁰.

The objective of the present work was to evaluate the possible neuroprotective actions of hydroalcoholic extract of *Anacardium occidentale* (AO) in oxidative stress induced by rotenone, as one model of experimental Parkinson's disease in rats.

MATERIALS AND METHODS:

Animals

The study used adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. Albinus) weighing 250 to 300 g,

from the Department of Physiology and Pharmacology, from the Federal University of Pernambuco (UFPE) and mice (*Mus musculus* var. Swiss) of both sexes, weighing between 25 and 30g, obtained from the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), UFPE.

The animals were maintained under standard environmental conditions (12h light/dark cycle) and temperature (22±2°C) and fed with commercial feed (Labina®, Purina, Brazil) and water *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Center for Biological Sciences UFPE, under license N°. 23076.027073, according to the recommended standards by the Brazilian College for Animal Experimentation.

Sample and preparation hydroalcoholic extract

Samples of pseudofruit clone CCP-76 were from the Brazilian Organization for Agricultural Research (EMBRAPA) Brazil. These samples had been submitted to special treatment according to the protocol developed by EMBRAPA, described by Broisizi et al.¹. Peduncle of the cashew samples was lyophilized and stored at -20°C for further analysis. The hydroalcoholic extract was prepared according to the method described by Krygier and Sobuski¹¹ with some modifications.

The cashew peduncle was initially subjected to extraction with ethyl ether at a ratio of 1:5 (g sample: solvent mL) for one hour in a magnetic stirrer (Model RO15 power IKA® Staufen, Germany) until it reached room temperature, then the solution was vacuum filtered through a Buchner funnel. The resulting residue was extracted again with ethyl alcohol (90%) in the same proportion as before, following the same procedure, thus obtaining the hydroalcoholic extract. For administration to animals, hydroalcoholic rotaevaporated (B525, Micronal) was extracted under vacuum at 30°C, in order to remove all the residual ethanol then resuspended in filtered water. All reagents and solvents used were of an analytical grade.

Experimental Groups

The animals were randomly divided into four experimental groups (n= 8). Rats from Group 1 received water and Tween 80 (2%, w/v) by oral

gavage (1 mL/kg) and one hour later a subcutaneous (s.c.) administration of the vehicle (sunflower oil 90%, w/v + DMSO 10%, w/v) for five days. Group 2 received water and Tween 80 (2%, w/v), the same as Group 1, and rotenone (3 mg/kg, s.c.) after one hour for five days. Groups 3-4 received the AO hydralcoholic extract at 150 and 600 mg/kg respectively, and one hour later were given rotenone (3 mg/kg, s.c.) also over a period of five days. Twenty-four hours after the last day of treatment, the rats were evaluated with behavioral tests. After the behavioral tests, the animals were sacrificed for biochemical assays.

Assessment of acute toxicity of AO

In this test, male and female mice ($n=3/\text{sex}$) were housed in cages and deprived of food overnight, with free access to water. A single dose of 5000 mg/kg body weight of AO was administered orally to the animals by gavage. In each case, the volume administered was 10 mL/kg. Following administration, the animals were carefully observed during the first 3 h, and thereafter, daily for 14 days, for any toxic signs and symptoms or death. Signs and symptoms of toxicity included: (1) autonomic effects, such as salivation, and piloerection; (2) central nervous system effects, such as tremors and convulsions; and (3) changes in activity levels, posture, strength, and strange behavior¹². Body weight, food and water consumption were recorded daily.

Behavioral procedures

All animals were submitted to behavioral tests 24 hours after the processing.

Locomotor activity

To quantify the general activity, each rat was placed individually into the center of an open-field arena (a circular wooden box with a diameter of 100 cm and 40 cm high, with a floor divided into 19 regions). The frequency of locomotion (number of floor units entered by the animal with four paws); rearing frequency (number of times that the animal stood on its hind legs, with the trunk perpendicular to the floor of the arena); immobility time (time the animal stood without making any movement) and movement start (time to get out of the center of the open-field arena) were assessed for 5 min. The arena was cleaned with 5% alcohol, between the tests.

Rotarod activity

All animals were tested for motor skills and balance using a rotary axis according to Kumar and Kumar¹³. To perform this test, the animal was placed with all four paws on a bar with a diameter of 7.0 cm and set 25 cm above the floor, rotating at a speed of 25 rpm. Before division into experimental groups, the rats were trained in two sessions of 180 seconds each for acclimatization. The animals were placed on the rotating bar and the length of stay was recorded. A cut off time of 180 seconds was maintained throughout the experiment.

The elevated T-maze test for spatial memory

The test was performed according to the method by Kumar et al.¹⁴. The elevated T-maze consisted of one opposite open arms (50x10 cm) and two closed arms of the same dimensions, facing each other and a central area (10x10 cm) connecting the arms. The arms had walls of 40 cm. The rats were placed individually at the end of an open arm facing away from the central area.

The time taken by the animal to move from the open arm to either of the closed arms was registered 24 h after the last day of treatment and was called initial latency. Rats were allowed to explore the maze for 30 seconds after acquisition of the initial latency, and were then returned to their cages. The learning retention latency was evaluated again the next day.

The percentage of memory retention was calculated from the formula:

$$\frac{\text{Transfer of initial latency} - \text{Transfer latency repetition} \times 100}{\text{Transfer of initial latency}}$$

Catalepsy

The standard bar test was used to determine the intensity of catalepsy. The bar was made of wood and had a diameter of 1.2 cm and the height from the floor to the top of the bar was 9 cm. Both forelegs of a rat were gently placed on the horizontal bar and the animal was timed (in seconds, maximum 180 s) until one forepaw touched the floor. Each animal was used for the experiment only once.

Biochemical studies

Dissection and homogenization After behavioral assessments, the animals were anesthetized and then

decapitated, the brains removed, placed on ice the striatum, cortex and substantia nigra dissected. These regions were weighed and homogenized in Potter Elvehjem type homogenizer with 1X phosphate buffered saline (10%, w/v), to which was added BHT (0.004%, w/v) to prevent autoxidation of the samples. The homogenate was centrifuged at 10000 g for 30 minutes at 4°C and an aliquot of supernatant was separated for biochemical analyzes.

Measurement of lipid peroxidation

Quantitative measurement of lipid peroxidation in the dissected regions was assessed according to the method of Buege and Aust¹⁵. The amount of malonaldehyde (MDA) present in samples was quantified by the reaction with TBA. Aliquots of 500 μ L of the supernatant were added to 1 mL TBA: TBA 0.38% (w/v), 250 mL of 1N chloridric acid (HCl), 15% TCA (w/v) and 20 mL of ethanolic BHT (2%, w/v).

The solution was heated at 100°C for 15 minutes, followed by cooling in an ice bath. 1.5 mL of n-butanol was added, shaken and centrifuged to 3000 g. After centrifugation, the upper phase was collected and analyzed in a spectrophotometer (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian) at 532 nm. For calculations, we performed a standard curve with 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane. Results were expressed as nmol MDA/ mg protein.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison/post-hoc test to determine the significance level. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism[®] 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA). P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS:

Acute toxicity

During the 14-day experiment, no death, toxic signs and negative symptoms were observed in any mice after acute treatment by oral route with AO in a dose of 5000 mg/kg. No significant changes in food and water consumption or in the body weight were observed (data not shown). The LD₅₀ could not be estimated, but it was possibly higher than 5000 mg/kg.

Effect of AO on locomotor activity

Administration of rotenone for 5 days significantly reduced the ambulatory activity and rearings and increased the duration of immobility and time of movement start of rats in the open field test. Treatment with extract of AO (150 and 600 mg/kg) for 5 days significantly improved locomotor activity and decreased the time of immobility and the movement start time in rats. (Fig. 1)

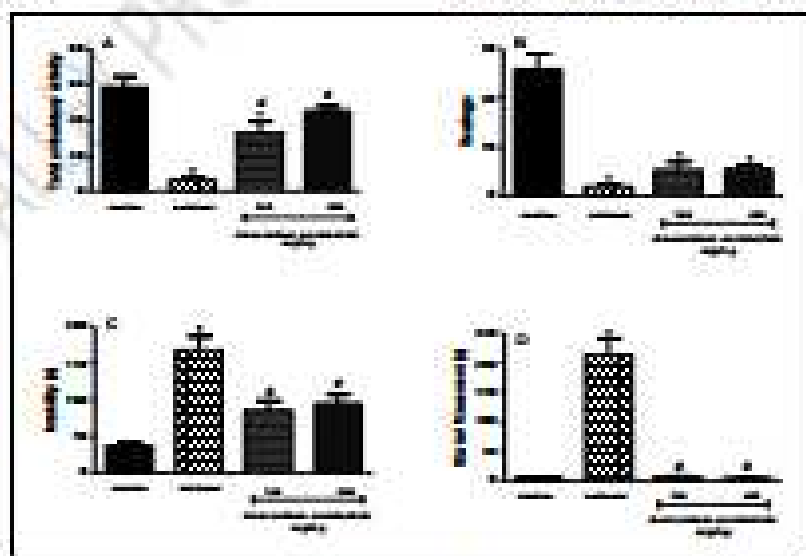


FIGURE 1: Effect of *Abacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on locomotor activity in the open field test of rats. (A) Total ambulatory activity, (B) rearings, (C) duration of immobility and (D) mean movement. Rotenone (3 mg/kg, s.c). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM ($n=6$ per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Effect of AO on rotarod test

Administration of rotenone caused a significant decrease in the time of permanency of the animals compared with control animals in the rotarod test. Daily treatment with extract of AO (600 mg/kg) for 5 days significantly increased the time of permanency compared with the group that received only rotenone (Fig. 2).

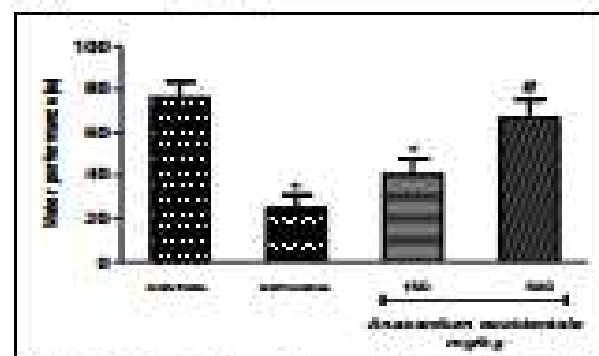


FIGURE 2: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) in the rotarod test in rats. Rotenone (3 mg/kg, i.c.). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control; # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Effect of AO on memory performance in the elevated T-maze test

Treatment with rotenone caused marked memory loss as shown by the significant decrease in the percentage of memory retention compared with the control group in the elevated T-maze test. Daily treatment with extract of AO (150 and 600 mg/kg) 1 h before the administration of rotenone increased significantly the percentage of memory retention in rats, compared with the group that received only rotenone (Fig. 3).

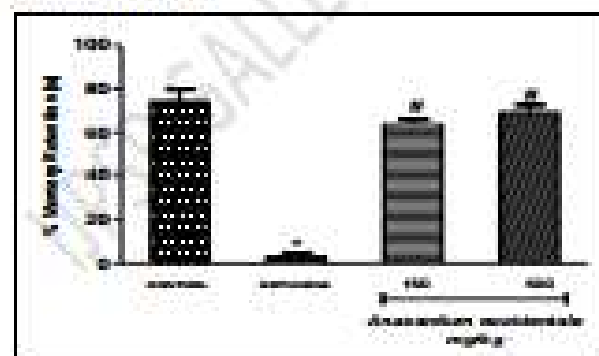


FIGURE 3: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on memory performance in the elevated T-maze test in rats. Rotenone (3 mg/kg, i.c.). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control; # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Effect of AO on catalepsy

Treatment with rotenone caused a marked akinesia state as shown by the significant increase in motor deficiency compared with the control group. Daily treatment with the extract of AO (600 mg/kg) significantly improved the motor deficit in rats compared with the group that received only rotenone (Fig. 4).

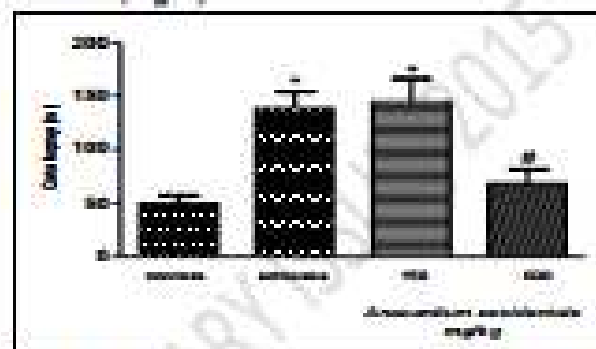


FIGURE 4: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on catalepsy test, in rats. rotenone (3 mg/kg, i.c.). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control; # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Effect of AO on brain lipid peroxidation

The administration of rotenone for 5 days induced oxidative stress as indicated by the significant increase of MDA concentration in the substantia nigra, cortex and striatum compared with the control group. Treatment with the extract of AO (600 mg/kg) 1 h before the administration of rotenone attenuated lipid peroxidation in the substantia nigra, cortex, and striatum, as shown by the decrease in MDA concentration (Fig. 5).

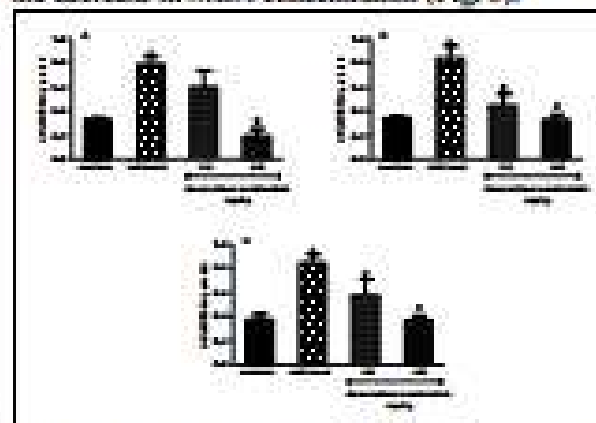


FIGURE 5: Lipid peroxidation levels (A) substantia nigra (B) cortex (C) striatum rats. Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control; # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

DISCUSSIONS: The current study investigated the hypothesis that hydroalcoholic extract of AO could have a potential antioxidant and neuroprotector action upon the rat in the central nervous system. Acute toxicity assessment in mice using a single AO dose of 5000 mg/kg shows for the first time that even in a high dose, this compound does not provoke toxic signs. According to Kennedy et al.¹⁶, substances that present a lethal dose 50% (LD₅₀) higher than 5000 mg/kg by the oral route can be considered practically nontoxic.

Rotenone is a potent hydrophobic pesticide and highly selective inhibitor of complex I in the electron transport chain. This inhibition causes selective degeneration of nigrostriatal dopaminergic terminals^{17,18}, reproducing many of the features of PD⁸, such as reduced activity, flexed posture, rigidity and catalepsy correlated with the depletion of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase^{19,20} and neuroinflammation²⁰. Sherer et al.²¹ showed that the exposure to low doses of rotenone (2-3 mg/kg/day) caused highly selective nigrostriatal dopaminergic lesion.

There was no evidence of degeneration of other brain regions, such as the basal ganglia nuclei, such as the globus pallidus and subthalamic nucleus. Therefore, rotenone exposure to rodents is widely regarded as an experimental model for mimicking human PD.

In this study treatment with rotenone caused a marked akinesia state related to neural circuits associated with the basal ganglia function. Motor abnormalities, evidenced by decreased length of stay in the revolving bar rotated, are mainly attributed to degeneration of striatal neurons, a region functionally connected by adhesions to the motor cortex²². Oral administration hydroalcoholic extract of AO was able to reduce motor abnormalities induced by rotenone and significantly promoted an improvement in the clinical state of the animals observed by their increased locomotor activity, percentage of memory retention and time of permanency on rotarod, suggesting a benefic systemic effect of this extract.

Sanders and Greenamyre¹⁸ reported the important role of oxidative stress in the etiology of PD.

Markers of oxidative stress are typically found in brain biopsies, peripheral cells, and biological fluids derived from patients with PD, indicating that indeed oxidative stress is a key factor in PD pathogenesis. Similarly, cumulative oxidative damage is the primary mechanism by which rotenone exposure leads to degeneration of dopaminergic neurons²³.

Brain cells are particularly susceptible to oxidative damage due to reduced activity of antioxidant enzymes and the large amount of polyunsaturated fatty acids, which may affect the ability of neurons to respond to stress²⁴. In postmortem brains from PD victims markers of lipid peroxidation are found⁶. Malondialdehyde (MDA) is a specific marker of lipid peroxidation, which is largely a result of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids with more than two double bonds²⁵. In our study, administration of rotenone promoted increased levels of MDA in substantia nigra, striatum and cortex, suggesting an increased lipid peroxidation and, thus, oxidative stress. The treatment with AO decreased the levels of MDA and this effect was probably due to the antioxidant capacity of this extract^{1,2}.

CONCLUSIONS: Taken together, our data suggested neuroprotective effects of AO, probably mediated through its antioxidant activity. Thus the present work brought out new insights for the treatment of neurodegenerative diseases and highlighted the pharmacological properties of AO, suggesting its effective use in clinical conditions in human. However, the clinical relevance of AO for the treatment of PD warrants further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS: Authors are grateful to Rejane de Souza Silva for excellent technical assistance. FACEPE by financial support. Jaime Tomaz de Aquino owner Companhia Industrial de Óleos do Nordeste – CIONE. The English version of this text was revised by Sidney Pratt, Canadian, BA, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip (TEFLA).

REFERENCES:

1. Brucini PRB, Andrade-Wartha EES, Silva AMO, Novoa APV, Torres RP, Azende HMC, Alves RL, Mancini-Filho E: Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do

- paradoxiás de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência Tecnologia dos Alimentos* 2007; 27:902-908.
2. Davinzi PRB, Andrade-Wartha RES, Silva AMO, Tamas RP, Azevedo HMC, Alves RE, Mancini-Filho J: Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados em ratos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 44:773-781.
3. Poirier ES, Elson JL, Rocco C, Nelson G, Tambull DB, Morris CM: Mitochondrial abnormality associates with type-specific neuronal loss and cell morphology changes in the pedunculo-pontine nucleus in Parkinson disease. *The American Journal of Pathology* 2012; 182(6): 1826-1840.
4. Kerttunen JM, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Barua RT: Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson disease. *Brain* 2012; 135(8): 2419-2431.
5. Tapia V, Cannon JR, Greenamyre JT: Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 2014; 35:102-117.
6. Taylor JM, Main BS, Crack PJ: Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochemistry International* 2012; 62(5): 803-819.
7. Halliwell B: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 2006; 97:1634-1658.
8. Karuppagounder SS, Madathil SK, Pandey M, Haebler R, Rajanna U, Mohanalakshmi KP: Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 2013; 256:136-148.
9. Zaitsev SA, Abu-Elmatty DM, Shukla AA: Acetyl-L-carnitine and α -lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2012; 100:347-360.
10. Cannon JR, Tapia V, Na HM, Henick AS, Draeli RE and Greenamyre JT: A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2009; 34:279-290.
11. Krygier K, Szanki F and Hogg E: Fins, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1982; 30:330-334.
12. Makela, R.C: Pharmacological approach to natural products screening and evaluation Inc: New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutic activity. Ed. By H. Warren and P. Wolf, Springer-Verlag, Berlin 1977:24 -53.
13. Kumar P and Kumar AK: Possible role of curcumin against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain: possible behavioural, biochemical and cellular alterations. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2009; 33:980-8.
14. Kumar P, Pad SSV, Naidu PS and Kumar A: Effect of rocuranol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behavioral Pharmacology* 2006; 17:485-92.
15. Buge JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1978; 52: 302-16.
16. Kennedy GL, Fennel RL and Burgess HA: Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *Journal of Applied Toxicology* 1988; 8:145-148.
17. Higgins GS, Greenamyre JT: [3H] Dihydrobenzoyl Binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) electron transport chain: an autoradiographic study. *Journal of Neuroscience* 1996; 16:3897-3916.
18. Sanders LH, Greenamyre JT: Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 62:111-20.
19. Qi Z, Miller GW, Voit EE: Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity. *Toxicology* 2014; 315:92-101.
20. Bissuquet M, Calera F, Cicchelli F: Impact of omega 3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* 2011; 10:453-461.
21. Sherr TH, Kim JH, Benabib R, Greenamyre JT: Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Experimental Neurology* 2000; 179:9-16.
22. Delaville C, Cruz AV, McCoy AJ, Braithwaite E, Avila I, Newkov N, Watan JR: Oscillatory activity in basal ganglia and motor cortex in an awake behaving rodent model of Parkinson's disease. *Basal Ganglia* 2014; 3:221-227.
23. Cannon JR, Greenamyre JT: Rotenone as preclinical model compound in Parkinson disease. *Handbook of Neurotoxicity* 2014; 995-1012.
24. Nisqjan R: The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Focus on Atractyops. *Molecular Neurobiology* 2014; 49(1):28-38.

How to cite this article:

Linard-Medeiros CTR, Victor de Albuquerque WS, Ramos AC, Szanki A, Salles Trevizan MT, Wanderley AG and Lopes Lafayette SS: Neuroprotective Effect of Extract of *Anacardium occidentale* Linn on a Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Int J Pharm Sci Res* 2015; 6(1): 1000-07. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(1).1000-07.

© 2015 an official journal of International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This journal licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

This article can be downloaded to ANDROID OS based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Playstore)

APÊNDICE B

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ANACARDIC ACID ON OXIDATIVE STRESS
INDUCED BY PARKINSON'S DISEASE MODEL

Cybelle Façanha Barreto Medeiros Linard ^{1#}; Belmira L. S. Andrade da Costa ^{3#}, Adriana Sereniki ¹, Maria Teresa Sales Trevisan ², Renata de Cássia Ribas Perreira ¹, Francisco Thiago Correia de Souza ², Ricielle Lopes Augusto ³, Almir Gonçalves Wanderley ³, Soraya S. Smailli ⁴, Simone Sette Lopes Lafayette ^{3*}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil

² Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceara ³Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, Brazil.

⁴ Department of Pharmacology, Federal University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

Running title: Anacardic acid induces neuroprotection in Parkinson's disease model

Text pages: 23

Figures: 9

Corresponding author:

Dr. Simone Sette Lopes Lafayette
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco
Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária,
Recife, Pernambuco, Brasil
CEP 50670-901
Phone: 55-81- 21268530
FAX: 55-81-21268976
E-mail: simonesette@terra.com.br

[#]Cybelle Façanha Barreto Medeiros Linard and Belmira L. S. Andrade da Costa contributed equally to this work

ABSTRACT

BACKGROUND: Anacardic acid (AA) is a flavonoid obtained from *Anacardium occidentale*. Evidence *in vitro* and *in vivo* has shown its low toxicity, anti-inflammatory and antioxidant effects, suggesting its potential therapeutic use. Nevertheless, none of these studies were carried out in order to test the antioxidant effects of AA systemic administration on the central nervous system. The present study hypothesized that AA can exert neuroprotection on the cerebral cortex and nigrostriatal system against oxidative stress induced by rotenone.

METHODS: Adult rats were treated by gavage with AA (1-100 mg/kg) or vehicle 1h before rotenone (3 mg/kg; s.c.) for 5 consecutive days. Behavioral parameters were analyzed using open field, rotarod and elevated T-maze tests. Signals of neurodegeneration in the substantia nigra (SN) as well as lipoperoxidation in the nigrostriatal system and cerebral cortex were also evaluated.

RESULTS: In the group treated with AA the rotenone-induced lipoperoxidation was reversed starting with the lowest dose (1 mg/kg/day). Increased activity of total superoxide dismutase enzyme was detected using 25-100 mg/kg AA in all regions analyzed. The impairment in behavioral parameters induced by rotenone was reversed in animals treated with AA from 10 mg/kg. This flavonoid also blunted SN neurodegeneration signals provoked by rotenone.

CONCLUSION: Oral administration of AA prevented rotenone-induced oxidative stress in the brain, in part due to its modulatory action on superoxide dismutase enzyme, reducing neurodegeneration in the nigrostriatal system.

GENERAL SIGNIFICANCE: Antioxidant effect and low toxicity of AA open new perspectives on potential systemic therapeutic use of this flavonoid in Parkinson's disease.

Keywords: Neuroprotection; rotenone; flavonoids; superoxide dismutase; substantia nigra; fluorojade C.

1. Introduction

The brain is particularly susceptible to oxidative damage because of its high levels of polyunsaturated fatty acids and relatively low antioxidant activity [1]. The production of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial dysfunction in the brain are both associated with the progression of various neurodegenerative conditions, including Parkinson's disease (PD) [2]. It is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the SN, resulting in a deficiency of dopamine in the striatum and other nuclei that leads to motor, limbic and cognitive impairment [3].

Brain oxidative stress have been shown in PD patients, who have decreased glutathione (GSH) levels, increased levels of iron, neuromelanin-associated redox-active iron, lipoperoxidation, protein oxidation, and DNA damage in the substantia nigra (SN) [4-6]. Antioxidant therapy has been suggested to ameliorate these effects [7]. A growing number of studies have been carried out on drug screening for neuroprotectants, especially those bioactive substances obtained from natural compounds which can have low toxicity and can be used via oral administration or taken in the diet [2,7]. Among these substances, polyphenols such as flavonoids present in fruits and vegetables have been extensively studied and proposed as potential therapeutic agents in epidemiological diseases with socio-economic repercussion [8].

Anacardium occidentale, popularly known as the cashew tree, is a tropical tree native to northeastern Brazil. Peduncles and nuts can be eaten raw or converted into various nutritional products (juice, tea, jam, and beverages). The cashew nut liquid (CNSL) is a by-product obtained during the processing of cashew nuts from which AA is extracted [9]. AA is a flavonoid and has been described as the main active compound of CNSL. *In vitro* assays suggest that the side chain of AA and phenolic ring are responsible for its antioxidant capacity [10]. Moreover, *in vivo* studies have also shown that AA has anti-inflammatory, anticancer [11], antimicrobial [12] and gastroprotective properties [13]. It also protects against epidermal thickening induced by ultraviolet rays [14]. Enzymatic assays demonstrated that AA hampers the production of superoxide radicals and uric acid by xanthine oxidase [15] and inhibits cyclooxygenase, lipoxygenase [16], tyrosinase [17] and histone acetyltransferase activities [18, 19].

All biochemical studies above cited suggest a potential therapeutic use of AA especially for pathological conditions where inflammation and oxidative stress occur. Recent studies using cell lineages have demonstrated that this flavonoid is able to

reduce neuronal damage modulating histone hyperacetylation induced by pesticides such as dieldrin and paraquat [20, 21]. Nevertheless, none of these studies were carried out in order to test antioxidant effects of AA systemic administration on the central nervous system under conditions of impaired redox balance. Therefore, in the present study, using an experimental model of PD, based on inhibition of mitochondrial complex I of the electron transport chain, we hypothesized that AA taken orally can exert neuroprotection and reduce rotenone-induced OS in the nigrostriatal system and cerebral cortex of rats.

2. Material and methods

2.1. Animals

This study used adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. Albinus) weighing 250 to 300 g, from the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE) and mice (*Mus musculus*, var. Swiss) of both sexes, weighing between 40 and 46 g, obtained from the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), UFPE. The animals were maintained under standard environmental conditions (12-h light/dark cycle; light on 6 am) and temperature $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and fed with commercial chow (Labina[®], Purina, Brazil) and water *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Pernambuco, under license N^o. 23076.014558/2011-55, according to the standards recommended by the Brazilian College for Animal Experimentation.

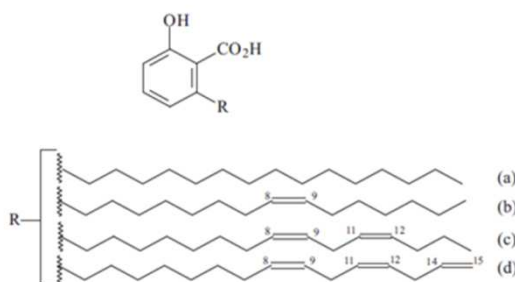
2.2. Reagents

Rotenone was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and dissolved (3 mg/mL) before the beginning of treatment in dimethyl sulfoxide (DMSO) (10% w/v in sunflower oil, pH 7.4) for 5 days. During treatment period, the rotenone solution was stored in a refrigerator (6°C).

Cashews (*A. occidentale*) were harvested at the Embrapa Tropical Agroindustry Experimental Station, located in Paraipaba, Ceará, Brazil, during the 2009 summer season. The fruit came from a commercial cultivar (CCP-76) whose genetic material is maintained in Embrapa's germ plasm bank. The fresh cashew apples were manually separated from the nuts and were provided as a kind gift by Dr. Edy Sousa de Brito (Embrapa, Fortaleza, Brazil). The AA used in this study was extracted from the CNSL

and kindly provided by Dr. Maria Teresa Salles Trevisan – Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. The AA was isolated according to Trevisan et al. [10] and Morais et al. [13]. In the laboratory, AA was stored at a temperature of -16°C. Immediately before use, it was dissolved in a tween 80 solution (2% w/v in water). The chemical structure of AA is shown in Figure 1. Butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrilidrazil (DPPH), thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), sodium pentobarbital solution, peroxide, and epinephrine, used in biochemical analyses, were also acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). Entellan was acquired from Merck Sharp & Dohme Corporation, USA. Fluoro-Jade C (FJC) was acquired from Merck Millipore, USA.

Figure 1: Chemical structure of Anacardic acid according to Carvalho et al., (2011)



2.3. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity

The *in vitro* antioxidant activity of AA was determined by the capture of DPPH, radical assay according to the method described by Brand-Williams et al. [22]. Aliquots (0.5 mL) of a solution containing different concentrations of AA (5, 10, 25, 50, 75, 125, 250 and 500 µg/mL) were added to 1.5 mL of a methanolic solution of DPPH (60 mM). The solutions were homogenized and incubated for 30 min at room temperature (~ 22°C) and the absorbance of the resulting solution was read in a spectrophotometer at 515 nm. A decrease in the optical density reading of the AA samples was compared to the standard antioxidant Butylated hydroxytoluene (BHT), as the positive control, thus establishing the percentage of DPPH discoloration, according to the formula below:

$$\% \text{ protection} = \frac{(\text{absorbance of BHT} - \text{absorbance of AA sample}) \times 100}{\text{absorbance of BHT}}$$

The methanolic solution of DPPH was used as a negative control. Antioxidant activity was expressed as half maximal inhibitory concentration IC_{50} which represents the sample concentration required to inhibit 50% of the radical DPPH, compared to the negative control. All experiments were done in triplicate.

2.4. Assessment of acute toxicity of AA

In this test, male and female mice ($n= 6/\text{sex}$) were housed in cages and deprived of food overnight, with free access to water. A single dose of 5000 mg/kg body weight of AA was administered orally to the animals by gavage. In each case, the volume administered was 10 mL/kg. Following administration, the animals were carefully observed during the first 3 hours and thereafter, on a daily basis for 14 days, for any toxic signs and symptoms or death. Signs and symptoms of toxicity included: (1) autonomic effects, such as salivation and piloerection; (2) central nervous system effects, such as tremors and convulsions and (3) changes in activity levels, posture and strength [23]. Body weight, food and water consumption were recorded daily.

2.5. Pharmacological studies

The animals were randomly divided into nine experimental groups treated over 5 consecutive days ($n= 8/\text{group}$). Rats from Group 1 received tween 80 (2% w/v in water) by gavage (1 mL/kg) and 1 hour after, vehicle (sunflower oil 90% w/v + DMSO 10% w/v; s.c.). Group 2 received tween 80 (2% w/v) by gavage and 1 hour after, rotenone (3 mg/kg/day, s.c.). Groups 3–8 were treated with AA at 1, 3, 10, 25, 50, or 100 mg/kg/day by gavage 1 hour after, rotenone (3 mg/kg/day, s.c.). Twenty-four hours after the last day of treatment, the rats were evaluated by behavioral tests. Group 9 was treated with AA only at 100 mg/kg/day by gavage in order to test whether this compound is able to act on superoxide dismutase activity. Body weight of all rats was recorded on the first and last days of the treatment.

2.6. Behavioral Tests

2.6.1 Exploratory and General locomotor activity

To quantify the exploratory and general locomotor activity the open field test according Gould et al. [24] was used. Each individual rat was placed individually in the center of an open-field arena (a circular wooden box with a diameter of 100 cm and 40 cm high, with a floor divided into 19 regions). The frequency of locomotion (number of times that each animal entered in the delimited regions with its four paws), rearing frequency (number of times that the animal stood on its hind legs, with the trunk perpendicular to the floor of the arena), immobility time (time the animal stood without making any movement), and time to start of movement (time for the animal to start moving out of the center of the open-field arena) were assessed for 5 min. The arena was cleaned with 5% ethanol before each test but each animal was put there, only after the alcohol smell had disappeared.

2.6.2. Rotarod activity

In order to quantify the motor deficit, we used the rotarod test at a fixed speed according to [25]. To perform this test, the animal was placed with all four paws on a bar with a diameter of 7.0 cm and set 25 cm above the floor. The bar rotated at a speed of 25 rpm. Before being submitted to the different treatments, the rats were trained in two sessions of 180 seconds for habituation. Animals were placed on the rotating bar and the time of stay on the bar was recorded. A cut-off time of 180 seconds was maintained throughout the experiment. The average results were recorded as time of fall.

2.6.3. The elevated T-maze test for spatial memory performance

The test was performed according to Kumar et al. [26] who that used this test in order to evaluate limbic and cognitive memory performance in experimental models of ganglia basal neurodegeneration.

The elevated T-maze consisted of one open arm (50x10 cm) and two closed arms of the same dimensions, facing each other and a central area (10x10 cm) connecting the arms. Closed arms had 40 cm height walls. The rats were placed

individually at the end of the open arm facing away from the central area. The time taken by the animal to move from the open arm to either of the closed arms was registered 24 hour after the last day of treatment and was called initial latency. Rats were allowed to explore the maze for 30 seconds after acquisition of the initial latency, and were then returned to their cages. The learning retention latency was evaluated again the next day. The percentage of memory retention was calculated using the following formula:

$$(initial\ latency - latency\ repetition) \times 100 / initial\ latency$$

Immediately after the behavioral tests, the animals were sacrificed for biochemical assays.

2.7. Biochemical studies

2.7.1. Dissection and homogenization

After behavioral assessments, the animals were anesthetized and then decapitated. The brains were removed and placed on ice. The striatum, cortex, and substantia nigra were dissected and weighed. After weighing, the pooled tissue (n=5) of each region was homogenized (w/v) in a potter with phosphate buffered saline (PBS 1:10) to which BHT (0.004% w/v) was added to prevent autoxidation of the samples. The homogenate was centrifuged at 10000 *g* for 30 min at 4°C and an aliquot of supernatant was separated for biochemical analysis.

2.7.2. Measurement of lipid peroxidation

Quantitative measurement of lipid peroxidation was performed according to the method of Buege and Aust [27]. The amount of malonaldehyde (MDA) present in the samples was quantified by the reaction with TBA. Aliquots of 500 µL of the supernatant were added to 1 mL of a TBA solution: 0.38% (w/w) TBA, 250 mL of 1N cloridric acid (HCl), 15% (w/w) trichloroacetic acid (TCA), and 20 mL of 2% (w/v) ethanolic BHT. The solution was heated at 100°C for 15 min, followed by cooling in an ice bath. Then, 1.5 mL of n-butanol was added. The mixture was shaken and centrifuged at 3000 *g* for 20 min. After centrifugation, the upper phase was collected and analyzed in a

spectrophotometer (CARY 3E UV-Visible Spectrophotometer Varian, Inc; Brazil) at 532 nm. The results were expressed as nmol/mg of protein using a standard curve generated with different concentrations of TMP) solution.

2.7.3. Total Superoxide dismutase (tSOD) activity

Total SOD activity in the substantia nigra, cortex and striatum was determined according to the method by Misra and Fridovich [28]. This method relies on the ability of tSOD to inhibit the oxidation of epinephrine. The epinephrine self oxidizes at basic pH (10.2) through a mechanism that generates superoxide radicals that, in turn, activate the reaction of autoxidation. To evaluate the enzymatic activity, 100 μ L of the homogenate was added to 880 μ L of carbonate buffer (0.05 M, pH 10.2, 0.1 mM ethylene-diamino-tetraacetic acid. Twenty microliters of epinephrine (30 mM in 0.05% acetic acid) were added to the mixture and the reading was performed on a spectrophotometer (CARY 3E UV-Visible Spectrophotometer Varian, Inc; Brazil) at 480 nm. The enzymatic activity is expressed as the amount of enzyme that inhibits 50% of the oxidation of epinephrine, which is equal to 1 unit.

2.8. Fluoro Jade C assay

In order to analyze neurodegeneration in the SN, another set of experiments was done using FJC according to Ehara and Ueda (2009) [29]. After 5 days of treatment with AA followed by behavioral tests, three animals from each group were anesthetized with a sodium pentobarbital solution (100 mg/kg, i.p.). They were then perfused with a 0.9% NaCl solution, followed by 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4. The brains were post-fixed in the same fixative for 2 h, rinsed in a phosphate buffer (PB), and subsequently cryoprotected in solutions of 10, 20, and 30% sucrose in PB.

Brain blocks were serially cut on a freezing microtome (Leitz Wetzlar) into 50- μ m thick sections in the parasagittal plane. All sections were collected serially in PB and arranged in six series. The Atlas of Paxinos and Watson [30] was used to delimit cytoarchitectonic regions of SN. Sections of one series per animal were mounted on gelatin-coated slides, air-dried, and subjected to FJC staining. Slides were immersed in a 1% NaOH solution (in 80% ethanol) for 5 min, rinsed for 2 min in 70% ethanol and for 2 min in distilled water, and then incubated in a 0.06% potassium permanganate

solution for 5 min. After washing in water (2 min), the slides were immersed in a FJC solution (0.0001%, in 0.1% acetic acid) for 10 min, followed by washing in distilled water. The slides were air-dried on a slide warmer at 50°C for 30 min, cleared in xylene, and covered with Entellan. The presence of FJC-positive neurons in the SN was analyzed in three animals of control, rotenone, AA (25, 50 and 100 mg/kg/day) groups at the stereotaxic coordinate identified as corresponding approximately to lateral 1.9 mm (plate 81) according to Paxinos and Watson [30].

2.9. Statistical analysis

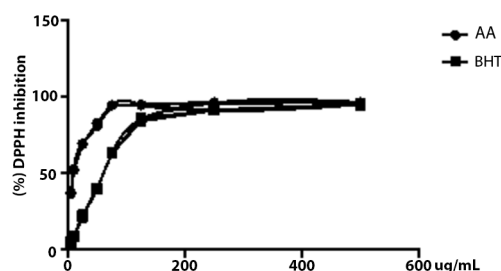
The results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The difference between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison /post-hoc test to determine the significance level. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism[®] 5.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA). p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Reduction of DPPH

DPPH radical scavenging activity was obtained with all concentrations of AA tested (5-500 mg/mL). The AA was able to reduce the stable free radical DPPH to the yellow-colored 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl with an IC₅₀ of 9.1 μ g/mL. The AA concentration of 75 μ g/mL was able to induce 94.09% of DPPH inhibition. This effect increased up to 96.32% in the AA concentration of 500 μ g/mL. Under similar conditions, the synthetic antioxidant BHT presented an IC₅₀ 61.1 μ g/mL and induce 95.12% of DPPH inhibition only when was used in the concentration of 500 μ g/mL. (Figure 2)

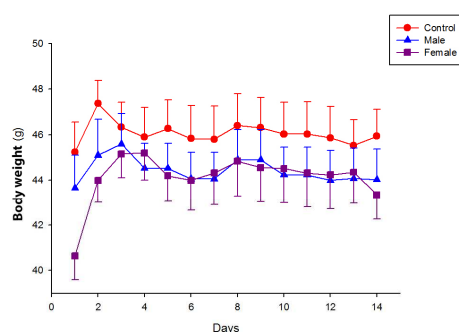
Figure 2: DPPH radical scavenging activity of Anacardic acid and the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in the concentration range of 5-500 mg/mL. The IC₅₀ estimated for Anacardic acid and BHT were 9.1 µg/mL and 61.1 µg/mL, respectively.



3.2. Acute toxicity

The single AA dose of 5000 mg/kg administered orally to mice did not modify body weight of males (43.66 ± 1.42 g at first day and 44.03 ± 1.34 g at 14th day) and females (40.64 ± 0.95 g at first day and 43.36 ± 0.99 g at 14th day) compared to the control animals (45.23 ± 1.32 g at the first day and 45.93 ± 1.17 g at 14th day). Figure 3 shows daily body weights of both groups during 14 days.

Figure 3: Effect of Anacardic acid on the dough variation in the acute toxicity test. (●) Male animals treated with vehicle in the Control group (▲), Male animals treated with single dose of Anacardic acid 5000 mg/kg, (■) Female animals treated with single dose of Anacardic acid 5000 mg/kg (n = 6 per group) .



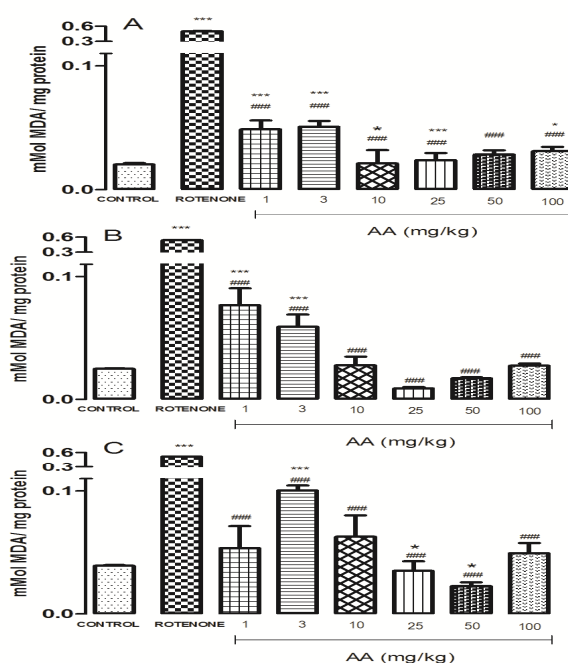
Death or signs and symptoms of toxicity including autonomic effects (salivation, and piloerection), central nervous system effects (tremors and convulsions) or behavioral effects were not observed in any of the mice treated with AA.

In the group treated by AA 5000 mg/kg, differences in the daily consumption of food (28.3 ± 1.43 g/day) and water (52.21 ± 3.47 mL/day) were not also observed when compared to control group (27.0 ± 4.97 g/day and 51.99 ± 2.38 mL/day). Therefore, the acute minimum lethal dose of AA for mice could not be calculated, suggesting that it is higher than 5000 mg/kg.

3.3. Effect of AA on brain lipid peroxidation

As expected, the administration of rotenone for 5 days induced lipoperoxidation as indicated by the significant increase of MDA levels in the SN, cortex, and striatum in comparison to the control group. Treatment with AA (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) 1 hour before the administration of rotenone attenuated lipid peroxidation levels in the substantia nigra, cortex and striatum ($p < 0.00001$; ANOVA followed by Newman-Keuls as pos-hoc test), as shown by the significant decrease in MDA concentration (Fig. 4).

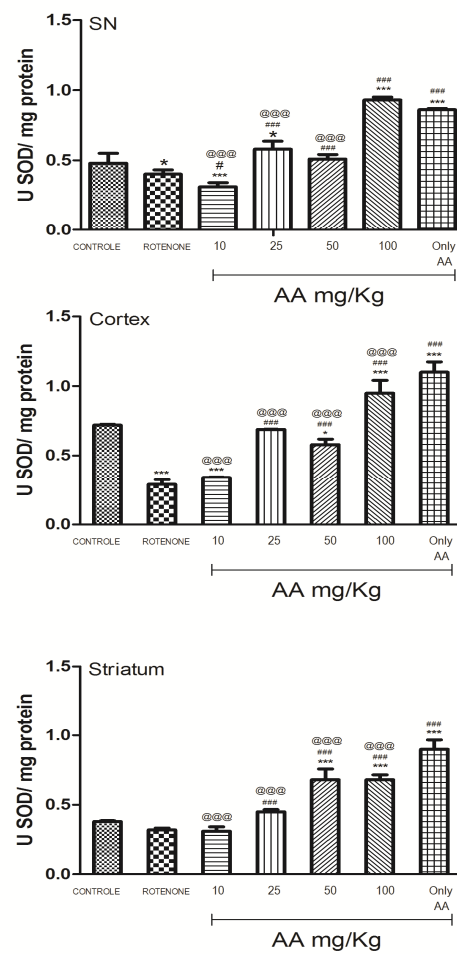
Figure 4: Levels of thiobarbituric acid-reactant substances (TBARS) in the substantia nigra (A), cerebral cortex (B), and striatum (C) of rats in the control and experimental groups treated with rotenone only or in combination with anacardic acid (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day). Each bar represents mean $\pm$ standard error of the mean. *** $p < 0.00001$, * $p < 0.05$ compared with control. #### $p < 0.00001$, # $p < 0.05$ compared with rotenone. One-way analysis of variance followed by Newman Keuls Multiple Comparison test. $n = 8$ per group).



3.4. Effect of AA on tSOD

The administration of rotenone produced a decrease in tSOD activity compared with the control group in the SN and cerebral cortex (Fig. 5A and B) but not in the striatum (Fig. 5C). Treatment with AA (25, 50 and 100 mg/kg/day) plus rotenone significantly increased the activity of this antioxidant enzyme in all regions analyzed (Fig. 5A, B and C). Doses of both 25 and 50 mg/kg/day AA were equally effective in elevating activity of tSOD in the SN and cerebral cortex, while 100 mg/kg/day significantly increased this effect compared to lower doses (Fig. 5A and B). In the striatum, a dose-dependent effect was detected between AA 25 and 50 mg/kg/day but no additional increase was induced by AA 100 mg/kg/day (Fig. 5C). In order to clarify mechanisms involved in this effect, one animal group was treated with AA 100 mg/kg/day in the absence of rotenone. As can be shown in the figure 5, AA alone was also able to increase tSOD activity, compared to the control condition. This increase varied according to the region, and corresponded to about 80% in the SN, 53% in the cerebral cortex and 230% in the striatum.

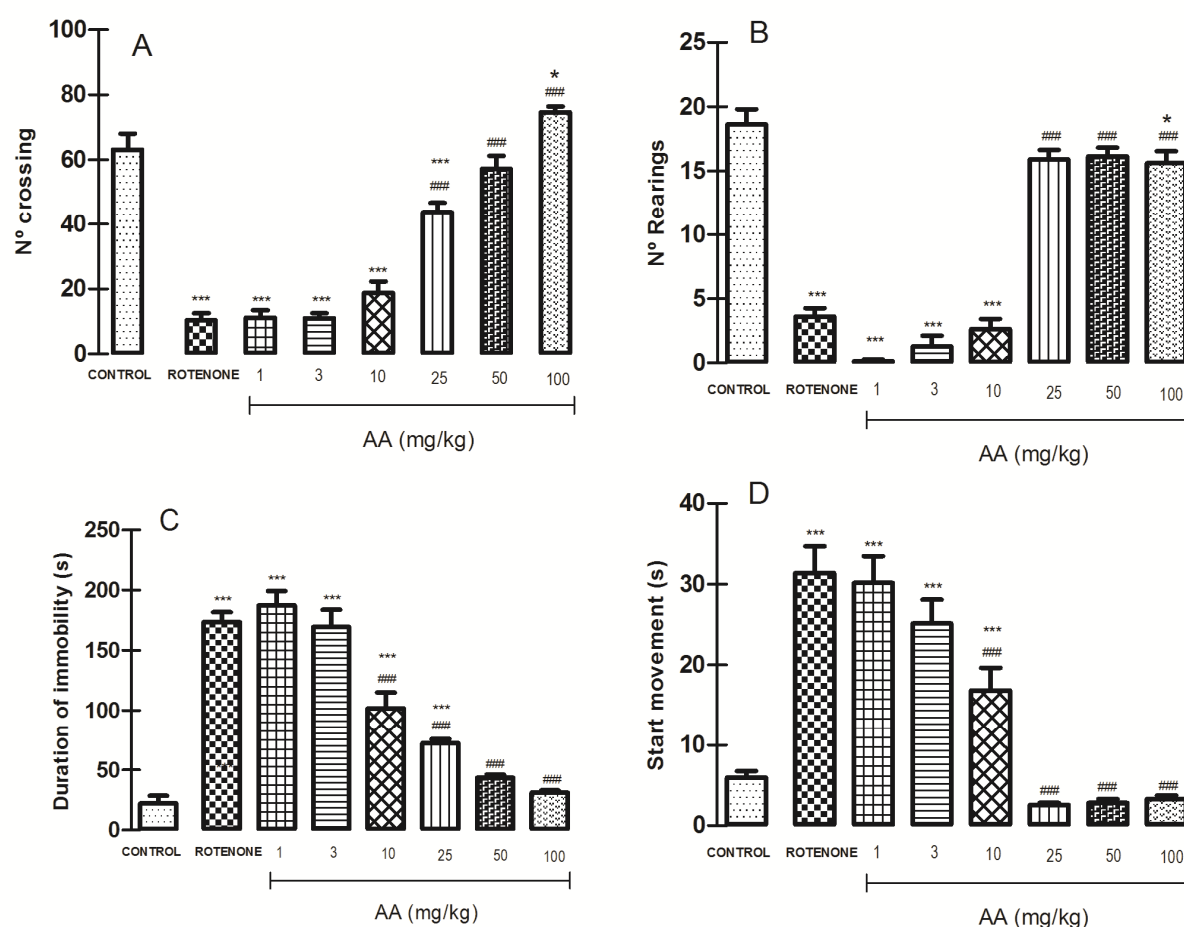
Figure 5: Total superoxide dismutase (t-SOD) activity in the substantia nigra (A), cerebral cortex (B), and striatum (C) of rats in the control and experimental groups treated with rotenone only or in combination with anacardic acid (10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) or with anacardic acid only (100 mg/kg/day). Each bar represents mean $\pm$ standard error of the mean. *** $p < 0.00001$, * $p < 0.05$ compared with control. ### $p < 0.00001$, # $p < 0.05$ compared with rotenone. @@@ $p < 0.00001$ compared to AA 100 mg/kg/day in the presence or absence of rotenone. One-way analysis of variance followed by Newman Keuls Multiple Comparison test. $n = 8$ per group).



3.8 Effect of AA on locomotor activity

Administration of rotenone for 5 days significantly reduced the ambulatory activity and rearings of the rats and increased the duration of immobility and time to start movement of rats in the open field test. Treatment with AA (10, 25, 50, and 100 mg/kg) for 5 days significantly improved locomotor activity and rearings and decreased the immobility time and the time to start movement in rats (Fig. 6).

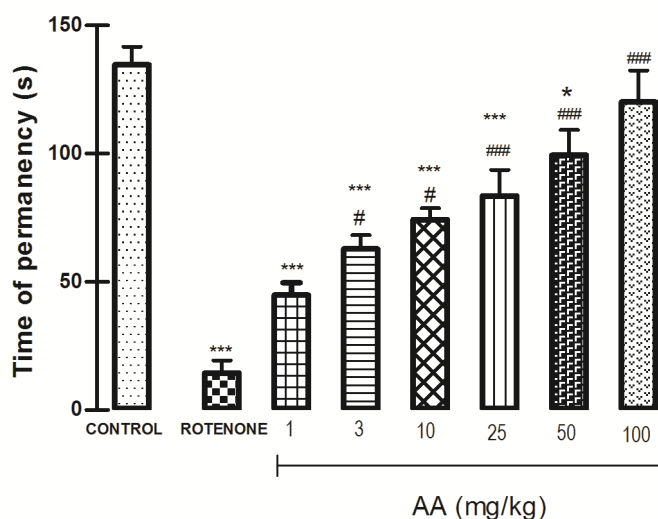
Figure 6: Effect of Anacardic acid (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) on locomotor activity in the open field test of rats that received rotenone (n = 8 per group). (A) Total ambulatory activity, (B) rearings, (C) duration of immobility, (D) time of start of movement. Each bar represents mean $\pm$ standard error of the mean. *** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$ compared with control. . ### $p < 0.0001$, # $p < 0.05$ compared with rotenone. One-way analysis of variance followed by Newman Keuls Multiple Comparison test.



3.9. Effect of AA on rotarod test

Administration of rotenone caused a significantly decrease in the time of permanency of the animals compared with control animals in the rotarod test. Daily treatment with AA (3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) for 5 days significantly increased the time of permanency compared with the group that received only rotenone (Fig. 7).

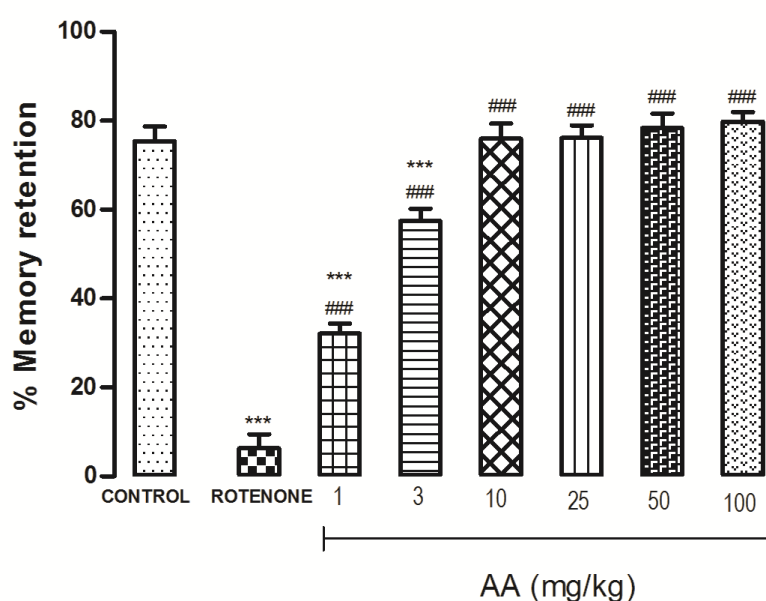
Figure 7: Effect of Anacardic acid (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) in the rotarod test in rats that received rotenone (n = 8 per group). Each bar represents mean $\pm$ standard error of the mean. *** p<0.0001, * p<0.05 compared with control. ### p<0.0001, # p<0.05 compared with rotenone. One-way analysis of variance followed by Newman Keuls Multiple Comparison test.



4.0. Effect of AA on memory performance in the elevated T-maze test

Treatment with rotenone caused marked memory loss, as shown by the significant decrease in the percentage of memory retention compared with the control group. Daily treatment with AA (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) 1 h before the administration of rotenone increased the percentage of memory retention in rats compared with treatment with rotenone alone (Fig. 8).

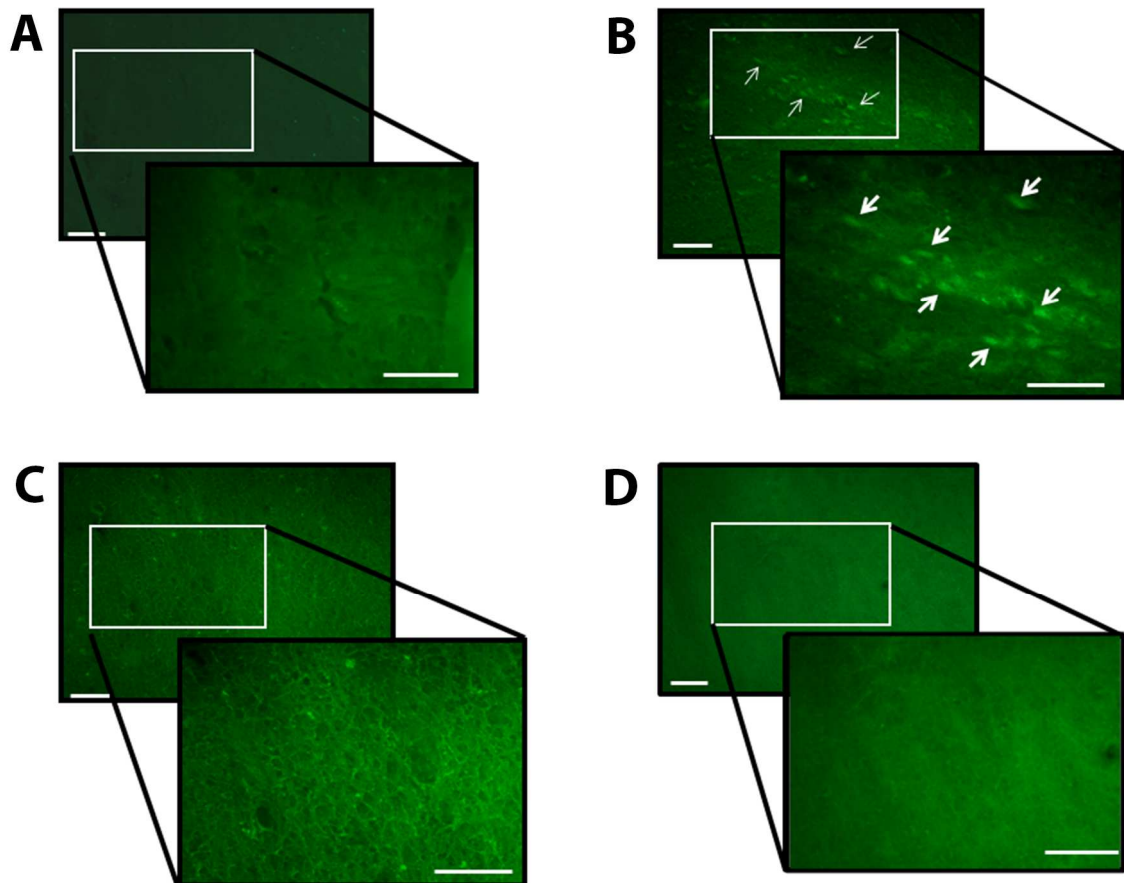
Figure 8: Effect of Anacardic acid (1, 3, 10, 25, 50, and 100 mg/kg/day) on memory performance in the elevated T-maze test, in rats that received rotenone (n = 8 per group). Each bar represents mean $\pm$ standard error of the mean. *** p<0.0001 compared with control. ### p<0.0001 compared with rotenone. One-way analysis of variance followed by Newman Keuls Multiple Comparison test.



4.1 Effect of AA on neurodegeneration assessed by FJC labeling

The animals that received rotenone only presented signals of neurodegeneration in the substantia nigra detected as FJC positive cells (Fig. 9B) compared to control condition (Fig. 9A). In the group pretreated with AA (25 and 100 mg/kg/day) followed by rotenone, no FJC positive cells were detected in the substantia nigra (Fig. 9C and D).

Figure 9: Photographs of epifluorescence microscopy showing brain parasagittal sections at the level of Substantia Nigra processed by Fluoro-Jade C staining. Images in low and high magnification of representative animals treated with vehicle (A), rotenone only (B) and with AA 50 mg/Kg/day (C) or AA 100 mg/Kg/day (D) followed by rotenone. Note the effect of AA in prevent signals of neurodegeneration induced by rotenone. Scale bars: 40 μ m.



4. Discussion

The present study tested the hypothesis that AA systemically administered would have a potential antioxidant and neuroprotector action upon the rat nigrostriatal system and cerebral cortex. Systemic rotenone treatment for five days, used as an experimental model of PD, was able to induce neurodegeneration in the SN and increased lipoperoxidation levels in all regions analyzed. Nevertheless, in the majority of the rats this treatment did not induce mortality. Acute toxicity assessment in mice using a single AA dose of 5000 mg/kg showed for the first time that even in a high dose, this compound does not provoke toxic signs. According to Kennedy et al. [31], substances that present a lethal dose 50% (LD₅₀) higher than 5000 mg/kg by the oral route can be considered practically nontoxic. Therefore, our present findings reinforce this idea with respect to AA, adding information to previous evidence that successive oral administration of AA using 300-1000 mg/kg or a single dose of 2000 mg/kg is nontoxic [32].

Nowadays there is a growing body of evidence that OS contributes to the etiology of PD where mitochondrial dysfunction is considered to be one of the mechanisms responsible for neurodegeneration in the brain [33]. Several markers of lipid peroxidation are increased in brains of patients with PD [5]. Similarly, cumulative oxidative damage is the primary mechanism by which rotenone exposure leads to inhibition of complex I of the mitochondrial electron transport chain and degeneration of midbrain dopaminergic neurons [34]. It has been shown that several types of antioxidants may attenuate the toxicity promoted by rotenone [34, 35]. For this reason, this approach was used in the present work.

In our study, administration of rotenone via a subcutaneous route promoted increased levels of lipoperoxidation (~26 fold) in the substantia nigra, striatum and cerebral cortex in comparison to the control condition. At the same time, lower levels of tSOD activity were observed in the SN and cerebral cortex. AA treatment was almost completely able to blunt lipoperoxidation provoked by rotenone in low doses such as 1 mg/kg/day. This effect was similar in order of magnitude among SN, cerebral cortex and striatum (92, 87 and 90% reduction, respectively). It is noteworthy to mention that this protective effect occurred even when 100 mg/kg AA was used, suggesting the absence of a biphasic modulation in this dose range.

The effects of AA on rotenone induced-lipoperoxidation were at least in part due to a stimulatory action on the tSOD enzyme. These findings were supported by the findings that AA was effective in elevating activities of tSOD even in the absence of rotenone. To our knowledge, this is the first evidence of a modulatory effect of this flavonoid on this antioxidant enzyme, providing a novel molecular mechanism of action of AA. Besides this activity on tSOD, we cannot discard the possibility that the antioxidant action of AA is also due to the presence of alkyl side chains, which confer on this compound an ability to inhibit the generation of superoxide anions and uric acid by xanthine oxidase [10]. Another aspect that should be taken in account is the pharmacological action of AA as a non-selective inhibitor of histone acetyltransferase (HAT). It has been demonstrated that rotenone treatment and ROS production can increase histone acetylation as one of mechanisms involved in cellular damage [36]. In addition, in a cell culture model of Parkinson's disease, it has been shown that the inhibition of HAT by AA protected against dopaminergic cell death induced by the pesticide paraquat [21].

It has been proposed that the cytoprotective capacity of an antioxidant molecule would be critical to define a potential neuroprotective therapeutic activity. In this aspect, the use of flavonoids would be advantageous considering that these molecules are able to inhibit the action of several enzymes and activate survival signals in addition to the direct scavenging of ROS [37]. Thus, effects of AA were also investigated in the present study with respect to its ability to reduce rotenone-induced signs of neurodegeneration in the SN. Our findings using FJC staining, which specifically labels damaged neurons [29], demonstrated that AA at doses from 25 to 100 mg/kg/day completely prevented signs of cell damage. This data reinforces previous evidence obtained *in vitro* [20, 21] and shows that a cytoprotective action of AA can occur even when it is systemically administered. In the dose range used in the present work, AA seems to be more protective than ascorbic acid, for example, which induced pro-oxidative effects in the cerebral cortex when was taken by oral route in doses of 60 and 120 mg/Kg/day [38].

Besides oxidant effects, rotenone can also modify several aspects of motor and cognitive behavior, including reduced activity, flexed posture, rigidity and catalepsy correlated with dopamine cell degeneration [39, 40, 41, 42] and neuroinflammation [35]. In this study, pretreatment with AA significantly reduced rotenone-induced behavior abnormalities, increasing general locomotor activity in the open field test, time

of permanence in the revolving bar (rotarod test) and in the percentage of memory retention in the elevated T-maze.

Comparative analysis of AA effects in improving motor and cognitive performance analyzed in these tests, demonstrated a better therapeutic efficacy of this flavonoid in increasing the time of permanence in the rotarod and memory retention, which were respectively reduced about 9 and 12 fold by rotenone. In these cases, AA doses of 1 or 3 mg/kg/day were enough to improve these parameters around 3 and 5 fold, respectively. Nevertheless, the dose dependent effects of AA in these tests were different. In the elevated T-maze, AA at 10 mg/kg/day completely reversed rotenone-induced effects whereas in the rotarod test the maximum effect was only observed at 100 mg/kg/day. Such results suggest beneficial effects of AA on two different pathways related to midbrain dopaminergic systems: first, the mesocorticolimbic system involved in the working memory [43], herein assessed by T-maze test; and second the nigrostriatal system, mainly associated with motor performance, especially under conditions that require balance (rotarod test) [25, 43, 44].

The open field test was used in the present study as a measure of exploratory behavior and general activity related to several neural circuits associated to the basal ganglia function [24, 44, 45]. Crossings assess the ambulatory movement; rearing, the exploratory behavior and the latency to start the movement mainly reflects the animal motivation. Such parameters are usually impaired in PD and this decline in neuromotor function was herein reproduced using rotenone. AA administered at a dose of 10 or 25 to 100 mg/kg/day was able to prevent rotenone-induced effects on these parameters. Such results are consistent with the neuroprotective action of AA on the biochemical and cellular parameters analyzed in the present study.

5. Conclusion

In conclusion, the present findings demonstrate for the first time that AA systemically administered by oral route may exert protective action on an experimental model of neurodegenerative disorder. Under this condition, AA is able to cross the brain-blood barrier and reach the central nervous system in sufficient amounts to have a positive effect, indicating an adequate bioavailability. Beneficial effects of AA were evident considering its ability to reduce behavioral impairment, OS and signs of neurodegeneration in the SN. Our results also provide a novel mechanism of AA action

indicating that SOD enzyme activity is a potential pharmacological target of this flavonoid. Thus, new perspectives on therapeutic use AA in PD as well as other dopamine related neurological disorders should be considered.

Acknowledgements

The author thanks Professor Carioca from Federal University of Ceara. João Henrique Costa e Silva, Rejane de Souza Silva, Henriqueta Dias Cardoso, José Luiz de Brito Alves from Federal University of Pernambuco. This study was funded by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) and CAPES-PROCAD-NF 2009(#068).

Conflict of interest

The authors declare that there is no potential conflict of interest in the research described in this article.

REFERENCES

- [1]. Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P. 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 827, 65–75.
- [2]. Melo, A., Monteiro, L., Lima, R.M.F., Oliveira, D.M., Cerqueira, M.D., El-Bach, R.S., 2011. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 467180, 14 pages.
- [3]. Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;79:368-376.
- [4]. Faucheux, B.A., Martin, M.E., Beaumont, C., Hauw, J.J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2003. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*, 86, 1142–8.
- [5]. Jenner, P., Olanow, C.W., 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44, 72–84.

- [6]. Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., Marsden, C.D., 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52, 381–9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x.
- [7]. Lau, F.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A. 2005. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26(1), 128–132.
- [8]. Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. 2013, 162750, 16 pages, doi.org/10.1155/2013/162750.
- [9]. Rodrigues, F.H.A., Feitosa, J.P.A., Ricardo, N.M.P.S., França, F.C.F., Carioca, J.O.B., 2006. Antioxidant activity of cashew nut shell liquid (CNSL) derivatives on the thermal oxidation of synthetic cis-1,4-polyisoprene. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 17, 265–71.
- [10]. Trevisan, M.T.S., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R., Wurtele, G., Pfundstein, B., Haubner, R., 2006. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 88–197.
- [11]. Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Price, B.D., 2006. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett*, 580, 4353–6.
- [12]. Mamidyala SK, Ramu S, Huang JX, Robertson AA, Cooper MA., 2013. Efficient synthesis of anacardic acid analogues and their antibacterial activities. *Bioorg Med Chem Lett*. 23:1667-1670.
- [13]. Moraes, T.C., Pinto, N.B., Carvalho, K.M., Rios, J.B., Ricardo, N.M., Trevisan, M.T., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chemico Biological Interactions*, 183, 264–9.
- [14]. Kim, M.K., Lee, S., Kim, E.J., Kong, K.H., Lee, D.H., Chung, J.H., 2013. Topical application of anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid) reduces UV-induced histone modification, MMP-13, MMP-9, COX-2 and TNF- α expressions in hairless mice skin. *J Dermatol Sci*, 70, 64–7. doi 10.1016/j.jdermsci.2012.11.008.
- [15]. Masuokaa, N., Kubo, I., 2004. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1688, 245–9.
- [16]. Ha, T.J., Kubo, I., 2005. Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4350–4.

- [17]. Kubo, I., Kinst-Hori, I., Yokokawa, Y., 1994. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *Journal of Natural Products*, 57, 545–51.
- [18]. Dekker, F.J., Haisma, H.J., 2009. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discovery Today*, 14, 942–8.
- [19]. Hemshekhar, M., Santhosh, M.S., Kemparaju, K., Girish, K.S., 2011. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview, 110, 122-132.
- [20]. Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F, Kanthasamy AG. 2010. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol*. 77(4): 621-32
- [21]. Song, C., Kanthasamy, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2011. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *NeuroToxicology*, 32, 586-595.
- [22]. Brand- Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- [23]. Malone, R.A., 1977. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. H. Warner, P. Wolf (Eds), *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*, Springer-Verlag, Berlin, pp 24–53.
- [24]. Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E., 2009. The open field test. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. *Neuromethods*, 42, pp 1-20 chapter 1.
- [25]. Monville, C., Torres, E.M., Dunnett, S.B., 2006. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *Journal of Neuroscience Methods*, 158, 219–223.
- [26]. Kumar, P., Padi, S.S., Naidu, P.S., Kumar, A., 2006. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behavioral Pharmacology*, 17, 485–92.
- [27]. Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–10.
- [28]. Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170–5.

- [29]. Ehara, A., Ueda, S., 2009. Application of fluoro-jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta Histochem Cytochem*, 42, 171–9.
- [30]. Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press Inc, California.
- [31]. Kennedy, G.L. Jr., Ferenz, R.L., Burgess, B.A., 1986. Estimation of acute oral toxicity in rates by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *Journal of Applied Toxicology*, 6, 145–8.
- [32]. Carvalho, A.L.N., Annoni, R., Silva, P.R.P., Borelli, P., Fock, R.A., Trevisan, M.T.S., Mauad, T., 2011. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 730–6.
- [33]. Anwar, N., George, M., Adrian, C.B.M., 2012. Oxidative stress in Parkinson's disease; parallels between current animal models, human studies and cells, oxidative stress and diseases, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0552-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-in-parkinson-s-diseaseparallels-between-current-animal-models-human-studies-a>
- [34]. Sanders, L.H., Greenamyre, J.T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med*, 62, 111–20.
- [35]. Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2003. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Experimental Neurology*, 179, 9–16.
- [36]. Choudhury, M., Park, P.H., Jackson, D., Shukla, S.D., 2010. Evidence for the role of oxidative stress in the acetylation of histone H3 by ethanol in rat hepatocytes. *Alcohol*, 44(6), 531-40.
- [37]. Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquio A. 2003. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res*. 36, 1613-20.
- [38]. Mendes-da-Silva RF, Lopes-de-Morais AA, Bandim-sa-Silva ME, Cavalcanti GD, Rodrigues AR, Andrade-da-Costa BL, Guedes RC. 2014. Proxidant versus antioxidante brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats

as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. *Neuropharmacology*. 86C:155-160.

- [39]. Alam, M., Schmidt, W.J., 2002. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res*, 136, 317–24.
- [40]. Betarbet, R., Sherer, T.B., Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301–6.
- [41]. Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., Greenamyre, J.T., 2009. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 34, 279–90.
- [42]. Ying-Jui, H., Shih-Chun, H., Cornelius, R.P., Kuei-Ying, Y., 2011. Effects of d-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: Potential for treatment of Parkinson's disease dementia. *Behavioural Brain Research* 219, 280–290.
- [43]. Groenewegen, H.J., 2003. The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plasticity*, 10, 107- 120.
- [44]. Graybiel, A.M., 2000. The basal ganglia. *Current Biology*, 10(14), R509-511.
- [45]. Roesler, R., Walz, R., Quevedo, J., de-Paris, F., Zanata, S.M., Graner, E., Izquierdo, I., Martins, V.R., Brentani, R.R., 1999. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^C. *Molecular Brain Research*, 71, 349–353.

ANEXOS

ANEXO A

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

R. Prof. Nelson Chaves, s/n
50070-450 / Recife - PE - Brasil
fones: (51 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (51 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 30 de setembro de 2010.

Ofício nº 318/10

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFPE
Para: Prof.: **Simone Sette Lopes**
Departamento: Fisiologia e Farmacologia/ CCS
Processo nº 23076.027073/2010-41

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, *"Estudo do efeito neuroprotetor de Anacardium occidentale L. e do Ácido anacárdico em modelo experimental da doença de Parkinson."*

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 09 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Atenciosamente,

Observação: Origem dos animais: Biotério de Fisiologia e Farmacologia do CCS da UFPE; Animais: Ratos e Camundongos; Linhagem: Ratos Wistar; Sexo: Machos; Idade: 2(dois) à 3(três) meses; Camundongos Mus Musculus, Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: 2(dois) à 3(três) meses; Nº de Animais previsto no projeto: 12 Camundongos (6 machos e 6 fêmeas), 272 ratos(machos).


Profa. Maria Teresa de Jesus
Presidente da CEUA
UFPE

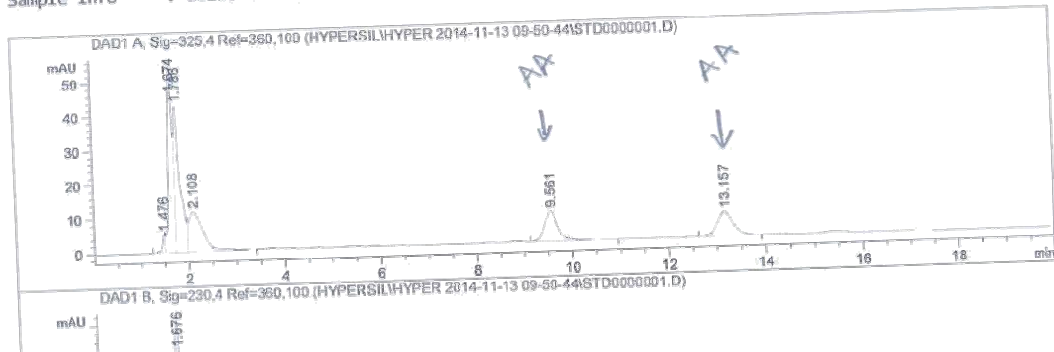
ANEXO B

SINTOMAS	NORMAL	TEMPO E DATA			
Aparência geral	4				
Frêmito vocal	0				
Irritabilidade	0				
Resposta ao toque	4				
Aperto da cauda	4				
Contorção	0				
Trem posterior	0				
Endireitamento	4				
Tônus muscular	4				
Força de agarrar	4				
Ataxia	0				
Reflexo auricular	4				
Reflexo corneal	4				
Tremores	0				
Convulsões	0				
Estimulações	4				
Straub	0				
Hipnose	0				
Anestesia	0				
Lacrimação	0				
Ptose	0				
Micção	4				
Piloereção	0				
Defecação	4				
Hipotermia	0				
Respiração	4				
Cianose	0				
Morte					

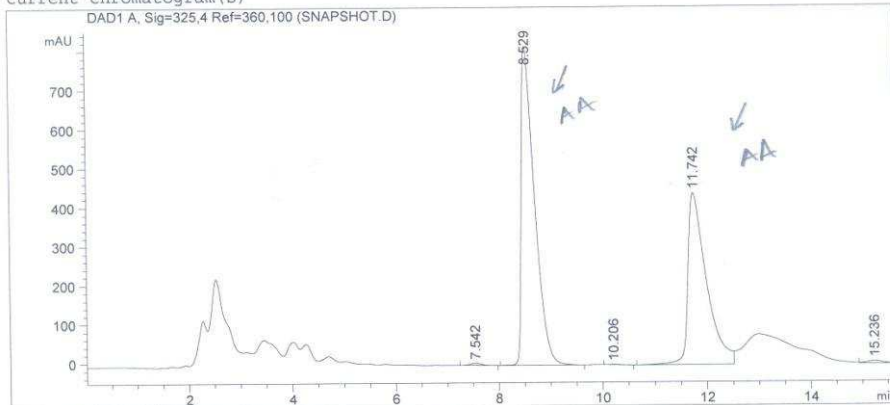
Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4. Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

ANEXO C

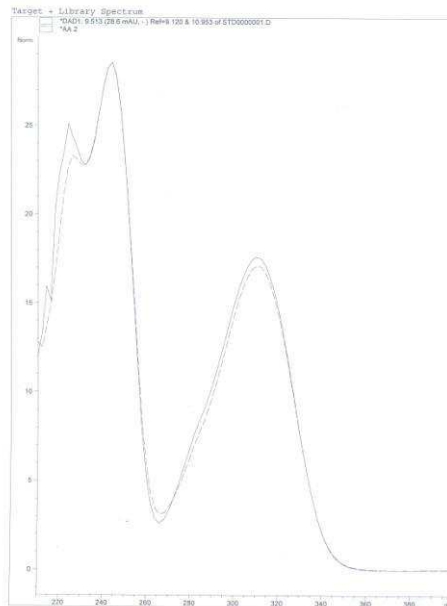
Last changed : 11/13/2014 9:50:44 AM by SYSTEM
 Sample Info : acido anacardico amostra 1 Recife



Current Chromatogram(s)



Print of Window 39: Target + Library Spectrum



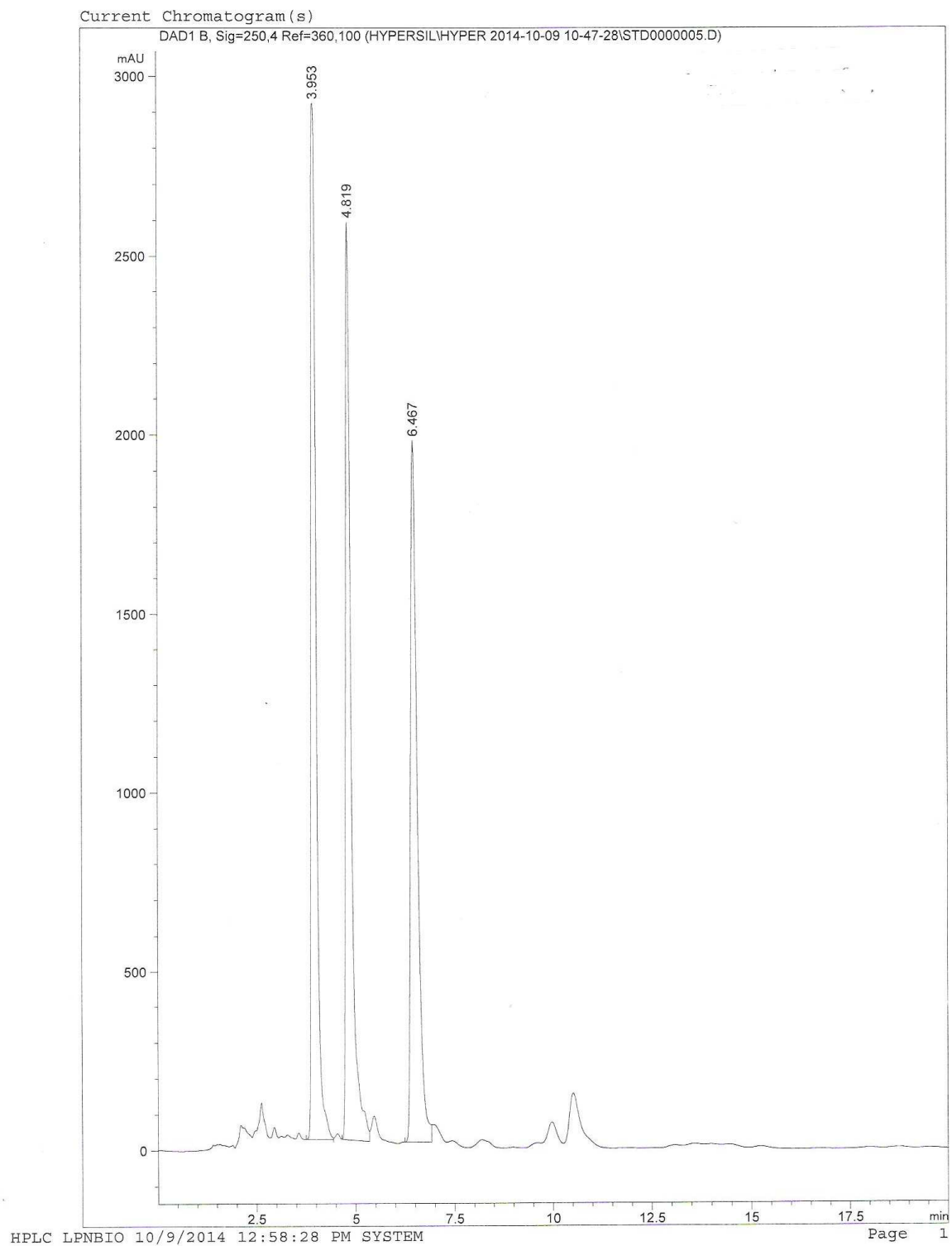
RP/LC LFW010 11/13/2014 11:01:48 AM SYSTEM

Page 1 of 1

ANEXO D

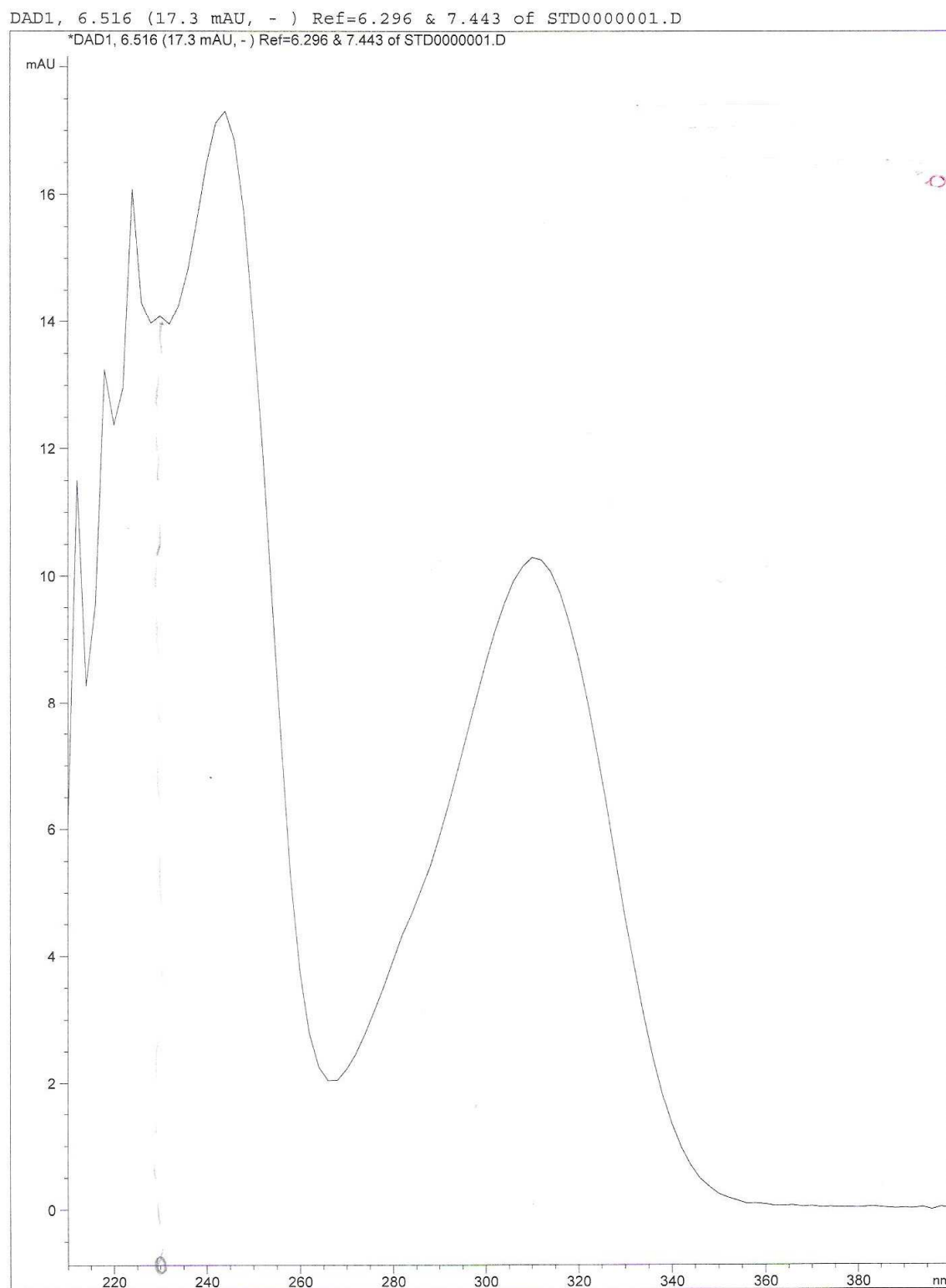
HPLC DA AMOSTRA DE ÁCIDO ANACÁRDICO UTILIZADA NESTE TRABALHO.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



PICO ÁCIDO ANACÁRDICO NA ANÁLISE PELA METODOLOGIA DO HPLC

Print of window 39: DAD1, 6.516 (17.3 mAU, -) Ref=6.296 & 7.443 of STD0000001.D



Print of window 39: DAD1, 4.594 (472 mAU, -) Ref=4.401 & 5.187 of STD0000002.D

DAD1, 4.594 (472 mAU, -) Ref=4.401 & 5.187 of STD0000002.D

