

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ADRIANA SERENIKI PASTRE

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi, NA ATIVIDADE COMPORTAMENTAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM RATOS.

RECIFE - 2016

ADRIANA SERENIKI PASTRE

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi, NA ATIVIDADE COMPORTAMENTAL E ESTRESSE OXIDATIVO NO MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador:

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

RECIFE-2016

P293e Pastre, Adriana Sereniki.
Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi, na atividade comportamental e estresse oxidativo no modelo experimental da doença de Parkinson induzida por rotenona em ratos / Adriana Sereniki Pastre. – 2016.
102 f. il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.

Inclui referências e apêndices.

1. Doença de Parkinson. 2. Efeito antioxidante. 3. Peroxidação de lipídios. 4. Rotenona. 5. *Schinus terebinthifolius* Raddi. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)
UFPE (CCS2017-188)

ADRIANA SERENIKI PASTRE

Efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi, na atividade comportamental e estresse oxidativo no modelo experimental da doença de parkinson induzida por rotenona em ratos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Aprovada em: 14/09/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabiano Ferreira (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Tadeu José DA SILVA Peixoto Sobrinho (Examinador Externo)
Faculdade do Vale do Ipojuca

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
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^a. Dr^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

A Jesus Cristo por nunca desistir de Seu amor.

A Nossa Senhora por cobrir com Seu manto sempre o meu caminho.

Aos meus pais, Anansi e Teófilo, pelo amor, exemplo de vida e ensinamentos
valiosos na minha formação pessoal.

A meu esposo, Juliano, por todo amor transmitido através de seu companheirismo e
dedicação.

A meu filho, Luiz Otavio, meu maior e mais perfeito projeto de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força concedida diante dos obstáculos da vida, me proporcionado clareza e determinação nas horas de desânimo e desespero.

À Prof^a. Dr^a. Simone Sette Lopes Laffayete, minha admiração e gratidão pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, paciência e incentivo ao longo deste caminho.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela parceria e confiança importantes na execução de atividades essenciais para este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite, por todos os conselhos indispensáveis para minha vida profissional.

A meus pais, pelo amor, confiança e incentivo durante esta etapa da minha vida e compreensão por minha ausência em alguns momentos.

Ao meu amor, Juliano, por todo carinho e amor durante todos esses anos, pelo companheirismo e incentivo no auxílio da minha realização profissional.

A minha amiga da pós-graduação Cybelle, por todo apoio no decorrer da elaboração deste trabalho, pela convivência diária e pelos momentos de lágrimas e risos.

Aos demais colegas do grupo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia - entre eles: Shirliane, Renata, Adriano e Artur, que acompanharam minha jornada de pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro, que contribuiu para o bom desenvolvimento deste trabalho.

À PROPESQ pelo apoio acadêmico.

Às meninas da secretaria da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Nerilin, Julia e Barbara, por compartilhar comigo todos os momentos de dificuldade e alegria.

A todos aqueles que estando bem próximo ou mesmo distante, desempenharam seu papel na torcida por mais uma conquista minha.

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento da população de idosos tem levado ao aumento na incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. Este fato tem proporcionado um interesse cada vez maior nos estudos que visam novas estratégias para a prevenção e cura dessas doenças. Várias evidências têm demonstrado que elevados níveis de estresse oxidativo, alterações mitocondriais, neuroinflamação e apoptose estão fortemente associados ao desenvolvimento de muitas doenças típicas do envelhecimento como Alzheimer, Parkinson e Huntington. Entretanto, as bases moleculares que desencadeiam estas doenças, ainda não estão totalmente compreendidas. De uma maneira geral, os principais mecanismos envolvidos no processo de neurodegeneração estão relacionados à excitotoxicidade mediada por aminoácidos excitatórios; formação de agregados proteicos; alterações da função mitocondrial; aumento intraneuronal de cálcio, proteínas pró-apoptóticas e mutações no DNA mitocondrial; bem como inibição de determinados complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, mecanismos neuroinflamatórios, com ativação de células da glia e liberação de mediadores pró-inflamatórios, estão diretamente ligados à degeneração e à morte neuronal. Considerando que *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira, apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, pareceu-nos atraente investigar se o extrato hidroalcoólico do caule dessa espécie possui efeito neuroprotetor nas alterações comportamentais e bioquímicas na doença de Parkinson (DP) experimental induzida por rotenona. Para tanto, cinco grupos (n=10/grupo) de ratos Wistar foram tratados por gavagem durante 7 dias consecutivos respectivamente com água + veículo do extrato (controle), água (rotenona) e doses crescentes de *S. terebinthifolius* (150, 300 e 600 mg/kg). Uma hora após o tratamento foi administrado rotenona (3 mg/kg, s.c.) a todos os grupos, exceto o grupo controle que recebeu o veículo (óleo de girassol 90%+10%DMSO). Decorridos 24h da administração de rotenona, foram realizadas avaliações comportamentais por meio dos testes de campo aberto, rotarod e testes de labirinto elevado-plus em ratos adultos Wistar. Também foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* de atividade antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH e peroxidação lipídica (TBARS), respectivamente. Os resultados mostram que a administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.) produziu hipolocomoção, aumento da imobilidade, descoordenação muscular e déficit de memória, enquanto que a administração prévia do extrato de *S. terebinthifolius* impediu a rotenona de provocar comportamento disfuncional sobre a atividade locomotora, rotarod e retenção de memória. A análise bioquímica da substância nigra, striatum e córtex revelou que a rotenona aumentou significativamente a peroxidação lipídica, o que foi inibido pelo pré-tratamento com todas as doses de *S. terebinthifolius*. Dessa forma, conclui-se possível efeito neuroprotetor de *S. terebinthifolius* possivelmente mediada por meio da sua atividade antioxidante, indicando por sua vez um potencial benefício terapêutico desta espécie no tratamento da doença de Parkinson.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Parkinson. Efeito antioxidante. Peroxidação de lipídios. Rotenona. *Schinus terebinthifolius* Raddi.

ABSTRACT

In recent years, the increase of the aging population has led to increased incidence of neurodegenerative diseases worldwide. This fact has given an increasing interest in studies aimed at new strategies for prevention and cure of these diseases. Several evidences have demonstrated that elevated levels of oxidative stress, mitochondrial changes, neuroinflammation and apoptosis is strongly associated with the development of many typical diseases of aging such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's. However, the molecular basis that trigger these diseases are not yet fully understood. In general, the key mechanisms involved in the neurodegeneration process are related to excitotoxicity mediated by excitatory amino acids; formation of protein aggregates; changes in mitochondrial function; increase in intraneuronal calcium, proapoptotic proteins and mutations in mitochondrial DNA; and inhibition of certain complexes of the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, neuroinflammatory mechanisms with glial cell activation and release of proinflammatory mediators are directly linked to degeneration and neuronal death. Whereas, *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), commonly known as aroeira, has anti-inflammatory and antioxidant properties, it seemed attractive to investigate whether the hydroalcoholic extract of the stem of this species has neuroprotective effect on the behavioral and biochemical changes in Parkinson's disease (PD) trial rotenone-induced. For this, five groups (n= 10/group) Wistar rats were treated by gavage for 7 consecutive days, respectively extract with water + vehicle (control), water (rotenone) and increasing doses of *S. terebinthifolius* (150, 300, and 600 mg/kg). One hour after treatment rotenone was administered (3 mg / kg, s.c.), all groups except control group received the vehicle (sunflower oil 90% + 10% DMSO). After 24 hours of rotenone management, behavioral assessments were conducted through the open field test, rotarod and elevated-plus maze tests in adult Wistar rats. They were also carried out *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity by radical capture method DPPH and lipid peroxidation (TBARS), respectively. The results show that rotenone administration (3mg/kg, sc) produced hypolocomotion, increased immobility, muscle incoordination and memory deficit, whereas the prior administration of *S. terebinthifolius* extract prevented rotenone cause dysfunctional behavior on locomotor activity, rotarod and memory retention. Biochemical analysis of the substantia nigra, striatum and cortex revealed that rotenone significantly increased lipid peroxidation, which was inhibited by pre-treatment with all doses of *S. terebinthifolius*. Thus, it is concluded possible neuroprotective effect of *S. terebinthifolius* possibly mediated by its antioxidant activity, in turn indicating a potential therapeutic benefit of this species in the treatment of Parkinson's disease.

KEYWORDS: Antioxidant effect. Lipid peroxidation. Parkinson's disease. Rotenone. *Schinus terebinthifolius* Raddi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secções transversais de mesencéfalos de indivíduos controle (à esquerda) e de um paciente portador da doença de Parkinson (à direita).	21
Figura 2. Despigmentação da porção ventrolateral da substância negra parte compacta.	22
Figura 3. Estrutura química da rotenona e planta <i>Derris spp.</i>	30
Figura 4. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	33
Figura 5. Teste do campo aberto	41
Figura 6. Teste do Rotarod	42
Figura 7. Labirinto em cruz elevado	43
Figura 8. Cromatograma de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) detectado a 278 nm.	50
Figura 9. Amostra de <i>Schinus terebinthifolius</i> a presença de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) e taninos condensados (catequina e epicatequina).	51
Figura 10. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre o consumo de água dos animais.	52
Figura 11. Efeito da rotenona (3 mg/kg s.c.) e <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre o consumo de ração dos animais	52
Figura 12. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre a massa corporal dos animais no dia 1 do experimento	53
Figura 13. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre a massa corporal dos animais no dia 7 do experimento	53
Figura 14. Efeito de <i>Schinus terebinthifolius</i> (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral) 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na frequência de locomoção no campo aberto após 7 dias	54
Figura 15. Efeito de <i>Schinus terebinthifolius</i> (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3mg/kg, s.c.), na frequência de levantar após 7 dias.	55

- Figura 16.** Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.) no tempo de imobilidade no campo aberto após 7 dias 55
- Figura 17.** Efeito da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600mg/kg), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na latência para início do movimento após 7 dias. 56
- Figura 18.** Efeito da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), no tempo de permanência (s) no teste do Rotarod após 7 dias 57
- Figura 19.** Efeito do pré-tratamento via oral da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600mg/kg) 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.) na retenção de memória no teste do labirinto em cruz elevado após 7 dias 58
- Figura 20.** Atividade antioxidante *in vitro* do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* Raddi e do padrão BHT. 60
- Figura 21.** Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na concentração em nMol de malonaldeído/mg de proteína na substancia negra. 61
- Figura 22.** Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona 3mg/kg s.c., na concentração em nMol de equivalentes de malonaldeído por miligramas de proteína no estriado 62
- Figura 23.** Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona 3mg/kg s.c., na concentração em nMol de equivalentes de malonaldeído por miligramas de proteína no córtex 62

ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina
ATP: adenosina trifosfato
BHT: di-terc-butil metil fenol
CEA: coeficiente de eficácia alimentar
CNS: Central Nervous System
DAT: transportador de dopamina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DP: doença de Parkinson
DPPH': 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROs: espécies reativas do oxigênio
FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HCl: ácido clorídrico
HPLC: High performance liquid chromatography
LPS: lipopolissacarídeo
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridina
NaCl: cloreto de sódio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH: hidróxido de sódio
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: óxido nítrico
PBS: solução salina com tampão fosfato
RPM: rotações por minuto
S.C.: subcutânea
SNC: Sistema Nervoso Central
TBA: ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
V.O.: via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Epidemiologia	20
3.2 Fisiopatologia da Doença de Parkinson	21
3.3 Etiologia da Doença de Parkinson	23
3.3.1 Alterações genéticas	23
3.3.2 A Neuroinflamação	24
3.3.3 Estresse Oxidativo	24
3.4 Modelo Animal da Rotenona	29
3.5 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico	37
4.2 Análise da extração de componentes de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por procedimento de método cromatográfico	38
4.3 Animais	38
4.4 Grupos experimentais	39
4.5 Consumo durante o tratamento	39
4.6 Avaliações comportamentais	39
4.6.1 Teste do Campo Aberto (Open Field)	40
4.6.2 Teste do “Rotarod”	42
4.6.3 Teste do labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze)	42
4.7 Análises Bioquímicas	44
4.7.1 Avaliação da atividade antioxidante “ <i>in vitro</i> ”	44
4.7.2 Avaliação da atividade antioxidante “ <i>in vivo</i> ” - lipoperoxidação (TBARS)	45
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6. RESULTADOS	49

6.1 Análise da Extração de Componentes de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi por HPLC	49
6.2 Consumo dos animais durante os dias de tratamento	52
6.3 Efeito de <i>Schinus terebinthifolius</i> e rotenona avaliados no teste do campo aberto.	53
6.4 Efeito de <i>Schinus terebinthifolius</i> e rotenona no tempo de permanência avaliados no teste do Rotarod.	56
6.5 Efeito da <i>Schinus terebinthifolius</i> e rotenona na retenção de memória nos animais avaliados no teste do Labirinto em Cruz elevado.	58
7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	60
7.1 Efeito <i>in vitro</i> da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi sobre a atividade antioxidante de animais tratados com rotenona (DPPH)	60
7.2 Efeito <i>in vivo</i> da <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre a peroxidação lipídica de ratos tratados com rotenona (TBARS)	61
8. DISCUSSÃO	64
9. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE A	89
APÊNDICE B	96

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população idosa tem levado a uma crescente incidência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo. Com isso, os sistemas de saúde terão de fazer frente a uma crescente demanda por procedimentos diagnósticos e terapêuticos das doenças crônicas não transmissíveis e a uma demanda ainda maior por serviços de reabilitação física e mental. Várias evidências têm demonstrado que muitas destas doenças estão relacionadas com a produção excessiva de radicais livres. Devido a isso, o interesse por estudos que visem à prevenção e cura destas patologias é de grande valia.

Assim, constituintes naturais derivados de plantas possuem grande importância uma vez que estudos realizados mostram que esses compostos apresentam uma gama de atividades biológicas, dentre elas, atividade antioxidante com potencialidades terapêuticas. Diante disso, fica clara a necessidade de investimento em condições de saúde para a população idosa, bem como no desenvolvimento de novos agentes que melhorem a qualidade de vida desta população e pesquisas que envolvam possíveis alternativas terapêuticas utilizando matérias-primas locais devem ser estimuladas.

A doença de Parkinson é uma das principais doenças neurodegenerativas e é caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra ao estriado. Além disso, alterações motoras (bradicinesia, rigidez, tremor em repouso e desequilíbrio postural), declínio cognitivo e sintomas psiquiátricos (como depressão), são os sintomas cardinais da patologia (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015).

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar os eventos que resultam na morte neuronal apresentados na doença, os quais são associados com estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neuroinflamação e exposição ambiental, como pesticidas, contribuindo para o aparecimento das alterações comportamentais e bioquímicas (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; RENAUD et al., 2015). Vários modelos animais têm sido utilizados para mimetizar e elucidar a patogênese da doença de Parkinson, em especial a rotenona, o MPTP e a 6-OHDA (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; BLESA et al., 2012).

A rotenona (*Derris sp.* Fabaceae), tem sido um potente pesticida hidrofóbico e sua exposição ambiental imita os sintomas clínicos e patológicos da doença de

Parkinson, como alterações comportamentais, bioquímicas e histoquímicas, caracterizando um modelo reprodutível para a doença de Parkinson (BETARBET et al., 2000). A rotenona produziu a neurodegeneração por meio de vários mecanismos, principalmente pela inibição do complexo I, aumento do estresse oxidativo e indução da apoptose (ZAITONE et al., 2012; VON WRANGEL et al., 2015).

Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, é uma planta nativa da América do Sul (CORRÊA, 1974). No Brasil, é popularmente chamado de Aroeira; na medicina popular tem sido utilizada no tratamento de úlceras, problemas respiratórios, feridas e artrites e também como anstiséptico, antiinflamatório e hemostático (MEDEIROS et al, 2007). Muitas de suas propriedades são associados à presença de polifenóis, os quais provem o seu efeito antioxidante (MEDEIROS et al., 2007; ABDOLU et al., 2015).

Neste contexto, este estudo investigou os possíveis efeitos neuroprotetores da *Schinus terebinthifolius* Raddi na atividade comportamental e no estresse oxidativo no modelo animal da doença de Parkinson induzida por rotenona em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o possível efeito neuroprotetor de *Schinus terebinthifolius* Raddi no modelo experimental da Doença de Parkinson induzido pela rotenona.

2.2 Objetivos específicos

Analizar os principais marcadores fitoquímicos da amostra da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi por meio de análise cromatográfica líquida (HPLC);

Descrever o efeito neuroprotetor de *Schinus terebinthifolius* Raddi nos parâmetros comportamentais no campo aberto no modelo experimental da doença de Parkinson;

Investigar o efeito neuroprotetor de *Schinus terebinthifolius* Raddi nos parâmetros comportamentais no teste do rotadod no modelo experimental da rotenona;

Explorar o efeito neuroprotetor de *Schinus terebinthifolius* Raddi no teste do labirinto em cruz elevado no modelo experimental da rotenona em ratos.

Demonstrar a atividade antioxidante “*in vitro*” de *Schinus terebinthifolius* Raddi pelo método de captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH);

Examinar a atividade antioxidante “*in vivo*” de *Schinus terebinthifolius* Raddi pelo método da peroxidação lipídica (malonaldeído);

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

A doença de Parkinson (DP) é reconhecida como a neurodegeneração mais comum mais comum depois da doença de Alzheimer (DORSEY et al., 2007). A idade é um grande fator de risco, sendo que a prevalência e incidência aumentam exponencialmente, sendo o pico acima dos 80 anos (PRINGSHEIM et al., 2014). A grande maioria destes casos (90 a 95%) são esporádicos, sem ligação genética, enquanto 5-10% dos pacientes possuem a forma hereditária da patologia (LESAGE e BRICE, 2009).

A DP possui duas características neuropatológicas principais: a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc), que se projetam para o estriado, e a formação dos corpos de Lewy nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes (MEISSNER et al., 2011). Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas, que consistem de agregados proteicos; a principal proteína é a α -sinucleína, uma proteína pré-sináptica cuja exata função permanece desconhecida (SHULMAN et al., 2011).

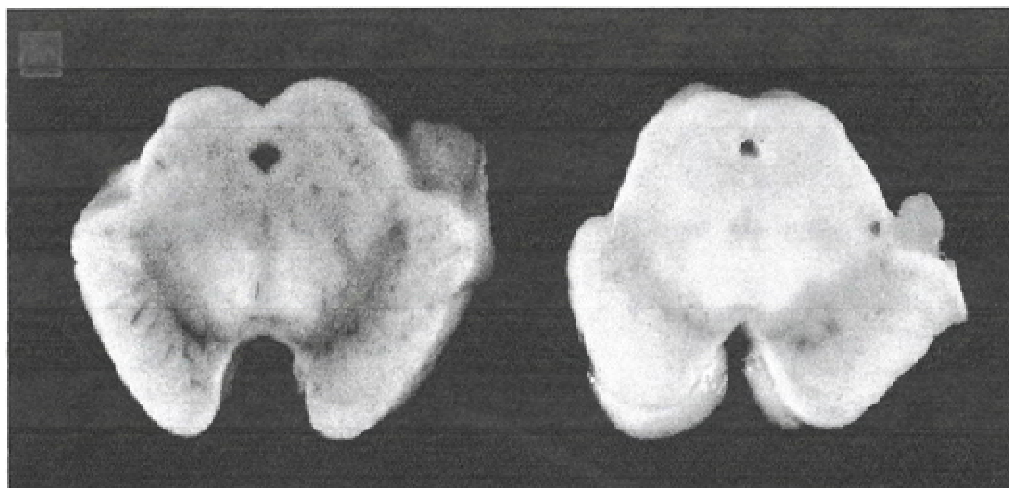
As manifestações clínicas da DP surgem quando pelo menos 70 a 80% das células dopaminérgicas do estriado e 50% da substância negra são acometidas (BLESA et al., 2012). As características motoras da DP relacionam-se com tremor em repouso; bradicinesia (lentidão na execução de movimentos), rigidez (hipertonia plástica, acometendo a musculatura flexora, determinando alterações típicas de postura) e distúrbio de equilíbrio (decorrente da perda de reflexos de readaptação postural). O tremor característico da doença de Parkinson é um tremor distal de repouso de 3 a 6 Hz, tomando a forma de um movimento conhecido como o de “enrolar cigarro”, entre o polegar e o indicador e é mais evidente quando a mão está em repouso durante situações de estresse (CONNOLLY e LANG, 2014). Há ainda outros sintomas, como micrografia, redução da mímica facial, marcha arrastada com passos curtos, distúrbios do sono, deficiências da fala. Dificuldades de mastigação e deglutição também estão presentes (CONNOLLY e LANG, 2014); além das alterações motoras, o declínio cognitivo e sintomas psiquiátricos (como a depressão), também estão presentes.

Atualmente os tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos para a doença de Parkinson têm sido capazes de aliviar apenas os sintomas (JANKOVIC, 2008). Desde a introdução no início dos anos 1960, a L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) tem sido o principal fármaco no tratamento da doença de Parkinson (BUCK e FERGER, 2010). Entretanto, a efetividade da terapia com a L-dopa reduz com o uso contínuo associado ao progresso prolongado da patologia por vários anos (CEREDA et al., 2010). Além disso, o tratamento prolongado com agonistas dopaminérgicos ou L-dopa resulta em efeitos motores severos (discinesia, flutuação motora) e efeitos não-motores (desordens de impulso, síndrome de disregulação dopaminérgica, demência dopaminérgica, desordens do sono) (MEISSNER et al., 2011).

3.2 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A neuropatologia da doença de Parkinson caracteriza-se pela perda progressiva dos neurônios pigmentados da substância negra parte compacta (SNc) evidenciada macroscopicamente por uma despigmentação da porção ventrolateral desta estrutura (figura 1), em associação à vasta ocorrência de lesões eosinofílicas conhecidas como corpúsculos de Lewy no interior do Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo (LONG-SMITH et al., 2009).

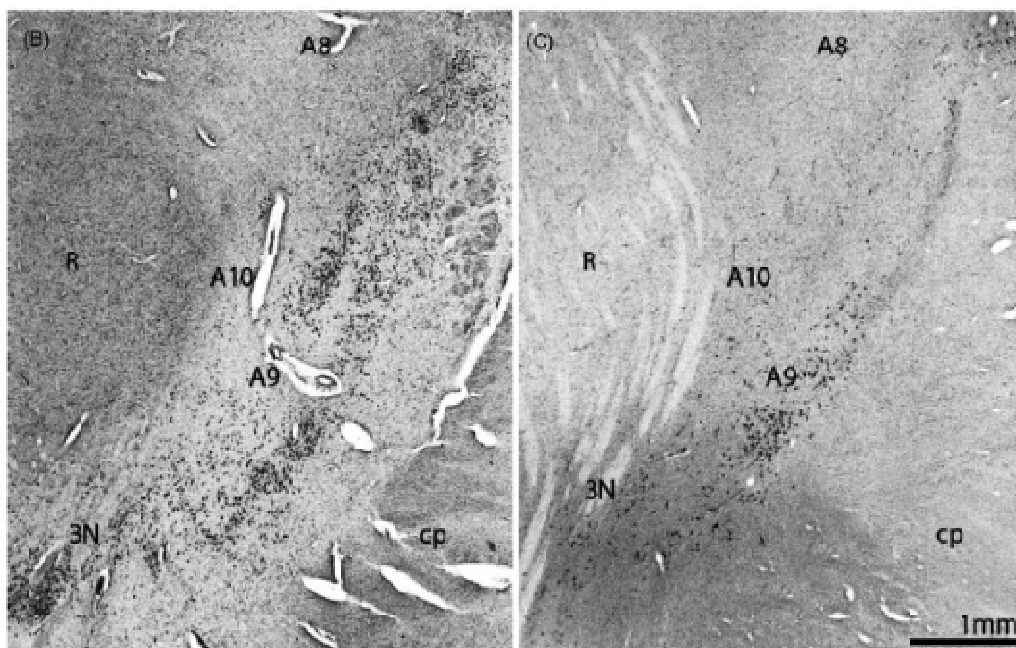
Figura 1. Secções transversais de mesencéfalos de indivíduos controle (à esquerda) e de um paciente portador da doença de Parkinson (à direita). A região pigmentada da substância negra parte compacta pode ser claramente vista no mesencéfalo ventral controle, contrastando com a significativa despigmentação presente na doença de Parkinson.



Retirado de: ORR et al. (2002).

No interior do cérebro existem três grupos de neurônios dopaminérgicos: o grupo A8, presente na formação reticular lateral; o grupo A9, presente na substância negra parte compacta e o grupo A10, presente no tegmento médio e dorsal. Os neurônios do grupo A9 enviam projeções para o putamen e o núcleo caudado a fim de influenciar na via dos gânglios basais (POLLACK, 2001). A primeira perda de células dopaminérgicas ocorre seletivamente no interior da região A9, devastando a substância negra parte compacta e afetando também as regiões circunvizinhas como a parte reticulada e as células dos grupos A8 e A10 (HALLIDAY et al., 1996; McRITCHIE et al., 1997) (Figura 2).

Figura 2. Despigmentação da porção ventrolateral da substância negra parte compacta. A) em indivíduos controle há uma alta densidade de neurônios pigmentados na secção transversal do mesencéfalo ventral. O grupo de células A9 é encontrado na substância negra parte compacta e contém duas camadas de neurônios pigmentados. Entre a área A9 e o núcleo rubro (R) encontra-se o grupo menos pigmentado da área A10, enquanto a área A8 localiza-se dorsal e lateralmente ao núcleo rubro (R) e a substância negra parte compacta. B) na doença de Parkinson, há uma significativa perda dos neurônios da área A9 e particularmente sua camada ventral.



Retirado de ORR et al. (2002).

A outra característica histopatológica da doença de Parkinson, os corpúsculos de Lewy, são formados por uma forma agregada anormal de proteína α -sinucleína (BRAAK et al., 2003). Ainda não está elucidado porque esta proteína hidrofílica deixa seu sítio de ligação no interior dos botões sinápticos e, associada a outros

componentes como neurofilamentos fosforilados e ubiquitina, transforma-se gradualmente em corpúsculos de Lewy insolúveis (KHATRI e JUVEKAR, 2016). O aparecimento dos corpúsculos de Lewy na doença de Parkinson, bem como em outras doenças neurodegenerativas, parece ocorrer anteriormente ao desenvolvimento dos sintomas motores (BRAAK et al., 2003).

3.3 Etiologia da Doença de Parkinson

Embora a doença de Parkinson tenha sido descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, a sua etiologia ainda permanece desconhecida. Muitos aspectos têm contribuído para o desenvolvimento da doença de Parkinson, como demografia, exposição ambiental, estilo de vida, consumo de drogas e dieta (TAN, 2013). DUTTA e MOHANAKUMAR (2015) também propuseram vários fatores para o desenvolvimento da doença de Parkinson, incluindo as alterações genéticas, a neuroinflamação, a exposição ambiental, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo.

3.3.1 Alterações genéticas

Formas hereditárias da doença de Parkinson são caracterizadas tanto de forma autossômica dominante ou recessiva. O primeiro grupo está associado a mutações em três diferentes genes: *SNCA* (*PARK1*), *LRRK2* (*PARK8*) e *VPS35* (*PARK17*) (CIERI et al., 2016). A alteração no gene da *SNCA* foi a primeira a ser descoberta (POLYMERPOULOS et al., 1997) e o primeiro gene associado a doença de Parkinson. Suas mutações são raras e levam ao declínio cognitivo, disfunção autonômica e demência. Este gene codifica α -sin, o qual associado com ubiquitina, torna-se o principal componente dos corpos de Lewy (CIERI et al., 2016).

Mutações no gene *LRRK2* são as causas genéticas mais comuns da doença de Parkinson e estão associadas com a perda de neurônios dopaminérgicos e a formação de corpos de Lewy no cérebro (MORTIBOYS et al., 2010; MANZONI et al., 2013). O último gene com mutação dominante é o *VPS35*, cujas alterações são raras e associadas a discinesia, distonia e demência (CIERI et al., 2016).

Mutações em outros 6 genes (*PINK1*, *parkina*, *DK-1*, *PLA2G6*, *FBXO7* e *ATP13A2*) são recessivos e associados a doença de Parkinson juvenil. *PINK1* (*PARK6*) é caracterizada por uma baixa progressão, parkinsonismo responsivo à levodopa, ansiedade e depressão (NARENDRA et al., 2010).

Mutações no gene da *PARK2* são a principal causa de parkinsonismo recessivo e são associados a doença de Parkinson idiopática de início precoce e resposta resistente à levodopa (CIERI et al., 2016).

3.3.2 A Neuroinflamação

A neuroinflamação é caracterizada por um aumento significativo nos níveis de componentes do sistema imune, incluindo sistema complemento e citocinas, como interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6 e TNF- α na substância negra e fluido cerebrospinal de pacientes com doença de Parkinson (BENKLER et al., 2012).

Estudos experimentais e post-mortem sugeriram que a inflamação está presente tanto em lesões agudas do Sistema Nervoso Central quanto em doenças neurodegenerativas (MARCHETTI e ABBRACCHIO, 2005). A astróglia e micróglia cerebrais representam a maioria das células envolvidas na neuroinflamação e morte neuronal. As células da glia correspondem a um completo e eficiente sistema imune inato (HAUWEL et al., 2005) e assim, sob condições patológicas, a desregulação ou ativação glial excessiva poderia resultar na morte neuronal.

Os astrócitos promovem atividades essenciais que protegem o tecido e sua função, além de promover o reparo neuronal, na produção de substratos energéticos e neurotrofinas. Esta população de células é capaz de reduzir a liberação do glutamato e radicais livres, restabelecer a barreira hematoencefálica e promover a neurovascularização e neurogênese (LIBERTO et al., 2004). Entretanto, a reação astrócita excessiva resulta na falência da reparação da barreira hematoencefálica, infiltração leucocitária, desmielinização severa e morte de células oligodendrócitos (FAULKNER et al., 2004). Similarmente, após ativação, a micróglia foi capaz de produzir metabólitos que provocam a morte neuronal e impediram a neurogênese hipocampal em humanos (MONJE et al., 2003). Mais ainda, evidências demonstraram que a deterioração ou disfunção da micróglia devido ao avanço da idade, poderia contribuir para a neurodegeneração presente na doença de Parkinson (STREIT, 2005).

3.3.3 Estresse Oxidativo

Intracelularmente, a dopamina é degradada tanto pela enzima monoamino oxidase A (MAO-A) (GOTZ et al., 1994) quanto por auto-oxidação. O metabolismo da dopamina pela MAO-A leva à formação do ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sob consumo de O_2 e H_2O (GESI et al., 2001). A auto-oxidação intracelular da dopamina produz H_2O_2 e dopamina-quinona (SULZER e ZECCA, 2000), a qual participa de reações nucleofílicas associadas à grupos sulfidril (STOKES et al., 1999), levando à redução dos níveis de glutathiona peroxidase (GSH), a principal enzima utilizada para contrabalançar o estresse oxidativo. Assim, a dopamina-quinona tem inibido a função do transportador de dopamina nos sinaptossomas (BERMAN e HASTINGS, 1997), inibindo a enzima tirosina-hidroxilase (TH) celular, resultando em uma síntese incompleta de ATP (BERMAN e HASTINGS, 1999). A proporção entre a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada (GSH/GSSG) é reduzida durante a degeneração, propiciando, então, a formação de mais radicais livres (SOFIC et al., 1992; SIAN et al., 1994). O prejuízo na remoção dos radicais livres dependente do GSH pode ser devido ao aumento do turnover que poderia, por ele mesmo, aumentar a produção basal de H_2O_2 e então depletar os estoques de GSH (RIEDERER et al., 1989). Esta depleção de GSH tem sido relacionada à toxicidade da dopamina e H_2O_2 em cultura (SHANG et al., 2003).

Estudos post-mortem demonstraram consistentemente que o estresse oxidativo é um sinal histopatológico não apenas em neurônios saudáveis, mas também em patologias humanas do sistema nigral. Modificações carboxílicas, indicativas da peroxidação protéica, estavam aumentadas duas vezes na substância negra de pacientes parkinsonianos em comparação a indivíduos normais (FLOOR e WETZEL, 1998). Em adição, níveis de 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), um aldeído produzido durante a peroxidação lipídica, e 8-hidroxiguanosina, um produto da oxidação nucleosídica, estavam aumentados aproximadamente 6 e 16 vezes, respectivamente, na substância negra de pacientes portadores da doença de Parkinson em relação a indivíduos controle (ZHANG et al., 1999). O HNE tem demonstrado modificar proteínas (CAMADOLA et al., 2000), bloquear a respiração mitocondrial (PICKLO et al., 1999) e induzir a apoptose dependente de caspases (LIU et al., 2000).

A associação entre a presença de radicais livres e a patogênese de diversas doenças, bem como a proteção conferida por certas substâncias antioxidantes, tem despertado o interesse da comunidade científica (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua orbita externa. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua orbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de oxido-redução, isto é, ou cedem o elétron, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo, assim radicais livres são formados fisiologicamente pelo organismo, como resultado do processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar ATP. Os radicais livres produzidos pelos macrófagos e neutrófilos são empregados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva a estes microorganismos. Estes também podem ser formados pela exposição do organismo a fatores exógenos, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, tabaco, substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, aflotoxinas, etc), alto consumo de gorduras saturadas (frituras, embutido, etc) e de certos medicamentos. Por outro lado, o excesso de radicais livres leva a importantes alterações a nível molecular que estão associados a danos às macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA, gerando alterações teciduais que estão implicadas em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatoide, etc (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Em sua maioria, os radicais livres derivam do oxigênio e denominam-se “Espécies reativas de oxigênio” (EROs). Estas também podem se referir às espécies que não são radicais livres, e sim algumas moléculas derivadas de oxigênio capazes de gerar radical livre, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos radicais livres, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica. Isso ocorre devido ao fato dos ácidos graxos poliinsaturados serem, devido as suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque das EROs (SIES, 1993). Tal processo pode gerar uma série de reações deletérias que acarretam alterações na sua estrutura e permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade na

troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído e dienos conjugados) culminado com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Inúmeras patologias como diabetes, hiperlipidemia, doenças hepáticas, cardiovasculares e neurodegenerativas mostram níveis aumentados de produtos de lipoperoxidação no plasma, como por exemplo, hidroperóxidos, dienos conjugados, aldeídos entre outros (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Embora múltiplos fatores possam precipitar o estresse oxidativo nas células, o neurotransmissor excitatório glutamato é o maior indutor deste processo no Sistema Nervoso Central (SNC). O glutamato é um neurotransmissor excitatório essencial que ativa diferentes receptores, entre os quais o receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), que é um receptor ionotrópico e cuja estimulação provoca a abertura do canal de cálcio e aumentos do cálcio intracelular. Em situações em que há aumento excessivo deste íon devido a estimulação do receptor NMDA, pode ocorrer um aumento na formação de EROs e o processo conhecido por excitotoxicidade (GILGUN-SHERKI et al., 2001).

Para prevenir os danos causados pelas EROs os organismos vivos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, que incluem antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos atuando conjuntamente na proteção celular (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999; SZYMONIK-LESIUK et al., 2003). É considerado um agente antioxidante qualquer substância capaz de prevenir os efeitos deletérios dos processos ou reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Pode se incluir como defesas antioxidantes os agentes que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, as proteínas que diminuem a disponibilidades de agentes prooxidantes, como os íons metálicos e ainda agentes sequestrantes de EROs e ERN (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Os sistemas antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são formados por várias enzimas entre as quais se pode destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx). Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos sintetizados pelo organismo como a glutational, a bilirrubina, a ceruloplasmina, a melatonina, o

ácido úrico, ou aqueles ingeridos através da dieta regular como ácido ascórbico, o alfa-tocoferol, o selênio, o cobre, o zinco, o betacaroteno e as substâncias fenólicas (SANDERS e GREENAMYRE, 2013).

Uma substância fenólica ou polifenólica é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, substituindo ao menos um hidrogênio (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Os compostos fenólicos podem atuar nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, fotoreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores. Contudo, há atualmente grande interesse sobre sua atividade antioxidante, devido a sua habilidade de sequestrar e de reduzir a formação de EROs (RENDEIRO et al., 2015).

Entre os polifenóis estudados, destacam-se os flavonóides, existentes naturalmente em uma variedade de alimentos de origem vegetal como frutas, sementes, folhas e flores, fazendo parte integrante da dieta humana. Flavonóide é o nome genérico de um grupo de moléculas formadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que se originam mediante uma via biossintética mista. Vários são os mecanismos propostos para ação antioxidante dos flavonóides a considerar as diferentes formas estruturais que existem e que podem ser determinadas por alguns fatores como: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavonoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e a ainda sua solubilidade e interação com as membranas (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; MATIAS et al., 2016).

O aumento previsto na incidência de demência na população destaca a necessidade urgente de uma compreensão mais abrangente de como diferentes aspectos do estilo de vida, em especial de exercícios e dieta, pode afetar a função neural e consequente desempenho cognitivo ao longo da vida. A este respeito, flavonóides, encontrados numa variedade de frutas, vegetais e bebidas derivadas, foram identificados como um grupo de compostos bioativos promissores capazes de influenciar diferentes aspectos da função do cérebro, incluindo o fluxo sanguíneo cerebral e da plasticidade sináptica, ambos resultando em melhorias na aprendizagem e memória em espécies de mamíferos. No entanto, os mecanismos precisos pelos quais flavonóides exercem essas ações ainda estão para ser totalmente estabelecida, embora os dados se acumulam indicam uma capacidade de interagir com os receptores neuronais e quinase percursos que são fundamentais

para a ativação neuronal e comunicação e fortalecimento sináptico sinalização. Alternativamente ou concorrentemente, também há evidências convincentes derivada de estudos clínicos em humanos, sugerindo que os flavonóides podem afetar positivamente o fluxo sanguíneo periférico e cerebral, que pode ser um mecanismo eficaz indireto, através da qual flavonóides dietéticas podem ter impacto sobre a saúde do cérebro e cognição (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; MATIAS et al., 2016). Além disso, a disfunção sináptica tem um importante significado na fisiologia neuronal e conseqüentemente no funcionamento do Sistema Nervoso Central. Estas alterações ocorrem durante o processo de envelhecimento fisiológico e são, entre outras causas, relacionadas ao declínio da função cognitiva (MORRISSON e BAXTER, 2012; SHI et al., 2015).

3.4 Modelo Animal da Rotenona

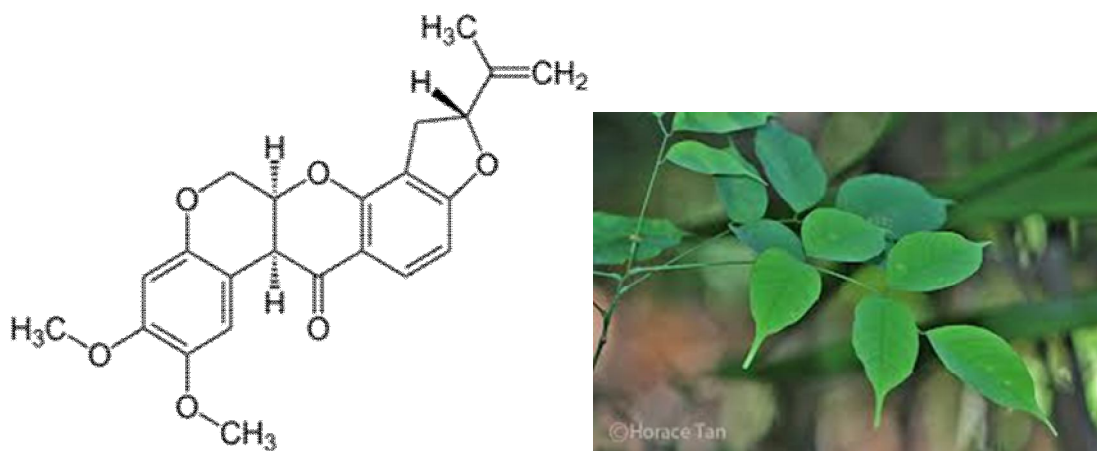
Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar as doenças neurodegenerativas, os quais levaram ao desenvolvimento de vários modelos animais da doença de Parkinson, caracterizadas em: 1) modelos induzidos por toxinas, como a rotenona, MPTP (metil-4fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina) e a 6-hidroxidopamina; 2) modelos inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeo (LPS); 3) modelos farmacológicos induzidos por reserpina e haloperidol e 4) modelos genéticos para modificações genéticas da α -sinucleína, parkina e outros genes (NATALE et al., 2010; JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015) os quais produzem alterações comportamentais, bioquímicas e histológicas semelhantes aos da doença de Parkinson em seres humanos. Entretanto, até o momento, nenhum modelo animal é capaz de mimetizar todos os aspectos presentes na patologia. O modelo animal da doença de Parkinson deveria replicar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, a formação das inclusões citoplasmáticas dos corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes e as alterações comportamentais motoras, sintomas que respondem ao tratamento com dopamina (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

A rotenona foi utilizada primeiramente nos anos 80, após a descoberta do MPTP, a toxina usada para induzir um dos mais completos modelos da doença de Parkinson, que é um inibidor do complexo I da cadeia mitocondrial (HEIKKILA et al., 1985), e sua exposição têm sido extremamente associadas ao aumento do risco de

desenvolvimento da doença de Parkinson (TANNER et al., 2011; MARTINEZ e GREENAMYRE, 2012).

A rotenona (*Derris spp.*), (Fabaceae), conhecida também como timbó (figura 3), um potente membro dos rotenóides, pertencente à família dos isoflavonoides obtidos de plantas leguminosas tropicais, é comumente usada como pesticida em plantações.

Figura 3. Estrutura química da rotenona e planta *Derris spp.*



É extremamente lipofílico e prontamente acessa todas as organelas (TALPADE et al., 2000) e facilmente atravessa a barreira hematoencefálica, sendo ainda independente de transportadores para entrar nas células (MARTÍNEZ e GREENAMYRE, 2012). Sua natureza lipofílica permite administrações sistêmicas, necessitando de menos técnicas invasivas como por exemplo as injeções estereotáxicas. É um inibidor da enzima NADH desidrogenase, que faz parte do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons e desta forma prejudica a respiração celular.

Assim, contribui para o aumento na habilidade deste pesticida produzir aumento nas EROs e, como a superóxido dismutase, consequentemente, gerando estresse oxidativo por acúmulo de elétrons, que reagem e formam radicais hidroxilados, altamente tóxicos, com subsequente aumento na peroxidação lipídica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto celular (MARTÍNEZ e GREENAMYRE, 2012). Na presença deste inseticida, os elétrons provenientes do NADH não podem entrar na cadeia de transporte de elétrons, o que resulta na

incapacidade de produzir ATP a partir da oxidação do NADH. O acúmulo de radicais também produz inflamação, reação da micróglia e finalmente apoptose. Devido ao dano mitocondrial ocorre entrada excessiva de cálcio e escape de citocromo-C mitocondrial, que acabam levando a uma cascata provocando mais apoptose.

A intoxicação aguda com este pesticida leva à depleção de dopamina, enquanto a exposição crônica leva também à depleção de outros neurotransmissores, como serotonina e noradrenalina (SANTIAGO et al., 2010). Além disso, animais intoxicados por rotenona desenvolveram posturas anormais e também alterações na coordenação motora (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Assim, a administração dessa substância produz alterações anatômicas, neuroquímicas, neuropatológicas e comportamentais semelhantes às aquelas observadas na doença de Parkinson, decorrente da produção de apoptose por inibição do complexo I mitocondrial e aumento das EROs (BETARBET et al., 2000; ALAM e SCHMIDT, 2002).

BETARBET et al. (2000) demonstraram pela primeira vez os prejuízos que o modelo animal da rotenona provocava nas terminações nervosas dos neurônios dopaminérgicos no estriado e na substância negra. Além disso, neurônios noradrenérgicos são perdidos no *locus coeruleus* enquanto neurônios dopaminérgicos da tegmental ventral são relativamente poupados, como na apresentação clínica (DUTY e JENNER, 2011), sendo assim a degeneração induzida pelo modelo da rotenona reproduziu a degeneração clínica na doença de Parkinson (CHENG et al., 2010).

Uma principal vantagem do modelo animal da rotenona é a habilidade de induzir a formação de inclusões citoplasmáticas α -sinucleínicas positivas nos neurônios nigrais, replicando o sinal neuropatológico dos corpos de Lewy observados na doença de Parkinson (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015). As principais limitações são a reprodutibilidade do número de animais que desenvolvem as lesões dopaminérgicas nigroestriatais, o local da lesão, a magnitude da lesão associados à taxa de mortalidade (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

A rotenona é comumente administrada aos roedores via minibombas osmóticas tanto intravenosamente como subcutaneamente, embora a administração intraperitoneal e a injeção estereotáxica têm se tornado de maior interesse por se tentar trazer ao modelo os principais sinais neuropatológicos da doença (XIONG et al., 2012). A administração sistêmica tem induzido à crônica degeneração da via

nigroestriatal em ratos, sendo reportado 28-45% de perda dos neurônios TH-positivos nigrais (HOGLINGER et al., 2005; TAPIAS et al., 2014); 40-70% de perda dos neurônios TH-positivos estriatais (HOGLINGER et al., 2005) e perda de 20-55% dos níveis de dopamina estriatais (TAPIAS et al., 2014). Entretanto, a administração sistêmica pode ocasionar uma toxicidade sistêmica, podendo levar até 30% de morte dos animais (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

3.5 *Schinus terebinthifolius* Raddi

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

A *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) (figura 4) é uma planta nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil do estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (CORRÊA, 1974), sendo popularmente conhecida como aroeira (PIRES et al., 2004). Sob o ponto de vista químico, a presença de vários constituintes foi estabelecida como: terpenos (CAMPELLO e MARSAIOLI, 1975; LLOYD et al., 1977), fenóis (STAHL et al., 1983; CERUKS et al., 2007), taninos (HAYASHI et al., 1989) e flavonoides (KASSEM et al., 2004; DEGÁSPARI et al., 2005). Além disso, foi observada a presença de antraquinonas, xantonas e esteróides livres (LIMA et al., 2006).

Figura 4. *Schinus terebinthifolius* Raddi



A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, é um membro da família Anacardiaceae, nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil nos estados de Minas Gerais e Bahia até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais. Apresenta várias sinonímias botânicas: *S. acutifolia* Engl., *S. glazioviana* Engl., *S. pohliana* Engl., *S. raddiana* Engl., *S. aroeira* Vell. e *S. mucronulatus* M. (CORRÊA, 1978).

Popularmente é conhecida no Brasil por aroeira, aroeira vermelha, aroeira mansa, pimenta-do-reino do Brasil, cabuí, fruto de sabiá; “pink peper”, “pink berries”, nos Estados Unidos; “pfeffer” e “rosa beeren”, na Alemanha; “baies roses de bourbon” na França e “aguará-mi-ybá”, no Paraguai (PIERIBATTESTI et al., 1981; PIRES et al., 2004).

A aroeira é uma planta perenifólia, heliófita e pioneira, comum em beira de rios, córregos e em várzeas úmidas de formações secundárias; entretanto, cresce também em terrenos secos e pobres. Sua altura varia de 5-10 m, dotada de copa arredondada, seu tronco é tortuoso, de 30-60 cm de diâmetro, com casca grossa e fissurada. Apresenta folhas compostas imparipinadas, folíolos subcoriáceos, glabros, em número de 3-10 pares, de 1-5 cm de comprimento por 1-3 cm de largura .

O emprego de diferentes partes da aroeira tem sido relatado na medicina tradicional de vários países. A espécie já foi relativamente bem pesquisada, apresentando um bom número de trabalhos relacionados à identificação das substâncias presentes na planta, bem como relacionados à comprovação de suas atividades terapêuticas.

Estudos fitoquímicos identificaram a presença de fenóis, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas na espécie (LIMA et al., 2006). Atividades antiinflamatória, antimicrobiana (MARTÍNEZ et al., 1996; SCHMOURLO et al., 2005; LIMA et al., 2006) e antioxidante (VELÁSQUEZ et al., 2003) têm sido demonstradas em diferentes modelos farmacológicos.

Na análise obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule da *Schinus terebinthifolius* foi encontrada uma predominância de compostos polifenólicos e terpenóides. Dentre os polifenóis, confirma-se a existência de forte concentração de taninos catéquicos, sendo atribuída a estes, boa parte da bioatividade dessa planta (ARAÚJO, 2002).

Em pesquisa desenvolvida por JAIN et al. (1995) foi verificado que os triterpenos, ácido masticadienóico e o ácido masticadienólico (schinol), presentes nos frutos da aroeira, apresentam atividade antiinflamatória por serem inibidores competitivos específicos da fosfolipase A₂.

O extrato hidroalcoólico obtido das folhas da aroeira apresentou significativa atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), além de uma ação antifúngica contra a *Candida albicans* (MARTÍNEZ et al., 1996).

Em relação à avaliação toxicológica, poucas informações são descritas na literatura. AMORIM e SANTOS (2003) constataram que o gel vaginal produzido com aroeira demonstrou ser seguro e eficaz no tratamento da vaginose bacteriana, promovendo 84% de cura nas pacientes tratadas.

Em uma análise preliminar da toxicidade aguda e da dose letal mediana (DL₅₀) dos frutos da aroeira em camundongos, foi determinada uma DL₅₀ acima de 5,0 g/kg na administração por via oral. Já pela via intraperitonal o valor obtido foi de 3,5 g/kg (PIRES et al., 2004). Em estudo realizado por ARAÚJO (2002) avaliando a toxicidade aguda do extrato metanólico bruto obtido das cascas da aroeira em ratos, não foi revelado qualquer sinal de toxicidade ou morte relacionada ao tratamento.

Muitas das propriedades ou efeitos curativos atribuídos pela medicina popular à aroeira estão associados à presença de polifenóis na planta, como apigenina, ácido elágico e naringina (QUEIRES e RODRIGUES, 1998; DEGÁSPARI et al., 2004), os quais conferem à planta propriedades antioxidantes.

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi vem sendo comercializada por várias indústrias farmacêuticas. Em Pernambuco, o Laboratório Pernambucano

(LAPERLI) comercializa o extrato da espécie em associação ao extrato de *Physalis angulata*, Linné, *Cereus peruvianus*, Miller e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, sob o nome comercial de Sanativo®, sendo indicado para o tratamento de feridas, queimaduras, processos inflamatórios e infecciosos, gastrites e úlceras gastroduodenais.

Considerando a composição fitoquímica da *Schinus molle* rica em compostos com ações anti-inflamatórias e antioxidantes e da importância dessas atividades na prevenção/redução do desenvolvimento da doença de Parkinson pareceu-nos atraente averiguar se o tratamento com essa espécie poderia proteger/atenuar as manifestações motoras da doença de Parkinson induzida experimentalmente pela rotenona em ratos Wistar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico

O caule seco macerado da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi foi colhido da floresta Atlântica localizada no município de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, entre fevereiro e abril de 2013 (8°20'33" sul e 34°56'59" oeste). Um exemplar autenticado pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foi depositado no Herbário Geraldo Mariz sob o número 8758.

O acondicionamento do material vegetal em Laboratório seguiu duas etapas: a extração consistiu de estabilização e secagem, na qual as amostras foram secas a 25°C, em ambiente seco, higienizado e seguido de moagem em um liquidificador industrial; 500 g do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram adicionadas a 1 litro de etanol 70% em temperatura ambiente, durante 7 dias. No laboratório, o extrato etanólico bruto foi evaporado sob pressão reduzida para total eliminação do álcool, seguido de liofilização, totalizando aproximando 35 g de resíduo seco. Em seguida, as amostras foram devidamente rotuladas e acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em ambiente limpo e seco. O extrato liofilizado de *Schinus terebinthifolius* Raddi foi mantido em temperatura ambiente até uso e suspensão em água mineral.

A rotenona e demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (USA). O óleo de girassol foi adquirido no comércio em Recife (PE).

4.2 Análise da extração de Componentes de *Schinus terebinthifolius* Raddi por procedimento de método cromatográfico

Os principais marcadores fitoquímicos das amostras de cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram analisados por CLAE-DAD usando um sistema Shimadzu (LC-20AT) equipado com um detector de fotodiodos (SPD-M20A). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Gemini RP-18 240 × 4 mm (Phenomenex), protegido por uma pré-coluna com o mesmo material. O gradiente de eluição utilizado foi solvente A (0,5% de ácido acético em água destilada, v/v) e solvente B (metanol) com fluxo de 0,8 mL/min no seguinte programa: 20-40% de B (10 min), 40-60% de B (10 min), B 60% (10 min), B 60:40% (10 min), e 40-20% de B (10 min). O extrato e padrões foram dissolvidos em metanol:água (20/80, v/v) e filtrados através de uma membrana de 0,45 µm (Millipore®, EUA) antes da injeção de 20 µL. Os picos de cada substância marcadora no extrato seco foram inicialmente identificados por comparação do tempo de retenção e espectros de UV a 278nm. Padrões utilizados: ácido elágico, ácido gálico, catequina e epicatequina.

4.3 Animais

Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 280-350 g entre 3-4 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2° C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração (Presence® – Purina) e água. Dois dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos ao 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 do Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº. 23076.050131/2013-82).

4.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais (n=10/grupo) foram formados por controle, por animais com doença de Parkinson induzida e animais com a doença e tratados com *Schinus terebinthifolius* Raddi.

◆ Grupo 1 (controle) – Os animais foram tratados com água, veículo da *S. terebinthifolius*, 1 mL/kg via oral, e uma hora depois, com veículo da rotenona (óleo de girassol 90%+10%DMSO), 1 mL/kg, subcutânea, durante 7 dias;

◆ Grupo 2 – Os animais foram tratados com água, 1 mL/kg via oral, e depois de uma hora, administrados com rotenona, 3 mg/kg, subcutânea, durante 7 dias;

◆ Grupo 3 – Os animais foram tratados com *Schinus terebinthifolius* Raddi na dose de 150 mg/kg, via oral e uma hora depois, administrados rotenona 3 mg/kg, subcutânea, durante 7 dias;

◆ Grupo 4 – Os animais foram tratados com *Schinus terebinthifolius* Raddi na dose de 300 mg/kg, via oral e uma hora depois, administrados rotenona 3 mg/kg, subcutânea, durante 7 dias;

◆ Grupo 5– Os animais foram tratados com *Schinus terebinthifolius* Raddi na dose de 600 mg/kg, via oral e uma hora depois, administrados rotenona 3 mg/kg, subcutânea, durante 7 dias.

4.5 Consumo durante o tratamento

Foram observados também, durante os 7 dias, o consumo de água, o consumo de ração e a massa corporal dos animais.

4.6 Avaliações comportamentais

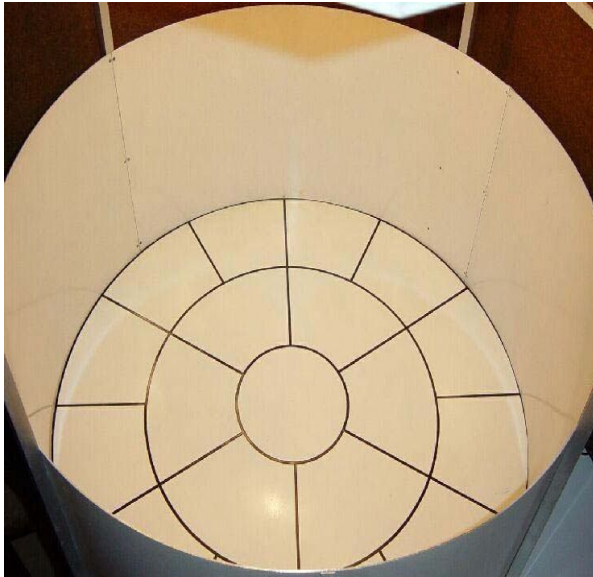
Vinte e quatro horas após a última administração dos tratamentos, os animais foram avaliados nos testes comportamentais.

4.6.1 Teste do Campo Aberto (Open Field)

A atividade motora foi mensurada no teste do campo aberto. O aparelho usado constitui numa arena circular (100 cm de diâmetro e 40 cm de altura). O chão do aparato é constituído por linhas pretas formando 19 divisões. 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 levará para deixar o primeiro quadrante no centro do aparelho). Os tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados com auxílio de cronômetros, e a limpeza da arena após a saída de cada animal foi realizada com solução de álcool a 5%. Este procedimento foi similar aquele descrito por BROADHURST (1957) e BERNARDI e PALERMO-NETO (1979), figura 5.

Figura 5. Teste do campo aberto. Os parâmetros observados foram: A) latência para início do movimento (saída da arena central); B) frequência de locomoção; C) frequência de levantar e D) tempo de imobilidade.

A



B



C



D



4.6.2 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). O aparelho denominado Rotarod, é constituído de uma barra de 7 cm de diâmetro, subdividida em quatro compartimentos que giram a 25 r.p.m., dispostos a 25 cm de altura. Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos, sendo retirados do experimento aqueles que não permanecerem sobre o aparelho pelo menos dois períodos consecutivos de 60 segundos cada. Cada animal foi colocado na barra giratória e o tempo de permanência foi registrado. Utilizou-se como tempo de corte 180 segundos, figura 6.

Figura 6. Teste do Rotarod. Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos, sendo eliminados aqueles que não permanecerem sobre o aparelho pelo menos dois períodos consecutivos de 60 segundos cada. Cada animal foi colocado na barra giratória e o tempo de permanência foi registrado. Utilizou-se como tempo de corte 180 segundos.



4.6.3 Teste do labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze)

A memória dos animais foi mensurada no teste do labirinto em cruz elevado adaptado para a memória (KUMAR et al., 2006, KUMAR e KUMAR, 2009). O aparelho usado foi constituído de quatro braços de madeira suspensos do chão e em forma de cruz (50x10 cm), sendo que dois destes braços apresentam suas

laterais circundadas por parede de madeira de 40 cm (fechados) e os outros dois são desprovidos destas paredes (abertos) e uma área central (10x10 cm) conectando os braços. Os animais foram colocados individualmente no braço aberto, com a face contrária ao aparato, e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Durante a observação foram avaliados parâmetros como número de entradas nos braços abertos (número de vezes que o animal adentra a qualquer dos dois braços abertos), número de entradas nos braços fechados (número de vezes que o animal adentra aos braços fechados), tempo de permanência do animal nos braços fechados e tempo de permanência nos braços abertos. O tempo dos parâmetros foi controlado por cronômetros, e a limpeza da arena após a saída de cada animal foi realizada com solução de álcool a 5%, figura 7. Aos ratos foi permitido explorar o labirinto por 30 segundos, após o que, foi realizado o registro inicial da aquisição de latência (transferência de latência dia 1) e então os animais foram recolocados em suas gaiolas. A retenção de latência foi avaliada novamente no dia seguinte e chamada de transferência de latência de repetição (PELLOW e FILE, 1986; KULKARNI e SHARMA, 1992; KUMAR e JUYAL, 2010; KUMAR e DHINGRA, 2012). A percentagem de retenção de memória foi calculada a partir formula:

$$\% \text{ retenção: } \frac{\text{transferência de latência dia 1} - \text{transferência de latência de repetição}}{\text{transferência de latência dia 1}}$$

Figura 7. Labirinto em cruz elevado, em que a memória dos animais foi avaliada por meio dos parâmetros: número de entradas nos braços abertos (número de vezes que o animal adentra a qualquer dos dois braços abertos), número de entradas nos braços fechados (número de vezes que o animal adentra aos braços fechados), tempo de permanência do animal nos braços fechados e tempo de permanência nos braços abertos.



4.7 Análises Bioquímicas

Após a avaliação comportamental todos os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros removidos e os cerebelos descartados. Substância negra, estriado e córtex foram dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados e homogeneizados, em homogeneizador tipo Potter Elvehjem, com tampão PBS (10% p/v) com adição de BHT (0,004% p/v), para prevenir a auto-oxidação da amostra. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes congelados em freezer à -20°C para posterior avaliação da peroxidação lipídica.

4.7.1 Avaliação da atividade antioxidante “*in vitro*”

A atividade antioxidante *Schinus terebinthifolius* foi determinada por meio do ensaio de captura de radicais DPPH, desenvolvido por BLOIS (1958) e adaptado por BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Esse ensaio tem por base a redução do radical [1,1-difenil-2-picril-hidrazil (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[•]. 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 EC₅₀ (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical).

4.7.2 Avaliação da atividade antioxidante “*in vivo*” - lipoperoxidação (TBARS)

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica nestas estruturas foram mensurados empregando-se as metodologias para detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuja técnica foi modificada de BUEGE e AUST (1978).

Para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, 1mL da solução de TBA foi adicionada a tubos de ensaio contendo 0,5 mL do homogeneizado. O produto corado foi retirado, sendo realizada sua leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Para realização dos cálculos, foi realizada uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (1 mM). Os resultados foram expressos em nMol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ E.P.M. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism® 5.0. A diferença entre os grupos foi verificada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Análise da Extração de Componentes de *Schinus terebinthifolius* Raddi por HPLC

A partir da mistura dos padrões de cromatografia injetados no HPLC, observamos a comparação dos tempos de retenção e foi possível confirmar na amostra de *Schinus terebinthifolius* a presença de taninos hidrolisáveis (ácidos gálico e ácido elágico) e taninos condensados (catequina e epicatequina).

Figura 8. Cromatograma de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) detectado a 278 nm. Picos: ácido galico (Rt = 4,66), catequina (7,51), epicatequina (10,24) e ácido elágico (Rt = 19,05).

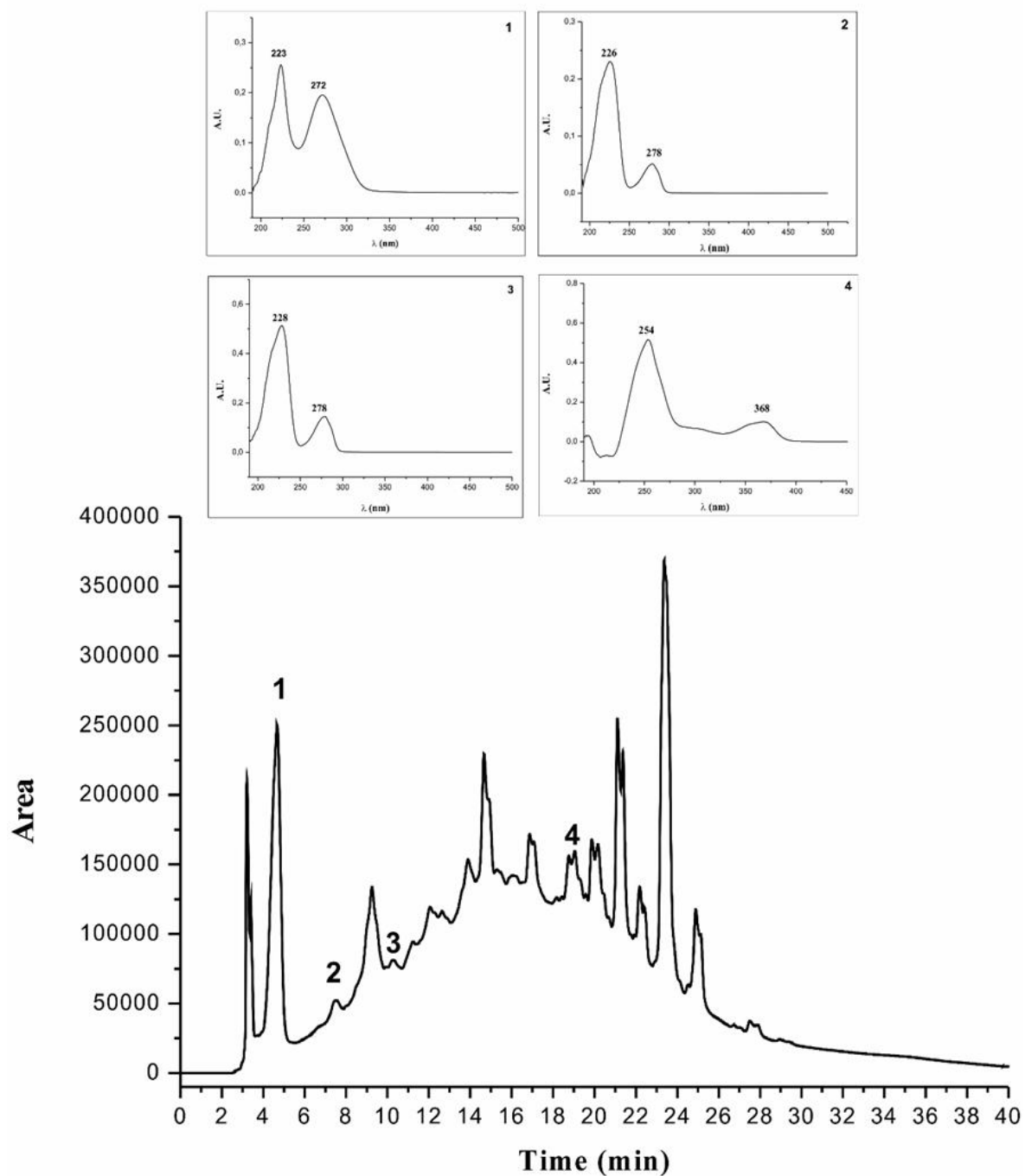
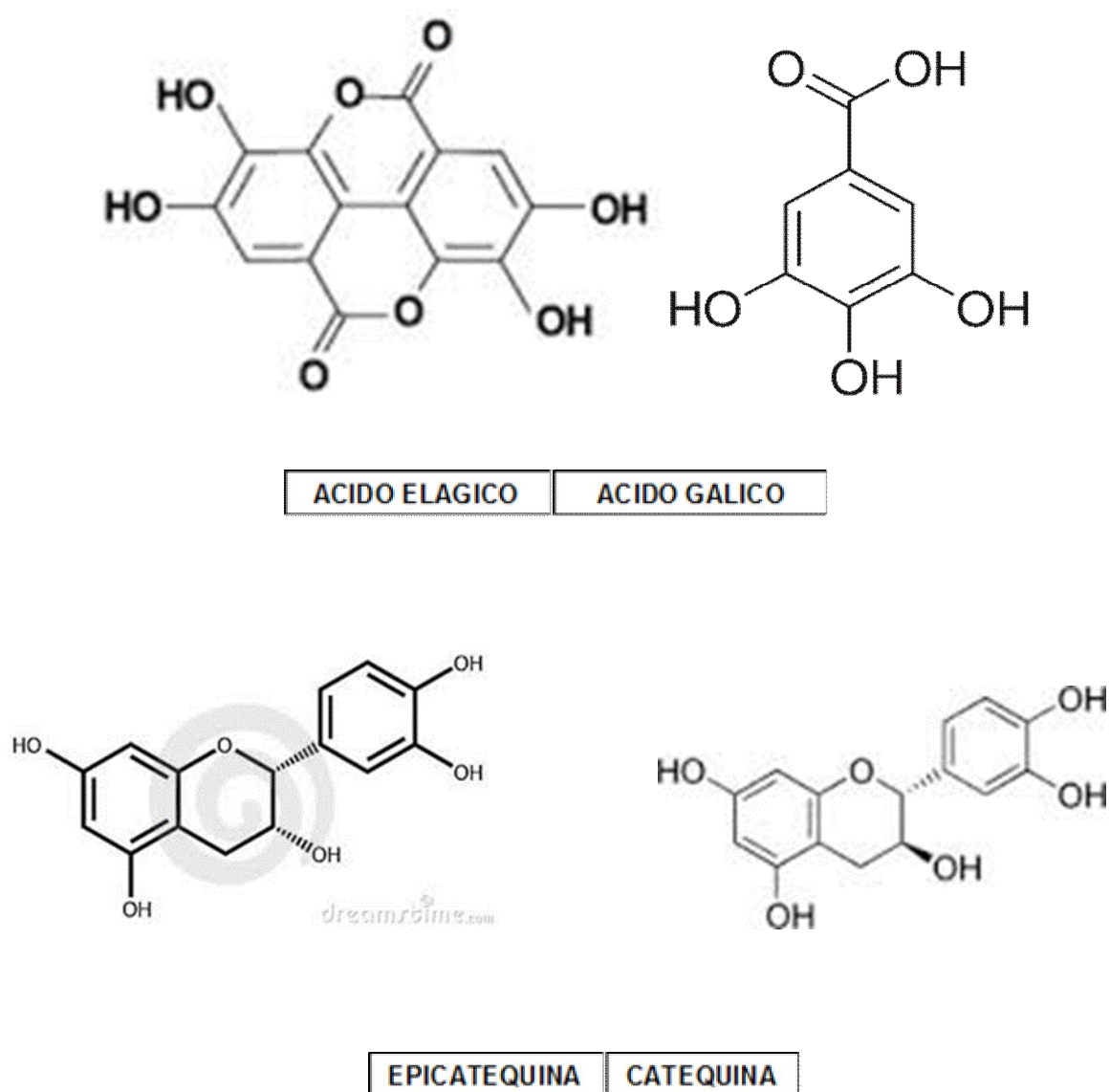


Figura 9. A partir de comparação dos tempos de retenção do extrato com padrões previamente injetados no HPLC foi possível confirmar a amostra de *Schinus terebinthifolius* a presença de taninos hidrolisáveis (ácidos gálico e ácido elágico) e taninos condensados (catequina e epicatequina).



6.2 Consumo dos animais durante os dias de tratamento

Diariamente, antes da administração dos tratamentos de cada grupo específico, foram verificados por meio do consumo de água, de ração e a massa corporal dos animais. Observou-se que nas figuras 10 a 13 não houve diferença estatística entre os grupos St e controle.

Figura 10. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre o consumo de água dos animais. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 10 animais por grupo. Valor não significativo para o grupo controle e para o grupo rotenona. $p \geq 0,05$.

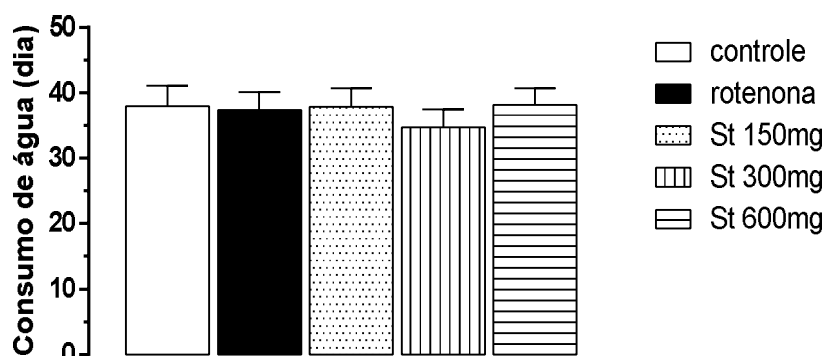


Figura 11. Efeito da rotenona (3 mg/kg s.c.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre o consumo de ração dos animais. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 10 animais por grupo. Valor não significativo para o grupo controle e para o grupo rotenona. $p \geq 0,05$.

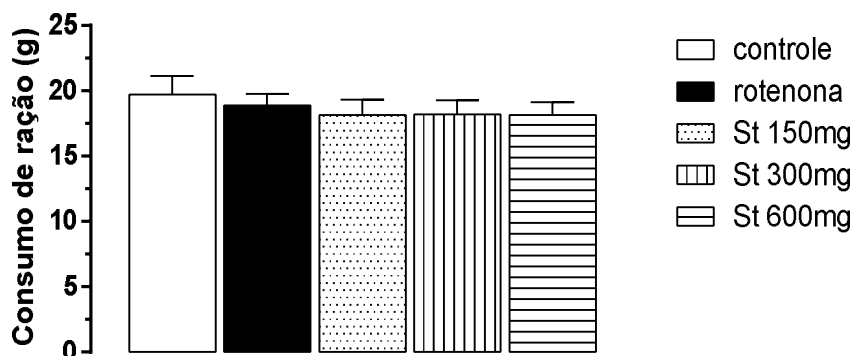


Figura 12. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre a massa corporal dos animais no dia 1 do experimento. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 10 animais por grupo. Valor não significativo para o grupo controle e para o grupo rotenona. $p \geq 0,05$.

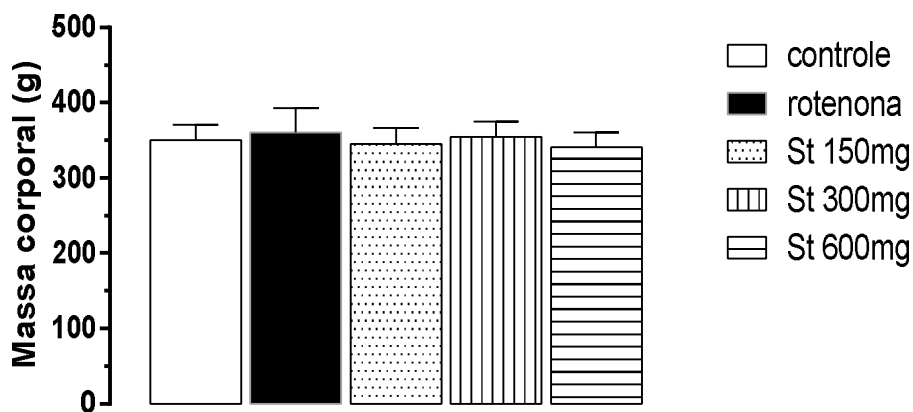
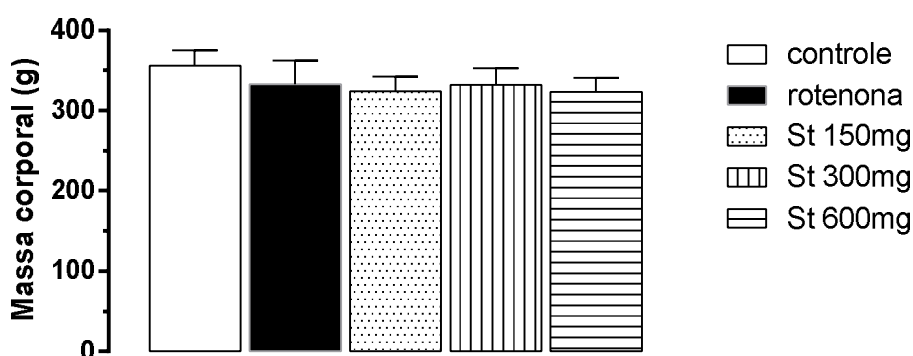


Figura 13. Efeito da rotenona (3 mg/kg, s.c.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (St 150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) sobre a massa corporal dos animais no dia 7 do experimento. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 10 animais por grupo. Valor não significativo para o grupo controle e para o grupo rotenona. $p \geq 0,05$.



6.3 Efeito de *Schinus terebinthifolius* e rotenona avaliados no teste do campo aberto.

Neste teste, com relação ao parâmetro locomoção, verificou-se que os animais tratados com rotenona 3mg/kg, apresentaram uma redução significativa da atividade geral quando comparados aos animais do grupo controle. Observou-se também que o pré-tratamento com as doses de St 150, 300 e 600 mg

significativamente aumentaram, de forma dose-dependente, a atividade locomotora dos animais que receberam o tratamento com rotenona (Figura 14).

Mais ainda, observou-se uma redução na frequência de levantar das patas dos animais tratados com rotenona (3 mg/kg, s.c.) em comparação aos ratos do grupo controle. A pré-administração, 1 hora antes da administração de rotenona, das doses de St 300 e 600 mg significativamente aumentaram a frequência de levantar dos animais que receberam o tratamento com rotenona (Figura 15).

Com relação ao tempo de imobilidade, os animais que receberam rotenona 3mg/kg s.c. apresentaram aumento significativo deste parâmetro em relação ao grupo controle. Além disso, os animais pré-tratados com *Schinus terebinthifolius* com as doses de 300 e 600 mg/kg demonstraram uma redução da imobilidade no teste do campo aberto (Figura 16).

Em adição, observou-se que os animais do grupo rotenona apresentaram aumento significativo do tempo para início do movimento no parâmetro de latência (Figura 17) em relação ao grupo controle. Entretanto, nos grupos que receberam St nas doses de 300 e 600 mg/kg, ocorreram redução deste parâmetro.

Figura 14. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral) 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na frequência de locomoção no campo aberto após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

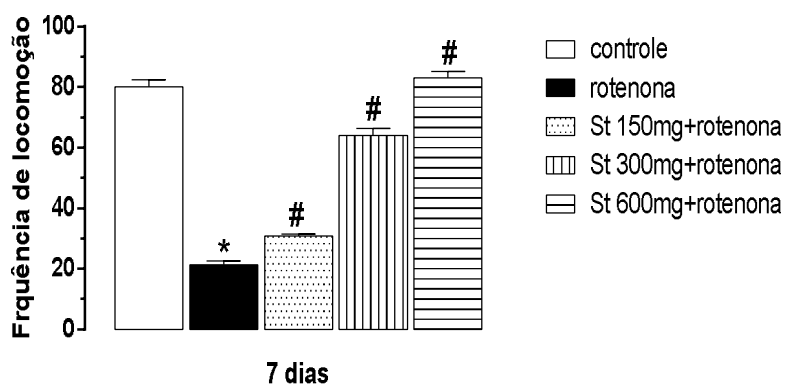


Figura 15. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3mg/kg, s.c.), na frequência de levantar após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

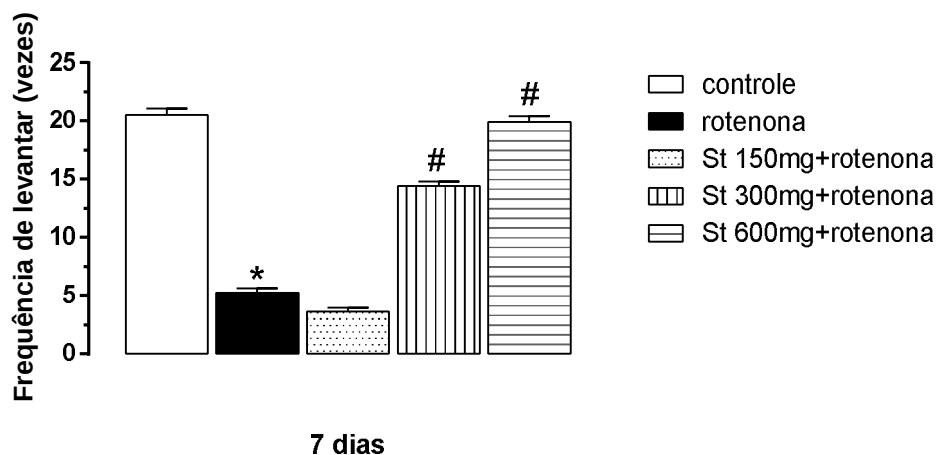


Figura 16. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.) no tempo de imobilidade no campo aberto após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

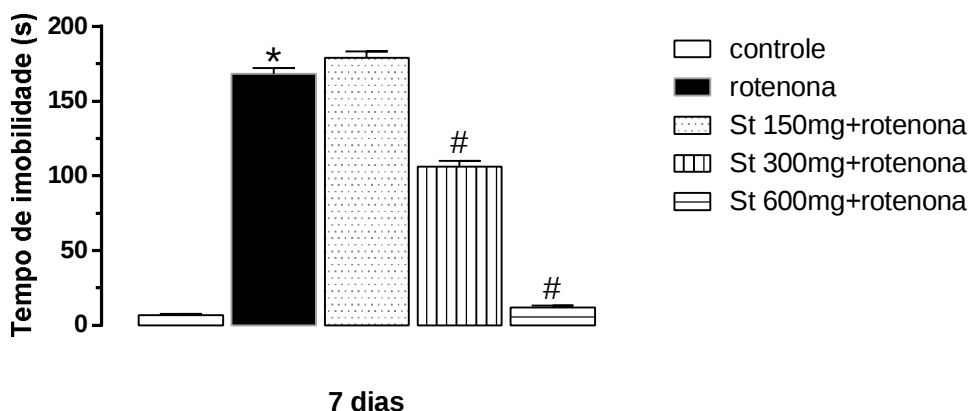
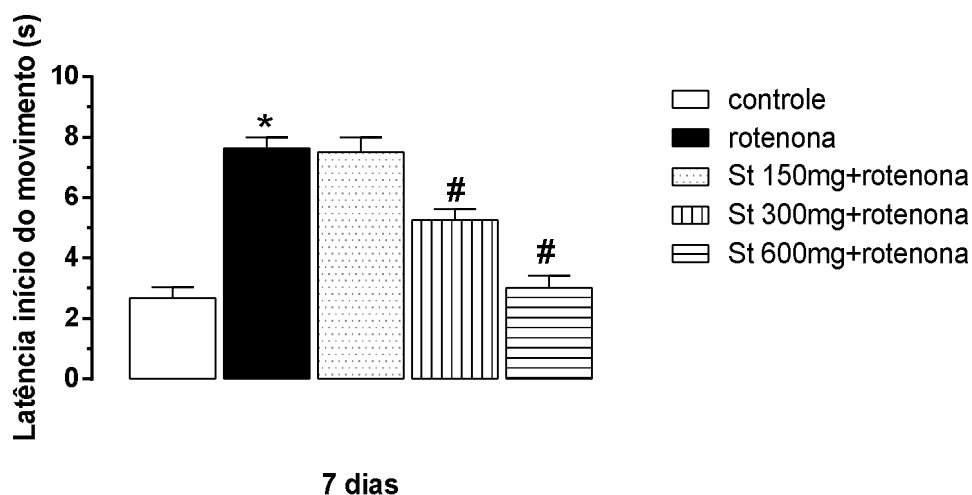


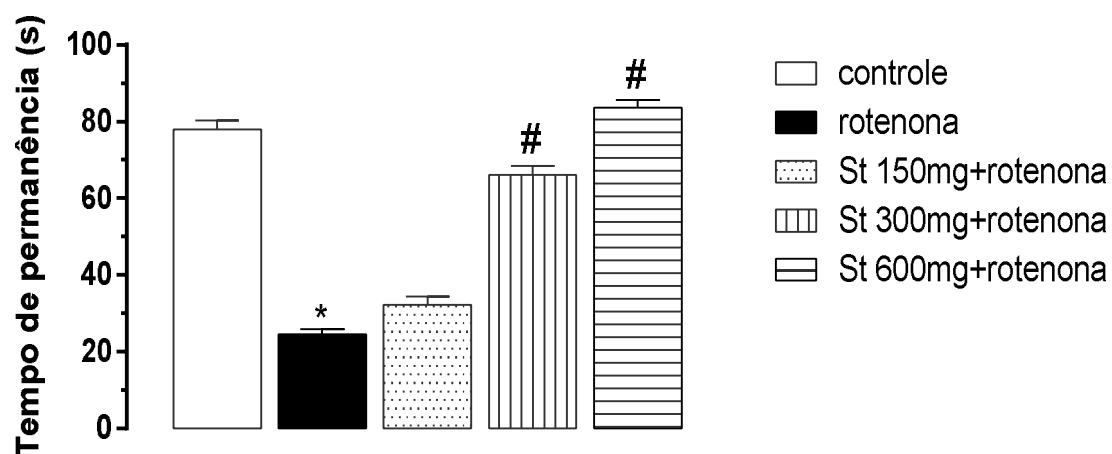
Figura 17. Efeito da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600mg/kg), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na latência para início do movimento após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.



6.4 Efeito de *Schinus terebinthifolius* e rotenona no tempo de permanência avaliados no teste do Rotarod.

Neste teste, observou-se que os animais do grupo rotenona (3 mg/kg, s.c.) apresentaram redução do tempo de permanência (s) no aparato quando comparados ao grupo controle. E os animais que receberam a dose diária via oral de *Schinus terebinthifolius* 300 e 600 mg/kg, 1 hora antes da rotenona, foram capazes de aumentar significativamente o tempo de permanência em relação ao grupo rotenona (Figura 18).

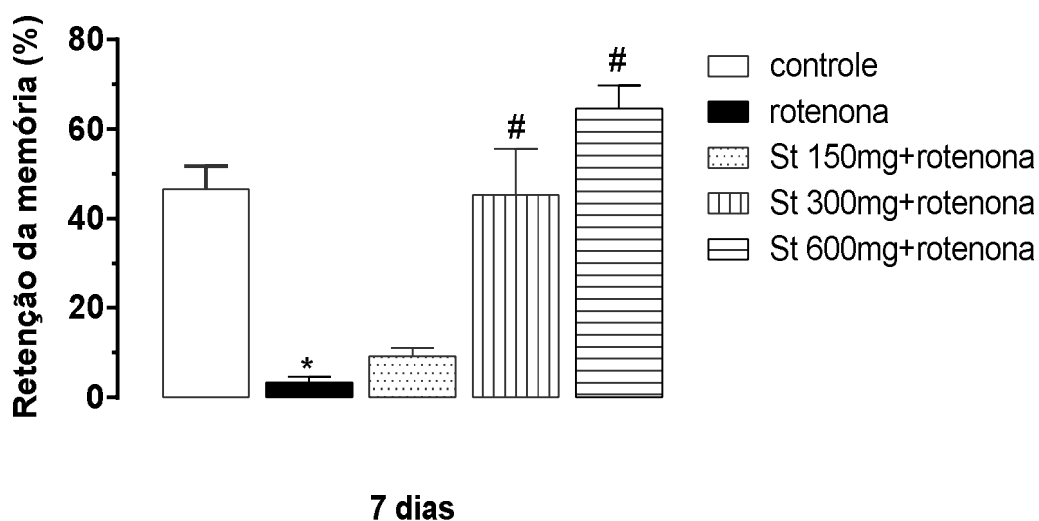
Figura 18. Efeito da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), no tempo de permanência (s) no teste do Rotarod após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.



6.5 Efeito da *Schinus terebinthifolius* e rotenona na retenção de memória nos animais avaliados no teste do Labirinto em Cruz elevado.

A indução do Parkinson por rotenona (3 mg/kg, s.c.) ocasionou uma intensa redução do percentual de retenção de memória apresentada no teste do labirinto em cruz elevado. Observou-se também que as doses de St 300 e 600 mg/kg apresentaram aumento significativo no percentual de retenção de memória em relação ao grupo administrado com rotenona nesta avaliação (Figura 19).

Figura 19. Efeito do pré-tratamento via oral da *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg) 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.) na retenção de memória no teste do labirinto em cruz elevado após 7 dias. Dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10/grupo). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

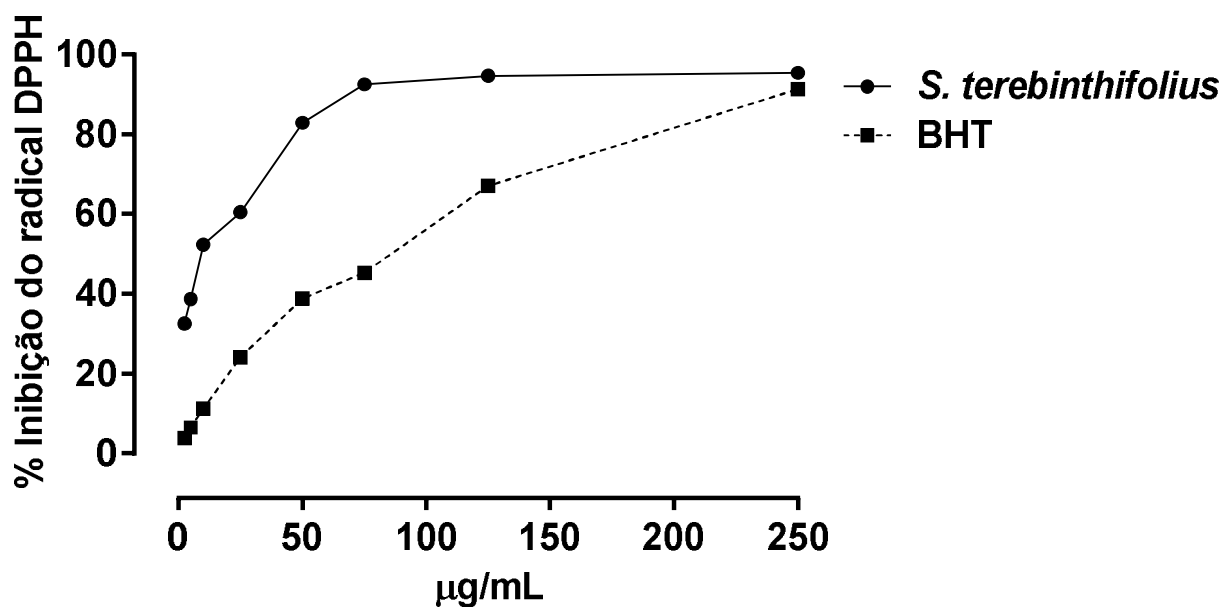


7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

7.1 Efeito *in vitro* da *Schinus terebinthifolius* sobre a atividade antioxidante de animais tratados com rotenona (DPPH)

Neste ensaio, foi observado que a *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade em sequestrar o radical livre DPPH[•] superior ao antioxidante sintético BHT ($p < 0,05$). A concentração de *Schinus* necessária para inibir 50% do radical foi 8,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o padrão BHT apresentou uma EC₅₀ de 73,76 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 20).

Figura 20. Atividade antioxidante *in vitro* do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* Raddi e do padrão BHT. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M, em triplicata.



7.2 Efeito *in vivo* da *Schinus terebinthifolius* sobre a peroxidação lipídica de ratos tratados com rotenona (TBARS)

A indução da doença de Parkinson pela rotenona (3 mg/kg, s.c.) provocou um aumento bastante significativo da peroxidação lipídica na substância negra, no estriado e no cortex. As doses de 150, 300 e 600 mg/kg de *Schinus teribinthifolius* provocaram a inibição da peroxidação nos animais em relação ao grupo administrado com rotenona em todos os tecido, não havendo diferença em relação ao controle.

Figura 21. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg, via oral), 1 hora antes da administração de rotenona (3 mg/kg, s.c.), na concentração em nMol de malonaldeído/mg de proteína na substancia negra. Dados foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

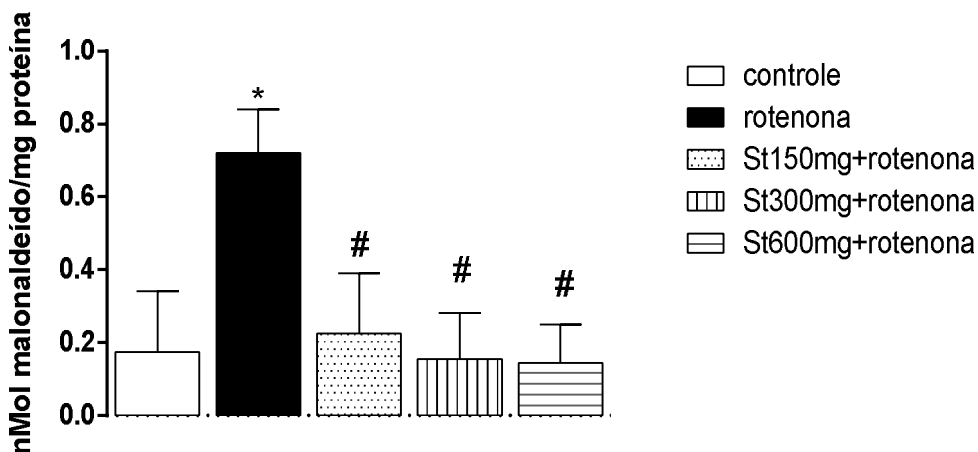


Figura 22. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona 3mg/kg s.c., na concentração em nMol de equivalentes de malonaldeído por miligramas de proteína no estriado. Dados foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.

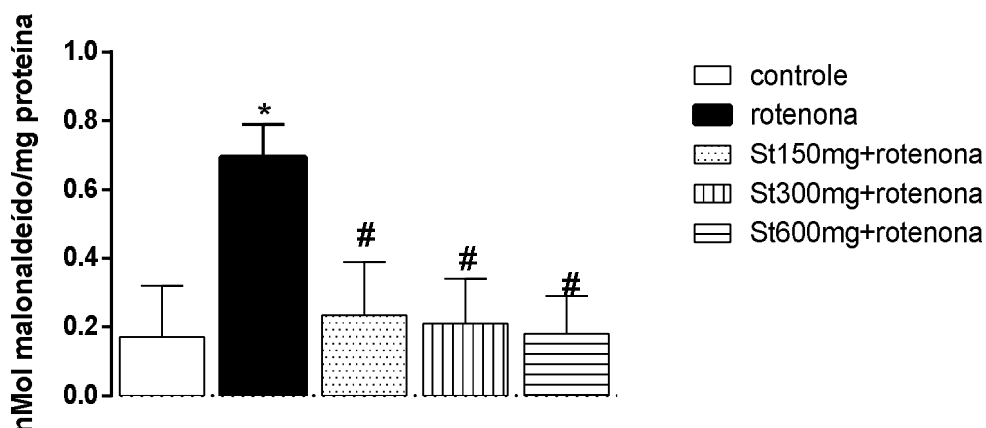
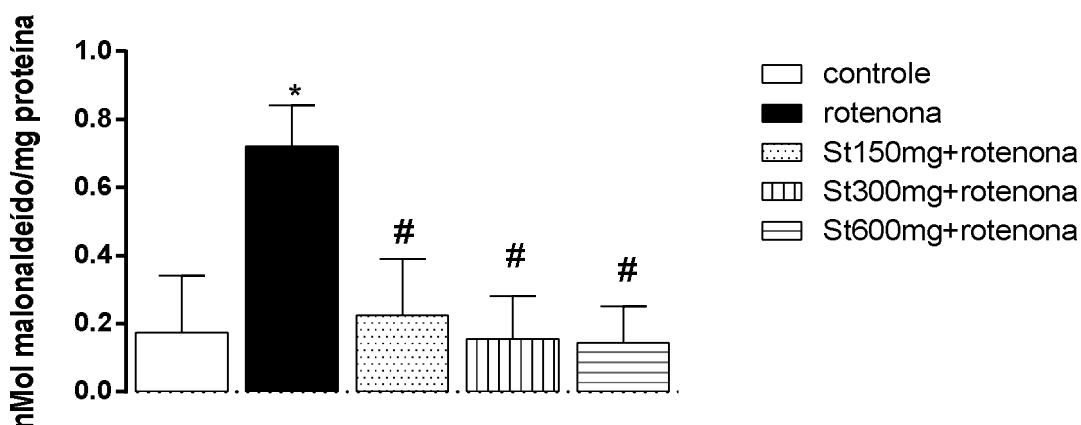


Figura 23. Efeito de *Schinus terebinthifolius* (St 150, 300 e 600 mg/kg via oral), 1 hora antes da administração de rotenona 3mg/kg s.c., na concentração em nMol de equivalentes de malonaldeído por miligramas de proteína no córtex. Dados foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls, como média $\pm$ E.P.M. (n=10). Valor significativo para $p \leq 0,001$. * diferença significativa em relação ao controle. # diferença significativa em relação ao grupo rotenona.



8. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou o efeito neuroprotetor da administração de *Schinus terebinthifolius* Raddi na doença de Parkinson utilizando o modelo da administração subcutânea de rotenona (3 mg/kg) durante 7 dias.

As doses da *Schinus terebinthifolius* Raddi (150, 300 e 600 mg/kg) preveniram significativamente as alterações motores nos testes do campo aberto no parâmetro locomoção, enquanto que apenas as doses de 300 e 600mg/kg foram capazes de prevenir a toxicidade nos parâmetros frequência de levantar, tempo de imobilidade e latência para iniciar o movimento. Nos testes do rotarod e labirinto em cruz elevado, somente as doses de 300 e 600mg/kg impediram a alteração motora induzida pela rotenona.

Na avaliação bioquímica realizada pela peroxidação lipídica por intermédio da mensuração da concentração de malonaldeído, todas as doses de *Schinus*, 150, 300 e 600mg/kg, de forma dose dependente, foram capazes de inibir o estresse oxidativo induzido pela administração sistêmica de rotenona, observada no método *in vivo* de TBARS. Também foi demonstrado o efeito antioxidante *in vitro* do extrato do *Schinus terebinthifolius* Raddi, medido pelo método do radical DPPH.

A análise da extração dos principais componentes observados no método do HPLC observados no extrato da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi, detectado a 278 nm, demonstrou os picos obtidos foram de ácido gálico (Rt: 4,66), catequina (7,51), epicatequina, (10,24) e ácido elágico (19,05). Foram observados os picos de cada constituinte em separado no cromatograma e na estrutura química dos ácidos gálico e ácido elágico (taninos hidrolisáveis) e da catequina e epicatequina (taninos condensados).

Também de acordo com nossos resultados, não houve diferenças significativas no que se refere ao consumo de água, ração, massa dos ratos no 1º dia e massa dos ratos no 7º dia após o início da indução com a neurotoxina rotenona e tampouco com o pré-tratamento com a *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Neste estudo, o tratamento com a neurotoxina rotenona foi capaz de produzir um estado de acinesia relacionado aos circuitos neuronais associados à função do gânglio basal. As alterações motoras, evidenciadas pela redução nos testes do campo aberto e no tempo de permanência no rotadod, estão principalmente atribuídos à degeneração dos neurônios estriatais, uma região funcionalmente conectada por projeções para o córtex motor (DELAVILLE et al., 2014).

A rotenona é um potente inibidor do complexo I (NADH: ubiquinooxidaredutase) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Em ratos, esta toxina causou uma síndrome que replicou tanto aspectos neuropatológicos quanto sintomas comportamentais da doença de Parkinson. A perda de células dopaminérgicas induzidas por rotenona levou ao desenvolvimento de sintomas parkinsonianos como bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (BETARBET et al., 2000).

Numerosos testes comportamentais têm sido empregados para visualizar deficiências motoras em modelos animais da doença de Parkinson. Muitos destes, como campo aberto, rotarod, catalepsia, teste de atividade locomotora e teste de iniciação motora (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015). Muitos destes têm demonstrado significativamente as alterações motoras: a rotenona demonstrou induzir uma demora na iniciação do movimento (FLEMING et al., 2004); redução da atividade motora (SHERER et al., 2003); latência prolongada no teste de catalepsia (SHARMA e NEHRU, 2013) e resistência reduzida no teste do rotarod (INDEN et al., 2007). VON WRANGEL et al. (2015) também observaram um período reduzido gasto no teste do rotadod nos animais tratados com injeções de rotenona, permanecendo este prejuízo por duas semanas, sugerindo alterações neuroestruturais permanentes e não um efeito tóxico agudo da rotenona.

A cognição também tem sido alterada nos ratos tratados com rotenona, como a latência de transferência no teste de aprendizado no elevated plus maze, o qual foi prolongado quando comparados aos animais do grupo controle (KAUR et al., 2011). O prejuízo da memória também tem sido reportado em ratos tratados com rotenona, os quais falharam em detectar um objeto novo no teste de reconhecimento de objeto (DOS SANTOS et al., 2013). Outro estudo similar demonstrou o prejuízo na memória espacial em camundongos tratados com rotenona, 5 mg/kg intragastricamente, 5 dias na semana, durante 1 mês (JIA et al., 2014).

Nossos dados também demonstraram que, após a administração de rotenona 3 mg/kg, houve um aumento bastante significativo na concentração de malonaldeído nos tecidos da substância negra, córtex e estriado (indicador de peroxidação lipídica devido aos radicais livres), sugerindo um aumento do estresse oxidativo central.

Contudo, a administração das doses de 150, 300 e 600 mg/kg de *Schinus terebinthifolius* foi capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida pela toxina, podendo este efeito neuroprotetor ser devido à sua capacidade antioxidante no teste

do TBARS. Está bem estabelecido que a captura de radicais livres por antioxidantes é devido à sua capacidade de doar hidrogênio (SHINOMOL e MURALIDHARA, 2008). No organismo o estresse oxidativo é combatido por meio de antioxidantes endógenos e por sequestradores de radicais livres (STACK et al., 2010). Com isso a administração de agentes antioxidantes tem demonstrado melhorar o estresse oxidativo e retardar a progressão de doenças neurodegenerativas (ROSENSTOCK et al., 2004) o que os tornam potenciais alvos para o tratamento de diversas patologias nas quais os radicais livres estejam envolvidos.

A administração de baixas doses de rotenona *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado sinalizar muitos dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Parkinson, como a alteração da sinalização de cálcio, indução do estresse oxidativo e apoptose, redução da tirosina hidroxilase, disfunção proteossomal, acúmulo de ferro na substância negra e a formação de inclusões citoplasmáticas que contem ubiquitina e α -sinucleína (VON WRANGEL et al., 2015).

SHERER et al. (2003) também demonstrou que a exposição a baixas doses de rotenona (2-3 mg/kg/dia) causou alta lesão seletiva dopaminérgica nigroestriatal. Um elemento comum de todas as toxinas de modelos que induzem a doença de Parkinson é a habilidade de produzir um estresse oxidativo e causar morte de células dopaminérgicas assim como é visto na doença de Parkinson (BLESA et al., 2012).

Vários estudos têm demonstrado que os níveis de MDA estão aumentados no cerebelo, estriado e mesencéfalo de animais tratados com rotenona em comparação a ratos tratados com veículo (NEHRU et al., 2008; VERMA e NEHRU, 2009; ZAITONE et al., 2012). BASHKATOVA et al., (2004) também demonstraram haver um aumento dos níveis de MDA primeiramente no estriado e depois no córtex em um modelo animal induzido por rotenona. Marcadores de estresse oxidativo são tipicamente encontrados em biópsias cerebrais, células periféricas e fluidos biológicos derivados de pacientes com doença de Parkinson, indicando assim que o estresse oxidativo é uma chave na patogênese. Malonaldeído (MDA) é um marcador específico da peroxidação lipídica, o qual é largamente um resultado da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados com mais de duas ligações duplas (SANDERS e GREENAMYRE, 2013).

Em nosso estudo, a administração de rotenona foi capaz de promover o aumento dos níveis de MDA na substância negra, no estriado e no córtex, sugerindo

um aumento da peroxidação lipídica e assim, do estresse oxidativo. Desta forma, houve um aumento dos níveis de MDA cerebrais (um indicador da peroxidação lipídica devido à radicais livres), os quais foram inibidos pela administração da casca do caule de todas as doses da *Schinus terebinthifolius*, sugerindo sua ação antioxidante. Neste sentido, recentemente, COSTA et al., (2015) demonstrou que o extrato de diferentes tecidos da *Schinus terebinthifolius* apresentaram atividade antioxidante pelo método de radical DPPH. ABDOU et al. (2015) investigaram os efeitos curativos e protetores do extrato etanólico da *Schinus terebinthifolius* (350 mg/kg) contra a hepatotoxicidade aguda induzida por CCl₄- em ratos e demonstrou que a administração reestabeleceu significativamente a capacidade antioxidante. O estresse oxidativo devido ao aumento da geração de radicais livres ou o mecanismo antioxidante debilitado endógeno é um importante fator que tem sido implicado em várias doenças neurodegenerativas (SANDERS e GREENAMYRE, 2013; SOLANKI et al., 2015).

O cérebro é altamente suscetível ao dano causado por radicais livres, devido à sua alta utilização de oxigênio e à presença de baixas concentrações de enzimas antioxidantes e baixos quelantes de radicais livres. Há um grande interesse em estabelecer estratégias terapêuticas e alimentares para combater o estresse oxidativo produzido no sistema nervoso central (GAO et al., 2012; VIRMANI et al., 2013). Estudos em humanos têm sugerido que os flavonoides, um grande grupo de compostos polifenólicos, encontrados em frutas e vegetais são capazes de neutralizar o prejuízo neuronal, além de regredir a progressão de doenças neurodegenerativas, motivando assim esforços em pesquisas para identificar os mecanismos de morte neuronal, bem como descobrir novos componentes para controlá-los (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; SOLANKI et al., 2015; RENAUD et al., 2015).

A *Schinus terebinthifolius* já foi utilizada anteriormente nas mesmas doses de 150, 300 e 600mg/kg no modelo animal da doença neurodegenerativa de Huntington induzido por ácido-3-nitropropilônico (3-NP) (SILVA J.B.R. et al., artigo submetido). Ainda nesse trabalho, não foram constatadas mortes ou outros sinais clínicos de toxicidade como alterações de pelo e mucosas; alterações da atividade locomotora; alterações do sistema respiratório e circulatório; do sistema nervoso central ou periférico; alterações do comportamento; ocorrência de tremores, letargia ou coma,

com o uso do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* na dose de 5 g/kg de massa corporal, até o 14º dia após sua administração.

Os principais compostos da casca do caule da *Schinus terebinthifolius* Raddi são flavonoides (catequina e epicatequina) e ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico). Catequinas são poderosos antioxidantes e quelantes de radicais livres em ensaios *in vitro* e modelos *in vivo* (SRIVIDHYA et al., 2009; SOLANKI et al., 2015).

Tem sido demonstrado que as catequinas têm maior atividade antioxidante em comparação às vitaminas C e E *in vitro* (LEVITES et al., 2001; SRIVIDHYA et al., 2008; SRIVIDHYA et al., 2009). As estruturas químicas que contribuem estes efeitos incluem a estrutura tri-hidroxi e fração galato, os quais podem quelar íons metálicos e evitar a geração de radicais livres, bem como permitir a deslocalização de elétrons e conferem alta reatividade para eliminar os radicais livres (BALU et al., 2005; MANDEL et al., 2006; KHAN e MUKHTAR, 2007; SENTHIL et al., 2008).

Além disso as catequinas e epicatequinas também foram capazes de modular indiretamente a indução da expressão de algumas enzimas antioxidantes protetoras (HIGDON e FREI, 2003; UNNO et al., 2004; WEINREB et al., 2004; SRIVIDHYA et al., 2008). O tratamento crônico com catequinas evitou o declínio da atividade T-SOD e GSH-Px no soro de camundongos idosos e também impediu significativamente o aumento de TBARS no hipocampo (ABD EL MOHENSEN et al., 2002; MANDEL et al., 2006).

As estruturas químicas têm contribuído para seu efeito para quelar os íons metálicos, prevenindo a geração de radicais livres, permitindo o deslocamento de elétrons e fornecendo alta reatividade para eliminar radicais livres (MANDEL et al., 2006; KHAN e MUKHTAR, 2007; SENTHIL et al., 2008). Além disso, as catequinas e epicatequinas foram capazes de modular indiretamente a expressão de algumas enzimas antioxidantes (HIDGON e FREI, 2003; WEINREB et al., 2004). O tratamento crônico com catequinas foi capaz de prevenir o declínio da atividade das enzimas SOD e GSH e soro de camundongos idosos, prevenindo significativamente também o aumento de TBARS no hipocampo destes animais (ABD EL MOHENSEN et al., 2002; MANDEL et al., 2006).

Por outro lado, o ácido gálico e elágico são taninos hidrolisados de produtos naturais encontrados em abundância em uvas, chás, frutas e vinhos (SINGH et al., 2004). Estes ácidos foram capazes de reduzir a produção de ROS e superóxido,

como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e ácido hipocloroso; também devido à suas atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas (KIM, 2007).

O efeito neuroprotetor do ácido gálico é ainda apoiada no pré-tratamento de células SH- SY5Y em modelo de estresse oxidativo in vitro induzido por 6-OHDA (LU et al., 2006). Além de efeitos protetores em modelos de neurotoxicidade, os ácidos hidrolisados neutralizaram os efeitos tóxicos do lindano e tetracloreto de carbono no estresse oxidativo em fígado e rim de ratos (PADMA et al., 2011).

No prejuízo cognitivo induzido por injeção de 6-OHDA, o tratamento com ácido gálico mostrou reduzir significativamente o nível de TBARS em ratos. Resultados semelhantes, mostrando redução da formação de TBARS, foram relatados por outros pesquisadores (PADMA et al., 2011). A atividade de GPx diminuiu significativamente no grupo tratado com veículo comparado com o grupo controle, enquanto que a atividade desta enzima antioxidante aumentou nos ratos tratados com ácido gálico. Junto com SOD e CAT, a GPx é uma das importantes enzimas antioxidantes no cérebro, pois elimina o peróxido de hidrogênio, convertendo em água. Os resultados de DUTTA e MOHANAKUMAR (2015) mostraram que os ácidos hidrolisados, tais como ácidos fenólicos, elevaram a expressão e atividade das enzimas catalases e GPx no coração de ratos Sprague–Dawley. Demonstrou-se também que a administração de ácido gálico não só restabeleceu as atividades da CAT e GPx mas reduziram significativamente a quantidade de malonaldeído no fígado, cérebro e rim de ratos idosos (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; SOLANKI et al., 2015; RENAUD et al., 2015).

9. CONCLUSÃO

No modelo animal da doença de Parkinson induzido pela rotenona, a administração subcutânea de 3mg/kg durante 7 dias desta toxina provocou a redução da atividade geral dos ratos avaliados no teste do campo aberto;

A administração da rotenona também produziu a redução do tempo de permanência dos animais no teste do rotarod;

A administração da rotenona reduziu significativamente o percentual de retenção de memória dos ratos no teste do labirinto em cruz elevado;

A administração subcutânea da rotenona durante 7 dias produziu o aumento da peroxidação lipídica na substância negra, no estriado e no córtex;

A avaliação do cromatograma da *Schinus terebinthifolius* Raddi demonstrou a presença de catequina e epicatequina (taninos condensados) e ácido gálico e ácido elágico (taninos hidrolisáveis);

A pré-administração, via oral, de *Schinus* nas doses de 150mg, 300mg e 600mg/kg foram capazes de prevenir a alteração do parâmetro locomoção no teste do campo aberto, enquanto somente as doses de 300mg e 600mg/kg foram capazes de inibir a hipoatividade dos outros parâmetros;

O pré-tratamento de *Schinus* nas doses de 300mg e 600mg/kg inibiram as alterações motoras e comportamentais provocadas pela rotenona nos testes de rotarod e labirinto em cruz elevado;

Schinus terebinthifolius Raddi apresentou atividade antioxidante *in vitro*;

A pré-administração, via oral, de *Schinus* nas doses de 150mg, 300mg e 600mg/kg foram capazes de inibir o aumento da peroxidação lipídica na substância negra, estriado e córtex;

O pré-tratamento dos ratos com *Schinus terebinthifolius* Raddi produziu uma neuroproteção significativa, provavelmente mediada por sua ação antioxidante;

Deste modo, o presente trabalho trouxe novas perspectivas e propriedades farmacológicas para o tratamento da doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

ABDL EL MOHSEN, M.M.; KUHNLE, G.; RECHNER, A.R.; SCHROETER, H.; ROSE, S.; JENNER, P.; RICE-EVANS, C.A. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. **Free Radic Biol Med.** v.33, p. 1693-1702, 2002.

ABDOU, R.H.; SALEH, S.Y.; KHALIL, W.F. Toxicological and biochemical studies on *Schinus terebinthifolius* concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Pharmacogn Mg.** v.11, p. S93-S101, 2015.

ALAM, M.; SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behav Brain Res.** v. 136, p. 317-324, 2002.

AMORIM, M.M.R.; SANTOS, L.C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi: ensaio clínico randomizado. **Rev Bras Ginecol Obst.** v. 25, p. 95-102, 2003.

ARAÚJO, E.L. Aroeira da praia – estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado do Departamento de Ciências Farmacêuticas /UFPE, Recife, 2002.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; MURALI, G.; PANNEERSELVAM, C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. **Int J Dev Neurosci.** v. 23, p. 501-507, 2005.

BASHKATOVA, V.; ALAM, M.; VANIN, A.; SCHMIDT, W.J. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. **Exp Neurol.** v. 186, p. 235-241, 2004.

BENKLER, M.; AGMON-LEVIN, N.; HASSIN-BAER, S. et al. Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. **Clin Rev Allergy Immunol** v. 42, p. 164-167, 2012.

BERMAN, S.B.; HASTINGS, T.G. Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. **J Neurochem.** v. 69, p. 1185-1195, 1997.

BERMAN, S.B.; HASTINGS, T.G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 73, p. 1127-1137, 1999.

BERNARDI, M.M.; PALERMO-NETO, J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacol** v. 65, p. 247-250, 1979.

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. **Nat Neurosci.** v. 3, p. 1301-1306, 2000.

BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and new models of Parkinson's disease. **J Biomed Biotechnol.** v. 2012, 845618, 2012.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** v. 181(4617), p. 1199-1200, 1958.

BRAAK, H.; TREDICI, K.D.; RÜB, U. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging** v. 24, p. 197-211, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BREST, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss. Technol.** v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BROADHURST, P.L. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br J Psychol** v. 49, p. 12-20, 1957.

BUCK, K.; FERGER, B. The selective α -1 adrenoreceptor antagonist HEAT reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Synapse** v.64 (2), p. 117-126, 2010.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978.

CAMADOLA, S.; POLI, G.; MATTSON, M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1 binding activity through caspase activation in neurons. **J Neurochem**, v. 74, p. 159-168, 2000.

CAMPELO, J.P.; MARSAIOLI, A.J. Terebinthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Shinus terebinthifolius*. **Phytochemistry** v.14, p. 2300-2302, 1975.

CEREDA, E.; BARICHELLA, M.; PEZZOLI, G. Controlled-protein dietary regimens for Parkinson's disease. **Nutr Neurosci** v.13 (1), p. 29-32, 2010.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova** v.30: 597-599, 2007.

CHAUDIÈRE J, FERRARI-ILIOU R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem Toxicol** v. 37 (9-10), p. 949-962, 1999.

CHENG HC, ULANE CM, BURKE RE. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. **Ann Neurol** v. 67, p. 715-725, 2010.

CIERI, D.; BRINI, M.; CALI, T. Emerging (and converging) pathways in Parkinson's disease: keeping mitochondrial wellness. **Biochem Biophys Res Commun**, article in press, p. 1-11, 2016.

CONNOLLY, B.S.; LANG, A.E. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: a review. **JAMA** v. 311(16), p. 1670-1683, 2014.

CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas, vol. 3. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brazil, pp 125-126, 1978.

COSTA, C.O.D'S.; RIBEIRO, P.R.; LOUREIRO, M.B.; SIMÕES, R.C.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Phytochemical screening antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Phcog Mag.** v.11, p. 607-614, 2015.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron** v. 39, p. 889-909, 2003.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKJ, N.; SANTOS, R.J dos. Atividade antioxidante do extrato do fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5 (2), p. 83-90, 2004.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Tecnologia Lavras** v.29, p. 617-622, 2005.

DELAVILLE, C.; CRUZ, A.V.; MCCOY, A.J. et al. Oscillatory activity in basal ganglia and motor cortex in an awake behaving rodent model of Parkinson's disease. **Basal Ganglia** v.3, p. 221-227, 2014.

DORSEY, E.R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J.P; et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology** v.68, p. 384-386, 2007.

DOS SANTOS, A.C.; CASTRO, M.A.; JOSE, E.A.; DELATTRE, A.M.; DOMBROWSKI, P.A., DA CUNHA, C., et al. REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **J Neurosci Res.** v. 91, p. 1508-1516, 2013.

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.

DUTTA D.; MOHANAKUMAR, I. Tea and Parkinson's disease: Constituents of tea synergize with antiparkinsonian drugs to provide better therapeutic benefits. **Neurochem Int** v. 89, p. 181-190, 2015.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol** v.164: 1357-1391, 2011.

FAULKNER, J.R.; HERMANN, J.E., WOO, M.J., et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, p. 2143-2155, 2004.

FLEMING, L.; MANN, J.B.; BEAN, J. et al. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. **Ann Neurol**, v. 36, p. 100-103, 1994.

FLOOR, E.; WETZEL, M.G. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. **J Neurochem**, v.70, p. 268-275,1998.

GAO, X.I; CASSIDY, A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; RIMM, E.B.; ASCHERIO, A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology** v.78, p. 1138-1145, 2012.

GESI, M.; SANTINAMI, A.; RUFFOLI, R. et al. Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). **Pharmacol Toxicol**, v. 89, p. 217-224, 2001.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacol**, v. 40, p. 959-975, 2001.

GOTZ, M.E.; KUNING, G.; RIEDERER, P.; YODIM, M.B. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. **Pharmacol Ther**, v. 63, p. 37-122, 1994.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci** v. 899, p.136-147, 2000.

HALLIDAY, G.M.; MCRITCHIE, D.A.; CARTWRIGHT, H. et al. Midbrain neuropathology in idiopathic Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. **J. Clin. Neurosci.**, v. 3, p. 52-60, 1996.

HAUWEL, M.; FURON, E.; CANOVA, C.; GRIFFITHS, M.; NEAL, J., GASQUE, P.; et al. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal endependymal cells. **Brain Res Rev**, v. 48, p. 220-233, 2005.

HAYASHI, T.; NAGAYAMA, K.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, "molle-l" (*Schinus terebinthifolius*). **Journal of Natural Products** v. 52, p. 210-211, 1989.

HEIKKILA, R, NICKLAS, W., VYAS, I., DUVOISIN, R. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implications for the mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. **Neurosci Lett** v. 62: 389-394, 1985.

HIDGON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr** v. 43, p. 89-143, 2003.

HOGLINGER, G.U., LANNUZEL, A., KHONDIKER, M.E.; MICHEL, P.P.; DUYCKAERTS, C.; FEGER, J. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. **J Neurochem** v.95, p. 930-939, 2005.

INDEN, M.; KITAMURA, Y.; TAKEUCHI, H.; YANAGIDA, T.; TAKATA, K.; KOBAYASHI, Y. et al. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. **J Neurochem** v. 101, p. 1491-1504, 2007.

JAIN, M.K.; YU, B.Z.; ROGERS, J.M.; SMITH, A.E.; BOGER, E.T.; OSTRANDER R.L.; RHEINGOLD, A.L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**. v 39, p. 537-547, 1995.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psyatry** v.79 (4), p. 368-376, 2008.

JIA, F.; SONG, N.; ZHAO, C.; XIE, J.; JIANG, H. Unexpected improvements of spatial learning and memory abilities in chronic rotenone intoxicated mice. **PloS One** 9, 91641, 2014.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **Neuro Toxicology** v.46, p. 101-116, 2015.

KASSEM, M.E.S.; EL-DESOKY, S.K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and bioflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 40, p. 447-450, 2004.

KAUR, H.; CHAUHAN, S.; SANDHIR, R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**. v 36 (8), p. 1435-1443, 2011.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sci** v. 81, p. 519-533, 2007.

KHATRI, D.K.; JUVEKAR, A.R. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Beh** v. 150-151, p.39-47, 2016.

KIM, Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biol Pharm Bull** v. 30, p. 1052-1055, 2007.

KULKARNI, S.K.; SHARMA, A.C. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus maze in rats and mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 16(1), p. 117-25, 1992.

KUMAR, P.; PADI, S.S.V.; NAIDU, P.S.; KUMAR, A. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioral changes: possible neuroprotective mechanisms. **Behav Pharmacol** ,v. 17, p. 485-492, 2006.

KUMMAR, P.; KUMAR, A.K. Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat brain: possible behavioral, biochemical and cellular alterations. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** . v. 33, p. 100-108, 2009.

KUMAR, A., JUYAL, V. Green tea attenuates memory impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. **Pharmacologyonline**, v.1, p. 864-878, 2010.

KUMAR, V.; DHINGRA, D. Memory-enhancing activity of palmatine in mice using elevated plus maze and Morris water maze. **Adv Pharmacol Sci**, 2012..

LESAGE, S.; BRICE, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Hum Mol Genet** v.18, R48-49, 2009.

LEVITES, Y.; WEINREB, O.; MAOR, G.; YODIM, MB.; MANDEL, S. Green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate prevents MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration. **J Neurochem** v. 78, p. 1073-1082, 2001.

LIBERTO, C.M.; ALBRECHT, P.J.; HERX, L.M., YONG, V.W.; LEVISON, S.W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **J Neurochem**, v. 89, p. 1092-1100, 2004.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENETJ, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol** v. 105, p. 137-147, 2006.

LIU, B.; DU, L.; HONG, J-S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 293, p. 607-617, 2000.

LLOYD, H.A.; JAOUNI, T.M.; EVANS, S.L.; MORTON, J.F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry** v. 16, p. 1301-1302, 1977.

LONG-SMITH, C.M.; SULLIVAN, A.M.; NOLAN, Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol** v.89, p. 277-287, 2009.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, O.S.; TANG, H.; ZHAO, B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochem Int** v. 48 (4), p. 263-274, 2006.

MANDEL, S.; AMIT, T.; YODIM, M.B. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. **Mol Nutr Food Res** v. 50, p. 229-234, 2006.

MANZONI, A.; MAMASIS, S.; DIHANICH, R. et al. Inhibition of LRRK2 kinase activity stimulates macroautophagy. **Biochem Biophys Acta** v.1833, p.2900-2910, 2013.

MARCHETTI, B.; ABBRACCHIO, M.P. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? **Trends Pharmacol Sci**, v. 26 (10), p. 517-525, 2005.

MARTÍNEZ, M.J.; BELANCOURT, J.; ALONSO-GONZALES, N.; JAUREGUI, A. Screening of some Cuba medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol** v. 52, p. 171-174, 1996.

MARTINEZ, T.N.; GREENAMYRE, J.T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal** v. 16, p. 920-934, 2012.

MATIAS, I.; BUOSI, A.S.; GOMES, F.C.A. Functions of flavonoids in the central nervous system: astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochem Int** v. 95, p. 85-91, 2016.

McRITCHIE, D.A.; CARTWRIGHT, H.R., HALLIDAY, G.M. Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v. 144, p. 202-213, 1997.

MEDEIROS, K.C.P.; MONTEIRO, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SILVA, B.A.; PIUVEZAM, M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. **Braz J Pharmacogn** p. 23-28, 2007.

MEISSNER, W.G.; FRASIER, M.; GASSER, T.; et al. Priorities in Parkinson's disease research. **Nat Rev Drug Discov** v.10, p. 377-393, 2011.

MONJE, M.L.; TODA, H.; PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p. 1760-1765, 2003.

MORRISON, J.H.; BAXTER, M.G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. **Nat Ver Neurosci** v. 13, p. 240-250, 2012.

MORTIBOYS, H.; JOHANSEN, K.K.; AASLY, J.O. Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. **Neurology** v.75, p. 2017-2020, 2010.

NARENDRA, D.P.; JIN, S.M.; TANAKA, A.; et al. PINK1 is selectively stabilized on impairment mitochondria to activate Parkin. **PloS Biol** v.8, e1000298, 2010.

NATALE, G.; KASTSIUSHENKA, O.; FULCERI, F.; RUGGIERI, S.; PAPARELLI A.; FORNAI, F. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclasse of TH-positive neurons in the gut. **Brain Res** v. 1355, p. 195-206, 2010.

NEHRU, B.; VERMA, R.; KHANNA, P.; KUMAR, S.; SHARMA, S.K. Behavioral alterations in rotenone model of Parkinson's disease: attenuation by co-treatment of centrophenoxine. **Brain Res** v.1201, p. 122-127, 2008.

ORR, C.F.; ROWE, D.B.; HALLIDAY, G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Prog in Neurobiol**, v. 68, p. 325-340, 2002.

PADMA, V.V.; SOWMYA, P.; FELIX, T.A.; BASKARAN, R. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. **Food Chem Toxicol** v. 49 (4), p. 991-998, 2011.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v.24 (3), p. 525-529, 1986.

PIERIBATESTTI, J.C.; CONAN, J.Y.; GRONDIN, J.; VINCENT, E.J.; GUERERE M. Chemical study of Bourbon red berries.In: Anonymous Annales Des Falsifications De l'Expertise Chimique Et Toxicologique (pp 11-16). Sainte-Clotilde, France, 1981.

PICKLO, M.J.; AMARNATH, V.; MELNTYRE, J.O. et al. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. **J Neurochem**, v. 72, p. 1617-1624, 1999.

PIRES, O.C.; TAQUEMASA, A.V.C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C.E.P. Preliminary comparative analysis of the acute toxicity and median lethal dose of the fruit of the Brazilian black pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and black pepper (*Piper nigrum* L.). **Latin Am J Pharm** v. 23, p. 176-182, 2004.

POLLACK, A.E. Anatomy, physiology and pharmacology of the basal ganglia. **Neurol. Clin.**, v. 19, p. 523-534, 2001.

POLYMERPOULOS, M.H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, p. 2045-2047, 1997.

PRINGSHEIM T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T.D.L. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord** v.29, p. 1583-1590, 2014.

QUEIRES, L.C.S.; RODRIGUES, L.E.A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Braz Arch Biol Technol** v. 41, p. 247-253, 1998.

RENAUD, J.; NABAVI, S.F.; DAGLIA, M.; NABAVI, S.M.; MARTINOLI, M.G. Epigallocatechin-3-gallate, a promising molecule for Parkinson's disease? **Rejuvenation Res** v. 18, p. 257-269, 2015.

RENDEIRO, C.; RHODES, J.S.; SPENCER, J.P.E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: direct *versus* indirect effects. **Neurochem Int** v. 89: 126-139, 2015.

RIEDERER, P.; SOFIC, E.; RAUSCH, W.D. et al. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. **J. Neurochem.**, v. 52, p. 515-520, 1989.

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 induced by 3-nitropropionic acid. **J Neurochem** v. 88, p. 1220-1228, 2004.

SANDERS, H.L.; GREENAMYRE, J.T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radic Biol Med** v. 62, p. 111-120, 2013.

SANTIAGO, R.M.; BARBIERO, J.; LIMA, M.M.S.; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry** v. 34, 1104-1114, 2010.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agentes using etanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J Ethnopharmacol** v. 96, p. 563-568, 2005.

SENTHIL, K.V.; ARULMATHI, K.; SRIVIDHYA, R. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. **Exp Gerontol** v. 43, p. 143-183, 2008.

SHANG, F.; LU, M.; DUDEK, E. et al. Vitamin C and vitamin E restore thenresistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. **Free Radical Biol Med**, v. 34, p. 521-530, 2003.

SHARMA, N; NEHRU, B. Beneficial Effect of Vitamin E in Rotenone Induced Model of PD: Behavioural, Neurochemical and Biochemical Study. **Exp Neurobiol.** v. 22(3), p. 214–223, 2013.

SHERER, T.B.; BETARBET, R.; KIM, J.H.; GREENAMYRE, J.T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 341, p. 87-90, 2003.

SHI, Q.; COLODNER, K.J.; MATOUSEK, S.B.; MERRY, K.; HONG, S.; KENISON, J.E.; FROST, J.L.; LE, K.X.; LI, S.; DODART, J.C.; CALDARONE, B.J.; STEVENS, B.; LEMERE, C.A. Complement C3-deficient mice fail to display age-related hippocampal decline. **J Neurosci.** v. 35, p. 13029-13042, 2015.

SHINOMOL, G.K.; MURALIDHARA, A.T. Effect of Centella asiatica leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice in vivo and its in vitro efficacy to ameliorate 3-NPA-induced oxidative stress in mitochondria. **Phytomedicine** v. 15, p. 971-84, 2008.

SHULMAN, J.M.; DE JAGER, P.L.; FEANY, M.B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. **Annu Rev Pathol Mech Dis** v. 6; 193-222, 2011.

SIAN, J.; DEXTER, D.T.; LEES, A.J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann. Neurol.**, v. 36, p. 348-355, 1994.

SIES H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem** v. 215 (2): 213-219, 1993.

SINGH, R.P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. **J Ind Acad Clin Med**, v. 5 (3), 2004.

SOFIC, E.; LANGE, K.W.; JELLINGER, K. et al. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.**, v.142, p.128-130, 1992

SOLANKI, I.; PARIHAR, P.; MANSURI, M.L.; PARIHAR, M.S. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Adv Nutr** v. 6, p. 64-72, 2015.

SRIVIDHYA, R.; JYUTHILAKSHMI, V.; KALAISELVI, P.; KARPAGAVINAYAGAM, A.; et al. Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Int J Dev Neurosci** v. 26, p.217-223, 2008.

SRIVIDHYA, R.; ZARKOVIC, K.; STROSER, M.; WAEG, G.; et al. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate. **Int J Dev Neurosci** v. 27, p. 223-231, 2009.

STACK, C.; HO, D.; WILLE, E.; CALINGASAN, N.Y.; WILLIAMS, C.; LIBY, K. et al. Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Free Rad Bio Med** v. 49, p. 147–58, 2010.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in Pink Pepper. **Planta Medica** v. 48, p. 5-9, 1983.

STOKES, A.H.; HASTINGS, T.G.; VRANA, K.E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **J Neurosci Res**, v. 55, p. 659-665, 1999.

STREIT, W.J.S. Microglia and neuroprotection: implication for Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**, v. 48, p. 234-239, 2005.

SULZER, D.; ZECCA, L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. **Neurotox Res**, v. 1, p. 181-195, 2000.

SZYMONIK-LESIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECKA-ZIMMER, M.; SLOMKA, M.; MADRO, A.; CELIŃSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**. v. 10 (4): 309-315, 2003.

TALPADE, D.J.; GREENE, J.G.; HIGGINS, D.S.; GREENAMYRE, J.T. *In vivo* labelling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using (³H) dihydrorotenone. **J Neurochem** v. 75, p. 2611-2621, 2000.

TAN, L.C.S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Asia* v. 18, p. 231-238, 2013.

TANNER, C.M.; KAMEL, R.; ROSS, G.W.; HOPPIN, J.A.; GOLDMAN, S.M.; KOREL, M. Rotenone, paraquat and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect** v. 119: 866-72, 2011.

TAPIAS, V.; CANNON, J.R.; GREENAMYRE, J.T. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. **Neurobiol Aging** v. 35, p. 1162-76, 2014.

UNNO, K.; TAKABAYASHI, F.; KISHIDO, T.; OKU, N. Suppressive effect of green tea catechin on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). **Exp Gerontol** v. 39, p. 1027-1034, 2004.

VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74: 91-97, 2003.

VERMA, R.; NEHRU, B. Effect of centrophenoxine against rotenone-induced oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurochem Int** v. 55, p. 369-375, 2009.

VIRMANI, A.; PINTO, L.; BINIENDA, Z.; ALI, S. Food, nutrigenomics and neurodegeneration-neuroprotection by what you eat!!! **Mol Neurobiol** v. 48, p. 353-362, 2013.

VON WRANGEL, C.; SCHWABE, K.; NADINE, J.; KRAUSS, J.K.; ALAM, M. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioural and electrophysiological findings. **Behav Brain Res** v. 279, p. 52-61, 2015.

XIONG, N.; LONG, X.; XIONG, J.; JIA, M.; CHEN, C.; HUANG, J. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. **Critic Ver Toxicol** v. 42, p. 613-622, 2012.

WEINREB, O.; MANDEL, S.; AMIT, T.; YODIM, M.B. Neurological mechanisms of green tea catechin polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem** v. 15, p. 506-516, 2004.

ZAITONE, A.S.; ABO-ELMATTY, D.M.; SHAALAN, A.A. Acetyl-L-carnitine and α -lipoic acid effect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain: implication for Parkinson's disease therapy. **Pharmacol Biochem Behav** v. 100, p. 347-360, 2012.

ZHANG, J.; PERRY, G.; SMITH, M.A. et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. **Am J Pathol**, v.154, p. 1423-1429, 1999.



Brazilian Journal of Pharmacognosy

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

www.elsevier.com/locate/bjp



Original Article

Schinus terebinthifolius administration prevented behavioral and biochemical alterations in a rotenone model of Parkinson's disease



Adriana Sereniki^a, Cybelle F.B. Linard-Medeiros^a, Shirliane N. Silva^b, Juciene B.R. Silva^a,
Tadeu J.S. Peixoto Sobrinho^b, Juliano R. da Silva^a, Lariza D.S. Alves^a, Soraya S. Smaili^c,
Almir G. Wanderley^{a,b,*}, Simone S.L. Lafayette^{a,b}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2015

Accepted 30 November 2015

Available online 29 January 2016

Keywords:

Antioxidant effects

Lipid peroxidation

Parkinson's disease

Rotenone

Schinus terebinthifolius

ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by motor impairment, cognitive decline and psychiatric symptoms. *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, had been studied for its anti-inflammatory and antioxidant properties, and in this study, the stem bark was evaluated for the neuroprotective effects on behavioral and biochemical alterations induced by administrations of rotenone in rats. Behavioral evaluations were performed using open-field and rotarod. The *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities were determined by the DPPH radical scavenging activity and lipid peroxidation method respectively. The administration of rotenone (3 mg/kg, s.c.) produced hypolocomotion, increase of immobility and muscle incoordination, while the treatment with *S. terebinthifolius* stem bark extract (150, 300 and 600 mg/kg p.o.) for seven days prevented rotenone-induced dysfunctional behavior. Biochemical analysis of the substantia nigra, striatum and cortex revealed that rotenone administration significantly increased lipid peroxidation, which was inhibited by treatment with all doses of *S. terebinthifolius*. The results suggested neuroprotective effect of *S. terebinthifolius* possibly mediated through its antioxidant activity, indicating a potential therapeutic benefit of this species in the treatment of Parkinson's disease.

© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

The increase of elderly population has led to an increasing incidence of neurodegenerative diseases worldwide, leading, thus, to the interest in studies for prevention and treatment of these pathologies. Natural constituents derived from plants are important to investigate, since studies have shown that these compounds exhibited a range of biological activities, with therapeutic potential, for instance antioxidant and anti-inflammatory effects.

Parkinson's disease (PD) is one of the major neurodegenerative disorder in the entire world and is characterized by progressive degeneration of dopamine-containing neurons that project from substantia nigra pars compacta to the striatum. Besides, motor impairment (bradykinesia, rigidity, tremor at rest and disturbances in balance), cognitive decline and psychiatric symptoms (like depression) are the cardinal symptoms of the pathology (Dutta

and Mohanakumar, 2015; Fernandez, 2015). Main mechanisms have been proposed to explain the events culminating in neuronal death in PD, which are associated with oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation and environmental exposures, like pesticides, contributing for the appearance of behavioral and biochemical alterations (Dauer and Przedborski, 2003; Renaud et al., 2015). Several animal models have been used to mimic and elucidate the pathogenesis of PD, in special rotenone, MPTP and 6-hydroxydopamine (Dauer and Przedborski, 2003; Blesa et al., 2012).

Rotenone (*Derris* sp., Fabaceae) has been a potent hydrophobic pesticide and its environmental exposure mimics the clinical and pathological features of PD, such as behavioral, biochemical and pathological changes, providing a reproducible animal model for PD (Betarbet et al., 2000). It provoked neurodegeneration via multiple mechanisms, mainly by inhibition of complex I, increase of oxidative stress and induction of apoptosis (Zaitone et al., 2012; von Wrangel et al., 2015).

Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae, is a native plant of South America (Corrêa, 1974). In Brazil it is popularly called Aroeira

* Corresponding author.

E-mail: almir.wanderley@ufpe.br (A.G. Wanderley).

or Cabuá. In folk medicine, it has been used for the treatment of ulcers, respiratory problems, wounds and arthritis (Morton, 1978) and as an antiseptic, antiinflammatory and haemostatic (Medeiros et al., 2007). Many of its properties or healing effects attributed by folk medicine are associated to the presence of polyphenols in the plant, which give the plant its antioxidant properties (Medeiros et al., 2007; Abdou et al., 2015). The aim of this study was to investigate the possible neuroprotective effects of *S. terebinthifolius* in the behavior activity and on the oxidative stress induced by rotenone as experimental model of Parkinson's disease in rats.

Materials and methods

Plant material

Stem bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, were collected in the remains of the Atlantic rainforest located in the municipality of Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil between February and April 2013 (8°20'33" S and 34°56'59" W). A voucher specimen was authenticated in the Department of Botany of the Federal University of Pernambuco by the curator M. Barbosa and was deposited at Geraldo Mariz Herbarium under record n°. 8758. Extraction was performed by maceration and air dried, and 500 g of pulverized *S. terebinthifolius* bark was added to 1.0 l of ethanol 70% at room temperature, for 7 days, and was occasionally shaken. In the laboratory, the crude ethanolic extract was evaporated to dryness under reduced pressure for the total elimination of alcohol, followed by lyophilization, yielding approximately 35 g of dry residue. The lyophilized extract of *S. terebinthifolius* was kept at room temperature until use and suspended in distilled water.

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

The main phytochemical markers (gallic acid, ellagic acid, catechin and epicatechin) in *S. terebinthifolius* samples were analyzed by way by way of liquid chromatography–diode array detection (LC-DAD) analysis using a Shimadzu system (LC-20AT) equipped with a photo diode array detector (SPD-M20A). The chromatographic separation was performed using a Gemini RP-18 column 5 μ m particle size and 250 mm $\times$ 4.60 mm i.d. (Phenomenex), protected by a guard column of the same material. A gradient elution was performed by varying the proportion of Solvent A (0.5% acetic acid in distilled water, v/v) and solvent B (methanol) at a flow rate of 0.8 ml/min following gradient program: 20–40% B (10 min), 40–60% B (10 min), 60% B (10 min), 60–40% B (10 min), and 40–20% B (10 min). The dried extracts and standards were dissolved in methanol:water (20/80, v/v) and filtered through a membrane of 0.45 μ m (Millipore®, USA) prior to injection of 20 μ l. The peaks of each marking on dry substance were identified by comparing retention times and UV spectra of DAD.

Animals

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*), age 3 months and weighing between 250 and 300 g, were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal University of Pernambuco, Brazil. The animals were maintained in standard environmental conditions (22 $\pm$ 2 °C, 12:12 h dark/light cycle). Commercial food (Presence®, Purina, Brazil) and water were available *ad libitum*. All protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco, under license n°. 23076.050131/2013-82 in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Drugs

Butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), malondialdehyde (MDA), thiobarbituric acid (TBA), epinephrine, 1,1,3,3-tetrametoxipropene (TMP), Tween 80, DMSO and rotenone, were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Rotenone was dissolved in sunflower oil one day before beginning treatment. On subsequent days, solutions remained in the refrigerator (4 °C). Sunflower oil was obtained in local market.

Experimental groups

The animals were randomly divided into five experimental groups (n=10). Rats from Group 1 received water by gavage (1 ml/kg) and 1 h later a subcutaneous (s.c.) administration of the vehicle (90%, w/v sunflower oil, +10% w/v DMSO) for seven days. Group 2 also received water by gavage and rotenone (3 mg/kg, s.c.) diluted in vehicle after 1 h during seven days. Groups 3, 4 and 5 received by gavage 150, 300 or 600 mg/kg of *S. terebinthifolius*, respectively, suspended in water, and 1 h later were given them rotenone (3 mg/kg, s.c.) also during seven days. 24 h after the last day of treatment, the rats were evaluated with behavioral tests and biochemical assays (Linard-Medeiros et al., 2015).

Open field test

The open field test was carried out to Broadhurst (1957) and Bernardi and Palermo-Neto (1979). To quantify exploratory and general locomotor activity, each rat was placed into the center of an open-field arena (a circular wooden box with a diameter of 100 cm and 40 cm high, with floor divided into 19 regions). Rats were assessed individually for 5 min, while four parameters were analyzed: (i) latency to start the movement (time to leave the inner circle, in s), (ii) locomotion frequency (number of square crossed with four paws), (iii) rearing frequency (number of times the animal stood on their hind paws) and (iv) immobility time (lack of movement during testing, in s). The apparatus was cleaned with a 5% ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rat.

Rotarod activity test

In order to quantify motor deficiency, the rotarod test was used at a fixed speed, according to Monville et al. (2006). To perform this test, the animal was placed with all four paws on a bar with a diameter of 7 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 s each for habituation. Animals were placed on the rotating bar and the time spent on the rotating bar was recorded. A cut-off time of 180 s was maintained throughout the experiment. The average results were recorded as time of fall.

Biochemical analysis

After behavioral observations, animals were immediately anesthetized, euthanized by decapitation and their brains removed. Bilateral substantia nigra, striatum and cortex were dissected, weighed and homogenized in a Potter-Elvehjem type homogenizer with a tissue homogenate 1 $\times$ phosphate buffered saline (10% w/v, PBS) to which was added butylated hydroxytoluene (0.004% w/v, BHT) for preventing oxidation of the samples. The homogenate was centrifuged at 10,000 $\times$ g for 30 min at 4 °C and an aliquot of supernatant was separated for biochemical analysis. Each individual experiment was carried out in triplicate and repeated two or three times.

DPPH radical scavenging activity in vitro

Antioxidant radical scavenging activity was evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals (Brand-Williams et al., 1995). 1 ml of DPPH solution (30 mM, in 95% ethanol) was incubated with 2.5 ml of varying concentrations of *S. terebinthifolius* extract (2.5–250 µg/ml). The reaction mixture was shaken well and incubated for 30 min at room temperature, and the absorbance of the resulting solution was read at 515 nm against a blank. The radical scavenging activity was measured as an absorbance decrease of DPPH and was calculated using the following equation: $(\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of test}) \times 100 / \text{Absorbance of control}$. The synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) was included in experiments as a positive control. The EC₅₀ value for each sample (three replicates), was calculated from a calibration curve obtained for the percentage of radical scavenging activity versus concentration of the sample required to reduce the absorbance of the negative control (DPPH solution) by 50%. The BHT curve antioxidant was $y = 15.695 \ln(x) + 16.477$ ($R^2 = 0.9544$). The *S. terebinthifolius* extract curve was $y = 18.322 \ln(x) - 24.936$ ($R^2 = 0.9026$).

Measurement of lipid peroxidation in vivo

The quantitative measurement of lipid peroxidation in the substantia nigra, striatum and cortex was performed according to the method described by Buege and Aust (1978). The amount of malondialdehyde (MDA) of lipid peroxidation was measured by reaction with thiobarbituric acid. Briefly, aliquots (500 µl) of supernatant were placed in test tubes and added to 1 ml of TBA reagent: 0.38% (w/w) TBA, 250 ml of 1 N hydrochloric acid, 15% (w/w) of trichloroacetic acid and 20 ml of 2% (w/v) ethanolic BHT. The solution was shaken and heated to 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 to 3000 × *g* for 20 min. After centrifugation, the upper layer was collected and assessed with a spectrophotometer (CARY 3E UV–Visible Spectrophotometer Varian, Inc. Brazil) at 532 nm. Results of TBARS of substantia nigra, striatum and cortex were expressed as nmol MDA/mg protein using a standard curve generated with different concentrations of 1,1,3,3-tetramethoxypropane solution.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). The difference between groups was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Newman–Keuls test. The comparisons were carried out by GraphPad Prism® 5.0 and significant at $p \leq 0.05$.

Results

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

From the comparison of retention times with extract standards previously injected into the HPLC, it was possible to confirm that, *S. terebinthifolius* sample demonstrated the presence of phenolic acids (gallic acid, 4.66 min; ellagic acid, 7.51 min) and also flavonoids (catechin, 10.24 min; epicatechin 19.05 min) (Fig. 1).

Effects of *S. terebinthifolius* on behavioral tests

Rotenone administration (3 mg/kg, s.c.) during 7 days significantly reduced the frequencies of locomotion and rearing and increased the time of immobility and latency to start the movement in the open field test. Pre-treatment with the stem bark

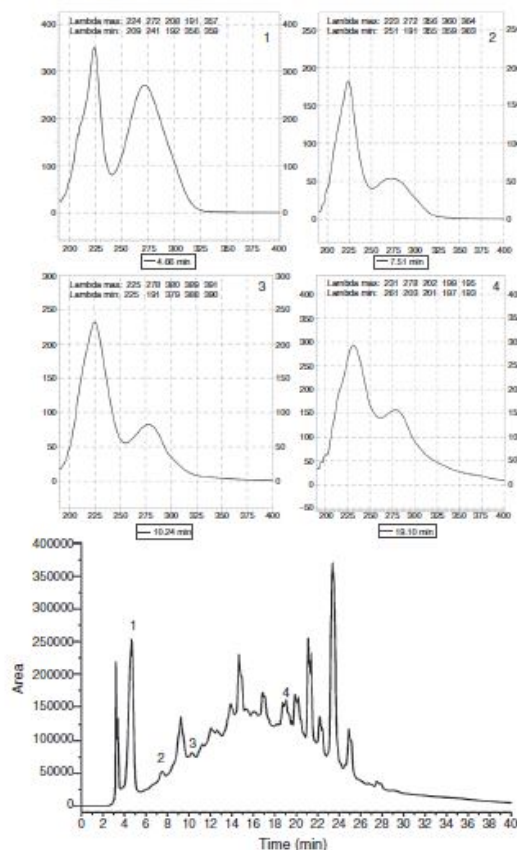


Fig. 1. Chromatogram of *Schinus terebinthifolius* stem bark detected at 278 nm. Peaks: gallic acid (Rt=4.66), catechin (7.51), epicatechin (10.24) and ellagic acid (Rt= 19.05) obtained by HPLC method.

(150, 300 and 600 mg/kg) significantly improved locomotor activity and rearing and decreased the time of immobility and latency to start the movement when compared to rotenone animals. However, the lower dose of the extract (150 mg/kg) was unable to prevent the rotenone-induced locomotor deficits in the open field test (Fig. 2a–d).

On rotarod test, rotenone administration (3 mg/kg, s.c.) induced a significant decrease in the time of permanency of the animals compared with control rats during the observation in the apparatus. Daily pre-treatment of 300 and 600 mg/kg doses was able to increase the time of permanency to rotenone group. However, the lower dose of the extract was unable to prevent the rotenone-induced locomotor deficits in the open field test (Fig. 3).

Reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in vitro

Significant DPPH radical scavenging activity was evident in all concentrations tested of *S. terebinthifolius* stem bark (1–250 µg/ml). The extract was able to reduce the stable free radical DPPH to the yellow-colored 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl with an EC₅₀ 12.176 ± 0.077 µg/ml. Under similar conditions, the

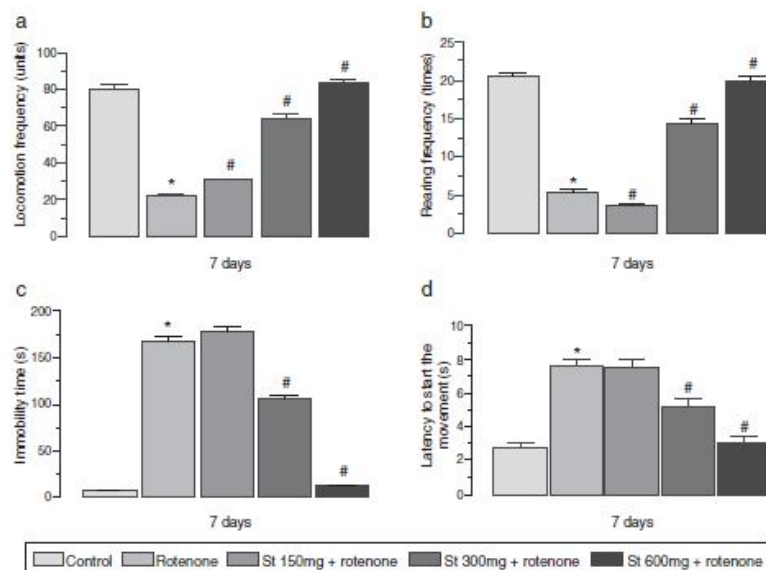


Fig. 2. Effect of *Schinus terebinthifolius* (St, 150, 300 and 600 mg/kg, p.o.) on open field test in rats before rotenone (3 mg/kg, s.c.) administration. (a) Total ambulatory activity, (b) rearing frequency, (c) immobility time and (d) latency to start de movement. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 10$ /group). One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (* $p \leq 0.05$ vs. control group and # $p \leq 0.05$ vs. rotenone group).

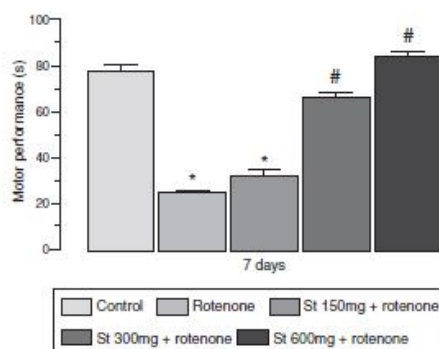


Fig. 3. Effect of *Schinus terebinthifolius* (St, 150, 300 and 600 mg/kg, p.o.) on rotarod test in rats before rotenone (3 mg/kg, s.c.) administration. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 10$ /group). One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (* $p \leq 0.05$ vs. control group and # $p \leq 0.05$ vs. rotenone group).

synthetic antioxidant BHT showed EC_{50} 25.768 ± 0.147 μ g/ml. This activity was about 2.1 times smaller when compared to *S. terebinthifolius*.

Measurement of lipid peroxidation in vivo (TBARS)

Rotenone administration (3 mg/kg) during 7 days provoked an increase on oxidative stress as indicated by the significant increase of MDA concentrations in substantia nigra, striatum and cortex when compared to control group. However, the pre-treatment with all doses of *S. terebinthifolius* was able to inhibit the lipid peroxidation in comparison to rotenone animals (Fig. 4a–c).

Discussion

This report showed the neuroprotective effect of *S. terebinthifolius* in Parkinson's disease using the model of rotenone subcutaneous administration during 7 days. All doses of *S. terebinthifolius* (150, 300 and 600 mg/kg) significantly prevented motor deficits in the open field and rotarod tests, and mainly, was able to inhibit the oxidative stress induced by systemic rotenone administration observed in *in vivo* TBARS method. It was also demonstrated the *in vitro* antioxidant effect of *S. terebinthifolius*, as well its mainly compounds in HPLC method. The antioxidant activity of the extract was also measured in the DPPH radical assay, which primarily evaluates proton radical-scavenging ability.

Rotenone is a potent inhibitor of complex I (NADH: ubiquinoneoxidoreductase) of the mitochondrial electron transport chain. In rats, this toxin causes a syndrome that replicates both neuropathological findings and behavioral symptoms of Parkinson's disease. Application of low doses of rotenone *in vitro* and *in vivo* have been shown to affect many of the mechanisms involved in the pathogenesis of Parkinson's disease, such as altered calcium signaling, induction of oxidative stress and apoptosis, loss of tyrosine hydroxylase, proteasomal dysfunction, nigral iron accumulation and the formation of fibrillar cytoplasmic inclusions that contain ubiquitin and α -synuclein (von Wrangel et al., 2015). Sherer et al. (2003) also showed that the exposure to low doses of rotenone (2–3 mg/kg/day) caused highly selective nigrostriatal dopaminergic lesion. A common feature of all toxin-induced models of Parkinson's disease is their ability to produce an oxidative stress and to cause cell death in dopamine neuronal populations that reflect what is seen in Parkinson's disease (Blesa et al., 2012). Markers of oxidative stress are typically found in brain biopsies, peripheral cells, and biological fluids derived from patients with Parkinson's disease, indicating that indeed oxidative stress is a key factor in pathogenesis. Malondialdehyde (MDA) is a specific marker of lipid peroxidation, which is

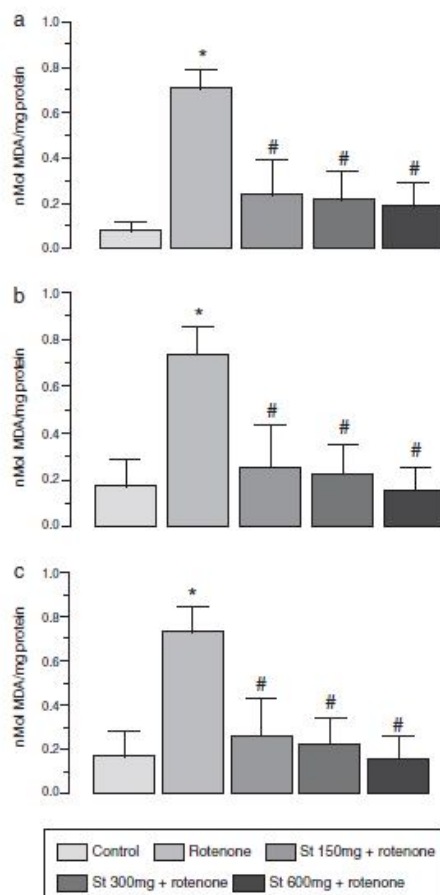


Fig. 4. Effect of *Schinus terebinthifolius* (St, 150, 300 and 600 mg/kg, p.o.) on lipid peroxidation levels in rats before rotenone (3 mg/kg, s.c.) administration. (a) Substantia nigra, (b) striatum and (c) cortex of brain rats. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 10$ /group). One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (* $p \leq 0.05$ vs. control group and # $p \leq 0.05$ vs. rotenone group).

largely a result of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids with more than two double bonds (Sanders and Greenamyre, 2013).

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. In this way, there was an increase in brain MDA levels (an indicator of lipid peroxidation due to free radicals) which was inhibited by the administration of stem bark of all doses of *S. terebinthifolius*, suggesting its antioxidant action. Indeed, recently Costa et al. (2015) shown that extract from different tissues of *S. terebinthifolius* present antioxidant activity by DPPH radical assay. Abdou et al. (2015) investigated the curative and protective effects of *S. terebinthifolius* ethanolic extract (350 mg/kg, p.o.) against CCl₄-induced acute hepatotoxicity in rats and shown that the administration significantly reinstated the antioxidant capacity. Oxidative stress due to an increase in free radical generation or an impaired endogenous antioxidant mechanism is an

important factor that had been implicated in various neurodegenerative diseases (Sanders and Greenamyre, 2013; Solanki et al., 2015).

The brain is highly susceptible to free radical damage because of its high utilization of oxygen and the presence of a relatively low concentration of antioxidant enzymes and free radical scavengers. There is a growing interest in establishing therapeutic and dietary strategies to combat oxidative stress induced damage to the central nervous system (Gao et al., 2012; Virmani et al., 2013). Studies in humans and animals have suggested that flavonoids, a large group of polyphenolic compounds found in fruits and vegetables are capable of counteracting neuronal injury, thereby delaying the progression of neurodegenerative diseases, motivating researches efforts to identify the mechanisms of neuronal death as well to discover new compounds to control them (Dutta and Mohanakumar, 2015; Chen et al., 2015; Solanki et al., 2015; Renaud et al., 2015).

The major compounds of stem bark of *S. terebinthifolius* Raddi are flavonoids (catechin and epicatechin) and phenolics acids (gallic acid and ellagic acid). Catechins are powerful antioxidants and free radical scavengers *in vitro* assays and *in vivo* models (Srividhya et al., 2009; Solanki et al., 2015). It has been found that catechins have much higher antioxidant activity in comparison to vitamins C and E *in vitro*. The chemical structures have been contributed to this effect to chelate metal ions, prevent the generation of free radicals, allow the displacement of electrons and provide high reactivity to eliminate the free radicals (Mandel et al., 2006; Khan and Mukhtar, 2007; Senthil, 2008). Furthermore, the catechins and epicatechins were also able to indirectly modulate expression of some protective enzymes antioxidants (Hidgon and Frei, 2003; Weinreb et al., 2004). The chronic treatment with catechins prevented the decline in the activity of SOD and GSH enzymes in the serum of old mice, preventing also significantly increased TBARS in the hippocampus of these animals (Abd El Mohsen et al., 2002; Mandel et al., 2006). Otherwise, gallic acid and ellagic acid are hydrolyzed tannins of natural products found in abundance in grapes, tea, fruit and wine (Singh et al., 2004). These acids were able to reduce the production of ROS and superoxide, such as hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and hypochlorous acid; also due to their antimutagenic and anticarcinogenic activities (Kim, 2007). In the cognitive impairment induced by another animal model of Parkinson's disease in animals, 6-OHDA, the treatment with gallic acid significantly reduced the level of TBARS in the rat brains (Kim, 2007).

In conclusion, the results of this study confirm that the subcutaneous administration of rotenone in rats induces neurobehavioral and biochemical changes mimicking those observed in Parkinson's disease. Treatment of rats with *S. terebinthifolius* produced significant neuroprotection probably mediated through its antioxidant activity. Taken together, our data suggested neuroprotective effects of *S. terebinthifolius* Raddi, 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 for Parkinson's disease and other neurodegenerative pathologies.

Author's contributions

AS, SNS, and JRS contributed in running the laboratory work, analysis of the data and drafted the paper. TJSPS and LDSA contributed in the chemicals analysis. CFBLM and JBRS contributed in the biochemical analysis. SSS, SSLL and AGW designed the study, supervised the laboratory work and contributed to the critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES for financial support. The authors also would like to dedicate this paper to Simone Sette Lopes Lafayette.

References

- Abd El Mohsen, M.M., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., Rice-Evans, C.A., 2002. Uptake and metabolism of epigallocatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1693–1702.
- Abdou, R.H., Saleh, S.Y., Khalil, W.F., 2015. Toxicological and biochemical studies on *Schinus terebinthifolius* concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Pharmacogn. Mag.* 11, S93–S101.
- Bernardi, M.M., Palermo-Neto, J., 1979. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. *Psychopharmacology* 65, 247–250.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., Mackenzie, G., Garcia-Osuma, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (ID), 845618.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 28, 25–30.
- Broadhurst, P.L., 1957. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. *Br. J. Psychol.* 48, 1–12.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Chen, M., Wang, T., Yue, F., Li, X., Wang, P., Li, Y., Chan, P., Yu, S., 2015. Tea polyphenols alleviate motor impairments, dopaminergic neuronal injury, and cerebral α -synuclein aggregation in MPTP-intoxicated Parkinsonian monkeys. *Neuroscience* 286, 383–392.
- Corrêa, M.P., 1974. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas, vol. 3. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 125–126.
- Costa, C.O.D'S., Ribeiro, P.R., Loureiro, M.B., Simões, R.C., Castro, R.D., Fernandez, L.G., 2015. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Phcog. Mag.* 11, 607–614.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- Dutta, D., Mohanakumar, K.P., 2015. Tea and Parkinson's disease: constituents of tea synergize with antiparkinsonian drugs to provide better therapeutic benefits. *Neurochem. Int.* 89, 181–190.
- Fernandez, H.H., 2015. Update on Parkinson disease. *Clev. Clin. J. Med.* 82, 563–568.
- Gao, X.I., Cassidy, A., Schwarzschild, M.A., Rimm, E.B., Ascherio, A., 2012. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 78, 1138–1145.
- Hidgion, J.V., Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 89–143.
- Khan, N., Mukhtar, H., 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 81, 519–533.
- Kim, Y.J., 2007. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1052–1055.
- Linard-Medeiros, C.F.B., Sales, V.A.W., Ramos, A.C., Sereniki, A., Trevisan, M.T.S., Wanderley, A.G., Lafayette, S.S., 2015. Neuroprotective effect of extract of *Anacardium occidentale* Linn on a rotenone model of Parkinson's disease. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6, 123–129.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., Youdim, M.B., 2006. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 229–234.
- Medeiros, K.C.P., Monteiro, J.C., Diniz, M.F.F.M., Medeiros, I.A., Silva, B.A., Piuvezam, M.R., 2007. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models. *Rev. Bras. Farmacogn.* 7, 23–28.
- 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. *J. Neurosci. Methods* 158, 219–223.
- Morton, J.F., 1978. Brazilian pepper: its impact on people, animals and the environment. *Econ. Bot.* 32, 353–359.
- Renard, J., Nabavi, S.F., Daglia, M., Nabavi, S.M., Martinoli, M.G., 2015. Epigallocatechin-3-gallate, a promising molecule for Parkinson's disease? *Rejuvenation Res.* 18, 257–269.
- Sanders, L.H., Greenamyre, J.T., 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 111–120.
- Senthil, K., 2008. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. *Exp. Gerontol.* 43, 143–183.
- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2003. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp. Neurol.* 179, 9–16.
- Singh, R.P., Sharad, S., Kapur, S., 2004. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J. Indian Acad. Clin. Med.* 5, 218–225.
- Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M.L., Parihar, M.S., 2015. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Adv. Nutr.* 6, 64–72.
- Srividhya, R., Zarkovic, K., Stroser, M., Waeg, G., Zarkovic, N., Kalaiselvi, P., 2009. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (–)-epigallocatechin gallate. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 223–231.
- Virmani, A., Pinto, L., Binienda, Z., Ali, S., 2013. Food, nutrigenomics, and neurodegeneration-neuroprotection by what you eat! *Mol. Neurobiol.* 48, 353–362.
- von Wrangel, C., Schwabe, K., John, N., Krauss, J.K., Alam, M., 2015. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings. *Behav. Brain Res.* 279, 52–61.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., Youdim, M.B., 2004. Neurological mechanisms of green tea catechin polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Nutr. Biochem.* 15, 506–516.
- Zaitone, S.A., Abo-Elmatty, D.M., Shaalan, A.A., 2012. Acetyl-L-carnitine and α -lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain; implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 347–360.



Received on 20 May, 2014; received in revised form, 13 July, 2014; accepted, 11 November, 2014; published 01 January, 2015

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

Cybelle Facanha Barreto Linard-Medeiros¹, Victor de Albuquerque Wanderley Sales¹, Adriano Costa Ramos¹, Adriana Sereniki¹, Maria Teresa Salles Trevisan², Almir Gonçalves Wanderley^{1,3} and Simone Sette Lopes Lafayette^{*1,3}

Department of Pharmaceutical Sciences¹, Department of Physiology and Pharmacology³, 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 Ceara, Campus do Pici, bloco 940 Bairro Pici CEP 60451-970, Fortaleza, CE, Brazil.

Keywords:

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

Correspondence to Author:

Simone Sette Lopes Lafayette

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

E-mail: simonesette@terra.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, molluscicides and antidiabetogenic activity. Behavior evaluations were performed using the models of open-field, rotarod, 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.

QUICK RESPONSE CODE	DOI:
	10.13040/IJPSR.0975-8232.6(1).123-29
	Article can be accessed online on: www.ijpsr.com
DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(1).123-29	

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,

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^o. 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 Broinizi 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 Solsulski¹¹ 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 hydroalcoholic 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/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:

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

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/w), 250 mL of 1N chloridric acid (HCl), 15% TCA (w/w) 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)

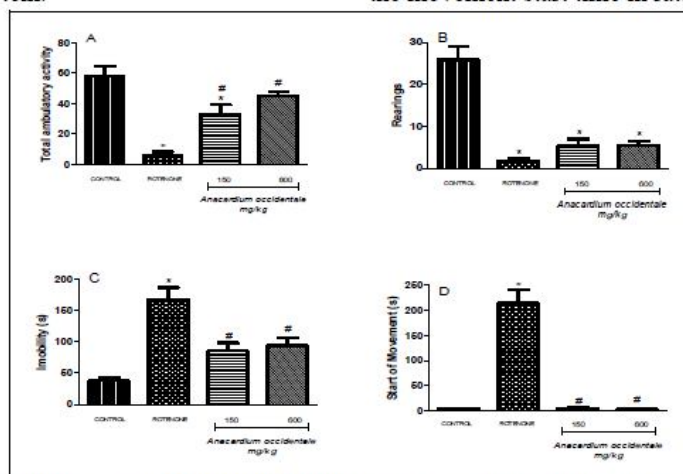


FIGURE 1: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on locomotor activity in the open field test of rats. (A) Total ambulatory activity, (B) rearings, (C) duration of immobility and (D) start movement. Rotenone (3 mg/kg, s.c). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per 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 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).

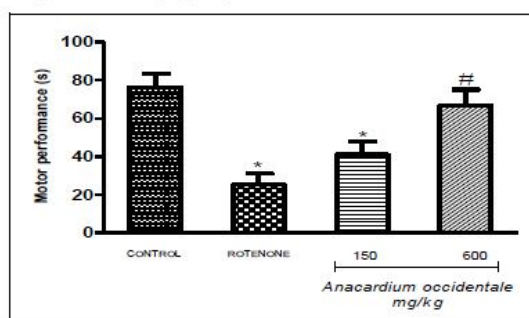


FIGURE 2: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) in the rotarod test in rats. Rotenone (3 mg/kg, s.c). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control # Statistically significant compared to rotenone (One-way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

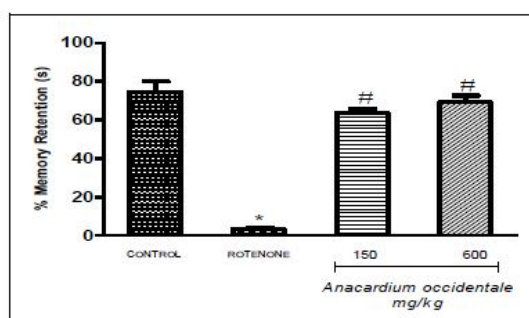


FIGURE 3: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on memory performance in the elevated T-maze test in rats. Rotenone (3 mg/kg, s.c). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control # Statistically significant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

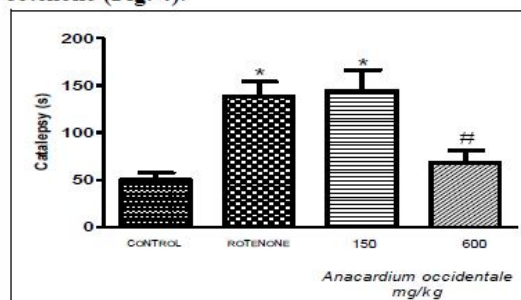


FIGURE 4: Effect of *Anacardium occidentale* (AO 150 and 600 mg/kg, p.o.) on akinesia test, in rats. rotenone (3 mg/kg, s.c). Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$ * Statistically significant compared to control. # Statistically significant compared to rotenone (One-way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

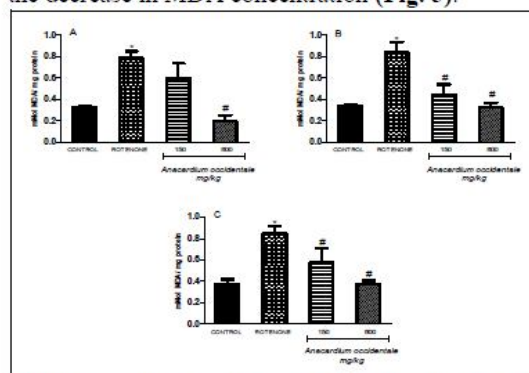


FIGURE 5: Lipid peroxidation levels (A) *substantia nigra* (B) cortex (C) striatum rats. Each bar represents the group mean $\pm$ SEM (n=8 per group). $p < 0.05$. * Statistically significant compared to control # Statistically significant compared to rotenone (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

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^{10,19} 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 rotarod, 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 bonds¹⁸. 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. Broinizi PRB, Andrade-Wartha ERS, Silva AMO, Novoa AJV, Torres RP, Azeredo HMC, Alves RE, Mancini-Filho J: Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do