EFEITOS DO EXTRATO DE JAMELÃO (*Syzygium cumini*) SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE RATOS INDUZIDOS COM 6-HIDROXIDOPAMINA

Luís Paulo dos Santos Ribas[1], João Gabriel Carvalho Rocha[1], Raquel de Moura[1], Jean Carlos Costa Nogueira [1], Simone Pinton[1], Cristiane Casagrande Denardin[1].

[1]Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Brasil
(luisribas.aluno@unipampa.edu.br)

Resumo: A Doença de Parkinson (DP) promove sintomas motores e não motores, como depressão. Este estudo avaliou o efeito do extrato de jamelão (*Syzygium cumini*) em ratos induzidos com 6-OHDA. O extrato (500 e 750 µg EAG/kg) melhorou significativamente os parâmetros motores (Rotarod e teste do cilindro). Na dose de 500 µg EAG/kg, também atenuou o comportamento do tipo depressivo no teste Splash, efeito não observado com levodopa. Conclui-se que o jamelão apresenta potencial adjuvante no tratamento da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Motricidade, Depressão.

INTRODUÇÃO

A DP é uma doença crônica e progressiva que atinge aproximadamente 1,1% da população do mundo, afetando principalmente pessoas com mais de 60 anos. A DP é caracterizada como um distúrbio do sistema motor com quatro sintomas principais que incluem: bradicinesia, rigidez muscular nos membros e tronco, instabilidade postural com prejuízo do equilíbrio e coordenação e tremor de repouso (Ferrazzoli et al., 2020). Já as principais manifestações não-motoras incluem: distúrbios do humor e do sono, disfunção cognitiva, depressão, ansiedade e dor (Dhingra et al., 2021).

A DP está diretamente relacionada à perda de neurônios dopaminérgicos na região nigro estriatal dos núcleos da base. Essa degeneração acarreta numa disfunção no lobo frontal responsável pelo controle motor e movimentos voluntários. Portanto, por ser uma doença que afeta diretamente a motricidade do indivíduo existem critérios de diagnóstico como as três manifestações motoras cardinais que incluem a bradicinesia, o tremor de repouso e a rigidez muscular (Saavedra Moreno; Millán; Buriticá Henao, 2019). Atualmente uma das principais explicações para essa falha na conexão entre os sistemas motores é a agregação de α-sinucleína em corpos de Lewy e o processo de estresse oxidativo em regiões encefálicas cruciais ao movimento.

Tal processo fisiopatológico, com perda de massa neuronal e comprometimento de vias motoras, resulta na clínica motora usual, além de outros sintomas cognitivos e emocionais. Mais especificamente, pacientes com DP tendem a apresentar quadros relacionados a condições como ansiedade, depressão e perda cognitiva (Barone et al., 2009).

Em relação à fisiopatologia, muito se conhece sobre as alterações histopatológicas encontradas em indivíduos com DP, porém pouco se sabe sobre os mecanismos desencadeadores da condição. Em determinados estudos, preconiza-se que a alta demanda energética de neurônios dopaminérgicos e serotonérgicos os torna mais sensíveis a processos oxidativos e, portanto, à formação de espécies oxidativas reativas (ROS), o que, uma vez que haja disfunção da metabolização e manejo dessas, leva a um processo inflamatório e de dano tecidual, culminando na neurodegeneração característica da doença (Guo et al., 2018).

Apesar desse paradigma, porém, a terapêutica atual ainda perpassa somente no aporte das vias neuronais afetadas e atenuação dos sintomas, sendo o medicamento mais preconizado para isso sendo a monoterapia com Levodopa (Pringsheim et al., 2021). Esse tratamento, mesmo que efetivo em muitos casos, além de apresentar determinada taxa de rejeição, possui efeitos colaterais neuropáticos e metabólicos importantes (Ceravolo et al., 2013), o que pode dissuadir ou impossibilitar seu uso. Além disso, os efeitos deste medicamento em sintomas não-motores não é presente ou relatado na maioria dos pacientes que realizam seu uso (Armstrong; Okun, 2020).

Dado o exposto, diversas alternativas que tivessem tanto mecanismos de mitigação dessa fisiopatologia da doença, quanto maior aceitação e benefícios em sintomas não-motores e motores. Nesse contexto, o Jamelão, proveniente da planta *Syzygium Cumini*, é uma fruta roxa que se destaca por seu alto teor de

polifenóis, como antocianinas, que possuem capacidade antioxidante em organismos (Do Nascimento-Silva; Bastos; Da Silva, 2022). Essa está presente em diversas regiões do Brasil e possui diversas aplicações farmacológicas já conhecidas e determinados potenciais anti-inflamatórios e neuroprotetores (Sagrawat; Mann; Kharya, 2006).

Assim, o presente trabalho tem como avaliar a capacidade de um extrato de Jamelão na atenuação de sintomas motores e não-motores em um modelo de estudo de Doença de Parkinson em ratos induzidos com de 6-hidroxidopamina.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e confecção do extrato de Jamelão (*Syzygium Cumini)*

Os frutos do Jamelão foram obtidos na cidade de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, no dia 28 de fevereiro de 2019. Estes frutos foram lavados com água corrente e congelados na temperatura de -18°C. Para a confecção do extrato etanólicos, os frutos, após descongelamento, foram submetidos, com casca e polpa, a trituração. Posteriormente foram homogeneizados com 100g de polpa e 300ml de álcool etílico absoluto (99,5%) em recipiente protegido da luz, usando um misturado ultra-turrax por 5 minutos e depois colocado em agitador magnético por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado após centrifugação por 5 minutos a 3000rpm e foi submetido a nova extração, similar ao primeiro procedimento, recuperando-se depois o evaporado em um evaporador rotativo usando temperaturas entre 40 e 45°C a vácuo.

Animais experimentais

No experimento foram utilizados 50 ratos Wistar machos com 90 dias de idade, obtidos do biotério da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) da cidade de Uruguaiana, RS. Estes animais foram ambientados ao local durante 5 dias, mantidos em regime de dieta peletizada padrão para ratos (Presence®) e água *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12 horas. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa (CEUA-UNIPAMPA), com número de protocolo 018/2023.

Cirurgia estereotáxica para a indução da Doença de Parkinson com 6-hidroxidopamina

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para indução de modelo de DP. Dessa forma, os animais foram submetidos a anestesia com Cloridrato de Cetamina (75 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal. A cirurgia foi realizada em todos os animais, com infusão intraestriatal unilateral, seguindo coordenadas estabelecidas por (Paxinos; Watson, 1986), sendo essas: 1mm anterior, 3mm lateral e -5mm ventral em relação ao bregma, com doses estabelecidas pelo mesmo protocolo. Assim, o grupo 1 (controle) recebeu apenas injeção de salina (3 µL), enquanto todos os outros grupos receberam indução por injeção de 6-OHDA (20 µg / 3 µL), em solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico. A injeção foi feita por meio de uma seringa Hamilton de 10 µL, sendo a agulha deixada no local de indução por 5 minutos. Os animais posteriormente receberam Cloridrato de Tramadol (20 mg/kg) para analgesia e foram observados diariamente após as cirurgias (Sampaio et al., 2017).

Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

I. Controle (n=10): grupo controle sem indução, administração oral de salina;

II. 6-OHDA (n=10): grupo induzido com DP, administração oral de salina;

III. 6-OHDA + EXT 500µg EAG/kg (n=9): grupo induzido com DP, administração oral de extrato de Jamelão (dose de 500µg EAG/kg);

IV. 6-OHDA + EXT 750µg EAG/kg (n=10): grupo induzido com DP, administração oral de extrato de Jamelão (dose de 750µg EAG/kg);

V. 6-OHDA + LEVODOPA (n=9): grupo induzido com DP, administração oral de Levodopa (6 mg/kg) como controle positivo.

Após 3 dias do pós-operatório, iniciou-se tratamento por gavagem em um período de 30 dias, em que os grupos I e II receberam solução de salina, enquanto os grupos III e IV receberam administração de extrato de Jamelão (em doses de 500 e 750 µg EAG/kg, respectivamente) e o grupo V recebeu Levodopa, na dose de 6 mg/kg (Kosaraju et al., 2014), sendo este o controle positivo.

Após o período de tratamento do protocolo e do testes comportamentais realizados, no dia 31 do delineamento, após jejum de 8 horas, os animais foram pesados e anestesiados com 100mg/kg de Cetamina e 10 mg/kg de Xilazina via intraperitoneal. Com os animais anestesiados, foi realizada eutanásia desses por punção cardíaca.

Testes comportamentais

Teste de Rotarod

O teste de Rotarod tem como principal abordagem a caracterização fenotípica motora em modelos de animais (Brooks; Dunnett, 2009). O teste foi realizado

no dia 28 do protocolo. Nesse, foi avaliado o número total de quedas durante o período de teste. O teste foi realizado em 3 tentativas e houve um período de 120 segundos de adaptação, antes da aplicação do teste, e mais 180 segundos para a realização do teste em si (Srivastava et al., 2013).

Teste do Cilindro

O Teste do Cilindro foi realizado no dia 29 do protocolo e teve como objetivo avaliar a assimetria no uso do membro anterior na atividade exploratória vertical (‘Rearing’). O procedimento consiste em colocar os animais em um cilindro transparente (de dimensões de 30cm de altura e 18cm de diâmetro) e o número de contatos de cada membro superior independente do outro (usos dos membros ipsilaterais versus contralaterais), bem como o número de contatos por ambas as patas, simultaneamente ou em alternância rápida (“ambos os usos”) foram registrados por 2 minutos. Os resultados são expressos em um índice de assimetria de membros (Sampaio et al., 2017).

Teste Splash

O teste Splash foi empregado para avaliação de comportamento do tipo depressivo, buscando avaliar parâmetros não-motores da DP. Nesse, são gotejadas poucas gotas (aproximadamente 200 µL) de uma solução de sacarose a 10%, que, por conta de sua viscosidade, estimula o rato ao comportamento de *grooming*, sendo esse avaliado por 5 minutos. Assim, busca-se observar a quantidade e tempo de duração de *groomings* realizados pelos ratos, de modo que, quanto maior estes valores, mais responsivo o rato se encontra, o que indicaria comportamento menos depressivo e de mais autocuidado. O teste foi realizado no dia 26 do protocolo (ref 11).

Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad Prism 8 para a realização das análises. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, quando apresentado comportamento normal foram submetidos a ANOVA de uma via pós teste de Tukey com nível de significância $p<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Equilíbrio e coordenação: Teste Rotarod

O número total de quedas da barra giratória do aparelho durante o período de teste foi quantificado. Assim, percebe-se que todos os grupos que receberam a indução da DP por 6-OHDA apresentaram número de quedas maior que os animais do grupo controle ($p<0,0001$) (Figura 1 ROTAROD). Entretanto, há também diferença entre o grupo de indução (6-OHDA), com os demais grupos tratados (6-OHDA + EXT 500µg EAG/kg, 6-OHDA + EXT 750µg EAG/kg e 6-OHDA + Levodopa), sendo que todos esses grupos apresentaram diminuição significativa ($p<0,0001$) no número de quedas em comparação ao grupo 6-OHDA, não apresentando diferença significativa com o grupo controle.

O teste fornece uma avaliação da coordenação motora e equilíbrio dinâmico dos ratos. A maioria dos modelos animais utilizados para o estudo da DP representam uma fase mais avançada da doença, em que a degeneração já é capaz de promover efeitos motores graves (Bové; Peried, 2012). As estruturas de ajuste do movimento voluntário como os gânglios da base e cerebelo estão substancialmente envolvidas na coordenação motora e realizam diversas sinapses que passam pelos núcleos pontinos e tálamo para o córtex pré-frontal (Debenedictis et al., 2022). Tal fato é notório ao se considerar que em estágios mais avançados da DP, a conexão entre cerebelo e gânglios da base é muito diminuída (Kawabata et al., 2020), promovendo descompensação e incoordenação entre estes centros de movimento, indicando que o modelo de indução é prejudicial às vias dopaminérgicas (Kolasiewicz et al., 2012). Contudo, os resultados com o extrato de jamelão, rico em antocianinas, são condizentes com a literatura no que concerne a atuação desses compostos no SNC, aliviando condições neurodegenerativas e atenuando parâmetros antiapoptóticos e oxidantes (Roghani et al., 2010).

Assimetria: Teste Cilindro

O teste do cilindro é muito utilizado de maneira confirmatória em modelos de indução de DP para avaliação da presença de assimetria motora dos ratos. Animais com déficit de dopamina nos neurônios nigroestriatais demonstram uma preferência por realizar o movimento de “rearing” com membro anterior ipsilateral ao lado lesionado no encéfalo, dado que os efeitos motores de indução unilateral com 6-OHDA são mais evidentes no lado contralateral à lesão (Woodlee et al., 2005).

Assim, no dia 29 (figura 1 CYLINDER TEST) o teste foi realizado, constatando-se que o grupo 6-OHDA apresentou percentual de assimetria significativamente maior ($p<0,001$) que o grupo controle, porém, os animais dos grupos tratados (6-OHDA + EXT 500µg EAG/kg, 6-OHDA + 750µg EAG/kg e 6-OHDA + Levodopa), apresentaram percentual de assimetria significativamente diminuído ($p<0,05$) em relação ao grupo 6-OHDA, e nenhuma diferença significativa em relação ao controle, confirmando a capacidade benéfica do extrato de jamelão sobre os parâmetros de assimetria em ratos.

O teste do cilindro é considerado uma medida sensível da extensão da perda unilateral do neurotransmissor dopamina após a lesão com 6-OHDA (Dahl, 2017). Essa assimetria observada nos resultados é ocasionada pelos grandes níveis de depleção de dopamina na substância negra, sendo que o extrato de jamelão foi capaz de atenuar significativamente esses efeitos motores finos e assimétricos em ambas as doses testadas, resultado que também foi observado no grupo tratado com levodopa. Os mecanismos que levaram a neuromodulação desses sintomas pelo extrato de jamelão não são totalmente elucidados, devido ao nosso estudo ser o primeiro a associar esse tratamento a este teste comportamental. É possível supor que esse efeito está diretamente ligado à capacidade dos compostos bioativos presentes no extrato modularem vias dopaminérgicas de regiões encefálicas diretamente relacionadas ao trato córtico-espinhal, permitindo a melhora da assimetria nestes animais.

Comportamento depressivo: Splash Test

No teste Splash, os resultados expressos pelo tempo que o roedor realiza o grooming (indicativo de autocuidado) mostraram que o grupo 6-OHDA apresentou tempo significativamente menor ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle. Contudo, o grupo 6-OHDA + EXT 500 µg EAG/kg apresentou tempo significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo 6-OHDA, demonstrando atenuação do comportamento do tipo ansioso nesses animais (Figura 1 - SPLASH TEST).

É sabido que a neurodegeneração na DP ocasiona diversos sintomas não motores, que incluem depressão e ansiedade. Os tratamentos atuais para DP visam principalmente aliviar os conhecidos sintomas motores, compensando a falta de dopamina na região nigroestriatal, porém não são eficientes no tratamento dos sintomas não motores, os quais podem ser ocasionados tanto pela progressão da doença quanto pelo uso prolongado e pelos efeitos colaterais dos fármacos prescritos (Yeni et al., 2024).

Em nosso estudo, o extrato de jamelão demonstrou efeito atenuante sobre sintomas do tipo depressivos nos animais induzidos com 6-OHDA, sendo que esse efeito não foi observado no grupo tratado com levodopa. Esses achados corroboram a necessidade de novos tratamentos adjuvantes para a DP que modulem sintomas do tipo depressivo. Curiosamente, a dose de 750 µg EAG/kg do extrato não atenuou esse parâmetro especificamente, sugerindo que, embora a dose mais elevada possa ser mais eficiente sobre as vias motoras, ela não se mostrou igualmente eficiente sobre as vias neurais relacionadas à depressão.

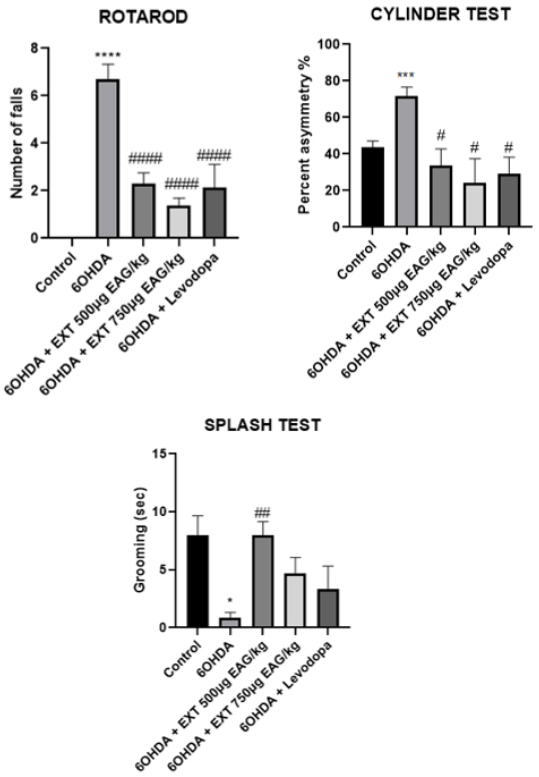


Figura 1. **ROTAROD:** Quantificação do número de quedas no teste rotarod dos animais induzidos com 6-OHDA e tratados com extrato de jamelão. **CYLINDER TEST:** Percentual de assimetria dos animais no teste do cilindro. **SPLASH TEST:** Quantificação do tempo de *grooming* no teste splash. Control: Grupo controle + salina; 6-OHDA: Grupo induzido + salina; 6-OHDA + EXT 500µg EAG/kg: Grupo induzido + extrato jamelão dose 500µg EAG/kg; 6-OHDA + EXT 750µg EAG/kgg: Grupo induzido + extrato jamelão dose 750µg EAG/kg; 6-OHDA + Levodopa: Grupo induzido + Levodopa. Os resultados são expressos como média ± erro padrão. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle e (#) Diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o extrato de jamelão (*Syzygium Cumini*) atenuou significativamente os sintomas motores (equilíbrio, coordenação e assimetria) em ambas as doses testadas (500 e 750 µg EAG/kg), com efeito semelhante à levodopa. Adicionalmente, a dose de 500 µg EAG/kg foi capaz de atenuar o comportamento do tipo depressivo no

teste Splash. Conclui-se que o extrato de jamelão, especialmente na dose de 500 µg EAG/kg, apresenta potencial como tratamento adjuvante na Doença de Parkinson, por atuar simultaneamente sobre sintomas motores e não motores. Estudos futuros são necessários para elucidar seus mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia (GBToxBio) e a Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Uruguaiana.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. JAMA, v. 323, n. 6, p. 548, 11 fev. 2020.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. Nature Reviews Neuroscience, jul. 2009.

CERAVOLO, R. et al. Neuropathy and levodopa in Parkinson's disease: Evidence from a multicenter study. Movement Disorders, v. 28, n. 10, p. 1391–1397, 8 jul. 2013.

DHINGRA, A. et al. Exploring Nonmotor Neuropsychiatric Manifestations of Parkinson Disease in a Comprehensive Care Setting. Journal of Geriatric Psychiatry and NeurologySAGE Publications Inc., , 1 maio 2021.

DO NASCIMENTO-SILVA, N. R. R.; BASTOS, R. P.; DA SILVA, F. A. Jambolan (Syzygium cumini (L.) Skeels): A review on its nutrients, bioactive compounds and health benefits. Journal of Food Composition and AnalysisAcademic Press Inc., , 1 jun. 2022.

FERRAZZOLI, D. et al. Motor-cognitive Approach and Aerobic Training: A Synergism for Rehabilitative Intervention in Parkinson's Disease. Neurodegenerative Disease Management, v. 10, n. 1, p. 41–55, fev. 2020.

GUO, J. D. et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). International Journal of Molecular MedicineSpandidos Publications, , 1 abr. 2018.

PRINGSHEIM, T. et al. Dopaminergic Therapy for Motor Symptoms in Early Parkinson Disease Practice Guideline Summary. Neurology, v. 97, n. 20, p. 942–957, 16 nov. 2021.

SAAVEDRA MORENO, J. S.; MILLÁN, P. A.; BURITICÁ HENAO, O. F. Introducción, epidemiología y diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. Acta Neurológica Colombiana, v. 35, n. 3 Supl 1, p. 2–10, 1 set. 2019.

SAGRAWAT, H.; MANN, A. S.; KHARYA, M. D. Pharmacognosy Magazine PHCOG MAG.: Review Article Pharmacological potential of Eugenia jambolana: A review, 2006.

SAMPAIO, T. B. et al. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model. European Journal of Pharmacology, v. 795, p. 28–35, 2017.

SHRIVASTAVA, P. et al. Anti-apoptotic and Anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's Rat model. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 24, n. 4, p. 680–687, abr. 2013.

YENI, Y. et al. Neuroprotective effects of L-Dopa-modified zinc oxide nanoparticles on the rat model of 6-OHDA-ınduced Parkinson's disease. Scientific Reports, v. 14, n. 1, 17 ago. 2024.