POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE JAMELÃO (*Syzygium cumini*) EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON: MODULAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDOS ENCEFÁLICOS E MUSCULAR

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

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

Resumo: Este estudo investigou o efeito do extrato de jamelão em ratos Wistar com Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina. O objetivo foi avaliar sua ação antioxidante pela atividade da SOD no córtex pré-frontal, cerebelo e músculo gastrocnêmio. A dose de 750µg EAG/kg do extrato aumentou significativamente a enzima superóxido dismutase nos tecidos, com efeitos semelhantes à Levodopa, sugerindo neuroproteção e benefício muscular. Concluiu-se que o extrato possui efeito antioxidante significativo.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo; Ratos Wistar; 6-Hidroxidopamina.

INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença progressiva e crônica que atinge cerca de 1,1% da população mundial, principalmente aquela acima de 60 anos. Similar a outras doenças degenerativas, seus fatores de risco são diversos, podendo estar relacionados tanto a fatores ambientais e comportamentais, como ingestão de pesticidas, produtos lácteos e poluição aérea, quanto a fatores fenotipários, como idade, sexo, etnia e heranças genéticas autossomais específicas, como alterações ao gene GBA, presente em até 30% dos casos de DP (Ben-Shlomo et al., 2024) .

Apesar de amplamente estudada, a DP ainda possui mecanismo fisiopatológico não totalmente esclarecido. Sabe-se que envolve agregados protéicos intracelulares chamados corpúsculos de Lewy, os quais deflagram resposta inflamatória e desequilíbrio redox. Esse desequilíbrio, caracterizado pelo processo de estresse oxidativo, envolve a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em detrimento da capacidade antioxidante celular, levando a danos mitocondriais e neurodegeneração. O sistema antioxidante endógeno, do qual faz parte a enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por converter o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), frequentemente encontra-se comprometido na DP. Esse comprometimento contribui para o acúmulo de ROS, dano neuronal e a disfunção de vias dopaminérgicas no sistema nervoso central (Özduran; Becer; Vatansever, 2021).

Como citados, esses danos ocorrem principalmente em neurônios dopaminérgicos, especialmente em áreas encefálicas como córtex pré-frontal e cerebelo, além de tecidos musculares, em suas terminações nervosas (Vandresen-Filho et al., 2015). No caso, estes podem ser tanto psicocognitivos, com depressão, perda de memória e diminuição da capacidade cognitiva, quanto mecânicos, com tremores de repouso, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez muscular (Ferrazzoli et al., 2020). Tais acometimentos tem característica progressiva e tem como resultado final um grande comprometimento muscular e cognitivo, frequentemente tendo a morte como resultado final.

Mesmo diante dessa sintomatologia e prevalência, entretanto, atualmente o tratamento mais preconizado para essa doença se encarrega somente numa atenuação dos sintomas. Desse modo, medicamentos como o Levodopa atuam apenas para restabelecer os níveis dopaminérgicos no SNC, diminuindo as manifestações clínicas da DP, mas não atuando em seus mecanismos fisiopatológicos (Tai; Gamiz-Arco; Martinez, 2024). Além disso, as terapias medicamentosas atuais não oferecem melhora significativa a parâmetros cognitivos e emocionais diretamente, limitando o escopo da melhora que os indivíduos podem atingir (Amara; Memon, 2018).

Nesse contexto, têm sido propostos diversos mecanismos que tentassem combater mais diretamente a fisiopatologia dessa doença, a fim de que a melhora experimentada fosse mais substancial e integral. Nesse sentido, compostos fenólicos têm demonstrado efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios frente a diversas doenças metabólicas e neurodegenerativas (Reglodi et al, 2017). Entre possíveis fontes destes compostos, destaca-se o jamelão, fruta roxa que possui alto teor de polifenóis, incluindo ácido gálico e antocianinas, que desempenham atividade antioxidante no combate aos

radicais livres (Do Nascimentos-Silva; Bastos; Da Silva, 2022). Essa, proveniente da planta *Syzyguym cumini*, da família *Myrtaceae*, oriunda da Ásia, também é muito presente em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo muito bem distribuída também no Brasil (Ayyanar; Subash-Babu, 2012), sendo já utilizada por povos tradicionais para o tratamento de diversas patologias, sendo muito bem conhecido seu uso associado à diabetes (Rodrigues et al., 2015). Além disso, outras atividades biológicas benéficas ao organismo também já foram observadas, como funções hipoglicêmicas, hipolipidêmicas, cardioprotetoras, antibacterianas, hepatoprotetoras, antineoplásicas e antialérgicas (Srivastava; Chandra, 2013), além de potencial anti-inflamatório e neuroprotetor (Sagrawat; Mann; Kharya, 2006).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização do efeito do extrato de jamelão, oriundo da região sul do Brasil, frente aos sintomas da DP em ratos WISTAR induzidos com 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção do extrato de jamelão (*Syzygium cumini*)

Os frutos do Jamelão (*Syzygium cumini*) foram colhidos em Uruguaiana, Rio Grande do Sul, no dia 28 de fevereiro de 2019. Os frutos coletados foram lavados em água corrente e congelados a -18°C. Para a obtenção do extrato etanólico, os frutos foram descongelados e tiveram suas cascas e polpas trituradas. Depois 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 um agitador magnético por 30 minutos. O resíduo sobrenadante recuperado após centrifugação por 5 minutos a 3000rpm foi submetido a nova extração similar à primeira, e posteriormente recuperou-se o evaporado em um evaporador rotativo usando temperaturas entre 40-45ºC a vácuo.

Animais experimentais

Para o 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. Os animais foram ambientados durante cinco dias e mantidos com dieta peletizada padrão para ratos (Presence®), água à vontade e 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 indução da Doença de Parkinson com a 6-Hidroxidopamina

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (75 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (8 mg/kg) via intraperitoneal. A cirurgia foi realizada em todos os animais, com infusão intraestriatal unilateral, seguindo coordenadas estabelecidas por (Paxinos; Watson, 1986), sendo essas: 1,0 mm anterior, 3,0 mm lateral e -5,0 mm ventral em relação ao bregma, com doses também estabelecidas pelo mesmo protocolo. O grupo 1 (controle) recebeu injeção de salina (a 3 µL), enquanto os demais grupos receberam injeção de 6-OHDA (20 µg / 3 µL), em solução salina contend 0,02% de ácido ascórbico. A injeção foi feita por meio de uma seringa Hamilton de 10 µL, sendo que a agulha foi deixada no local por 5 minutos, antes de ser recolhida. Os animais depois receberam cloridrato de tramadol, na dose de 20 mg/kg para analgesia e foram observados diariamente após as cirurgias (Sampaio et al., 2017).

Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram delineados da seguinte forma:

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

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

III. 6-OHDA + EXT 500 µg EAG/kg (n=9): grupo induzido com Parkinson, administração via oral de extrato de jamelão (Dose 500 µg EAG/kg);

IV. 6-OHDA + EXT 750 µg EAG/kg (n=10): grupo induzido com Parkinson, administração via oral de extrato de jamelão (Dose 750 µg EAG/kg)

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

Após 3 dias P.O., iniciou-se tratamento por gavagem durante 30 dias, em que os grupos I e II receberam solução salina, o grupo III recebeu extrato de jamelão na dose 500µg EAG/kg, o grupo IV recebeu extrato de jamelão na dose de 750µg EAG/kg e o grupo V recebeu levodopa, na dose de 6 mg/kg (Kosaraju et al., 2014), sendo este o controle positivo.

Após o período do tratamento e dos testes comportamentais, ao final do experimento (dia 31), após jejum de 8 horas, os animais foram pesados e anestesiados com 100 mg;kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina via intraperitoneal. Com os animais anestesiados, foi realizada a eutanásia pela coleta sangue por punção cardíaca. Após eutanásia, foram removidos os tecidos córtex pré-frontal, cerebelo e músculo gratrocnêmio para análises posteriores.

Análise da atividade da SOD

Os tecidos córtex pré-frontal, cerebelo e músculo gastrocnêmio foram pesados e homogeneizados em solução salina 150 mM usando um homogeneizador de vidro manual. Esse foi posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e utilizado o sobrenadante resultante. Este foi analisado quanto à atividade da SOD nos tecidos.

A atividade enzimática da SOD foi determinada seguindo o protocolo baseado na capacidade da enzima em inibir a autoxidação da adrenalina em meio alcalino (McCord; Fridovich, 1969). O princípio baseia-se no fato de que a oxidação espontânea da adrenalina a adenocromo é mediada pelo radical superóxido (O_2^-). Dessa forma, a presença da enzima SOD na amostra compete com a adrenalina pelo radical superóxido, reduzindo a velocidade de formação do cromóforo. A redução da formação do adenocromo foi monitorada por cinética espectrofotométrica no comprimento de onda de 480 nm. Os resultados foram determinados por meio de uma curva de regressão relacionando o volume do sobrenadante ao percentual de inibição e, posteriormente, normalizados pela concentração total de proteínas, sendo expressos em U de SOD/mg de proteína.

Para a dosagem de proteínas nos tecidos testados foi utilizada a metodologia de Peterson (Lowry Modificado) utilizando uma curva padrão de albumina bovina sérica (Peterson, 1977).

Análises estatísticas

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 , 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

Os gráficos da Figura 1 apresentam resultados referentes à avaliação da atividade da SOD. Os eixos do gráfico x-y estão representados em medidas de, respectivamente, grupos de ratos e unidades de SOD por miligrama de proteína (USod/mg of protein).

No tecido do córtex pré-frontal dos ratos analisados observa-se atividade significativamente reduzida da enzima no grupo 6-OHDA em relação ao grupo controle (Control), enquanto em ambos os grupos induzidos, mas tratados com doses de 750µg EAG/kg do extrato e com o Levodopa (6-OHDA + EXT 750µg EAG/kg e 6-OHDA + Levodopa, respectivamente) apresentam atividade aumentada da enzima em relação ao grupo de indução.

Esses achados corroboram com a literatura no que condiz com danos esperados tanto na patologia estudada, quanto no modelo de indução escolhido (Huang et al., 2024). Para além disso, danos teciduais no córtex pré-frontal em ratos estão associados a sintomas tanto cognitivos, principalmente no que condiz com questões como aprendizado e memória espacial e operacional (Lasisi-Sholola et al., 2024), quanto a sintomas motores experienciados na DP.

Dessa forma, a atividade aumentada da SOD nesse tecido, enzima responsável pela neutralização de ROS, explicita a capacidade protetora contra estas espécies reagentes no tecido cerebral, contribuindo para a melhora de parâmetros bioquímicos na DP.

Ainda sobre o gráfico, nota-se que no cerebelo também houve uma diminuição expressiva na atividade da enzima no grupo 6-OHDA, mas aumento nos grupos de tratamento com extrato a 750µg EAG/kg e com Levodopa.

O cerebelo é um órgão que controla muitos aspectos relacionados à motricidade, mas que também está ligado a outras funções não-cognitivas, como resolução de operações matemáticas e resolução de figuras complexas. No caso, parâmetros mais favoráveis em relação ao controle de espécies reativas, como apresentado no gráfico, impactam em uma manutenção de funções cognitivas e motoras nos ratos analisados, algo que também pode ser observado em outros trabalhos que analisaram estes parâmetros (Hassan et al., 2024) (Radosinska et al., 2024).

Por último, buscou-se analisar o dano ao tecido muscular por meio da coleta e análise do músculo gastrocnêmio. Assim como o tratamento à base de Levodopa, a terapêutica com dose de 750µg EAG/kg do extrato foi capaz de modular significativa e positivamente a atividade da SOD neste tecido.

Apesar de ser uma condição essencialmente neurológica, com implicações neuromotoras, disfunção metabólica e produção exacerbada de ROS, a DP também causa certo dano muscular. Esse dano, aliado à hipoativação e à bradicinesia desses músculos, tende a culminar em atrofia muscular (Moresi; Adamo; Berghella, 2019). Concomitantemente, essa queda em atividade muscular, resultante do dano das vias dopaminérgicas, contribuem com uma queda na presença de miocinas, o que, por sua vez, contribuem para manutenção da neuroinflamação e pode ter ramificações aos sintomas cognitivos da doença (Harro et al., 2022).

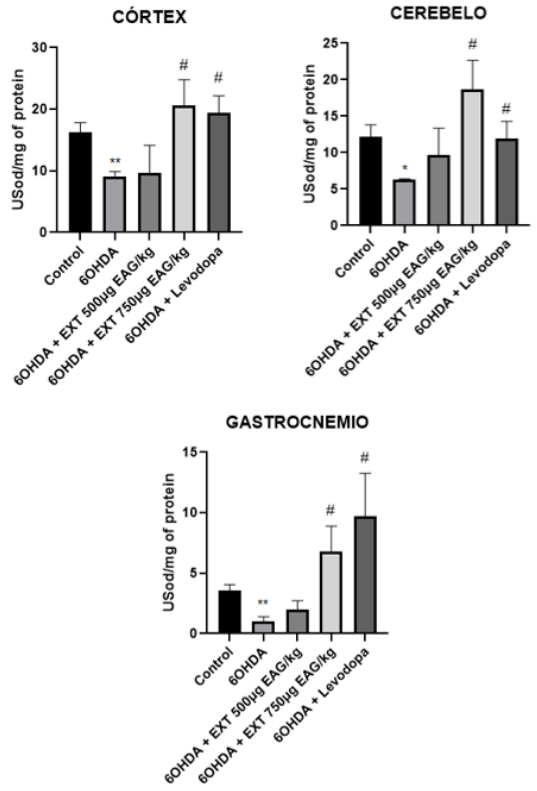


Figura 1. Atividade da SOD nos tecidos: Córtex, Cerebelo e Gastrocnêmio dos animais induzidos com 6-OHDA e tratados com extrato de jamelão. **Control:** Grupo controle + salina; **6-OHDA:** Grupo induzido + salina; **6-OHDA + EXT 500**µg EAG/kg **:** Grupo induzido + extrato jamelão dose 500µg EAG/kg ; **6-OHDA + EXT 750**µg EAG/kg **:** 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

Conclui-se, por meio do presente estudo, que o tratamento com extrato de Jamelão na dose de 750 µg EAG/kg possui relevância terapêutica e potenciais benefícios no tratamento **do** modelo de DP induzida pela administração de 6-OHDA. Os efeitos do extrato foram semelhantes aos do Levodopa, e ambos contribuíram com o sistema antioxidante endógeno e modularam a atividade da SOD nos tecidos testados. Mesmo diante dos resultados, ainda são necessários mais estudos para compreender os mecanismos de ação e sua aplicabilidade.

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

AMARA, A. W.; MEMON, A. A. Effects of Exercise on Non-motor Symptoms in Parkinson's Disease. Clinical Therapeutics, v. 40, n. 1, p. 8–15, jan. 2018.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, n. 3, p. 240–246, mar. 2012.

BEN-SHLOMO, Y. et al. The epidemiology of Parkinson's disease. The Lancet, v. 403, n. 10423, p. 283–292, jan. 2024.

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.

HARRO, C. C. et al. Effects of nordic walking exercise on gait, motor/non-motor symptoms, and serum brain-derived neurotrophic factor in individuals with Parkinson's disease. **Frontiers in Rehabilitation Sciences**, v. 3, 14 out. 2022.

HASSAN, A. et al. Enhancement of Vitamin C's Protective Effect against Thimerosal-Induced Neurotoxicity in the Cerebral Cortex of Wistar Albino Rats: An *In Vivo* and Computational Study. **ACS Omega**, v. 9, n. 8, p. 8973–8984, 16 fev. 2024.

HUANG, Y.-T. et al. Suppression of presynaptic corticostriatal glutamate activity attenuates L-dopa-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease mice. **Neurobiology of Disease**, v. 193, p. 106452, abr. 2024.

KOSARAJU, J. et al. Neuroprotective effect of Tinospora cordifolia ethanol extract on 6-hydroxy dopamine induced Parkinsonism. Indian Journal of Pharmacology, v. 46, n. 2, p. 176–180, 2014.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide

Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, nov. 1969.

MORESI, V.; ADAMO, S.; BERGHELLA, L. The JAK/STAT Pathway in Skeletal Muscle Pathophysiology. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 30 abr. 2019.

ÖZDURAN, G.; BECER, E.; VATANSEVER, H. S. The Role and Mechanisms of Action of Catechins in Neurodegenerative Diseases. Journal of the American Nutrition Association, v. 42, n. 1, p. 67–74, 24 nov. 2021.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1986.

PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowryetal. Which is More Generally ApplicableANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1977.

RADOSINSKA, D. et al. Oxidative Stress Markers and Na,K-ATPase Enzyme Kinetics Are Altered in the Cerebellum of Zucker Diabetic Fatty fa/fa Rats: A Comparison with Lean fa/+ and Wistar Rats. **Biology**, v. 13, n. 10, p. 759, 25 set. 2024.

REGLODI, D. et al. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. Progress in NeurobiologyElsevier Ltd, , 1 ago. 2017.

RODRIGUES, K. A. DA F. et al. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. Journal of Ethnopharmacology, v. 160, p. 32–40, fev. 2015.

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.

TAI, M. D. S.; GAMIZ-ARCO, G.; MARTINEZ, A. Dopamine synthesis and transport: current and novel therapeutics for parkinsonisms. Biochemical Society Transactions, v. 52, n. 3, p. 1275–1291, 30 maio 2024.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. Neurological Sciences, v. 36, n. 8, p. 1449–1456, 25 mar. 2015.