



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



THALITA PRATES DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *LIMONIUM BRASILIENSE* EM
MODELO DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA EM CÉLULAS SH-SY5Y**

Maringá
2022

THALITA PRATES DA SILVA

**Avaliação *in vitro* de extratos de *Limonium brasiliense* em modelo de
Parkinson induzido por rotenona em células SH-SY5Y**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo

Maringá
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586a

Silva, Thalita Prates da

Avaliação in vitro de extratos de Limonium brasiliense em modelo de Parkinson induzido por rotenona em células SH-SY5Y / Thalita Prates da Silva. -- Maringá, PR, 2022. 81 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Cultura de células. 2. Neuroproteção. 3. Parkinson, Doença de . 4. Plantas medicinais . I. Mello, João Carlos Palazzo de , orient. II. Araújo, Daniela Cristina de Medeiros, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.321

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

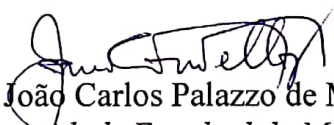
THALITA PRATES DA SILVA

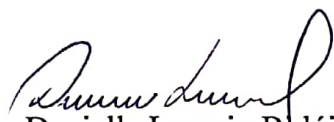
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS DE *LIMONIUM BRASILIENSE* EM
MODELO DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA
EM CÉLULAS SH-SY5Y**

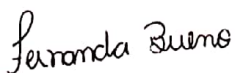
321ª Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 04 de outubro de 2022

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Danielle Lazzarin-Bidóia
Universidade Estadual de Londrina


Dra. Fernanda Giacomini Bueno
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO, blocos K80 e T22 (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (bloco B08) e Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP, bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

SILVA, T P da; CHIERRITO, D.; ARAÚJO, D. C. M. de; MELLO, J. C. P. de. Effect of crude extract of *Limonium brasiliense* in model rotenone-induced of Parkinson's disease on neuroblastoma SH-SY5Y cells. II SISLIF – International Symposium on Drug Delivery Systems: innovation, technology, and pharmacometrics. Maringá, Paraná, Brasil, 2021.

SILVA, T P da; CHIERRITO, D.; ARAÚJO, D. C. M. de; MELLO, J. C. P. de. Effect of ethyl acetate fraction of *Limonium brasiliense* in model rotenone-induced of Parkinson's disease on neuroblastoma SH-SY5Y cell. XI Seminário Anual do PCF. Maringá, Paraná, Brasil, 2021

À mim mesma por nunca ter desistido, mesmo nos tempos mais difíceis,
À Deus e
À minha família por todo suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por sempre me proteger, me abençoar e dar discernimento ao longo da vida, e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis;

À minha família. Em especial a minha mãe Gislaine Aparecida Prates por ter sido o meu Forte por todos esses anos sendo mãe e pai por muito tempo; ao meu “PAldrasto” Paulo Eduardo Modenez Sakuma por me incentivar e sempre vibrar com as minhas conquistas. Ao meu esposo Laércio Rodrigues por me apoiar em todas as minhas loucuras e vontades. Aos meus irmãos Nathally, Jamile, Thiago, Matheus, Bianca e Marco Antônio por estarem comigo. Amo vocês!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho. Em especial, a Helena, pela ajuda, disponibilidade e atenção.

Aos meus professores ao longo da minha vida que me orientaram e me inspiraram. Especialmente meu orientador pela oportunidade, ensinamentos, paciência, disponibilidade e apoio. Agradeço também a minha coorientadora Daniela Cristina de Medeiros Araújo que foi a responsável por proporcionar o mestrado.

A Danielly Chierito, Emilly Isabelli dos Santos Teodoro, Daniela Medeiros, Clara Beatriz de Lima, Mariana de Paula Nascimento, Augusto Borges, Naiara Gancedo, Ana Carolina Guidi e Danielle Bidóia. Agradeço as contribuições em laboratório, além do apoio, ajuda e aprendizados que foi muito importante ao longo dessa etapa e também no desenvolvimento deste trabalho.

A todos do laboratório Palafito pela recepção, companheirismo, auxílio e troca de experiências diárias, profissionais e pessoais.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional e pessoal. Meu sincero, muito obrigada!

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas
serem o que são”. (Aristóteles)

BIOGRAFIA



Thalita Prates da Silva nasceu em Maringá, PR, em 4 de março de 1996. Filha de Renato Alexandre Aurélio da Silva e Gislaine Aparecida Prates. Concluiu o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Silvio Magalhães Barros em 2013. Realizou Curso profissionalizante de nível técnico em Biotecnologia (2012-2014). Em 2015 ingressou no curso de Farmácia no Centro Universitário Ingá – UNINGÁ, por meio de bolsa integral do PROUNI. Entre 2016 e 2018 realizou estágio remunerado na 15ª Regional de Saúde, sendo avaliada como excelente estagiária. Participou da XII e XIII Jornada Acadêmica Uningá (2016 e 2017). Em 2017 recebeu premiação de 2º lugar como Aluna Destaque da UNINGÁ. Realizou curso de aplicação de injetáveis (2018) e extensão universitária em Escrita Farmacêutica - Produzindo Trabalhos de Conclusão de Curso (2018). Participou do projeto de extensão intitulado “Dia de Campo” (2018), e foi membro do grupo Conselho Regional de Farmácia Junior (CRF-Jr) da Uningá em 2018. Desde março de 2019 é mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Trabalha desde de janeiro de 2021 na prefeitura municipal de Maringá.

SILVA, T. P. 2022. Avaliação *in vitro* de extratos de *Limonium brasiliense* em modelo de Parkinson induzido por rotenona em células SH-SY5Y. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 71p.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica e progressiva que acomete milhões de pessoas pelo mundo, não existindo tratamento de cura ou retardo, somente medicamento que agem nos sintomas da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade e citoproteção de extratos do rizoma de *Limonium brasiliense* (Plumbaginaceae), utilizando linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y em modelo de doença de Parkinson. A partir do extrato bruto (EB) produzido com o rizoma de *L. brasiliense* foi preparado a fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ). A avaliação *in vitro* do efeito citotóxico da rotenona, e citoprotetor dos extratos foram realizados utilizando células de neuroblastoma humano, por meio da técnica de MTT, a detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais foi determinada com H₂DCFDA, a integridade da membrana foi determinada por iodeto de propídeo (IP), a determinação do potencial transmembrânico mitocondrial determinado por Rodamina 123 (Rh 123) e avaliação dos níveis de ATP intracelular com Kit Cell Titer-Glo. A análise estatística foi realizada usando o *software* GraphPad Prism 9. Na avaliação de citotoxicidade, a rotenona demonstrou reduzir significativamente a viabilidade celular nas concentrações testadas (500, 1000, 1500 e 2000 nM), sendo que 1702,11 nM foi a concentração necessária para causar morte em 50% da população celular e utilizada para os testes de citoproteção. O EB e frações, nas concentrações 1,95, 3,90 e 7,81 µg/mL, foram capazes de exercer proteção para a linhagem neuroblastoma SH-SY5Y frente aos danos causados pela rotenona, de forma significativa. Além disso, foi possível determinar que o EB e as frações reduziram significativamente a produção de EROs totais quando comparados com a rotenona, além de reduzir a despolarização da membrana e manter a integridade celular. Em contrapartida, as amostras não tiveram capacidade de aumentar os níveis de ATP reduzidos por rotenona. Assim, a cadeia transportadora de elétrons ligada a produção de energia não seria um possível alvo. Os tratamentos avaliados foram capazes de inibir o dano às células causado pela rotenona, devido a ação antioxidante diminuindo EROs. Esses resultados são satisfatórios no contexto da investigação de opções terapêuticas para o tratamento da DP. Porém são necessários estudos complementares de interação dos extratos com alguma proteína

da membrana mitocondrial que impede a despolarização da membrana e abertura dos poros de transição, ou até mesmo a inibição ou expressão de proteínas envolvidas na produção de EROs, a fim de compreender melhor a proteção exercida.

Palavras-chave: Citoproteção, doença de Parkinson, cultura de células, Plumbaginaceae.

SILVA, T. P. 2022. *In vitro* evaluation of *Limonium brasiliense* extracts in a rotenone-induced Parkinson's model in SH-SY5Y cells. Masters Dissertation. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 71p.

ABSTRACT

The Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive disease that affects millions of people in the world, there isn't cure or delay treatment, only drugs that act on the symptoms of the disease. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the cytotoxicity and cytoprotection of the *Limonium brasiliense* rhizome (Plumbaginaceae) using SH-SY5Y human neuroblastoma strain in a Parkinson's disease model. From the crude extract (CE) produced with the rhizome *L. brasiliense* the ethyl acetate fraction (EAF) and aqueous fraction (AF) were prepared. The *in vitro* evaluation of the cytotoxic effect of rotenone and cytoprotective effect of the extracts were performed using human neuroblastoma cells, using the MTT technique, the detection of reactive oxygen species (ROS) was determined with H₂DCFDA, the membrane integrity was determined by propidium iodide (PI), determination of mitochondrial transmembrane potential determined with rhodamine 123 (Rh 123) and assessment of intracellular ATP levels with Cell Titer-Glo kit. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 software. In the cytotoxicity evaluation, rotenone has shown to significantly reduce cell viability at the concentrations tested (500, 1000, 1500 and 2000 nM), with 1702.11 nM being the concentration necessary to cause death in 50% of the cell population and used for cytoprotection tests. The fractions and CE, at concentrations of 1.95, 3.90 and 7.81 µg/mL, were able to significantly protect the SH-SY5Y neuroblastoma lineage against the damage caused by rotenone. Furthermore, it was possible to determine that CE and fractions significantly reduced the production of ROS when compared to rotenone, in addition to reducing membrane depolarization and maintaining cell integrity. In contrast, the samples weren't able to increase the ATP levels reduced by rotenone. Thus, the electron transport chain linked to energy production would not be a possible target. The treatments evaluated were capable of inhibiting the damage to cells caused by rotenone, due to its antioxidant action by decreasing ROS. These results are satisfactory in context of the investigation of therapeutic options for the treatment of PD. However, complementary studies of the interaction of extracts with some mitochondrial membrane protein that prevents membrane depolarization and opening of transition pores, or even the inhibition or expression of proteins involved in the production of ROS, in order to better understand the protection exercised.

Key words: Cytoprotection, Parkinson' disease, cell culture, Plumbaginaceae,

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismos patológicos da Doença de Parkinson que resultam na morte dos neurônios dopaminérgicos.	16
2	Estrutura química da Levodopa. Utilizada como primeira escolha para tratamento da doença de Parkinson.	19
3	Neuroblastoma SH-SY5Y visualizado em microscópio óptico.	22
4	Estrutura química das substâncias mais usadas para mimetizar a doença de Parkinson em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	23
5	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae).	25
6	Avaliação da citotoxicidade da rotenona.	33
7	Avaliação do efeito protetor do EB e FAE nas concentrações 15,63; 7,81; 3,90; 1,92 µg/mL frente ao dano causado pela rotenona.	34
8	Avaliação do efeito protetor da FAQ nas concentrações 15,63; 7,81; 3,90; 1,92 µg/mL frente ao dano causado pela rotenona.	34
9	Efeito da rotenona na citotoxicidade celular. Células de neuroblastoma SH-SY5Y foram tratadas com diferentes concentrações (500; 1000; 1500 e 2000nM) de rotenona por 24h.	39
10	Efeito do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) contra o dano induzido pela rotenona.	42
11	Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com rotenona, extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ), marcadas com H ₂ DCFDA	45
12	Integridade de membrana de células neuroblastoma humana SH-SY5Y pré-tratadas por 1 hora com EB, FAE e FAQ; antes da exposição e marcadas com iodeto de propídeo (IP).	49
13	Potencial de membrana mitocondrial de células neuroblastoma humana SH-SY5Y tratadas por 1 hora com EB, FAE e FAQ induzido o dano com rotenona e marcadas com rodamina 123 (Rh123).	51
14	Níveis de ATP intracelular em células neuroblastoma humana SH-SY5Y tratadas por 1 hora com EB, FAE e FAQ; induzido o dano com rotenona e marcadas com Kit Cell Titer-Glo.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Viabilidade celular da linhagem neuroblastoma humano SH-SY5Y quando pré-tratadas com extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ), contra os danos causados pela rotenona.	41
2	Ensaio do potencial de membrana mitocondrial em células SH-SY5Y pré-tratadas com extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) por 1h e tratadas com rotenona por 24 h usando Rh123.	52

LISTA DE ABREVIações

ABTS	2,2' azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína pró-apoptótica
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAM	<i>Complementary and alternative medicine</i>
CBD	Canabidiol
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50% das células
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% das células
COMT	Catecol-O-metil transferase
CUPRAC	Capacidade antioxidante através da redução do íon cúprico
DA	Doença de Alzheimer
DL ₅₀	Dose letal de 50% dos animais
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecccon
DMEM/F12	Meio Eagle Modificado por Dulbecco/mistura de nutrientes F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EB	Extrato bruto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Forma oxidada de flavina-adenina dinucleótido - FAD
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
FCRC	Capacidade redutora de Folin-Ciocalteau
Fe ²⁺	Íon ferro
FRAP	Determinação do poder antioxidante de redução do ferro
GBD	Global Burden of Disease, Injures and Risk Factos Study
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO-1	Heme oxigenase 1
HSV-1	Vírus herpes simples tipo I
L-DOPA	L-dihidroxfenilalanina
LRRK2	Repetição rica em leucina quinase 2

MAO	Enzima monoamina oxidase
MAO-B	Enzima monoamina oxidase-B
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂ [•]	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALAFITO	Laboratório de Biologia Farmacêutico
PARK2	Parquina
PINK1	Quinase 1 induzida por homologo de tensionamento
SAM	Maquinaria de distribuição e montagem
SFB	Soro fetal bovino
SNCA	Gene responsável pela produção de α-sinucleína
TH	Tirosina hidroxilase
TOM	Translocase de membrana de externa
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VPS35	Proteína vacuolar associada à classificação 35
WHO	World Health Organization
6-OHDA	6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Doença de Parkinson	13
2.1.1 Etiologia da DP	14
2.1.2 Patologia da DP	15
2.1.3 Tratamento da Doença de Parkinson	18
2.2 Cultura de Células- Linhagem celular neuroblastoma humano SH-SY5Y	21
2.3 Aspectos gerais <i>Limonium brasiliense</i>	24
2.3.1 Aspectos químicos de <i>Limonium brasiliense</i>	26
2.3.2 Aspectos farmacológicos de <i>Limonium brasiliense</i>	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Produtos Químicos	30
4.2. Material Vegetal	30
4.3. Secagem e moagem	30
4.3.1 Preparo do extrato bruto (EB)	30
4.3.2 Partição líquido-líquido a partir do extrato bruto	31
4.4. Atividade biológica in vitro	31
4.4.1 Cultura de células.....	31
4.4.2 Atividade metabólica e viabilidade celular	32
4.3 Neuroproteção.....	33
4.4 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais (H ₂ DCFDA)	34
4.5 Determinação da integridade da membrana celular	35
4.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	36
4.7 Avaliação dos níveis de ATP intracelular	37
4.8 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Citotoxicidade da rotenona em células neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	39
5.2 Efeito neuroprotetor do EB, FAE e FAQ de <i>L. brasiliense</i> contra os danos causados pela rotenona em células neuroblastoma SH-SY5Y.....	40
5.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais (H ₂ DCFDA)	44
5.4 Determinação da integridade da membrana celular	48
5.5 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	50
5.5 Avaliação dos níveis de ATP intracelular	54
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

As desordens neurológicas como doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), epilepsia, lesões cerebrais, esclerose múltipla, dentre outras doenças, são distúrbios que acometem pessoas do mundo todo (WHO, 2007), sem restrição de sexo, idade, educação, renda ou país em que se vive (Poewe et al., 2017).

Entre essas doenças, a doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa, crônica e progressiva que mais frequentemente acomete o sistema nervoso central, atrás somente da DA (Chen e Tsai, 2010; Tysnes e Storstein, 2017). Sendo a DP, a doença que mais cresceu em relação a prevalência, incidência e mortalidade de acordo com o Global Burden of Disease, Injuries and Risk Factors Study (GBD) de 2015 (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018).

A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos, principalmente na substância nigra *pars compacta* (Steidl et al., 2007; Santos et al., 2019;) possivelmente ligada a diferentes mecanismos patológicos como disfunção mitocondrial, apoptose, acúmulo de metais de transição, desdobramento e agregação de proteínas, e estresse oxidativo (Hu et al., 2011; Caruana e Vassallo, 2015; Lee et al., 2015). O desenvolvimento dessa doença pode estar ligado a fatores como depressão, fatores genéticos (Chen e Tsai, 2010; Werneck, 2010), além de fatores ambientais e envelhecimento natural que favorecem ao desenvolvimento da doença, sendo a idade um dos fatores de risco mais importante (Shimohama et al., 2003; Samii et al., 2004; GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018).

Segundo o GBD, estima-se que existiam cerca de 6,2 milhões de pessoas com DP em 2016 (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018), e aproximadamente 8,5 milhões em 2019 (Ou et al., 2021), sendo que em 2040 esse número chegará a 12,9 milhões (Dorsey et al., 2018 a e b). E dentre as pessoas acometidas, 4 milhões possuem mais que 65 anos de idade. Já no Brasil, estima-se que existam 200 mil pessoas com DP, dobrando esse número até 2040. Um dos fatores para esse aumento é o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento populacional (Crefito14, 2021; MS, 2021).

O tratamento da DP inclui basicamente medicamentos para reposição de dopamina, que não curam e nem impedem a progressão da doença, ou seja, o tratamento é apenas sintomático. As principais classes de medicamentos utilizadas são os anticolinérgicos, agonista de receptores dopaminérgicos, inibidores da MAO

(enzima monoamina oxidase), e a L-dihidroxfenilalanina (L-DOPA), os quais geram efeitos indesejados como, acúmulo de metabolitos tóxicos da dopamina e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Morales-García et al., 2013; Orme et al., 2013; Hang et al., 2015; Le Douaron et al., 2015).

Apesar da existência de tratamentos, as medicações disponíveis são eficazes por um curto período de tempo afetando a qualidade de vida dos pacientes e familiares. Dessa forma, a busca por novos e alternativos tratamentos se faz necessário. Uma fonte de grande valia na busca por compostos biologicamente ativos que proporcionem tratamentos mais seletivos e, intervenções terapêuticas com menores efeitos colaterais, são os produtos naturais. Assim as espécies vegetais são alvos de pesquisas e desenvolvimento de opções terapêuticas, podendo fornecer substâncias promissoras no tratamento ou prevenção da DP (Rodrigues e Carlini, 2002; Gomes, 2007; Valmorbida, 2007; Park, 2010; Dias, et al., 2012; Yunes e Cechinel-Filho, 2012; Yoo e Park, 2012; Prasansuklab e Tencomnao, 2013; Rodrigues, et al., 2019).

Como demonstração, existem pesquisas envolvendo o efeito neuroprotetor de alguns compostos fitoquímicos derivados de plantas, sendo das classes dos polifenóis, alcaloides e saponinas (Sandoval-Avilla, 2019). Um exemplo é o resveratrol (um polifenol com propriedades anti-inflamatória e antioxidante) que tem efeito neuroprotetor por possui capacidade de manter os níveis de glutathione, aumentar parcialmente a expressão de heme oxigenase 1 (HO-1) e induzir autofagia celular, além de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse oxidativo, e diminuir a formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (Okawara, et al., 2007; Ren, et al., 2011; Moldzio, et al., 2013; Lin, et al., 2014; Arteaga, et al., 2015). Outro exemplo de polifenol com efeito protetor é a curcumina (que também possui efeito antioxidante e antiinflamatório), e protege contra estresse oxidativo, restaura os níveis de tirosina hidroxilase (TH), aumenta a absorção de dopamina, diminui a expressão de citocinas pro inflamatórias; além de reduzir a atividade (induzida por rotenona) e produção da caspase-3 (induzida 6-hidroxydopamina - 6-OHDA) (Yang et al., 2008; Yu et al., 2010; Qualls, et al., 2014; Meesarapee, et al., 2014;). Flavonoides como fustina, biochanina A, acacetina e baicaleína também apresentaram efeitos neuroprotetores em células SK-N-SH, neurônios dopaminérgicos de ratos e cultura primária de cérebro de ratos frente a 6-OHDA, lipopolissacarídeos e MPP⁺ (Park et. al, 2004; Chen et al., 2007; Jung et. al, 2007; Park et al., 2007; Mu et. al, 2009; Kim et. al, 2012).

O alcaloide tetrahydroberberina restaura a hiperpolarização da membrana induzida pela rotenona para condições fisiológicas através dos canais de potássio sensíveis a ATP (Wu et al., 2010). Já a berberina demonstrou efeitos protetores em célula SH-SY5Y contra 6-OHDA, diminuindo a apoptose celular (através da redução da atividade da caspase-3) e níveis mais baixos de EROs (Bae et al., 2013). Além disso, o celastrol previne a morte celular induzida por rotenona, diminuindo os níveis de EROs, bloqueando a liberação do citocromo C no citosol, inibindo a expressão de Bax, protegendo contra a perda de potencial de membrana e aumentando os níveis de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) (Kannaiyan et al., 2011).

Além dos compostos citados acima, o astragalosídeo IV (uma saponina encontrada nas raízes da *Astragalus membranaceus* Fisch. ex Bunge), ginseng e ginsenosídeos (Rb1, Rg1 e Rd) possuem propriedades neuroprotetoras (Radad et al., 2004; Lin et al., 2007; Zhang et al., 2012; Sandoval-Avila et al., 2019).

Há ainda uma revisão que relata a utilização de diferentes canabinoides no tratamento de Parkinson em estudos pré-clínicos e clínicos que demonstra resultados promissores na utilização do canabidiol (CBD) em sintomas motores e não motores, porém insuficientes para recomendar o uso do CBD para pacientes com DP devido a suas limitações quanto a extrapolação dos resultados a outros modelos e desconhecimento dos mecanismos para tal efeito (Santos et al., 2019).

Outra espécie em que foi relatada efeito neuroprotetor foi o *Limonium brasiliense* Kuntze, que foi capaz de proteger a células SH-SY5Y dos danos induzidos por βA_{25-35} (peptídeo tóxico utilizado em modelo de Alzheimer) (Sereia et al., 2019).

Esses efeitos neuroprotetores, bem como seus mecanismos de proteção, podem ser testados em bioensaios envolvendo culturas celulares. Os métodos de cultivo celular têm sido muito utilizados para avaliação inicial dos potenciais efeitos biológicos de composto, minimizando a utilização de animais em estudos *in vivo*, como no campo de investigação de espécies vegetais (Henriques e Sampaio, 2002; Mahlke, 2007; Arora, 2013; Adan et al., 2016).

Assim, o *L. brasiliense* é uma espécie vegetal presente no território brasileiro e popularmente utilizada. Sabe-se que essa espécie possui atividades farmacológicas conhecidas e descritas em literatura, entre elas, atividade antioxidante e anti-inflamatória. Nesse contexto, este trabalho representa uma oportunidade de aprofundar os conhecimentos do potencial biológico neuroprotetor do *L. brasiliense*, utilizando ensaios experimentais com cultura de células, uma vez que é uma espécie

considerada fonte promissora de substâncias ativas, com diversas atividades biológicas descritas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença degenerativa, crônica e progressiva, do sistema nervoso central, sendo considerada a segunda doença neuronal mais comum que acomete a população (Chen e Tsai, 2010; Tysnes e Storstein, 2017). Descrita primeiramente por James Parkinson em 1817, em sua publicação *“Essay on the Shaking Palsy”* (Parkinson, 1817). As manifestações motoras como bradicinesia, tremor em repouso, rigidez e instabilidade postural são as principais manifestações físicas, sendo o principal meio de diagnóstico clínico (Chen e Tsai, 2010; Martins Filho, 2011; Wirdefeldt et al., 2011; Tysnes e Storstein, 2017; Xicoy et al., 2017; Simon et al., 2020; Heger et al., 2021). Em adição, ainda tem-se manifestações não motoras como ansiedade, depressão (Wirdefeldt et al., 2011) e alterações cognitivas que também podem ser observadas (Steidl et al., 2007; Heger et al., 2021;) além de sintomas prodrômicos como, constipação e distúrbio do sono (Heinzel et al., 2019; Blauwendraat et al., 2020; Simon et al., 2020; Hansson, 2021; Heger et al., 2021).

A DP é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres. Sendo que a prevalência e a incidências dos casos da doença podem variar de acordo com raça, etnia, genótipo, e ambiente geográfico em que o indivíduo esteja inserido (Poewe et al., 2017; Armstrong e Okun, 2020; Cacabelos et al., 2021). Estima-se que existiam cerca de 8,5 milhões de pessoas com DP em 2019 (Ou et al., 2021), sendo que em 2040 esse número chegará a 12,9 milhões (Dorsey et al., 2018 a e b). Em sua maioria, a DP se desenvolve em pessoas com mais de 60 anos, porém pode ser observada precocemente antes dos 40 anos de idade, e pode estar ligada a fatores genéticos, acometendo 5% a 10% dos pacientes (Pajares et al., 2020; Tysnes e Storstein, 2017).

A doença de Parkinson pode ser subdividida em idiopática ou esporádica, onde a causa é desconhecida, e DP familiar (relacionada aos genes autossômicos dominantes e recessivos e seus padrões genéticos). Além disso, o parkinsonismo (nome dado aos sintomas motores) pode ser desenvolvido devido a outras doenças, como demência, degeneração corticobasal, paralisia supranuclear progressiva, atrofia sistêmica múltipla, dentre outras (Martins Filho, 2011; Samii et al., 2004). Embora uma pequena quantidade dos indivíduos portadores da doença terem fatores genéticos atrelados ao desenvolvimento da DP, o conhecimento dos genes que codificam as

proteínas envolvidas pode auxiliar no conhecimento das vias moleculares que levam ao início dessa neuropatologia. (Poewe et al., 2017).

2.1.1 Etiologia da DP

A DP não possui uma etiologia bem definida, mas acredita-se ser multifatorial na maioria dos casos. Fatores como pré disposição genética, histórico da doença na família e depressão (Chen e Tsai, 2010; Werneck, 2010; Simon et al., 2020) além do envelhecimento natural e fatores ambientais podem favorecer o seu desenvolvimento principalmente quando combinados dois ou mais fatores (Shimohama et al., 2003; Samii et al., 2004; Simon et al., 2020).

O envelhecimento natural pode não ser um fator determinante para a causa da doença, porém o encurtamento do telômero devido a incapacidade de total replicação das extremidades dos cromossomos (característico do envelhecimento) poderia contribuir para a patologia da DP em idades mais avançadas (Scheffold et al., 2016; Jankovic e Tan, 2020;). Outro evento relacionado, seria a diminuição gradual de proteínas proteolíticas capazes de degradar as proteínas, defeituosas ou produzidas em excesso, levando assim ao acúmulo de proteínas como a α -sinucleína (Xilouri et al., 2013; Kaushik e Cuervo, 2015; Poewe et al., 2017).

Em relação a pré-disposição genética, existem estudos que comprovam que mutações nos genes autossômicos dominantes *SNCA* (α -sinucleína), *LRRK2* (repetição rica em leucina quinase 2), *VPS35* (proteína vacuolar associada à classificação 35) (Shimohama et al., 2003; Cacabelos, 2017; Balestrino e Schapira, 2019;) e nos genes autossômicos recessivos *Parkin*, *PINK1* (quinase 1 induzida por homólogo de tensionamento) (Kalinderi et al., 2016; Cacabelos, 2017) e parquinha (*PARK2*) (Kitada et al., 1998; Cacabelos, 2017) estão ligados a DP familiar (Heger et al., 2021). Mutações específicas no gene α -sinucleína pode causar a DP familiar rara, já o polimorfismo de nucleotídeos únicos do gene, pode aumentar o risco de DP esporádica (Cacabelos, 2017; Poewe et al., 2017).

Já os fatores ambientais, compreendem um dos principais fatores na etiologia da DP, principalmente a idiopática, devido ao ser humano estar em constante troca com o meio em que vive. Alguns estudos relatam uma possível interação entre a exposição ocupacional a produtos químicos e o desenvolvimento da DP (Elbaz et al., 2009; Pezzoli e Cereda, 2013; Ball et al., 2019). A exposição a pesticidas (Samii et al., 2004; Simon et al., 2020), metais pesados como por exemplo o manganês, cobre e

chumbo (Ball et al., 2019; Simon et al., 2020), além da ingestão de água não potável podem aumentar a probabilidade de se desenvolver o Parkinson (Samii et al., 2004).

Outro fator seria o estilo de vida, sendo encontrado que tabagismo, o consumo de café, cafeína, chás, dietas com alto consumo de frutas, vegetais e grãos, além de atividade física de alta intensidade diminuem o risco de desenvolver a DP. Já a ingestão de bebidas lácteas e seus derivados podem aumentar o risco, possivelmente pela presença de substâncias tóxicas em altas concentrações no leite (Simon et al., 2020).

2.1.2 Patologia da DP

A neuropatologia da doença é caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na região de gânglios da base, denominada substância nigra de *pars compacta*, resultando na diminuição do neurotransmissor dopamina no corpo estriado (Steidl et al., 2007; Santos et al., 2019) e presença de inclusões, intraneuronais, citoplasmáticas fibrilares, denominadas corpos de Lewy (acúmulo principalmente das proteínas α -sinucleína e ubiquitina) nos neurônios remanescentes (Wirdefeldt et al., 2011; Xicoy et al., 2017; Balestrino e Schapira, 2019; Hansson, 2021).

O aparecimento dos sintomas físicos se dá após a perda de 50 a 60% dos neurônios e a perda de 85% da dopamina presente no estriado. Apesar do aumento de informações sobre a doença, os mecanismos não são totalmente conhecidos (Wirdefeldt et al., 2011). Apesar da perda de neurônios dopaminérgicos não estar bem definida, ela pode estar ligada a vários mecanismos patológicos (figura 1), como disfunção mitocondrial, apoptose, acúmulo de metais de transição, desdobramento e agregação de proteínas, e estresse oxidativo (Hu et al., 2011; Caruana e Vassallo, 2015; Lee et al., 2015; Kim et al., 2019) e neuroinflamação (Simon et al., 2020). Embora a principal característica seja a neurodegeneração dopaminérgica, outras células neuronais, como por exemplo células gliais também podem ser afetadas (Dauere e Przedborski, 2003; Martins Filho, 2011).

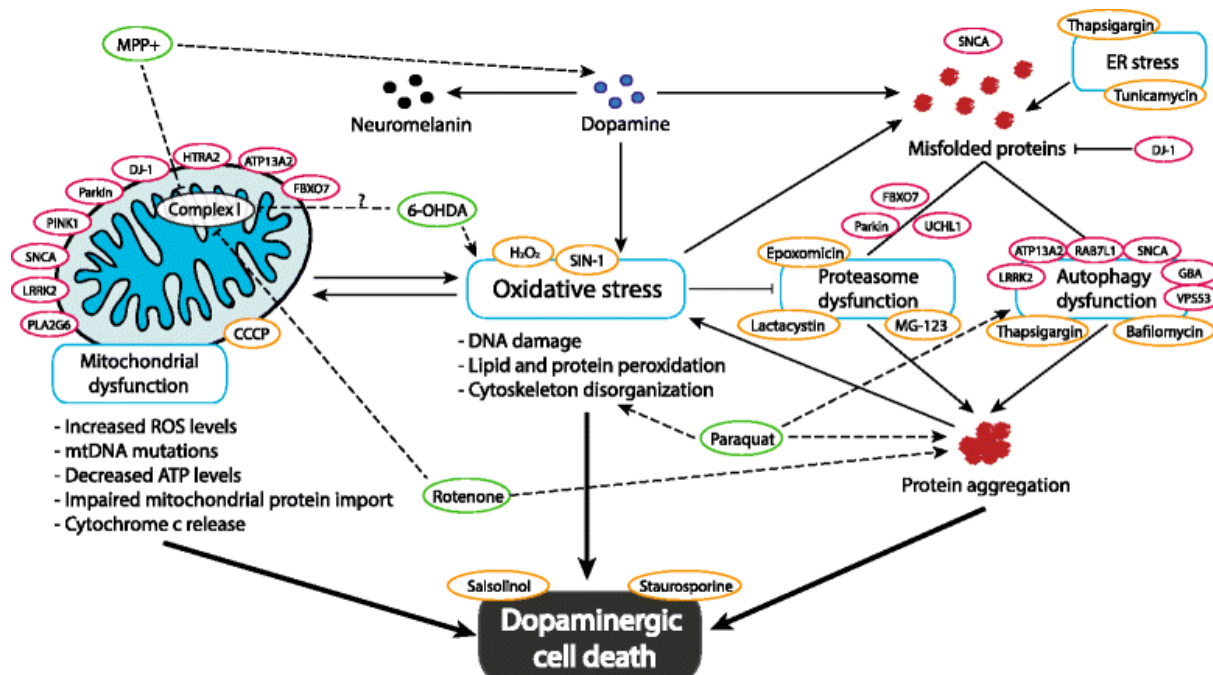


Figura 1. Mecanismos patológicos da Doença de Parkinson que resultam na morte dos neurônios dopaminérgicos. Fonte: Xicoy; Wieringa; Martens (2017).

Um possível mecanismo da degeneração de neurônios dopaminérgicos está ligado a falha na respiração mitocondrial e integridade da membrana relacionado com a DP familiar com mutações genéticas ou DP esporádica ligados ao processo mitocondrial de fosforilação oxidativa, envolvida na produção de energia, na cadeia transportadora de elétrons e efluxo de Ca^{2+} (Dauer e Przedborski, 2003; Martins Filho, 2011; Heger et al., 2021). A cadeia transportadora de elétrons facilita o fluxo de NADH ou FADH_2 e consequentemente a síntese de ATP pela atividade do complexo V através da ATP sintase (Heger et al., 2021).

Sucintamente, na respiração mitocondrial, como resultado do consumo do oxigênio, são formados o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Em condições normais o H_2O_2 é transformado, através da ação das enzimas catalase e glutatona, em água, mas também pode reagir com íons ferro (Fe^{2+}) formando radicais hidroxila altamente reativos. Já o superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO), gerando o peroxinitrito que é altamente reativo e causa danos a nível de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Martins Filho, 2011). Além disso, os neurônios estão mais susceptíveis a danos causado no complexo I, uma vez que a própria metabolização da dopamina gera EROS (Dauer e Przedborski, 2003; Heger et al., 2021; Martins Filho, 2011). Porém, esses subprodutos tóxicos denominados de EROS

podem ser controlados por antioxidantes naturais presentes nas células (Heger et al., 2021).

A α -sinucleína é uma proteína presente fisiologicamente no cérebro humano, ela é naturalmente desagregada e pode assumir estrutura terciária dependendo de interações químicas. Sua agregação de forma anormal é altamente tóxica para os neurônios podendo formar espécies oligoméricas e fibrilares, ativando resposta neuroinflamatória e podendo transferir essa proteína, em estado patológico, de um neurônio a outro. Além disso, a má formação e agregação da α -sinucleína podem estar relacionadas a superexpressão ou mutações no gene responsável pela formação dessa proteína, e ao estresse oxidativo (Jankovic e Tan, 2020).

Uma possível correlação, se dá entre a disfunção mitocondrial e o acúmulo anormal de α -sinucleína (Compagnoni et al., 2020). A α -sinucleína tem sido associada a disfunção mitocondrial principalmente pela interação com componentes da membrana mitocondrial externa aumentando a permeabilidade de membrana devido a abertura de poros de transição (Compagnoni et al., 2020; Malpartida et al., 2021). A α -sinucleína agregada interage com a translocase do complexo da membrana mitocondrial externa (TOM) e o complexo de maquinaria de distribuição e montagem (SAM) dificultando a entrada de proteínas nas mitocôndrias, além do mais ela migra para a membrana interna da mitocôndria e bloqueia canais catiônicos dependente de voltagem presentes. Em adição, a α -sinucleína patológica presente no espaço intermembranar interage com a cadeia transportadora de elétrons levando a depolarização da membrana, dano ao DNA mitocondrial, aumento as EROs, diminuição da atividade do complexo I, produção de ATP e capacidade respiratória. Além disso, a indução da abertura dos poros de transição leva ao efluxo de cálcio, libera o citocromo C para o citosol levando a morte por apoptose (Malpartida et al., 2021).

Além da interação com a α -sinucleína, a baixa atividade do complexo I pode causar excitotoxicidade, além das espécies oxidativas, levando alterações nos níveis de ATP e no influxo de cálcio intracelular (Sherer et al., 2002). Sendo um dos mecanismos que leva a anomalia na atividade desse complexo I da cadeia transportadora de elétrons e consequentemente a morte de neurônios dopaminérgicos (Compagnoni et al., 2020).

Outro mecanismo importante que pode estar ligado a DP, seria a ativação das células gliais. Comprovações em seres humanos (Langston et al., 1983, 1999;

Langston e Ballard JR, 1983) e estudos *in vivo* (Herrera et al., 2000; Kim et al., 2000; Gao et al., 2002) tem sugerido uma relação entre o processo de inflamação decorrente da ativação de células gliais, decorrente da agregação de α -sinucleína, e o processo neurodegenerativo (Parnetti et al., 2019; Vázquez-Vélez e Zoghbi, 2021; Williams et al., 2021).

Muitos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, vem sendo desenvolvidos em relação a doença de Parkinson a fim de reproduzir os achados fisiopatológicos (Xiong et al., 2012; Carrera et al., 2017; Xicoy et al., 2017; Salari e Bagheri, 2019; Santos et al., 2019). Para experimentação *in vivo*, deve-se seguir algumas características como: população neuronal dopaminérgica normal ao nascimento, para posterior perda gradual; necessidade que o modelo apresente manifestações motoras característica da DP; presença de corpos de Lewy nos neurônios remanescentes; em caso de modelos genéticos, é necessário mutação simples que permita propagação normal; e, curto período de experimentação, com avaliação rápida e baixo custo terapêutico (Beal, 2001). Normalmente são utilizadas em modelos animais as substâncias 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), rotenona, paraquat, lipossacarídeo de *Escherichia coli* (LPS); insetos como o gênero *Drosophila* e camundongos transgênicos (Martins Filho, 2011).

Já os modelos *in vitro*, tem a capacidade de oferecer experimentos mais rápidos, diminuir as variáveis externas e também possibilidade de estudar mecanismos de ação possivelmente envolvidos (Martins Filho, 2011). Dentro desse modelo utiliza-se, geralmente, culturas celulares de linhagens derivadas de neurônios dopaminérgicos, pedaços do tecido mesencefálico, e culturas de neurônios de mesencéfalo dissociados (Kitamura et al., 2000; Shimohama et al., 2003; Martins Filho, 2011).

2.1.3 Tratamento da Doença de Parkinson

O tratamento para DP inclui basicamente medicamentos para reposição de dopamina, que não modificam o curso da doença, sendo o tratamento sintomático. Esses tratamentos ainda são eficazes por um curto prazo, pois geram efeitos colaterais indesejáveis resultando em um acúmulo de metabolitos tóxicos da dopamina e EROs (Morales-García et al., 2013; Orme et al., 2013; Hang et al., 2015; Le Douaron et al., 2015). Existem quatro principais categorias de medicamentos que são usados, isoladamente ou em associação, entre eles estão: L-dihidróxifenilalanina

(L-DOPA - levodopa) anticolinérgicos, agonista de receptores dopaminérgicos, inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO) (Martins Filho, 2011; Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022) e inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) (Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022).

A levodopa (figura 2) é o medicamento de primeira escolha para tratamento da DP bem como auxiliar do diagnóstico clínico, pois é bem eficaz contra os sintomas motores. A L-DOPA é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica sendo convertida em dopamina (Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022). Porém, assim como os outros medicamentos antiparkinsonianos, com o passar do tempo de tratamento, os pacientes podem apresentar efeitos colaterais graves, além de gerar metabólitos tóxicos (Cacabelos, 2017). Os principais efeitos colaterais indesejáveis ou efeitos adversos observados no tratamento com esse medicamento são as complicações motoras como flutuações, discinesia, distonia e desgaste; além de sonolência, confusão, alucinações, dificuldade de controle de impulsos, náusea e hipotensão. Esses dois últimos podem ser amenizados com a utilização de inibidores de descarboxilase, como por exemplo carbidopa e benserazida (Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022).

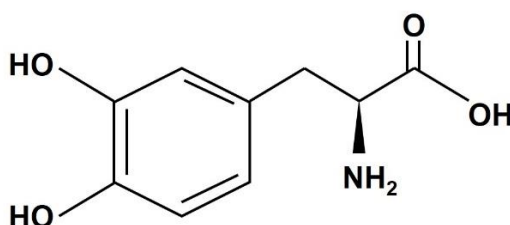


Figura 2. Estrutura química da Levodopa. Utilizada como primeira escolha para tratamento da doença de Parkinson. Fonte: O autor.

Os anticolinérgicos são responsáveis por melhorar o tremor, mas piora a função cognitiva, sendo os principais representantes dessa classe o biperideno, tri-hexifenidil, benzotropina e orfenadrina. Os agonistas dopaminérgicos (pramipexol, ropinirol, rotigotina, apomorfina) podem ser utilizados sozinhos na fase inicial ou em conjunto com a levodopa; possui efeitos colaterais semelhantes a L-DOPA, com adição de edema de perna, e menor risco de discinesia (Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022).

Inibidores da MAO, como rasagilina e seleginina, diminuem a metabolização da dopamina com menos efeitos que a levodopa. Além de uma possível neuroproteção

prevenindo a produção de EROs e aumentando fatores neurotróficos e antiapoptóticos (Robakis e Fahn, 2015; Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022). Outra classe são os inibidores da COMT (tolcapana, entacapona e opicapona) utilizados como coadjuvante inibindo o metabolismo da levodopa e melhorando flutuações motoras (Balestrino e Schapira, 2019; Yefroyev e Jin, 2022).

Além dos tratamentos convencionais, muitos pacientes recorrem a tratamentos não convencionais, denominados de medicina complementar e alternativa (CAM – do inglês *Complementary and alternative medicine*). As CAMs mais utilizadas pelos pacientes com DP são acupuntura, massagens, ervas, vitaminas/suplementos com a finalidade de interromper o curso da doença ou agir nos sintomas decorrentes. No entanto, a prática dessa terapia deve ser realizada com cautela, pois há pouco suporte técnico e evidências de eficácia para essas intervenções em pacientes com Parkinson. Além disso, muitos pacientes relatam não possuir muitas informações sobre a CAM utilizada, bem como a possibilidade de efeitos adversos. Sendo que muitas vezes aderem a essa terapia por meios não científicos, como indicação de terceiros. Além disso, muitos dos pacientes não relatam o uso de CAMs aos seus médicos o que pode levar a falta de eficácia dos tratamentos convencionais, interações medicamentosas com efeitos adversos, dentre outros eventos. (Kim et al., 2016).

Outra opção de tratamento é a estimulação cerebral profunda (DBS), que consiste em uma cirurgia utilizada no tratamento para distúrbios neurológicos onde são registrados os potenciais de campo locais, ou seja, a atividade eletrofisiológica neuronal no local onde está implantado o eletrodo, sendo a partir desta desenvolvida a estimulação cerebral profunda adaptativa (aDBS) para a DP. A atividade eletrofisiológica é registrada através da atividade de diferentes bandas de frequências (delta, teta, alfa, beta, gama e oscilações de alta frequência) (Yin et al., 2021) a fim de reduzir sintomas motores e até mesmo a diminuição da dose dos medicamentos, principalmente em estágios mais avançados da doença melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Balestrino e Schapira, 2019).

Devido a diminuição ao longo do tratamento e visando diminuir os efeitos colaterais e prolongar a eficácia, pesquisas envolvendo compostos fitoquímicos são de grande valor e vem sendo desenvolvidas (Sandoval-Avila et al., 2019). Assim, com o intuito de avaliar o efeito, além dos mecanismos de proteção, os ensaios em culturas

de células são utilizados, principalmente em avaliações iniciais, diminuindo o uso de animais em estudo *in vivo*.

2.2 Cultura de Células - Linhagem celular neuroblastoma humano SH-SY5Y

Muitas doenças neuronais possuem mecanismos complexos que muitas vezes não são totalmente compreendidos, como é o caso da DP que não possui cura, e poucas opções de tratamentos estão disponíveis no mercado. Assim modelos que mimetizem a doença, como modelos animais e celulares, podem contribuir para a descoberta desses mecanismos patológicos e consequentemente em estudos de substâncias promissoras para o tratamento dessas doenças (Heger et al., 2021).

A modelagem através de culturas celulares é muito usada, principalmente, para analisar fatores genéticos, ambientais e patogênese da DP. A linhagem celular SH-SY5Y é a mais utilizada em modelos de Parkinson devido à sua origem humana catecolaminérgica. Essa linhagem foi subdesenvolvida a partir da linhagem SK-N-SH através de três rodadas de clonagem. A célula SK-N-SH foi primeiramente obtida da biópsia da medula óssea de um tumor ósseo metastático de uma paciente de 4 anos idade (Kovalevich e Langford, 2013; Forster et al., 2016; Shipley et al., 2016; Xicoy et al., 2017), sendo a primeira subclonagem, dessa linhagem, para SH-SY. Após nove semanas, a linhagem SH-SY foi clonada novamente para SH-SYS (uma cultura contínua) e reclonadas após doze semanas obtendo a linhagem SH-SY5Y (Ross et al., 1983; Kovalevich e Langford, 2013;).

A linhagem SH-SY5Y possui fenótipo catecolaminérgico, uma vez que apresenta atividade moderada de dopamina β -hidroxilase, atividade de tirosina hidroxilase, níveis insignificantes de colina acetiltransferase, acetil e butil colinesterase, além de ser capaz de liberar adrenalina. A tirosina hidroxilase é uma enzima catalizadora presente na síntese de catecolaminas, convertendo a tirosina em L-dopa que é modificada para a dopamina através da dopamina β -hidroxilase (Xicoy et al., 2017).

A cultura celular da linhagem SH-SY5Y pode incluir tanto células aderentes quanto flutuantes (ambas viáveis), porém, sendo utilizada principalmente pelos pesquisadores as células aderentes, e as outras descartadas no processo de renovação do meio de cultura. Essas células se duplicam em aproximadamente 27 h e a concentração de célula necessária para saturação de crescimento é de 1×10^6

células/cm² (Kovalevich e Langford, 2013). Assim a medida que ocorre o crescimento pode ser observada formação de multicamadas e densos aglomerados celulares focais (figura 3) (Ross et al., 1983; Kovalevich e Langford, 2013;).



Figura 3. Células neuroblastoma SH-SY5Y visualizadas em microscópio óptico em aumento de 4x. Fonte: O autor.

Uma cultura dessa linhagem pode variar em termos de composição do meio, condições de cultivo, diferenciação das células em células com característica somente dopaminérgica e, substância utilizada para mimetizar a doença de Parkinson, por exemplo: 1-metil-4-fenilpiridínio; 6-hidroxidopamina, e rotenona (Xicoy et al., 2017).

Em sua revisão Xicoy e colaboradores (2017) observaram que de 962 estudos utilizando a células SH-SY5Y, a maioria utilizou o meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecccon (DMEM) ou meio Eagle Modificado por Dulbecco/mistura de nutrientes F12 (DMEM/F12), com suplementação em sua maioria de Soro Fetal Bovino (SFB) nas concentrações 10% e 15% e; antibióticos e/ou antimicóticos e glutamina. Em adição, alguns estudos relataram a diferenciação das células em fenótipo dopaminérgico utilizando principalmente o ácido retinóico em diferentes concentrações e tempo de tratamento. Porém essa confirmação é controversa, pois há evidências de alguns estudos que relatam que essa substância poderia induzir um fenótipo colinérgico.

Com o intuito de mimetizar a DP, as substâncias mais utilizadas são a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) e rotenona (figura 4), que desregulam múltiplas vias celulares (figura 1), principalmente gerando estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Xicoy et al., 2017).

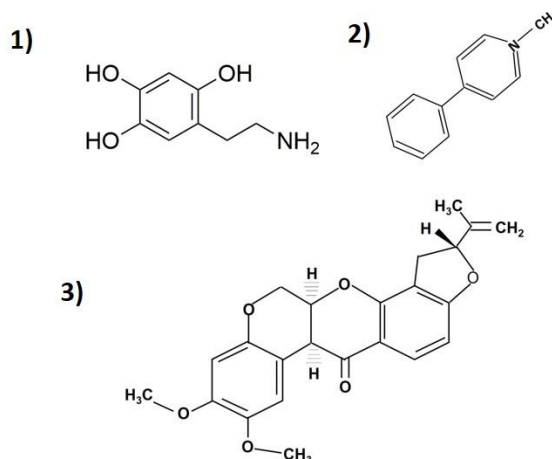


Figura 4. Estrutura química das substâncias mais usadas para mimetizar a doença de Parkinson em modelos *in vitro* e *in vivo*. 1) 6-OHDA; 2) MPP⁺; 3) Rotenona. Fonte: Autor

A 6-OHDA, um análogo tóxico da dopamina, foi a primeira substância utilizada para estudar a DP em modelos *in vivo* e *in vitro*. Ela se acumula em células catecolaminérgicas através de receptores de dopamina ou noradrenalina agindo no complexo I e IV da cadeia de elétrons da mitocôndria, formando EROs e desencadeando a morte celular (Martins Filho, 2011; Xicoy et al., 2017).

O MPP⁺ é um composto tóxico derivado a partir da metabolização do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina). O MPTP foi acidentalmente descoberto quando um estudante tentava produzir o MPPP, uma substância sintética semelhante a heroína. Levando a sintomas de parkinsonismo grave, e levantando a hipótese de que a interação entre ambiente e indivíduos poderiam levar ao desenvolvimento da DP idiopática pela presença de substâncias ou composto exógenos ali presentes. Em experimentos com a linhagem SH-SY5Y o composto utilizado é o MPP⁺ devido à falta da enzima monoamina oxidase-B (MAO-B), presente em células da glia, capaz de metabolizar o MPTP. O MPP⁺ entra na célula através de transportadores de dopamina presentes na membrana celular, podendo ficar armazenado no sinaptossomos, interagir com enzimas citoplasmáticas ou inibir o complexo I mitocondrial (Martins Filho, 2011; Xicoy et al., 2017).

A rotenona é um pesticida altamente hidrofóbico, que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e atua na inibição do complexo I mitocondrial. Ela é uma das substâncias mais utilizadas em modelo de Parkinson pois tem capacidade de degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos presentes na região nigroestriatal e a formação de corpos de Lewy em neurônios remanescentes (Martins Filho, 2011; Xicoy et al., 2017; Compagnoni et al., 2020). Além disso, em modelo *in*

vivo, possibilita gerar sintomas motores como bradicinesia, locomoção instável e tremor (Martins Filho, 2011; Compagnoni et al., 2020).

Quando comparadas as três substâncias, o 6-OHDA possui rápida perda de neurônios e terminais dopaminérgicos em toda a região nigroestriatal, além da ausência de agregados de α -sinucleína (um dos achados clínicos da DP). Já o MPTP é utilizado justamente por ser um inibidor do complexo I mitocondrial (um fator importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas) não possui capacidade de replicar a progressão crônica da DP e necessidade de metabolização enzimática para um composto ativo (MPP⁺). Por último, têm-se a rotenona que possui vantagens por atravessar a barreira hematoencefálica, facilitar a formação agregados de α -sinucleína, além de reproduzir grande parte dos sintomas motores e características histopatológicas *in vivo* (Xiong et al., 2012).

Assim estudos envolvendo compostos ou extratos derivados de espécies vegetais em cultura celular no modelo de Parkinson induzido por essas substâncias vem sendo desenvolvidas, obtendo resultados promissores (Dhanalakshmi et al., 2015; Marrazzo et al., 2019). Sabe-se ainda que a espécie *Limonium brasiliense* possui atividades bem documentas, até mesmo com efeito neuroprotetor contra a doença de Alzheimer (Sereia et al., 2019), sendo, portanto, um potencial para estudo em DP.

2.3 Aspectos gerais *Limonium brasiliense*

A família Plumbaginaceae Juss. é rica em quantidade de espécies possuindo uma vasta diversidade. Suas espécies podem ser utilizadas tanto para finalidade de enfeitar jardins quanto para usos medicinais. Um dos gêneros com maior número de espécies dessa família é o *Limonium* (Koutroumpa et al., 2018). As espécies desse gênero são popularmente utilizadas para tratar febre, hemorragia, infecções, dentre outras patologias. Muitos dos compostos presentes foram identificados e isolados primeiramente da espécie *Limonium bonducellii* (T.Lestib.) Kuntze como o composto aureusidina 4-glicosídeo (cernuosídeo), eriodictiol, luteolina, apigenina, e ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (Amrani et al., 2017).

Os efeitos farmacológicos conhecidos desse gênero são diversos, incluindo ação anti-inflamatória, antiviral, antipirética, hemostática, depurativa, antifúngica,

antimicrobiana, antioxidante, neuroprotetora (Amrani et al., 2017) e antitumoral (Amrani et al., 2017; Bae et al., 2017).

Uma das espécies estudadas devido as suas propriedades farmacológicas é o *L. brasiliense* (figura 5). Essa espécie é uma das 650 na família, sendo uma erva terrícola encontrada no Uruguai, Argentina e Brasil (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004; Blainski et al., 2013; Antonelli-Ushirobira et al., 2015a,b; Blainski et al., 2017a, 2017b; Caleare et al., 2017). Em território brasileiro é distribuída geograficamente na região Sudeste (principalmente no Rio de Janeiro) e Sul (Funez, 2019a, 2019b). Conhecido popularmente como baicuru, baycurú, guairacá ou guaicuru (Dias da Silva, 1920), tradicionalmente é utilizada em corrimento vaginal, dismenorreia, e inflamação geniturinária (Mentz e Schenkel, 1989), regulador menstrual (Lifchitz, 1981; Antonelli-Ushirobira et al., 2015a,b), como adstringente, cardioprotetor e depurativo (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004; Blainski et al., 2013; Blainski et al., 2017b; Caleare et al., 2017).



Figura 5. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae). (A) partes aéreas e rizomas, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata dos rizomas. Fonte: Blainski (2010).

Até 2015 os trabalhos publicados sobre o *L. brasiliense* se referiam às raízes da planta, porém estudo realizado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015b) comprovou que a parte utilizada se trata dos rizomas.

2.3.1 Aspectos químicos de *Limonium brasiliense*

Estudos sobre a composição química da espécie *L. brasiliense* determinaram a presença de ácido 4-O-metilgálico, três saponinas triterpênicas de estruturas não elucidadas, sitosterol, taninos condensados e taninos hidrolisáveis (Rosito, 1975), flavona, isoflavona, flavonona, ácido gálico, ácido elágico, benzoato de benzila, β -sitosterol, sacarose, miricetina, cumarinas e três saponinas triterpênicas (Moura et al., 1985). Além disso, Murray et al. (2004) isolaram através de cromatografia e identificaram por espectrofotometria de ultravioleta (UV), e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , as substâncias miricetina-3-O- α -ramnosídeo, (-) - epigalocatequina 3-O-galato, (-)-epigalocatequina, (+)-galocatecina e ácido gálico. Em adição as substâncias isoladas citadas acima, Blainski (2016) isolou e identificou, substâncias como miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo miricetina-3-O- β -D-galactosídeo-6"-galato, epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8), epigalocatequina-3-O-galato e monômeros e dímeros do tipo B duplamente ligados, como epigalocatequina-3-O-(2'→O→4")-galato,epigalocatequina-3-O-(2'→O→3")-galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B. Outros estudos elucidaram as substâncias epigalocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B (Caleare et al., 2017; Isolani, 2018).

Estudo recente identificou, através de RMN ^1H e ^{13}C , os compostos prodelfinidina B1-3,3'-digalato, miricetina, apigenina, taxifolina, 3-O-acetiltaxifolina, miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo e ácido gálico na fração aquosa (FAQ) de *L. brasiliense* (Rodriguez et al., 2021).

2.3.2 Aspectos farmacológicos de *Limonium brasiliense*

As atividades farmacológicas encontradas investigando a espécie *L. brasiliense* foram antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, hormonal, antioxidante e citoprotetora.

Um estudo realizado por Rosito (1985) demonstrou potencial efeito antimicrobiano do extrato bruto de rizomas de *L. brasiliense* quando testado em microrganismos como *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus*. Já Caleare e colaboradores (2017) avaliaram se o extrato bruto (EB) seria capaz de impedir a adesão da bactéria patogênica *Porphyromonas gingivalis* ao tecido epitelial em modelo *in vitro* utilizando célula epitelial humana KB. Como resultado, os autores obtiveram que o EB em concentrações $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir a adesão, bem

como diminuir as atividades das gingipaínas além de não oferecer citotoxicidade às células testadas. Outros estudos também apresentaram resultados positivos quando avaliaram diferentes extratos em algumas cepas como *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Staphylococcus epidermidis* (Blainski et al., 2017b; Cordeiro, 2017).

Os efeitos antivirais do extrato de *L. brasiliense* também foram investigados. A ação foi avaliada contra o vírus herpes simples tipo I (HSV-1) inibindo, *in vitro*, a replicação viral na concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) de 185 µg/mL (Faral-Tello, et al., 2012). Já Isolani (2018) avaliou, além do EB, as substâncias isoladas da fração acetato de etila (FAE) samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3-O-galato, sendo que os melhores resultados apresentados foram do EB com CC₅₀ de 85 ± 5 µg/mL e epigalocatequina-3-O-galato com CC₅₀ de 66,67 ± 15,28 µg/mL.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*. Os autores observaram redução do edema de pata de rato induzido por carragenina, quando administrado, por via intraperitoneal, 250 mg/kg de EB, porém com sinais expressivos de toxicidade em 2,0 g/kg, não sendo relatado morte em concentração de 1,5 g/kg por via intravenosa (Moura et al., 1985). Rodriguez e colaboradores (2011) avaliaram a ação do EB e da substância isolada miricetina-3-O-ramnosídeo, em linhagem celular RAW 264.7, frente a estimulação inflamatória com lipopolissacarídeos, obtendo melhor resultado com a substância isolada contra a superprodução de óxido nítrico.

A atividade hormonal foi avaliada, em modelo *in vivo* (ratas), por Blainski (2010) nas concentrações 400, 800, 1200 mg/kg de EB. Os resultados demonstraram tendência em diminuir a idade de abertura do canal vaginal, quando comparado os grupos tratados e controle, com efeito do tipo antiestrogênico. Outro estudo avaliou a segurança e atividade hormonal, também *in vivo*, do EB. Na avaliação da toxicidade, a dose letal para matar 50% dos animais (DL₅₀), foi de 4,8 g/kg, com baixo potencial mutagênico em doses menores que 2,0 g/kg. Além disso, foi relatado provável efeito no sistema reprodutor feminino, adiamento da abertura do canal vaginal, aumento do peso relativo do útero e ações no estrogênio e progesterona (Antonelli-Ushirobira et al., 2015a, 2015b)

Outra atividade investigada do rizoma de *L. brasiliense* é a atividade antioxidante. Essa atividade foi avaliada pelo método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

(DPPH) por Murray e colaboradores (2004), e o resultado foi expresso em CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% da concentração inicial de DPPH) apresentando bons resultados para extrato bruto e o composto miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (20,0 e 40,0 μ M, respectivamente) quando em comparação com a quercetina (20,7 μ M). Além disso, Sereia e colaboradores (2019) avaliaram essa ação pelos métodos de DPPH, redução de ferro (FRAP), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico (ABTS) e atividade da xantina oxidase, do EB e FAE confirmando a atividade antioxidante do extrato e demonstrando a atividade da fração.

Além das atividades acima citadas, um único estudo relatou atividade citoprotetora da FAE dessa espécie vegetal. Sereia e colaboradores (2019) avaliaram, pelo método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (MTT) a citotoxicidade e citoproteção da fração em linhagem celular neuroblastoma humano SH-SY5Y. Como resultado, não foi demonstrado efeito citotóxico nas concentrações 7,81, 15,62, 31,2 e 62,5 μ g/mL em 24 h de tratamento, e o pré-tratamento com a fração foi capaz de proteger as células, nas concentrações 7,81, 15,62 e 31,25 μ g/mL, contra o dano induzido por β A25-35 (um biomarcador da doença de Alzheimer).

Diante do exposto, pode-se considerar que a *L. brasiliense* é uma espécie ainda pouco explorada, sendo que até o momento não foram encontrados estudos que avaliem essa espécie vegetal em modelo de Parkinson, principalmente em cultura celular neuronal, possuindo um grande potencial a ser descoberto.

Assim, neste estudo foi investigado o potencial do extrato bruto (EB) e frações sobre a viabilidade, neuroproteção e detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais, determinação da integridade da membrana celular, determinação do potencial transmembrânico mitocondrial, em modelo de Parkinson induzido por rotenona em células neuroblastoma humano SH-SY5Y.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito protetor de extratos de rizomas de *Limonium brasiliense* em células neuroblastoma humano SH-SY5Y no modelo de doença de Parkinson induzido por rotenona.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade da rotenona frente a linhagem SH-SY5Y;
- Investigar o efeito do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* sobre a viabilidade celular em modelo de morte celular induzida por rotenona em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos protetores do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* frente ao aumento da produção de EROs induzido pela rotenona em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos protetores do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* frente diminuição da integridade da membrana celular induzida pela rotenona em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* frente ao potencial transmembrânico mitocondrial induzido pela rotenona em cultura de células SH-SY5Y;
- Avaliar os efeitos exercidos pelo EB, FAE e FAQ na recuperação dos níveis de ATP intracelular diminuídos pela rotenona.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produtos Químicos

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), solução antibiótico-antimicótica e tripsina foram obtidos da Gibco pela Life Technologies Inc. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] foi obtido da Sigma-Aldrich. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de potássio (KCl), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Synth (Labsynth, São Paulo, Brasil). Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau mais puro comercialmente disponível.

4.2. Material Vegetal

O rizoma de *L. brasiliense* foi coletado em fevereiro de 2013, na Ilha dos Marinheiros (31°59'33" S, 52°10'43" W), município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM) sob número 27725. A coleta foi realizada mediante autorização IBAMA-SISBIO (n° 11995-3, de 2 de novembro de 2010, com código de autenticação 46367613), sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado sob n°. 010252/2015-0. A identificação, ao nível específico, foi realizada pela Profa. Dra. Lilian Auler Mentz da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.3. Secagem e moagem

O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar ($37 \pm 2^\circ\text{C}$), fragmentado em moinho de martelos (Tigre ASN6), e acondicionado ao abrigo da luz e umidade.

4.3.1 Preparo do extrato bruto (EB)

O EB, foi produzido através do processo de turbólise (Ultra-Turrax®, UTC115KT, Ika® Works), onde foi utilizado 1 kg do rizoma de *L. brasiliense* cominuída e acetona:água (7:3, v/v) como líquido extrator, numa proporção de 1:10 (p/v). A extração foi realizada durante 20 min, com intervalos de 5 min para que a temperatura de extração fosse mantida abaixo de 40°C (Blainski, 2016). O extrato foi filtrado em

funil de Büchner, sob pressão reduzida. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório (Büchi® R-200), sob pressão reduzida, até eliminação de todo o solvente orgânico. O extrato foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado (Christ® alpha 1-2) (Mello; et al., 1996; Blainski et al., 2013).

4.3.2 Partição líquido-líquido a partir do extrato bruto

Foram dissolvidos 50 g do EB em 500 mL de água destilada, proporção 1:10 (m/v) e, adicionaram-se 500 mL de acetato de etila em funil de separação para a realização da partição. Em cada extração, a fase acetato de etila foi separada e reservada e a fase aquosa foi retornada ao funil de separação, adicionando-se mais 500 mL de acetato de etila, repetindo-se este processo por mais nove vezes, totalizando dez extrações (Mello; et al., 1996; Blainski et al., 2013). As fases acetato de etila foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Büchi® R-200), até eliminação de todo o solvente orgânico. A fase acetato de etila e a fase aquosa concentradas foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas (Christ® Alpha 1-2), obtendo-se a FAE (com rendimento de 10,4%) e a fração aquosa FAQ (com rendimento de 72,4%).

4.4. Atividade biológica *in vitro*

4.4.1 Cultura de células

Células neuroblastoma humano SH-SY5Y foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm³ ou 75 cm³, em 6,0 mL ou 11,0 mL de meio DMEM respectivamente, suplementado com 10,0% de SFB, 1,0% de solução antimicrobiano (penicilina-estreptomicina) e 3,7 g de NaHCO₃ sob condições de incubação de 37,0 °C em atmosfera de 5,0% de CO₂ (Chierito et al., 2019) As células foram subcultivadas com 0,1% de tripsina-EDTA quando ≥ 90% de confluência, mantendo um quarto (1:20) da população celular. Durante o período de manutenção da linhagem celular, foi realizado congelamento das células com SFB a 10% de DMSO.

4.4.2 Atividade metabólica e viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (Mosmann, 1983). Esse teste baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, dando origem, intracelularmente, a cristais azuis (Formazan). A redução do MTT ocorre por meio de uma reação enzimática dependente de NADH, realizada principalmente pela enzima succinato desidrogenase.

As células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SBF, sem antibiótico. Em seguida, 100 µL de suspensão celular de neuroblastoma SH-SY5Y na concentração $5,0 \times 10^5$ células/mL, foram transferidos para placa de cultura de 96 poços e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Decorrido o tempo de estabilização, o meio de cultura foi substituído e a monocamada celular tratada com 200 µL de rotenona nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 nM diluídos em meio sem SBF e antibiótico (figura 6). As placas foram incubadas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Duas condições de controle negativo (apenas meio de cultivo DMEM e uma mistura de DMEM mais 0,5% de DMSO) foram usadas como um controle para a análise estatística. Ao término do tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) incubados por 4 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Após, o sobrenadante foi removido e os cristais de Formazan solubilizados com 100 µL de DMSO. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (EPOCH 2) a 570 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação (1):

$$(\%) \text{ de viabilidade celular} = 1 - (\text{Abs}_{\text{Tratamento}} / \text{Abs}_{\text{CN}}) \times 100 \quad (1)$$

Onde: Abs_{Tratamento} é a absorbância do tratamento e Abs_{CN} é a absorbância do controle negativo.

O controle negativo (apenas meio de cultivo DMEM e DMEM + 0,5% de DMSO) foi considerado como 100% de viabilidade celular. Em todos os experimentos foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento e com viabilidade celular igual ou superior a 90%, determinada pela técnica de azul de Trypan, em câmara de Neubauer. Com esses resultados, foi possível determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) da proliferação celular.

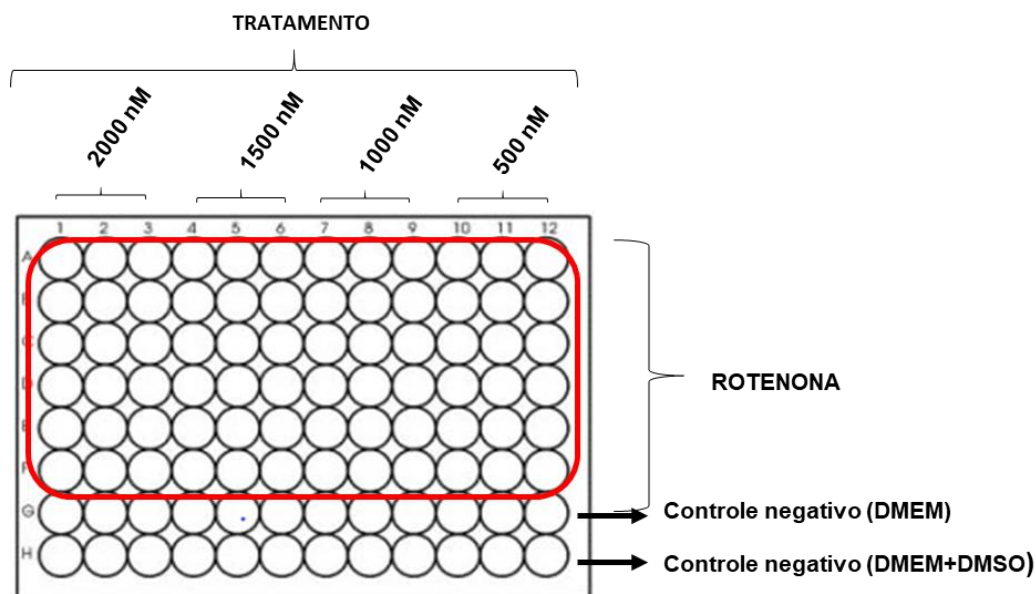


Figura 6. Avaliação da citotoxicidade da rotenona. Controle negativo: células e meio (DMEM e células+meio+DMSO). Tratamento: células tratadas com as concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 nM de rotenona dissolvida em DMEM+ 0,5% DMSO.

4.3 Neuroproteção

Para a avaliação da neuroproteção do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram utilizadas as mesmas condições de cultivo. Após a estabilização por 24 h as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de EB (1,95; 3,90; 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$), FAE (1,95; 3,90; 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$) e FAQ (1,95; 3,90; 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$), todos em DMEM e DMSO, por uma hora.

Após uma hora, o tratamento foi combinado com uma concentração inicial de rotenona a fim de atingir a concentração final selecionada de acordo com a determinação do CI_{50} , (figuras 7 e 8) e incubado por mais 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO_2 . Para condição de controle de solvente - controle negativo foi utilizado DMEM puro e DMEM + 0,5% de DMSO e um controle de impacto de rotenona - controle positivo (rotenona solubilizada em DMEM puro). Após 24 h, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 100 μL de MTT (0,5 mg/mL) em todos os poços e as placas foram incubadas por 4 h. A solução de MTT foi então removida e 100 μL de DMSO foram adicionados a todos os poços para dissolver os cristais Formazan. As placas foram agitadas durante um minuto e lidas em espectrofotômetro (EPOCH 2) utilizando um comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram analisados e expressos como porcentagens em relação ao controle negativo. O pré-tratamento e o

tratamento foram realizados com base em estudos anteriores com algumas alterações (Qualls et al., 2014; Manigandan et al., 2019; Sereia, 2019).

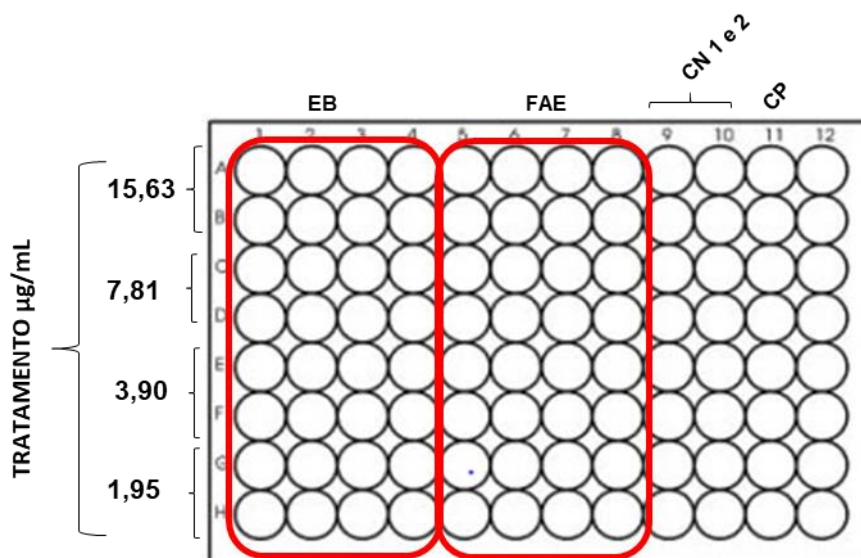


Figura 7. Avaliação do efeito protetor do EB e FAE, nas concentrações 1,95, 3,90, 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$ frente ao dano causado pela rotenona. CN 1 e 2: controle negativo1: células e meio e controle negativo 2: células e meio+ 0,5% DMSO; CP: controle positivo de rotenona.

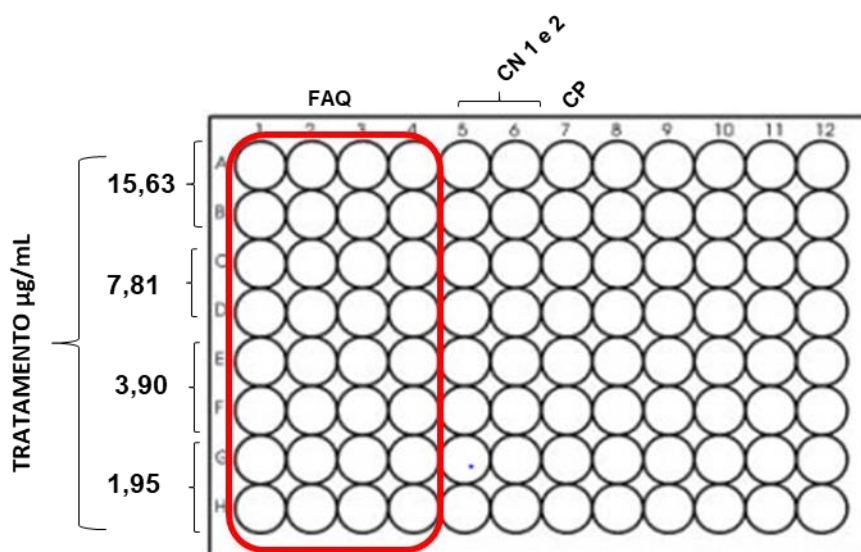


Figura 8. Avaliação do efeito protetor da FAQ, nas concentrações 1,95, 3,90, 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$ frente ao dano causado pela rotenona. CN 1 e 2: controle negativo1: células e meio e controle negativo 2: células e meio + 0,5% DMSO; CP: controle positivo de rotenona.

4.4 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais (H_2DCFDA)

As células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SBF, sem antibiótico. Em seguida, 750 μL de suspensão celular de neuroblastoma SH-SY5Y na concentração $5,0 \times 10^5$ células/mL, foram transferidos para placa de cultura de 12 poços e mantidas por 24 h a $37,0^\circ\text{C}$ em 5,0% de CO_2 . Depois do tempo de estabilização de 24 h o meio de cultura foi substituído e as células

foram pré-tratadas com 1 mL de EB, FAE e FAQ (diluídos em DMEM puro), nas concentrações em que houve melhor resultado de neuroproteção, e incubadas por uma hora (3,90 e 7,81 µg/mL). Em seguida, as células foram tratadas com 200 µL de rotenona a fim de atingir a concentração utilizada no teste de neuroproteção. As placas foram incubadas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Três condições de controle foram realizadas: controle do positivo do experimento (Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂), controle positivo (rotenona) e controle negativo (DMEM puro) foram usadas para a análise estatística.

Após 24 h de incubação, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM puro. As suspensões celulares de cada poço transferidas para microtubos previamente identificados e centrifugados por 5 min a 21,5 x g (Eppendorf – modelo 5415R).

O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido com PBS e novamente centrifugado (essa etapa foi repetida duas vezes para garantir a retirada de todo resto celular). As células foram novamente ressuspendidas em 497,5 µL de PBS e e marcadas H₂DCFDA (10 µM), sendo os microtubos incubados a 37,0 °C por 45 min no escuro. Após o tempo de incubação, foram transferidos 500 µL da suspensão celular para tubos de citometria previamente identificados e realizada a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com software CellQuest (Shukla et al., 2012).

4.5 Determinação da integridade da membrana celular

As células foram ressuspensas e meio de cultura contendo 10% de SFB, sem antibiótico. Em seguida, 750 µL de suspensão celular de neuroblastoma SH-SY5Y na concentração 5,0 x10⁵ células/mL, foram transferidos para placa de cultura de 12 poços e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Depois do tempo de estabilização de 24 h o meio de cultura foi substituído e as células foram pré-tratadas com 1 mL de EB, FAE e FAQ (diluídos em DMEM puro), nas concentrações em que houve melhor resultado de neuroproteção (3,90 e 7,81 µg/mL), e incubadas por uma hora. Após, foram adicionados 200 µL de rotenona aos poços a fim de atingir a concentração utilizada no teste de neuroproteção. As placas foram incubadas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Três condições de controle foram realizadas: controle positivo do experimento (DIG - digitonina), controle positivo (rotenona) e controle negativo (DMEM puro) foram usadas para a análise estatística.

Após 24 h de tratamento, as células foram ressuspensas em DMEM puro. As suspensões celulares de cada poço transferidas para microtubos previamente identificados e centrifugados por 5 min a 21,5 x g (Eppendorf – modelo 5415R).

O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido com PBS e novamente centrifugado (essa etapa de lavagem foi repetida duas vezes). Logo em seguida, as células foram ressuspensas em 450 µL de PBS e 50 µL de Iodeto de Propídio (IP) (2 µg/mL); no controle positivo do experimento além do IP, foi adicionado 2,5 µL de DIG (solução estoque de 40 µM) e 447,5 µL de PBS; e incubados por 5 min no escuro à 37,0 °C. Em seguida, foram transferidos 500 µL do inóculo para tubos de citometria e realizada a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com software CellQuest para análise dos resultados (Lazarin-Bidóia et al., 2016).

4.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

As células foram tripsinizadas e ressuspensas e meio de cultura contendo 10% de SFB, sem antibiótico. Em seguida, 750 µL de suspensão celular de neuroblastoma SH-SY5Y na concentração $5,0 \times 10^5$ células/mL, foram transferidos para placa de cultura de 12 poços e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Depois do tempo de estabilização de 24 h, o meio de cultura foi substituído e as células foram pré-tratadas com 1 mL de EB, FAE e FAQ (diluídos em DMEM puro), nas concentrações em que houve melhor resultado de neuroproteção (3,90 e 7,81 µg/mL), e incubadas por uma hora. Após, foram adicionados 200 µL de rotenona aos poços a fim de atingir a concentração utilizada no teste de neuroproteção. As placas foram incubadas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Três condições de controle foram realizadas: controle positivo do experimento (CCCP - carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona), controle positivo (rotenona) e controle negativo (DMEM puro) foram usadas para a análise estatística.

Após 24 h de tratamento, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM puro. As suspensões celulares de cada poço transferidas para microtubos previamente identificados e centrifugados por 5 min a 21,5 força G (Eppendorf – modelo 5415R).

O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido com solução salina 0,9% e novamente centrifugado (essa etapa de lavagem foi repetida duas vezes). Logo em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução

salina 0,9% e 1 µL de solução de Rh 123 (5 mg/mL); no controle positivo do experimento além da rodamina, foi adicionado 4 µL de CCCP (solução estoque de 25000 µM) e 996 µL de salina por 15 min no escuro à 37,0 °C. Após, foram novamente lavadas, ressuspensas em 500 µL de solução salina e incubadas por 30 min adicionais. Em seguida, foram transferidos 500 µL do inóculo para tubos de citometria e realizada a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com software CellQuest para análise dos resultados. CCCP (100 µM) foi usado como controle positivo do experimento (Menna-Barreto et al., 2005). As alterações na fluorescência de Rh123 foram quantificadas usando um índice de variação (IV) obtido da equação (2). Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial.

$$IV = (MT - MC) / MC \quad (2)$$

Onde MT é a fluorescência mediana das células tratadas e MC, a fluorescência mediana das células não tratadas.

4.7 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

As células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SFB, sem antibiótico. Em seguida, 100 µL de suspensão celular de neuroblastoma SH-SY5Y na concentração $5,0 \times 10^5$ células/mL, foram transferidos para placa de cultura de 96 poços e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Depois do tempo de estabilização de 24 h, o meio de cultura foi substituído e as células foram pré-tratadas com 200 µL de EB, FAE e FAQ (diluídos em DMEM puro), nas concentrações em que houve melhor resultado de neuroproteção (3,90 e 7,81 µg/mL), e incubadas por uma hora. Depois, o tratamento foi combinado com uma concentração inicial de rotenona a fim de atingir a concentração final selecionada de acordo com a determinação do CI₅₀. As placas foram incubadas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂. Três condições de controle foram realizadas: controle positivo do experimento (KCN), controle positivo (rotenona) e controle negativo (DMEM puro) foram usadas para a análise estatística.

Após 24 h de tratamento, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM puro. As suspensões celulares de cada poço transferidas para microtubos previamente identificados e centrifugados por 5 min a 21,5 x g (Eppendorf – modelo 5415R).

O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensionado com PBS e novamente centrifugado (essa etapa de lavagem foi repetida duas vezes). Logo em seguida, as células foram ressuspensionadas em 500 μ L de PBS; no controle positivo do experimento foram adicionados 50 μ L de KCN (solução estoque de 5000 μ M) e 450 μ L de PBS, sendo lavado mais uma vez com PBS. Em seguida, foram transferidos 50 μ L do inóculo para poços da placa de 96 poços branca, acrescidos de 50 μ L do Kit Cell Titer-Glo e incubados por 10 minutos no escuro.

A leitura da luminescência foi realizada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer) a 590 nm. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, e realizada uma diluição 1:5 com formalina (400 μ L de formalina e 100 μ L de inóculo).

4.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade da rotenona em células neuroblastoma humano SH-SY5Y

A viabilidade celular da linhagem neuroblastoma humano SH-SY5Y frente ao dano causado pela rotenona foi avaliada através do método colorimétrico de MTT. Conforme demonstrado na figura 9, foi possível observar uma atividade concentração-dependente da rotenona na viabilidade das células em 24h. A redução da viabilidade celular foi diretamente proporcional ao aumento da concentração testada, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Nas concentrações 500, 1000, 1500 e 2000 nM, a viabilidade foi de 74,08, 70,89, 53,95 e 41,93%, respectivamente, em relação ao controle (100% de viabilidade). O máximo de concentração utilizada (0,5%) de DMSO não afetou o crescimento das células.

Em relação à concentração de rotenona citotóxica para 50% da população, a concentração média foi de $1.702,11 \pm 2,51$ nM, sendo a concentração utilizada para os experimentos posteriores de neuroproteção.

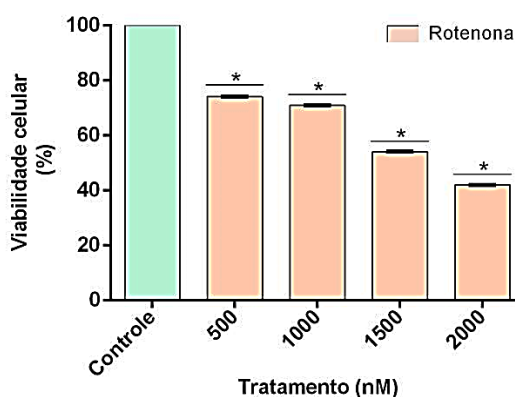


Figura 9. Efeito da rotenona na citotoxicidade celular. Células de neuroblastoma SH-SY5Y foram tratadas com diferentes concentrações (500, 1000, 1500 e 2000 nM) de rotenona por 24 h. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução de MTT. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As letras sobrescritas no topo das barras (*) indicam diferenças estatisticamente significativa entre a comparação de múltiplas condições por ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), realizado no software GraphPad Prism 9.

Resultados semelhantes foram encontrados por Manigandan e colaboradores (2019), no qual a viabilidade celular também diminuiu conforme a concentração testada. A viabilidade diminuiu entre 50% a 60% na concentração de 100 nM de rotenona. Em outro estudo, uma concentração de 100 nM de rotenona foi capaz de causar a morte em $\sim 50\%$ da população celular na concentração de 3×10^3 de células

SH-SY5Y (Dhanalakshmi et al., 2015). Corroborando com os resultados apresentados, um estudo utilizando células SK-N-SH, sob a mesma concentração celular (3×10^3 células/poço) também demonstrou que 100 nM de rotenona diminuiu a população celular para $55 \pm 4\%$ (Jayaraj et al., 2013). Vale ressaltar que a concentração de células utilizada nesses estudos foi menor, sendo assim a concentração citotóxica também diminuiu. Na diminuição da viabilidade causada pela rotenona observa-se grandes deformações morfológicas e retração de neurites o que confirmam a indução da morte celular por esse pesticida (Pakrashi et al., 2020).

Além dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância nigra de *pars compacta*, outros microcomponentes cerebrais (microglia – células gliais e astrogliais) também podem ser afetados em doenças neurodegenerativas, devido a neuroinflamação. Pensando nisso, Swarnkar e seus colaboradores (2012), avaliaram os danos induzidos pela rotenona na linhagem celular C6 astrogliar de ratos, e se a melatonina (um agente antioxidante) poderia ser capaz de inibir os efeitos desse pesticida na astroglia. Como resultados, a viabilidade celular foi de 74,83%, 61,55% e 49,37% nas concentrações 0,1, 1,0 e 10 μM de rotenona, respectivamente. Em contrapartida, a melatonina foi capaz de proteger as células quando 300 μM foram adicionados a 1 μM de rotenona (viabilidade 99,61% melatonina+ rotenona) e 100 e 300 μM juntamente com 10 μM de rotenona, com a viabilidade de 85,15% e 101,5% respectivamente. Dessa maneira a rotenona foi capaz de ativar as células astrogliais por meio da geração do estresse oxidativo e melatonina de inibir tal efeito (Swarnkar et al., 2012).

Um ponto a ser observado é que a concentração de rotenona necessária para causar danos nas células dopaminérgicas, apresentadas nesse trabalho, é menor do que a encontrada para células semelhantes as astrogliais (10 μM) (Swarnkar et al., 2012), sendo assim essas células podem ser afetadas primeiro, induzindo a morte de células vizinhas, e gerando uma cascata de danos em outras células.

5.2 Efeito neuroprotetor do EB, FAE e FAQ de *L. brasiliense* contra os danos causados pela rotenona em células neuroblastoma SH-SY5Y

A fim de proteger a linhagem neuroblastoma humano SH-SY5Y contra os danos causados pela rotenona, foi avaliado os efeitos protetores do EB, FAE e FAQ do *L. brasiliense* através do método colorimétrico de MTT. As concentrações de tratamentos foram escolhidas baseadas em experimentos previamente realizados onde nas

concentrações testadas (15,63 e 7,81 µg/mL) a viabilidade ficou acima de 80% no EB e frações (Chierrito, 2021). Assim, quatro concentrações foram avaliadas (1,95, 3,90, 7,81 e 15,63 µg/mL) frente a rotenona (tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade celular da linhagem neuroblastoma humano SH-SY5Y quando pré-tratadas com EB, FAE e FAQ contra os danos causados pela rotenona.

Viabilidade Celular (%) ± dp			
Concentração (µg/mL)	EB	FAE	FAQ
15,63	45,44 ± 0,036	35,25 ± 0,036	50,85 ± 0,036
7,81	87,62 ± 0,012	81,05 ± 0,017	80,12 ± 0,005
3,9	85,3 ± 0,001	84,0 ± 0,015	76,85 ± 0,019
1,95	72,47 ± 0,010	73,47 ± 0,022	68,58 ± 0,041
Rotenona	50,59 ± 0,061	51,12 ± 0,053	54,97 ± 0,035

Legenda. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. Dp: desvio padrão

Dessa maneira, como observado na figura 10, em relação ao controle positivo (rotenona), houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na morte celular nas concentrações 7,81, 3,90 e 1,95 µg/mL testadas de todos os tratamentos (EB e frações), tendo ainda, nas concentrações 7,81 e 3,90 µg/mL, um maior aumento na viabilidade celular, assim sendo essas concentrações escolhidas para os posteriores experimentos. Além disso, na concentração 15,63 µg/mL de EB e FAE houve um aumento significativo na morte celular.

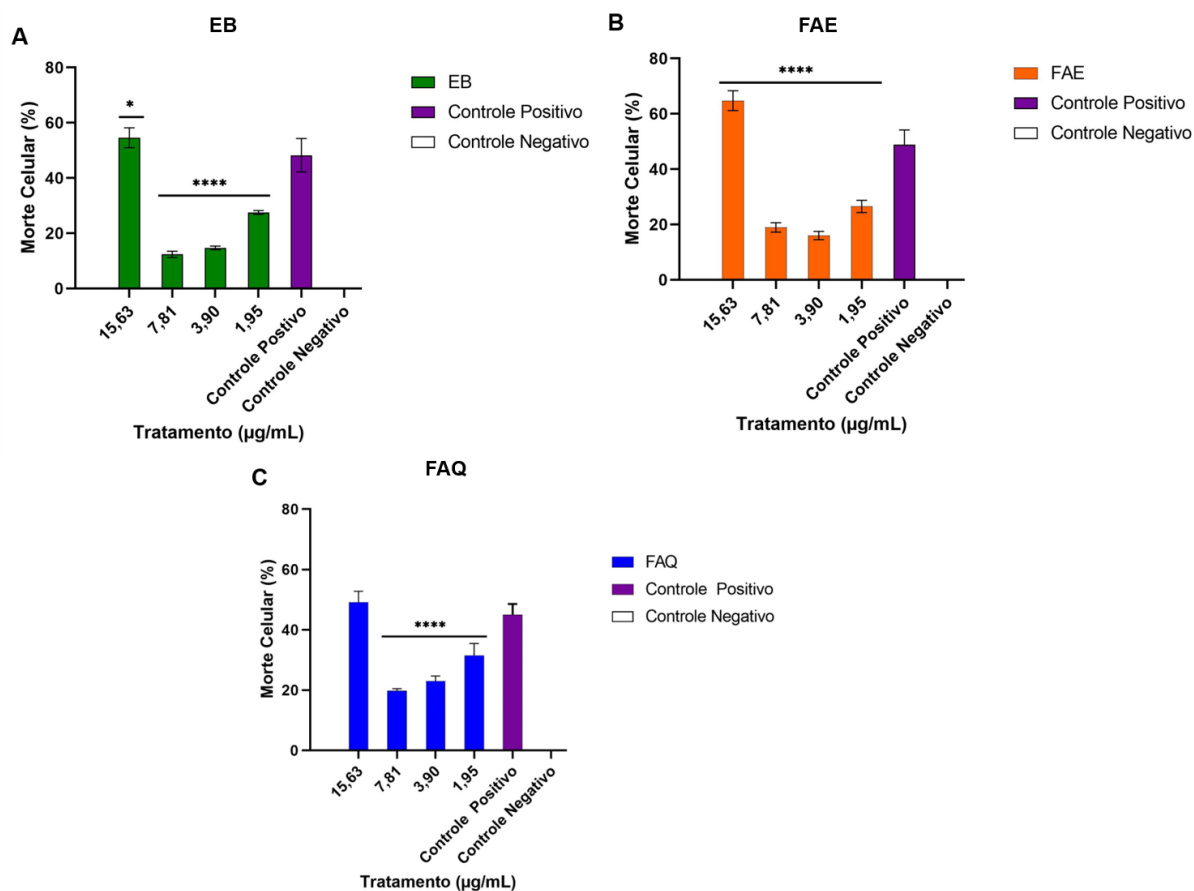


Figura 10. Efeito do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) contra o dano induzido pela rotenona. Células de neuroblastoma SH-SY5Y foram pré-tratadas com diferentes concentrações (1,95, 3,90, 7,81 e 15,63 µg/mL) 1 h antes da indução do dano por rotenona por 24 h. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio colorimétrico de MTT. Os dados estão apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes. As letras sobrescritas no topo das barras indicam diferenças estatisticamente significativa entre a comparação de múltiplas condições por ANOVA seguida pelo teste de Tukey $p < 0,05$ (*) quando comparado ao controle positivo e $p < 0,0001$ (****) quando comparado ao controle positivo, realizado no software GraphPad Prism 9.

Não há estudos com relação a proteção do EB e frações relacionados a modelo de Parkinson em linhagem celular SH-SY5Y, além de que poucos estudos utilizaram essa linhagem para avaliar a viabilidade celular utilizando a espécie *L. brasiliense*. Dois estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa avaliou a viabilidade celular frente ao EB e frações de *L. brasiliense*. Sereia e colaboradores (2019) avaliaram a FAE em células SH-SY5Y não apresentando redução da viabilidade até 62,5 µg/mL em 24 h, porém diferindo, em partes na metodologia empregada (como por exemplo concentração celular de $2,0 \times 10^4$ e o solvente de solubilização - etanol). Outro estudo, avaliou os efeitos na viabilidade tanto do EB quanto da FAE e FAQ, e apresentou

redução significativa da viabilidade dependente da dose, sendo mais pronunciada na concentração de 15,63 µg/mL de EB e FAE em 24 h. Substâncias isoladas da FAE (saramagenina A, saramagenina B e epigallocatequica-3-O- galato) demonstraram redução da viabilidade a partir da concentração de 20 µM em 24 h (Chierito, 2021). Esses resultados poderiam possivelmente justificar o aumento da morte celular em EB e FAE (15,63 µg/mL), devido a um sinergismo dessas substâncias presentes, principalmente em EB e FAE, e ao dano causado por rotenona.

Zhang e Zhao (2003) avaliaram se polifenóis do chá verde teriam efeito protetor frente ao nitroprussiato de sódio (NPS) em células neuroblastoma humano SH-SY5Y. Como resultado, os autores observaram que 1,5 mM de NPS foi suficiente para reduzir a viabilidade para 58,17% em relação ao controle, em um período de 24 h. Quando as células foram tratadas somente com os polifenóis nas concentrações 50, 100, 200 e 500 µM, não houve diminuição significativa da viabilidade celular em 24 h. Já quando adicionado o NPS após 1 h de pré-tratamento houve uma redução da viabilidade para 72,75; 53,25; 39,75 e 24,25%, respectivamente. Ainda, quando avaliado os compostos isolados (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) e epicatequina (EC) do chá verde, foi observado um aumento da toxicidade induzida por NPS associada aos compostos EGCG e EGC (que representam 58% e 12%, respectivamente, do extrato total). Em relação à proteção, foi observado que a ECG foi capaz de causar esse efeito frente a toxicidade induzida por NPS de forma dose-dependente.

Dhanalakshmi e colaboradores (2015) avaliaram o efeito citotóxico e citoprotetor da vanilina (um composto fenólico natural) frente aos danos causados por 100 nM rotenona em células SH-SY5Y na concentração de 3×10^3 células/poço, observaram um aumento na viabilidade celular para 84% na concentração de 100 nM quando tratadas 2 h antes da rotenona, ainda não exercendo nenhuma citotoxicidade às células até 200 nM. Outro estudo avaliou 100 nM de rotenona em células SK-N-SH, sendo que o composto CNB-001 (derivado da curcumina) na concentração 2 µM foi capaz de aumentar a viabilidade celular (Jayaraj et al., 2013).

A neuroproteção também foi avaliada por Manigandan e colaboradores (2019) em relação à proteção exercida pela substância quitosana sulfatada de baixo peso molecular frente ao dano induzido por rotenona em neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os autores observaram que a quitosana não possui citotoxicidade até concentração

de 15 μM , ainda sendo essa concentração que mais protegeu contra os danos causados por 100 nM de rotenona.

Um estudo conduzido por Marrazzo e colaboradores (2019), avaliou o possível efeito protetor de sulforafano (SF), epigallocatequina galato (EGCG) e plumbagina (PB), isolada ou em combinação (SEP) contra o dano induzido por H_2O_2 em uma matriz 3D de células SH-SY5Y. As células foram semeadas, na matriz de colágeno do tipo I liofilizado e estéril, na concentração de 4×10^6 células/mL diferenciadas com 10 μM de ácido retinoico, tratadas com 700 μM de H_2O_2 , 1 μM SF, 2,5 μM EGCG, 0,5 μM PB ou SEP (1 μM SF + 2,5 μM EGCG + 0,5 μM PB). Como resultado foi observado que PB, SF e SEP foram capazes de proteger contra os danos causados, ressaltando ainda que a combinação de compostos (SEP) foi a quem mais aumentou a viabilidade celular em comparação aos demais tratamentos. Uma observação interessante é que a EGCG não foi capaz de proteger a células isoladamente (Marrazzo et al., 2019).

As flavonas derivadas de flavonoides, principalmente a luteolina e apigenina, exercem efeito protetor em células SH-SY5Y contra o estresse oxidativo (exercido pelo peróxido de hidrogênio), principalmente, por meio da interação direta com a via das caspases, impedindo a apoptose celular (Kang et al., 2004). Corroborando com os resultados acima, a fração aquosa de *L. brasiliense* foi capaz de inibir a atividade da xantina oxidase (enzima catalisadora do ácido úrico através da oxidação hipoxantina e xantina), além de sequestrar o ânion superóxido inibindo a produção de EROs principalmente pela presença de substância prodelfinidina B1-3,3'-digalato (Rodrigues et al., 2021).

c, sendo observado no presente estudo que o EB, FAE e FAQ possuem efeito citoprotetor frente a rotenona devido ao aumento da viabilidade celular. Ressalta-se ainda que existem poucos estudos sobre a espécie *L. brasiliense*, e nenhum sobre a citoproteção dessa espécie frente a células neuronais em modelo de Parkinson, o que tornar esses resultados promissores para futuras investigações.

5.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) totais (H_2DCFDA)

Para a avaliação do grau de EROs nas células SH-SY5Y foi utilizado o marcador H_2DCFDA , o qual foi quantificado por citometria de fluxo. Esse experimento fornece o índice de oxidação citosólica celular (Wang et al., 2010). O H_2DCFDA é oxidado na presença de EROS em DCF, que é um composto fluorescente, assim

quanto maior for a intensidade de fluorescência, maior é a quantidade de EROs intracelular (Deng et al., 2020; Chung et al., 2022).

A figura 11 demonstra um aumento significativo para 169,65% no total de EROs após a exposição de células SH-SY5Y à rotenona por 24 h quando comparado com o grupo controle negativo (100%) ($p < 0,05$). Em contra partida, quando as células foram pré-tratadas com EB, FAE e FAQ nas concentrações 3,90 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$ 1 h antes da exposição à rotenona, houve uma diminuição significativa da produção de EROs totais em comparação à rotenona em todos os tratamentos. Além disso quando comparados ao controle negativo houve uma diminuição significativa para EB (3,90 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$) e FAE (7,81 $\mu\text{g/mL}$). Ressalta-se que os tratamentos com EB, FAE e FAQ não exibiram diferença significativa entre si. Células SH-SY5Y tratadas com H_2O_2 (controle positivo do experimento) exibiram aumento nos níveis de ERO para 249,60% após 24 h.

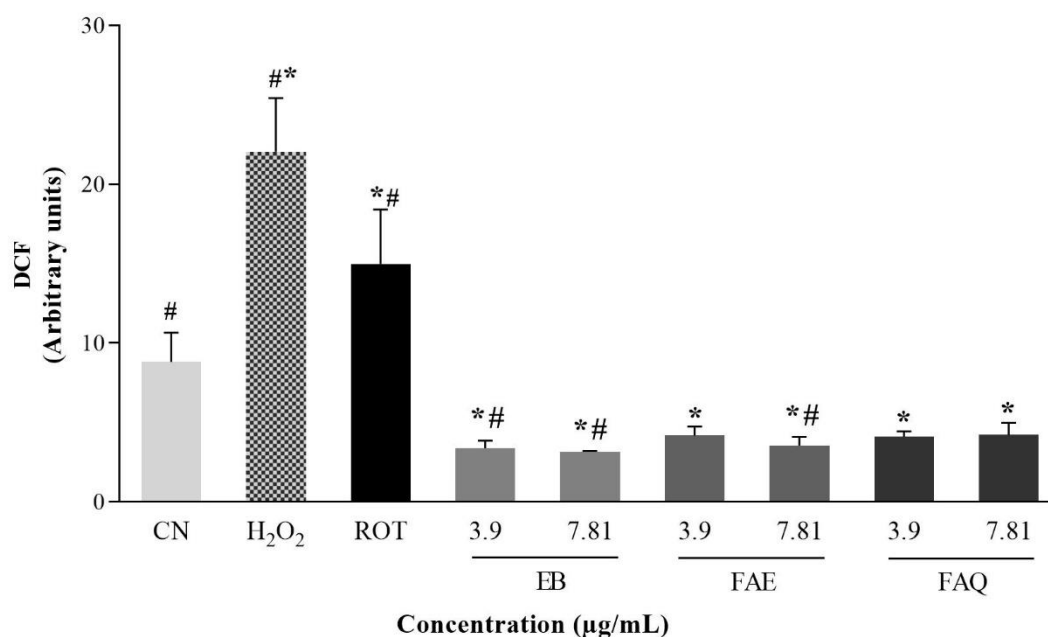


Figura 11. Detecção da produção de EROs em células neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com rotenona, EB, FAE e FAQ, marcadas com H_2DCFDA . EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa; CN: controle negativo (tratamento somente com DMEM); ROT: controle positivo de rotenona; H_2O_2 foi utilizado como controle positivo do experimento. Os resultados foram expressos em gráfico de barras, representando a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças significativas foram expressas como: * $p < 0,05$, quando comparado com a rotenona # $p < 0,05$, quando comparados com o controle negativo.

Os resultados apresentados podem sugerir que o EB e as frações impedem a produção de EROs exercida pela rotenona. Resultados semelhantes foram

encontrados por Ma e colaboradores (2018), os quais avaliaram o efeito das proantocianidinas (PA) no estresse oxidativo induzido por 0,5 μ M de rotenona em células SH-SY5Y através do Kit Fluorometric Intracellular ROS, e observaram que a rotenona aumentou significativamente a geração de EROs intracelular e as PA foram capazes de inibir essa produção. Além disso, as PA foram capazes de inibir a apoptose induzida por rotenona, inibindo a clivagem da caspase-9, caspase-3 e poli (ADO-ribose) polimerase (PARP) (Ma et al., 2018). A EROs é um dos principais mecanismos patológicos da DP, dessa maneira substâncias capazes de impedir ou diminuir a produção de EROs poderiam ser utilizados para desenvolver possíveis tratamentos.

Em outro trabalho, Zhang e Zhao (2003), avaliaram o efeito dos polifenóis presentes no chá verde na produção de EROs induzido por NPS em células SH-SY5Y, não encontraram efeitos protetores tendo ainda um aumento da produção de EROs dose-dependente em 24 h de tratamento. Esses resultados podem diferir quanto à droga indutora de dano além da composição do chá verde.

Dhanalakshmi e colaboradores (2015) avaliaram se a vanilina seria capaz de diminuir a produção de EROs, causados pela rotenona, e também observaram um efeito positivo, diminuindo os níveis de radicais livres produzidos.

Marrazzo et al. (2019) avaliaram se a combinação SEP (sulforafano, epigallocatequina galato e plumbagina) poderia exercer modulação dos genes, heme oxigenase 1 (HO1), NADPH, quinona oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione redutase (GR) e tioredoxina redutase (TR), envolvidos no controle do estresse oxidativo. Além disso, avaliaram a indução de uma regulação positiva significativa, porém em diferentes níveis para cada gene, em comparação com as células tratadas com H₂O₂. Em adição, ao avaliar as enzimas NADPH oxidase (NOX1 e NOX2) (relacionadas a produção de EROs) os autores observaram a redução dessas enzimas pela combinação SEP tanto quando comparada as células tratadas com H₂O₂ como quando comparada as células não tratadas.

O tecido neuronal necessita de altos valores energéticos, exigindo maior atividade mitocondrial e sendo mais susceptíveis à degeneração. O estresse oxidativo induzido pela produção de EROs mitocondrial desencadeia o processo de neurodegeneração dopaminérgica, o que auxilia na progressão da DP (Lin e Beal, 2006). Sendo assim, compostos ou extratos capazes de reduzir sua geração possuem potencial terapêutico contra essa doença.

Como já é descrito em literatura, a rotenona é um composto utilizado na agricultura para eliminar pragas, agindo como um inibidor da enzima do complexo I mitocondrial e gerando o estresse oxidativo, sendo utilizada na modelagem da doença de Parkinson *in vitro* e *in vivo*. Além de causar o estresse oxidativo em linhagem celular SH-SY5Y, a rotenona causa acúmulo de EROs em células HT22, que por sua vez não é reduzido com os compostos GIF-2165X-G1 (10 μ M), GIF-2014 (1 μ M), GIF2115 (0,1 μ M), sendo o primeiro híbrido oxindole-curcumina e os outros dois derivados de N,N- dimetilanilina. Esses composto são capazes de reduzir a ferroptose que resulta em morte celular distinta da apoptose, necrose e autofagia, porém com indução de estresse oxidativo dependente da desregulação do metabolismo de ferro livre. Assim essa via não seria um mecanismo de morte celular causada por rotenona (Hirata et al., 2022).

Os metabólitos oxidantes produzidos a partir do estresse oxidativo, em condições normais, são eliminados por agentes antioxidantes naturais do corpo. Porém, quando em excesso devido a alguma disfunção celular (principalmente mitocondrial, no caso da rotenona), esses agentes não são capazes de eliminar as EROS desencadeando a morte celular. Dessa maneira compostos com ação antioxidante poderiam minimizar os danos causados às células.

O *L. brasiliense* possui ação antioxidante de seu extrato bruto e fração acetato de etila, já descritos em literatura em testes *in vitro* (Murray et al., 2004; Sereia, 2019), além disso foi observado que a fração aquosa foi capaz de neutralizar o ânion superóxido (Rodriguez et al., 2021). Sabe-se ainda que essa droga vegetal possui substâncias da classe dos polifenóis, denominadas catequinas.

Um estudo avaliando epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC) e epicatequina galato (ECG) e combinações desses polifenóis, demonstrou a atividade antioxidante medida por FRAP, DPPH, CUPRAC (capacidade antioxidante através da redução do íon cúprico), FCRC (capacidade redutora de Folin-Ciocalteu). Além disso levantou a hipótese de que a ação antioxidante desses compostos não pode ser prevista isoladamente, sendo ainda influenciado pelas suas concentrações. Por exemplo, combinações entre EGCG/EGC e EGCG/ECG demonstrou maior efeito na capacidade quelante de cobre pelo método CUPRAC, DPPH (redução de radicais livres) e Cu^{2+} , já a combinação dos três compostos aumentou sinergicamente a capacidade em FRAP. A combinação ECG/EGCG possui melhor atividade antioxidante, sendo capaz de diminuir a produção de EROs, bem como inibir a

proliferação de células OVCAR-3, HFL1 e HEK293 (Xu et al., 2021). Em adição, a (-)-epigallocatequina-3-galato (50 μ M) foi capaz de proteger os neurônios colinérgicos (WT ChLNs) portadores da mutação E280A em Presenilin 1 (PSEN1 E280A) por múltiplos alvos. Foram observados a diminuição dos efeitos citotóxicos induzidos por iAPP β f e eA β 42 (peptídeos para doença de Alzheimer) e bloqueio da fosforilação da proteína TAU, dessa maneira, aumentando o potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a produção de EROs e oxidação da proteína DJ-1. Além do mais, inibe a ativação do fator de transcrição c-JUN e P53, inibe a ativação da caspase-3; além disso o EGCG foi capaz de inibir a secreção de IL-6 (citocina pró-inflamatória) e ativação de NF- κ B em astrócitos derivados de WT MenSCs (Soto-Mercado et al., 2021).

Já a miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, presente em *L. brasiliense*, foi isolada da espécie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit e demonstrou atividade anti-inflamatória (reduzindo a secreção de IL-6), atividade antioxidante, sendo capaz de eliminar radicais livres pelo método de DPPH. Porém, incapaz de diminuir a formação de EROs em macrófagos RAW 264.7 (Xu et al., 2018).

Assim, os resultados obtidos são promissores, uma vez que a proteção de *L. brasiliense* poderia ser conferida graças a ação antioxidante, principalmente aos polifenóis presentes nessa planta que são capazes de inibir a produção de EROs.

5.4 Determinação da integridade da membrana celular

IP é um agente intercalante de DNA, não permeável a membranas plasmáticas íntegras. Já células com membrana plasmática alterada permitem a entrada de IP, que se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência. Como demonstrado, apenas os controles positivos digitonina e rotenona tiveram aumentos significativos na marcação com IP (quando comparado com o controle negativo), ou seja, perda da integridade da membrana desencadeando aumento de 42,08% e 31,30%, respectivamente em 24 h, obtendo diferença significativa entre os dois (figura 12). Em contra partida, o tratamento com as amostras EB, FAE e FAQ (7,81 e 3,90 μ g/mL) não alteraram a permeabilidade de membrana das células demonstrando diferença significativa quando comparados com a rotenona.

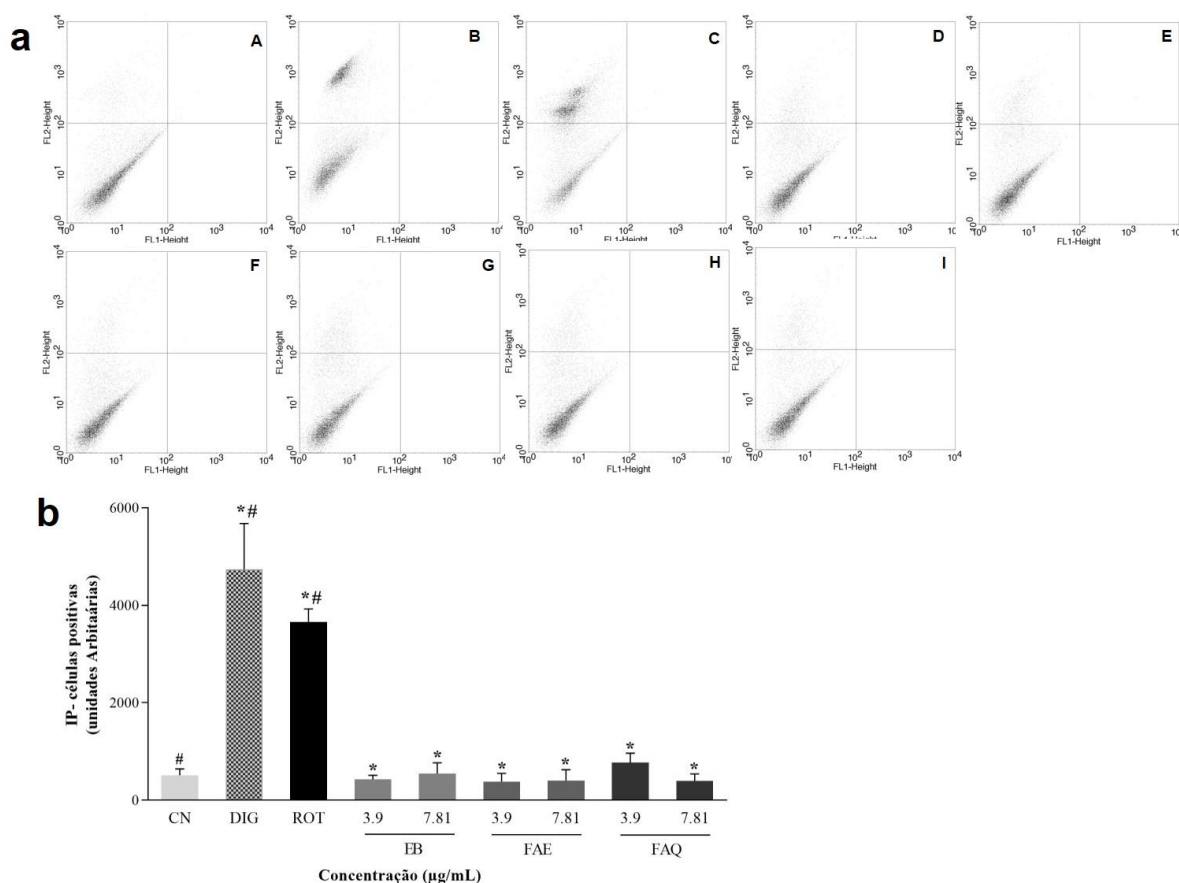


Figura 12. Integridade de membrana de células neuroblastoma humana SH-SY5Y pré-tratadas por 1 h com EB, FAE e FAQ; antes da exposição e marcadas com iodeto de propídeo (IP). (a) Histogramas típicos para células SH-SY5Y controle negativo (A), rotenona (B) digitonina (C), EB 3,90 µg/mL (D), EB 7,81 µg/mL (E), FAE 3,90 µg/mL (F), FAE 7,81 µg/mL (G), FAQ 3,90 µg/mL (H) e FAQ 7,81 µg/mL (I). As porcentagens de células PI-positivas são mostradas nos quadrantes superiores direito e esquerdo. As porcentagens de células PI-negativas são mostradas nos quadrantes inferiores direito e esquerdo. (b) Células PI-positivas. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle positivo rotenona (* < 0,05) e as hashtags indicam diferença significativa quando comparado ao controle negativo (# < 0,05). CN: controle negativo (células tratadas somente com DMEM); DIG: Digitonina foi utilizada como controle positivo do experimento, ROT: tratamento com rotenona sozinha foi utilizada como controle positivo; EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. Os resultados expressos em gráfico de barras, foram representados por média ± desvio padrão de células IP positivas de três experimentos independentes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pakrashi et al. (2020), no qual a rotenona nas concentrações 100 e 200 nM foi capaz de induzir o aumento da população apoptótica utilizando anexina V conjugada com co-colorações de FITC e PI, em 24 h de tratamento.

Ainda foi observado por Hirata et al. (2022) que, em células HT22, 5 µM de rotenona foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 24 h de tratamento, mas a perda

de integridade da membrana só foi evidenciada em 48 horas de tratamento medido através da atividade de lactato desidrogenase (LDH).

Em células HL-60 a rotenona causou aumento de EROs detectado através do peróxido de hidrogênio de células viáveis pelo método de oxidação PHPA (p-hidroxifenilacetato oxidado), além do que a diminuição dos níveis de ATP e da respiração celular pela inibição do complexo I estavam relacionadas aos níveis de peróxido de hidrogênio (Li et al., 2003).

O IP é um corante fluorescente utilizado como marcador no processo de verificação da integridade da membrana. Uma vez que esse composto, devido ao seu peso molecular, é incapaz de ultrapassar a membrana plasmática de células integras, ou seja, não fornece fluorescência sem que tenha alteração da permeabilidade da membrana, sendo assim utilizado para determinar a morte celular via necrose (Ribeiro, 2011), ou ainda estágios finais da apoptose (Palma, 2005).

5.5 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

A Rh 123 é uma sonda fluorescente utilizada em muitos estudos toxicológicos, metabólicos e farmacológicos quanto em relação ao potencial de membrana mitocondrial. Ela é um corante catiônico que se distribui eletroforicamente na matriz de mitocôndrias ativas, sendo capaz de atravessar a membrana devido a sua solubilidade aos lipídeos da membrana mitocondrial e da matriz, podendo assim medir o potencial de membrana mitocondrial de células intactas que emitem alta fluorescência (Baracca et al., 2003).

Como demonstrado nos histogramas (figura 13) não houve diminuição na intensidade de fluorescência de Rh123, ou seja, não houve despolarização da membrana mitocondrial, quando as células foram pré-tratadas com EB (7,81 e 3,90 µg/mL), FAE (7,81 e 3,90 µg/mL) e FAQ (7,81 e 3,90 µg/mL) por uma hora, quando comparados com o controle negativo. Em adição, os pré-tratamentos realizados com EB, FAE e FAQ não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si ou em comparação com o controle negativo, no entanto os tratamentos demonstraram diferenças significativas quando comparado com o controle positivo (rotenona).

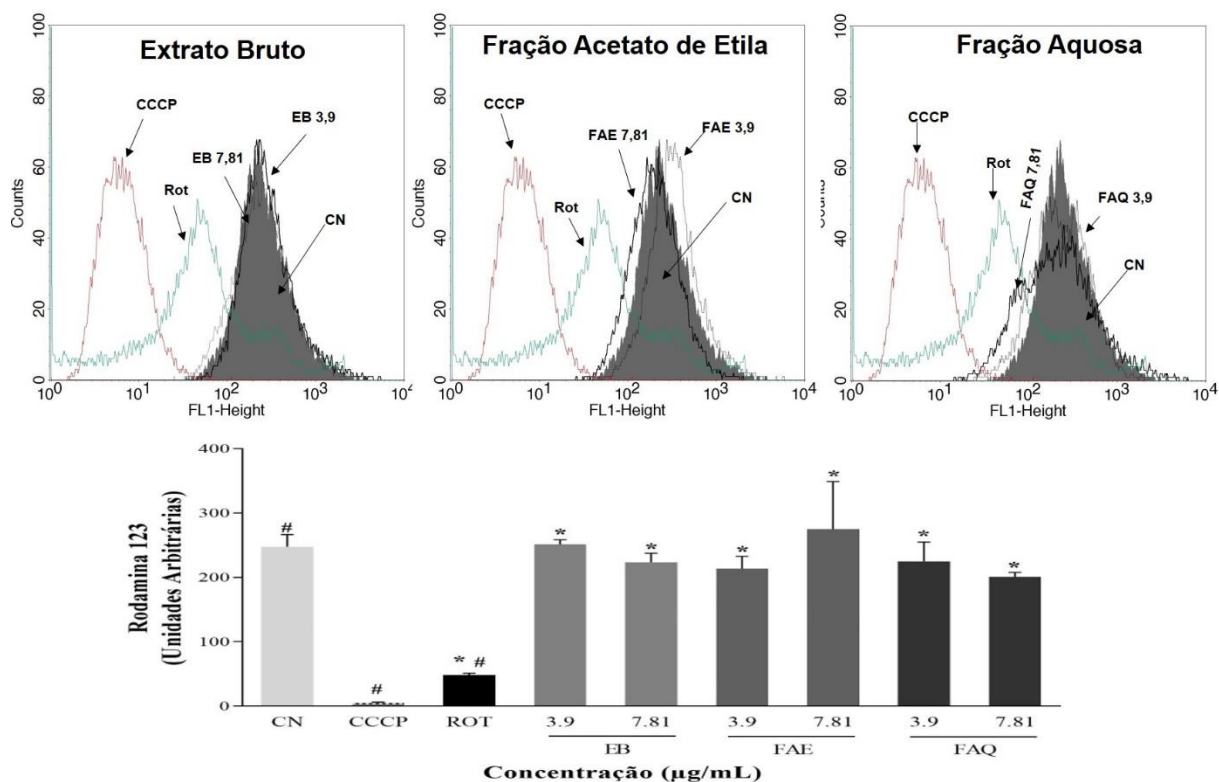


Figura 13. Potencial de membrana mitocondrial de células neuroblastoma humana SH-SY5Y tratadas por 1 h com EB, FAE e FAQ; induzido o dano com rotenona e marcadas com Rh123. Histogramas representativos dos tratamentos realizados por 24 h (A), linha vermelha correspondente ao grupo controle positivo do experimento CCCP; linha verde corresponde ao controle positivo rotenona (Rot); área cinza corresponde ao grupo controle negativo (CN); linha preta corresponde a concentração 7,81 $\mu\text{g/mL}$ das amostras; linha cinza clara corresponde a concentração 3,90 $\mu\text{g/mL}$ das amostras. Tratamentos com Extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ). CCCP e rotenona foram utilizados como controles positivos. Os resultados foram expressos em gráfico de barras, representando a média $\pm$ desvio padrão da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes. Diferenças significativas foram expressas como: # $p < 0,05$, quando comparado com o controle negativo e * $p < 0,05$, quando comparados com a rotenona.

Os índices de variação (IVs) demonstram o potencial de membrana mitocondrial, assim resultados negativos evidenciam a despolarização da membrana. Os controles positivos, Rotenona e CCCP, foram capazes de induzir danos no potencial de membrana mitocondrial com IV= -0,80 e -0,98 respectivamente (tabela 2), resultando em forte despolarização. Entretanto nos tratamentos (EB, FAE e FAQ) não houve despolarização significativa.

Tabela 2. Ensaio do potencial de membrana mitocondrial em células SH-SY5Y pré-tratadas com extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) por 1h e tratadas com rotenona por 24 h usando coloração Rh123.

Amostras	Fluorescência mediana	IV
Controle positivo (CCCP)	5,33	-0,978
Controle positivo (Rotenona)	48,6	-0,804
Controle negativo	247,77*	0,00
EB 7,81 µg/mL	223,62*	-0,097
EB 3,90 µg/mL	251,11*	0,013
FAE 7,81 µg/mL	274,90*	0,109
FAE 3,90 µg/mL	213,46*	-0,138
FAQ 7,81 µg/mL	200,57*	-0,190
FAQ 3,90 µg/mL	225,25*	-0,091

Observa-se, como demonstrado acima, que a rotenona é capaz de causar forte despolarização da membrana mitocondrial próximo ao controle positivo do experimento, levantando a suposição de que esse pesticida seria capaz de alterar o potencial de membrana mitocondrial. Pesquisa realizada por Pakrashi et al. (2020) também avaliou o potencial de membrana mitocondrial de células SH-SY5H tendo resultados positivos quanto a alteração do potencial causado por rotenona, corroborando com os resultados apresentados nesse estudo.

Além de realizar a respiração celular e produção de ATP, a mitocôndria possui a função de regular as funções celulares como homeostasia de cálcio, homeostasia osmótica, e modulação do estado redox na célula, a fim de realizar a morte celular através da apoptose por via intrínseca caso necessário. A mitocôndria possui, fisiologicamente, proteínas pro e anti-apoptóticas (proteínas da família Bcl-2) responsáveis pela manutenção celular. Dessa maneira danos à membrana mitocondrial pode desencadear a morte celular através da abertura do poro mitocondrial e liberação de proteínas pro-apoptóticas para o citosol, induzindo a apoptose. Além dessa proteínas, o citocromo C, presente entre a membrana interna e externa da mitocôndria, é liberado e se liga ao fator ativador da apoptose 1 ("apoptosis-activating factor 1, apaf-1") ativando proteínas da família das caspases que também levam à morte celular (Parolin e Reason, 2001; Palma, 2005; Pakrashi, et al., 2020).

Além de liberar o citocromo C no citosol, o dano mitocondrial, induzido por rotenona, aumenta a expressão da proteína LC3B que está associada ao processo de autofagia envolvida na apoptose por via extrínseca, (Zhou et al., 2018).

A melatonina, um hormônio que regula o sono, envelhecimento e resposta imune, além de proteger o DNA mitocondrial e nuclear devido a sua ação antioxidante, foi capaz de inibir a liberação do citocromo C para o citosol protegendo as células de morte por via autofágica induzida por rotenona (Zhou et al., 2018).

Em adição à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, a rotenona também causa a fragmentação nuclear mitocondrial (marca morfológica de apoptose celular) em células HT22, evidenciando que esse pesticida age em diferentes vias e levando à morte celular (Hirata et al., 2022).

Com as evidências apresentadas, a rotenona pode causar danos à mitocôndria por diferentes maneiras, levando à morte celular. Assim compostos isolados ou extratos, capazes de regular, inibir ou reverter os danos causados a essa organela pela rotenona são promissores. Levando em consideração que a rotenona é utilizada em modelo de Parkinson, resultados promissores para esse pesticida poderiam ser extrapolados também para a DP. Dessa maneira o extrato bruto de *L. brasiliense*, bem como suas frações aquosa e acetato de etila são promissores quanto ao efeito neuroprotetor pois inibe o dano à integridade da membrana e potencial de membrana mitocôndrial, além de diminuir os níveis de EROs totais intracelular.

5.5 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Como demonstrado na figura 14 o controle negativo (células tratadas DMEM) apresentou altos níveis de ATP intracelular, que foi diminuído significativamente nos controles positivos KCN e rotenona. Houve ainda uma diminuição significativa nos níveis de ATP intracelular quando as células foram pré-tratadas com EB (7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$), FAE (7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$) e FAQ (7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$) por uma hora, quando comparados com o controle negativo. Em adição, os pré-tratamentos realizados com EB, FAE e FAQ não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si ou em comparação com o controle rotenona.

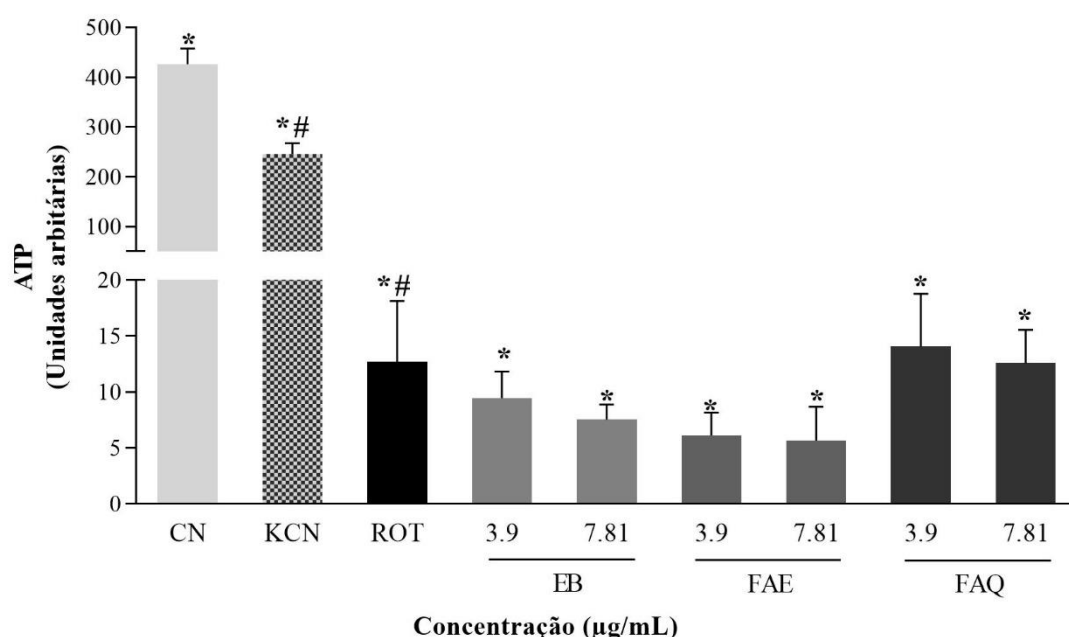


Figura 14. Níveis de ATP intracelular em células neuroblastoma humana SH-SY5Y tratadas por 1 hora com EB, FAE e FAQ; induzido o dano com rotenona e marcadas com Kit Cell Titer-Glo. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa; CN: controle negativo (tratamento somente com DMEM); ROT: controle positivo de rotenona; KCN: cianeto de potássio foi utilizado como controle positivo do experimento. Os resultados foram expressos em gráfico de barras, representando a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças significativas foram expressas como: # $p < 0,05$, quando comparado com a rotenona * $p < 0,05$, quando comparados com o controle negativo.

Resultados semelhantes foram observados por Dieter, et al. (2022), em modelo de Alzheimer com células SH-SY5Y- APP₆₉₅ (modelo de Alzheimer precoce) e SH-SY5Y-MOCK (condição controle) tratadas com 1 mM ou 100 μM de ácido alfa lipóico (ALA) 1 h antes de expor as células à 25 μM de rotenona. Os autores observaram que o ALA protege as células da disfunção mitocondrial, aumentando os níveis de potencial de membrana mitocondrial (em concentração de 1 mM), atividade dos

complexos I, II, III e IV, envolvidos na respiração celular (em concentração de 100 μM) em células SH-SY5Y-MOCK. Ainda foi capaz de reduzir a produção de EROs em ambas as células sem a exposição à rotenona nas duas concentrações testadas. Entretanto não foi observado aumento nos níveis de ATP quando as células foram tratadas com ALA 1 h antes da exposição à rotenona.

Já 100 μM de α -arbutina (Arb), um polifenol com propriedades antioxidantes extraída de espécies da Ericaceae, foi capaz de aumentar a produção de ATP e potencial de membrana, além de diminuir o estresse oxidativo quando tratados 6 h antes da exposição com 0,25 μM de rotenona (Ding et al., 2020).

A rotenona é um agente inibidor do complexo I mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons e consequentemente os níveis de ATP intracelular são reduzidos (Chung et al., 2022; Dieter et al., 2022). Curiosamente os EB, FAE e FAQ nas concentrações testadas não foram capazes de manter os níveis de ATP, levantando a hipótese de que a proteção exercida pelos extratos não está relacionada a capacidade de reverter o efeito da rotenona no complexo I. Contudo a inibição do complexo I além de reduzir drasticamente os níveis de energia, conduz ao estresse oxidativos por meio de produção de EROS e nitrogênio (Rajasekaran et al., 2015). Dessa maneira, a ação de proteção exercida pode-se dar através da redução na produção das espécies reativas ou sua neutralização pelos compostos antioxidantes presentes tanto no extrato quanto nas frações, além do que a integridade da membrana e o potencial de membrana mitocondrial foram mantidos. Assim, esses primeiros resultados dão probabilidade de os extratos de *L. brasiliense* serem utilizados no tratamento da DP, sendo necessário mais pesquisas para avaliar se esses extratos poderiam interagir com alguma proteína da membrana mitocondrial impedindo a despolarização da membrana e abertura dos poros de transição, ou até mesmo a inibição ou expressão de alguma proteína envolvida na produção de EROS, a fim de compreender melhor a proteção celular.

6 CONCLUSÃO

A rotenona é um pesticida tóxico para as células SH-SY5Y causando morte celular devido, principalmente, a disfunção mitocondrial. Em contra partida os extratos de *L. brasiliense* nas concentrações 1,95, 3,90 e 7,81 µg/mL são capazes aumentar a viabilidade celular, protegendo as células dos danos causados.

Notavelmente, os tratamentos com EB, FAE e FAQ (nas concentrações 3,90 e 7,81 µg/mL) foram capazes de diminuir a produção de EROs totais, reverter os danos causados na membrana celular além de prevenir a perda de potencial de membrana mitocondrial causados pela rotenona, indicando que a mitocôndria seria um possível alvo de proteção desses extratos.

Entretanto as amostras não foram capazes de aumentar os níveis de ATP.

Dessa maneira os extratos testados são promissores candidatos no desenvolvimento de medicamentos que poderiam ser usados como profilaxia para prevenção da doença ou como auxiliar nos tratamentos convencionais.

REFERÊNCIAS

- Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y., 2016. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17:1213-1221.
- Amrani, A., Boubekri, N., Benaissa, O., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2017. Protective role of *Limonium bonduelli* extract against non-enzymatic peroxidation in brain and testes induced by iron in vitro. *Int. J. Phytomedicine* 9, 72. <https://doi.org/10.5138/09750185.1976>.
- Antonelli-Ushirobira, T. M.; Blainski, A.; Fernandes, H. G.; Moura-Costa, G. F.; Costa, M. A.; Campos-Shimada, L. B.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L.; Kaneshima, E. N.; Becker, T. C. A.; Leite-Mello, E. V. S.; Mello, J. C. P. 2015a. Acute toxicity and long-safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 174:293-298.
- Antonelli-Ushirobira, T. M.; Blainski, A., Gancedo, N. C.; Gaburo, F., Cardoso, K. A. K.; Leite Melo, E. V. S.; Mello, J. C. P.; Milaneze-Gutierrez, M. A. 2015b. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 320-327.
- Armstrong, M.J., Okun, M.S., 2020. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 323:548–560. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Arora, M. 2013. Cell culture media: a review. Disponível em: <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>. Acesso em: 10 de jan. 2022.
- Arteaga, O., Revuelta, M., Urigüen, L., Álvarez, A., Montalvo, H., Hilario, E., 2015. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PLoS One* 10:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142424>
- Bae, J., Lee, D., Kim, Y.K., Gil, M., Lee, J.Y., Lee, K.J., 2013. Berberine protects 6-hydroxydopamine-induced human dopaminergic neuronal cell death through the induction of heme oxygenase-1. *Mol. Cells* 35:151–157. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2298-5>
- Bae, M.J., Karadeniz, F., Oh, J.H., Yu, G.H., Jang, M.S., Nam, K.H., Seo, Y., Kong, C.S., 2017. MMP-Inhibitory Effects of Flavonoid Glycosides from Edible Medicinal Halophyte *Limonium tetragonum*. Evidence-based Complement. *Altern. Med.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6750274>
- Balestrino, R., Schapira, A.H.V., 2019. Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* 27:27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Ball, N., Teo, W.-P., Chandra, S., Chapman, J., 2019. Parkinson's Disease and the Environment. *Front. Neurol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00218>
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., Lenaz, G., 2003. Rhodamine 123 as a probe of

- mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1606:137–146. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00110-5)
- Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:325–332. <https://doi.org/10.33588/rn.3101.99654>
- Blainski, A., Antonelli-Ushirobira, T.M., Godoy, G., Leite-Mello, E.V.S., Mello, J.C.P., 2017a. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a hplc-dad technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27:162–169. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.009>.
- Blainski, A., Gionco, B., Oliveira, A.G., Andrade, G., Scarminio, I.S., Silva, D.B., Lopes, N.P., Mello, J.C.P., 2017b. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *J. Ethnopharmacol.* 198:313–323. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.013>.
- Blainski, A., Lopes, G.C., De Mello, J.C.P., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>.
- Blainski, A. 2010. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baicuru. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá.
- Blauwendraat, C., Nalls, M.A., Singleton, A.B., 2020. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 19, 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)
- Cacabelos, R., 2017. Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Cacabelos, R., Carrera, I., Martínez, O., Alejo, R., Fernández-Novoa, L., Cacabelos, P., Corzo, L., Rodríguez, S., Alcaraz, M., Nebril, L., Tellado, I., Cacabelos, N., Pego, R., Naidoo, V., Carril, J.C., 2021. Atremorine in Parkinson's disease: From dopaminergic neuroprotection to pharmacogenomics. *Med. Res. Rev.* 41, 2841–2886. <https://doi.org/10.1002/med.21838>
- Caleare, A. de O., Hensel, A., Mello, J.C.P., Pinha, A.B., Panizzon, G.P., Lechtenberg, M., Petereit, F., Nakamura, C.V., 2017. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia* 118:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.03.002>
- Carrera, I., Fernandez-Novoa, L., Sampedro, C., Cacabelos, R., 2017. Neuroprotective Effect of Atremorine in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Curr.*

- Pharm. Des. 23, 1710–1720.
<https://doi.org/10.2174/1381612822666161201151832>
- Caruana, M., Vassallo, N., 2015. Tea Polyphenols in Parkinson's Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 863:1–20. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7>
- Chen, H.Q., Jin, Z.Y., Li, G.H., 2007. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation. *Neurosci. Lett.* 417:112–117. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.045>.
- Chen, S.-Y., Tsai, S.-T., 2010. The Epidemiology of Parkinson ' s Disease. *Tzu Chi Med. J.* 22:73–81.
- Chieritto, D.T. de O., 2021. Tratamento do transtorno de déficit da atenção com hiperatividade : revisão sistemática e cultura de células. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Maringá. 102.
- Chung, I.H., Park, H.A., Kang, J., Kim, H., Hah, S.M., Lee, J., Kim, H.S., Choi, W.S., Chung, J.H., Shin, M.J., 2022. Neuroprotective effects of ATPase inhibitory factor 1 preventing mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 12:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07851-8>
- Compagnoni, G.M., Di Fonzo, A., Corti, S., Comi, G.P., Bresolin, N., Masliah, E., 2020. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* 57:2959–2980. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1>
- Crefito14, 2021. Dia mundial de conscientização da Doença de Parkinson. Disponível em: <<https://www.crefito14.org.br/noticias/noticias-dia-mundial-de-conscientizacao-da-doenca-de-parkinson-2021-04-05>>. Acesso em: 31/05/2021 às 11:05.
- Cordeiro, M. F. 2017. Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica), Universidade Federal de Pernambuco.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and models. *Cambridge Companion to Philos. Biol.* 39, 889–909. <https://doi.org/10.1017/CCOL9780521851282.008>.
- Deng, H., Jia, Y., Pan, D., Ma, Z.G., 2020. Berberine alleviates rotenone-induced cytotoxicity by antioxidation and activation of PI3K/Akt signaling pathway in SH-SY5Y cells. *Neuroreport* 31:41–47. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001365>.
- Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Nataraj, J., Justin Thenmozhi, A., Essa, M.M., 2015. Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. Evidence-based

- Complement. Altern. Med. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/626028>.
- Dias da Silva, R. A. 1920. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Boletim da Associação Brasileira dos Pharmaceuticos,1, 4-14.
- Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2:303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.
- Dieter, F., Esselun, C., Eckert, G.P., 2022. Redox active α -lipoic acid differentially improves mitochondrial dysfunction in a cellular model of Alzheimer and its control cells. *Int. J. Mol. Sci.* 23:9186. <https://doi.org/10.3390/ijms23169186>.
- Ding, Y., Kong, D., Zhou, T., Yang, N. di, Xin, C., Xu, J., Wang, Q., Zhang, H., Wu, Q., Lu, X., Lim, K., Ma, B., Zhang, C., Li, L., Huang, W., 2020. α -Arbutin protects against parkinson's disease-associated mitochondrial dysfunction in vitro and *in vivo*. *NeuroMolecular Med.* 22:56–67. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08562-6>.
- Dorsey, E.R., Sherer, T., Okun, M.S., Bloem, B.R., 2018a. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J. Parkinsons. Dis.* 8, S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>.
- Dorsey E. R, Bloem B. R., 2018b. The Parkinson pandemic—a call to action. *JAMA Neurol.*;75(1):9–10. doi:10.1001/jamaneurol.2017.3299.
- Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.P., Delemotte, B., Alperovitch, A., Tzourio, C., 2009. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66:494–504. <https://doi.org/10.1002/ana.21717>.
- Faral-Tello, P. et al. 2012. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Scientific World Journal*, 2012, 1-5.
- Forster, J.I., Köglberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A.S., Buck, L., Balling, R., Antony, P.M.A., 2016. Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability. *J. Biomol. Screen.* 21:496–509. <https://doi.org/10.1177/1087057115625190>.
- Funez, L. A. 2019a. Plumbaginaceae In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB192>>. Acesso em: 08 Nov. 2021.
- Funez, L. A. 2019b. Plumbaginaceae. In: flora do Brasil 2020 em construção, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12938>>. Acesso em: 08 Nov. 2021.
- Gao, H.M., Hong, J.S., Zhang, W., Liu, B., 2002. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 782–790. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-00782.2002>

- GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 17, 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3).
- Gomes, M., 2007. Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichila catigua* A. Juss. MELIACEAE) 38.
- Hang, L., Thundiyil, J., Lim, K.-L., 2015. Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: a Parkin-AMPK alliance in neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1350:37–47. <https://doi.org/10.1111/nyas.12820>.
- Hansson, O., 2021. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 27:954–963. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01382-x>.
- Heger, L.M., Wise, R.M., Hees, J.T., Harbauer, A.B., Burbulla, L.F., 2021. Mitochondrial phenotypes in parkinson's diseases—a focus on human ipsc-derived dopaminergic neurons. *Cells* 10:1–22. <https://doi.org/10.3390/cells10123436>.
- Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., Postuma, R.B., 2019. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 34:1464–1470. <https://doi.org/10.1002/mds.27802>.
- Henriques, M. G. M. O.; Sampaio, A. L. F. 2002. Alternativas para animais de laboratório: sistemas in vitro. In: Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 339-343.
- Herrera, A.J., Castaño, A., Venero, J.L., Cano, J., Machado, A., 2000. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* 7, 429–447. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0289>
- Hirata, Y., Okazaki, R., Sato, M., Oh-hashii, K., Takemori, H., Furuta, K., 2022. Effect of ferroptosis inhibitors oxindole-curcumin hybrid compound and N,N-dimethylaniline derivatives on rotenone-induced oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 928:175119. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175119>
- Hu, X., Weng, Z., Chu, C.T., Zhang, L., Cao, G., Gao, Y., Signore, A., Zhu, J., Hastings, T., Greenamyre, J.T., Chen, J., 2011. Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating protein 1. *J. Neurosci.* 31, 247–261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4589-10.2011>
- IsolanI, R. G. 2018. Identificação e avaliação da atividade antiviral de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes simplex vírus tipo I. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia,

Universidade Estadual de Maringá.

- Jankovic, J., Tan, E.K., 2020. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 91:795–808. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>.
- Jayaraj, R.L., Tamilselvam, K., Manivasagam, T., Elangovan, N., 2013. Neuroprotective effect of CNB-001, a novel pyrazole derivative of curcumin on biochemical and apoptotic markers against rotenone-induced SK-N-SH cellular model of parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 51:863–870. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0075-8>.
- Jung, C.H., Kim, J.H., Hong, M.H., Seog, H.M., Oh, S.H., Lee, P.J., Kim, G.J., Kim, H.M., Um, J.Y., Ko, S.G., 2007. Phenolic-rich fraction from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) suppress inflammatory response via NF- κ B and JNK pathway in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 110:490–497. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.013>.
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Fidani, L., 2016. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol. Scand.* 134:314–326. <https://doi.org/10.1111/ane.12563>.
- Kang, S.S., Lee, J.Y., Choi, Y.K., Kim, G.S., Han, B.H., 2004. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 14, 2261–2264. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.02.003>.
- Kannaiyan, R., Shanmugam, M.K., Sethi, G., 2011. Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett.* 303:9–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.025>.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2015. Proteostasis and aging. *Nat. Med.* 21:1406–1415. <https://doi.org/10.1038/nm.4001>.
- Kim, D.E., Min, J.S., Jang, M.S., Lee, J.Y., Shin, Y.S., Park, C.M., Song, J.H., Kim, H.R., Kim, S., Jin, Y.H., Kwon, S., 2019. Natural bis-benzylisoquinoline alkaloids-tetrandrine, fangchinoline, and cepharanthine, inhibit human coronavirus oc43 infection of mrc-5 human lung cells. *Biomolecules* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom9110696>.
- Kim, H.J., Jeon, B., Chung, S.J., 2016. Professional ethics in complementary and alternative medicines in management of Parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* 6:675–683. <https://doi.org/10.3233/JPD-160890>.
- Kim, H.G., Ju, M.S., Ha, S.K., Lee, Hyangsook, Lee, Hyejung, Kim, S.Y., Oh, M.S., 2012. Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 35:1287–1294. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00127>.

- Kim, W.G., Mohny, R.P., Wilson, B., Jeohn, G.H., Liu, B., Hong, J.S., 2000. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: Role of microglia. *J. Neurosci.* 20, 6309–6316. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-16-06309.2000>.
- Kitada, T., Aakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nat. Lett.* 392:605–608.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Akaike, A., Taniguchi, T., 2000. The Parkinsonian models: invertebrates to mammals. *Japan J. Pharmacology* 84, 237–243.
- Koutroumpa, K., Theodoridis, S., Warren, B.H., Jiménez, A., Celep, F., Doğan, M., Romeiras, M.M., Santos-Guerra, A., Fernández-Palacios, J.M., Caujapé-Castells, J., Moura, M., Menezes de Sequeira, M., Conti, E., 2018. An expanded molecular phylogeny of Plumbaginaceae, with emphasis on *Limonium* (sea lavenders): Taxonomic implications and biogeographic considerations. *Ecol. Evol.* 8:12397–12424. <https://doi.org/10.1002/ece3.4553>.
- Kovalevich, J., Langford, D., 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* 1078:9–21. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>.
- Langston, J.W., Ballard JR, P.A., 1983. Parkinson's Disease in a Chemist Working with 1-Methyl-4-Phenyl-L,2,5,6-Tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* 309:310–310. <https://doi.org/10.1056/nejm198308043090511>.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, James W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. *Science* (80-). 219:979–980.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., Karluk, D., 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* 46:598–605. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199910\)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F).
- Lazarin-Bidóia, D., Desoti, V.C., Martins, S.C., Ribeiro, F.M., Ud Din, Z., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., De Oliveira Silva, S., 2016. Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:890–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.01360-15>.
- Le Douaron, G., Schmidt, F., Amar, M., Kadar, H., Debortoli, L., Latini, A., Séon-Ménier, B., Ferrié, L., Michel, P.P., Touboul, D., Brunelle, A., Raisman-Vozari, R., Figadère, B., 2015. Neuroprotective effects of a brain permeant 6-aminoquinoxaline derivative in cell culture conditions that model the loss of dopaminergic neurons in Parkinson disease. *Eur. J. Med. Chem.* 89:467–479. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.067>.

- Lee, J.A., Son, H.J., Park, K.D., Han, S.H., Shin, N., Kim, J.H., Kim, H.R., Kim, D.J., Hwang, O., 2015. A Novel Compound ITC-3 Activates the Nrf2 Signaling and Provides Neuroprotection in Parkinson's Disease Models. *Neurotox. Res.* 28, 332–345. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9550-z>.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278:8516–8525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>.
- Lifchitz, A. 1981. Plantas medicinales; Guia practico de Botânica Medicinal. Buenos Aires: Kier.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev.* 443.
- Lin, T.K., Chen, S. Der, Chuang, Y.C., Lin, H.Y., Huang, C.R., Chuang, J.H., Wang, P.W., Huang, S.T., Tiao, M.M., Chen, J.B., Liou, C.W., 2014. Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* 15:1625–1646. <https://doi.org/10.3390/ijms15011625>
- Lin, W.M., Zhang, Y.M., Moldzio, R., Rausch, W.D., 2007. Ginsenoside Rd attenuates neuroinflammation of dopaminergic cells in culture. *J. Neural Transm. Suppl.* 72:105–112. https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9_13
- Ma, J., Gao, S.S., Yang, H.J., Wang, M., Cheng, B.F., Feng, Z.W., Wang, L., 2018. Neuroprotective effects of proanthocyanidins, natural flavonoids derived from plants, on rotenone-induced oxidative stress and apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Front. Neurosci.* 12:1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00369>.
- Mahlke, J.D., 2007. *Buddleja Thyrsoides Lam.: Estudo Morfoanatômico, Fitoquímico E Biológico*. Diss. (Mestrado em Ciências Farm. – Programa Pós Grad. em Ciências Farm. Universidade Federal Santa Maria).
- Malpartida, A.B., Williamson, M., Narendra, D.P., Wade-Martins, R., Ryan, B.J., 2021. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's Disease: from mechanism to therapy. *Trends Biochem. Sci.* 46, 329–343. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.007>.
- Manigandan, V., Nataraj, J., Karthik, R., Manivasagam, T., Saravanan, R., Thenmozhi, A.J., Essa, M.M., Guillemin, G.J., 2019. Low molecular weight sulfated chitosan: neuroprotective effect on rotenone-induced in vitro parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 35:505–515. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9978-z>.
- Marrazzo, P., Angeloni, C., Hrelia, S., 2019. Combined treatment with three natural antioxidants enhances neuroprotection in a SH-SY5Y 3D culture model. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8100420>

- Martins Filho, A. J. M. 2011. Modelo in vitro de parkinsonismo experimental induzido por rotenona: investigação de mecanismos de ação, neuroproteção e morte celular. 2011. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 130.
- Meesarapee, B., Thampithak, A., Jaisin, Y., Sanvarinda, P., Suksamrarn, A., Tuchinda, P., Morales, N.P., Sanvarinda, Y., 2014. Curcumin i mediates neuroprotective effect through attenuation of quinoprotein formation, p-p38 MAPK expression, and caspase-3 activation in 6-hydroxydopamine treated SH-SY5Y cells. *Phyther. Res.* 28:611–616. <https://doi.org/10.1002/ptr.5036>
- Mello, J.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. 1996. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Tryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, 41:807-813.
- Mentz, L. A.; Schenkel, E. P. 1989. Plantas medicinais: a coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. *Caderno de Farmácia*, 5:93-119.
- Ministério Da Saúde, 2021. 11/4 – Dia mundial de conscientização da Doença de Parkinson: avançar, melhorar, educar, colaborar! Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/ultimas-noticias/3450-11-4-dia-mundial-de-conscientizacao-da-doenca-de-parkinson-avancar-melhorar-educar-colaborar#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o,n%C3%BAmero%20pode%20dobrar%20at%C3%A9%202040.>> Acesso em 31/05/2021 às 11:00.
- Moldzio, R., Radad, K., Krewenka, C., Kranner, B., Duvigneau, J.C., Rausch, W.D., 2013. Protective effects of resveratrol on glutamate-induced damages in murine brain cultures. *J. Neural Transm.* 120:1271–1280. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1000-6>
- Morales-García, J.A., Susín, C., Alonso-Gil, S., Pérez, D.I., Palomo, V., Pérez, C., Conde, S., Santos, A., Gil, C., Martínez, A., Pérez-Castillo, A., 2013. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors as potent therapeutic agents for the treatment of Parkinson disease. *ACS Chem. Neurosci.* 4:350—360. <https://doi.org/10.1021/cn300182g>.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- Moura, T.F.A.L., Schenkel, E.P., Schapoval, E.E.S., Simões, C.M.O., Santos, R.I. Dos, 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - plumbaginaceae (baicuru)*. *Cad. Farmácia* 1:45–54.
- Mu, X., He, G., Cheng, Y., Li, X., Xu, B., Du, G., 2009. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92:642–648. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.03.008>.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004.

- Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 59:477–480. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-804>.
- Okawara, M., Katsuki, H., Kurimoto, E., Shibata, H., Kume, T., Akaike, A., 2007. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem. Pharmacol.* 73:550–560. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.11.003>
- Orme, R.P., Bhangal, M.S., Fricker, R.A., 2013. Calcitriol imparts neuroprotection in vitro to midbrain dopaminergic neurons by upregulating GDNF expression. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062040>.
- Ou, Z., Pan, J., Tang, S., Duan, D., Yu, D., Nong, H., Wang, Z., 2021. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Frontiers Public Health.* 9:1-16. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.776847>
- Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., Cuadrado, A., 2020. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* 9:1–32. <https://doi.org/10.3390/cells9071687>.
- Pakrashi, S., Chakraborty, J., Bandyopadhyay, J., 2020. Neuroprotective role of quercetin on rotenone-induced toxicity in sh-sy5y cell line through modulation of apoptotic and autophagic pathways. *Neurochem. Res.* 45:1962–1973. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03061-8>
- Palma, P., 2005. Avaliação da anexina v e calceína am como marcadores de apoptose em linfócitos. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde). Universidade Federal de Santa Catarina, 91.
- Park, S.Y., 2010. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch. Pharm. Res.* 33:1589–1609. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y>.
- Park, B.C., Yong, S.L., Park, H.J., Kwak, M.K., Bong, K.Y., Joo, Y.K., Kim, J.A., 2007. Protective effects of fustin, a flavonoid from *Rhus verniciflua* Stokes, on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Exp. Mol. Med.* 39:316–326. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.35>.
- Park, K.Y., Jung, G.O., Lee, K.T., Choi, J., Choi, M.Y., Kim, G.T., Jung, H.J., Park, H.J., 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J. Ethnopharmacol.* 90:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.043>.
- Parkinson J An Essay on the Shaking Palsy. London: Sherwood, Neely, and Jones; 1817.
- Parnetti, L., Gaetani, L., Eusebi, P., Paciotti, S., Hansson, O., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Blennow, K., Calabresi, P., 2019. CSF and blood biomarkers

- for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 18:573–586.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30024-9).
- Parolin, M.B., Messias Reason, I.J., 2001. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. *Arq. Gastroenterol.* 38:138–144.
<https://doi.org/10.1590/s0004-28032001000200011>.
- Pezzoli, G., Cereda, E., 2013. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* 80:2035–2041.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318294b3c8>.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.E., Lang, A.E., 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 1–21.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Prasansuklab, A., Tencomnao, T., 2013. Amyloidosis in Alzheimer's disease: The toxicity of amyloid beta (A (beta)), mechanisms of its accumulation and implications of medicinal plants for therapy. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013.
- Qualls, Z., Brown, D., Ramlochansingh, C., Hurley, L.L., Tizabi, Y., 2014. Protective effects of curcumin against rotenone and salsolinol-induced toxicity: Implications for parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 25:81–89.
<https://doi.org/10.1007/s12640-013-9433-0>.
- Radad, K., Gille, G., Moldzio, R., Saito, H., Rausch, W.D., 2004. Ginsenosides Rb 1 and Rg 1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Res.* 1021, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.030>.
- Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., Debnath, M., 2015. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 48:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.005>.
- Ren, J., Fan, C., Chen, N., Huang, J., Yang, Q., 2011. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in Rats. *Neurochem. Res.* 36, 2352–2362.
<https://doi.org/10.1007/s11064-011-0561-8>
- Ribeiro, G.A., 2011. Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis*. *Inst. OSWALDO CRUZ, Pós-Graduação em Biol. Cel. e Mol.*
- Robakis, D., Fahn, S., 2015. Defining the Role of the Monoamine Oxidase-B Inhibitors for Parkinson's Disease. *CNS Drugs* 29:433–441. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0249-8>.
- Rodrigues, E.; Carlini, E. L. A. 2002. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. *Rev Racine*, p. 30-35.

- Rodrigues, R.M., Saturnino, J., Marinho, S., Calvo, B.F., 2019. Perfil neuropsicológico de pacientes com comprometimento cognitivo leve por doença de Parkinson : uma revisão sistemática 11, 13–20. <https://doi.org/10.5579/rnl.2016.0461>.
- Rodriguez, S. A.; Vina, M. D.; Murray, A. P.; Leiro, J. M. 2011. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Medica*, 77:1323–3.
- Rodriguez, S.A., Murray, A.P., Leiro, J.M., 2021. Xanthine oxidase inhibition by aqueous extract of *Limonium brasiliense* (Plumbaginaceae) 123. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-24-08410>.
- Rosito, J. F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). 1975. In: Moura, T. F. A. L.; Schenkel, E. P.; Schapoval, E. E. S.; Simões, C. M. O.; Santos, R. I. (Eds.). 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Ross, R.A., Spengler, B.A., Biedler, J.L., 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 71:741–747.
- Salari, S., Bagheri, M., 2019. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol. Res.* 68:17–24. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>.
- Samii, A., Nutt, J.G., Ransom, B.R., 2004. Parkinson's disease dementia. *Neuropsychiatr. Cogn. Chang. Park. Dis. Relat. Mov. Disord. Diagnosis Manag.* 363, 177–191. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139856669.017>.
- Sandoval-Avila, S., Diaz, N.F., Gómez-Pinedo, U., Canales-Aguirre, A.A., Gutiérrez-Mercado, Y., Padilla-Camberos, E., Marquez-Aguirre, A.L., Díaz-Martinez, N.E., 2019. Neuroprotective effects of phytochemicals on dopaminergic neuron cultures. *Neurología.* 34:114–124. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2016.04.014>.
- Santos, R.G. dos, Hallak, J.E.C., Crippa, J.A.S., 2019. O uso do canabidiol (CBD) no tratamento da doença de Parkinson e suas comorbidades. *Rev. Med.* 98:46–51. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v98i1p46-52>.
- Scheffold, A., Holtman, I.R., Dieni, S., Brouwer, N., Katz, S.F., Jebaraj, B.M.C., Kahle, P.J., Hengerer, B., Lechel, A., Stilgenbauer, S., Boddeke, E.W.G.M., Eggen, B.J.L., Rudolph, K.L., Biber, K., 2016. Telomere shortening leads to an acceleration of synucleinopathy and impaired microglia response in a genetic mouse model. *Acta Neuropathol. Commun.* 4:1–17. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0364-x>.
- Sereia, A.L., Longhini, R., Lopes, G.C., de Mello, J.C.P., 2017. Capillary Electrophoresis as Tool for Diastereomeric Separation in a *Trichilia catigua* Fraction. *Phytochem. Anal.* 28, 144–150. <https://doi.org/10.1002/pca.2653>.
- Sereia, A. L.; De Oliveira, M.T.; Baranoski, A.; Marques, L. L. M.; Ribeiro, F. M.; Isolani,

- R. G.; et al. 2019. In vitro evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide induced toxicity in human neuroblastoma SHSY5Y cells. PLoS One. 1-24,. DOI: 10.1371/journal.pone.0212089).
- Sereia, A.L., 2019. Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos toxicidade induzida por β A 25-35 em células SH-SY5Y. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá. 87.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2002. Environment, Mitochondria, and Parkinson's Disease. *Neurosci.* 8, 192–197.
- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., Taniguchi, T., 2003. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* 9:360–365. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00117-5).
- Shipley, M.M., Mangold, C.A., Szpara, M.L., 2016. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J. Vis. Exp.* 108:1–11. <https://doi.org/10.3791/53193>.
- Shukla, A. K.; Patra, S.; Dubey, V. K. 2012. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arborescens* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in Leishmania parasite. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 54:49-58.
- Simon, D.K., Tanner, C.M., Brundin, P., 2020. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin. Geriatr. Med.* 36, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>.
- Soto-Mercado, V., Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-rio, M., 2021. (–)-epigallocatechin-3-gallate diminishes intra-and extracellular amyloid-induced cytotoxic effects on cholinergic-like neurons from familial Alzheimer's disease PSEN1 E280A. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11121845>.
- Steidl, E., Ziegler, J., Ferreira, F., 2007. Doença de parkinson: revisão bibliográfica. *Rev. Discip. Sci.* 10:115–129.
- Swarnkar, S., Singh, S., Goswami, P., Mathur, R., Patro, I.K., Nath, C., 2012. Astrocyte activation: A key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem. Res.* 37:2178–2189. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0841-y>.
- Tysnes, O.B., Storstein, A., 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 124:901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.
- Valmorbida, J., 2007. Propagação da espécie *Trichilia catigua* A. Juss (Catigua). *Fac. Ciências Agrônômicas* 1–95.
- Vázquez-Vélez, G.E., Zoghbi, H.Y., 2021. Parkinson's Disease Genetics and Pathophysiology. *Annu. Rev. Neurosci.* 44:87–108. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-100720-034518>.

- Wang, H.Q., Sun, X.B., Xu, Y.X., Zhao, H., Zhu, Q.Y., Zhu, C.Q., 2010. Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 1360, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.100>.
- Werneck, A.L.S., 2010. Doença de Parkinson: Etiopatogenia, Clínica e Terapêutica. *Rev. Hosp. Univ. Pedro Ernesto* 9:10–19. <https://doi.org/10.12957/rhupe.2010.9026>.
- Who. 2007. Neurological disorders affect millions globally: WHO report. <<https://www.who.int/news/item/27-02-2007-neurological-disorders-affect-millions-globally-who-report>> . Acesso em: 31/05/2021 às 10:30.
- Williams, G.P., Schonhoff, A.M., Jurkuvenaite, A., Gallups, N.J., Standaert, D.G., Harms, A.S., 2021. CD4 T cells mediate brain inflammation and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 144:2047–2059. <https://doi.org/10.1093/brain/awab103>.
- Wirdefeldt, K., Adami, H.O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, J., 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 26. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>.
- Wu, C., Yang, K., Liu, Q., Wakui, M., Jin, G. zhang, Zhen, X., Wu, J., 2010. Tetrahydroberberine blocks ATP-sensitive potassium channels in dopamine neurons acutely-dissociated from rat substantia nigra pars compacta. *Neuropharmacology* 59:567–572. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.018>.
- Xicoy, H., Wieringa, B., Martens, G.J.M., 2017. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Stefanis, L., 2013. α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol. Neurobiol.* 47:537–551. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8341-2>.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., Wang, T., 2012. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 613–632. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>.
- Xu, Y., Tao, Z., Jin, Y., Yuan, Y., Dong, T.T.X., Tsim, K.W.K., Zhou, Z., 2018. Flavonoids, a potential new insight of leucaena leucocephala foliage in ruminant health. *J. Agric. Food Chem.* 66:7616–7626. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02739>.
- Xu, Y.Q., Gao, Y., Granato, D., 2021. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. *Food Chem.* 339:128060.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128060>.

- Yang, S., Zhang, D., Yang, Z., Hu, X., Qian, S., Liu, J., Wilson, B., Block, M., Hong, J.S., 2008. Curcumin protects dopaminergic neuron against LPS induced neurotoxicity in primary rat neuron/glia culture. *Neurochem. Res.* 33:2044–2053. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9675-z>
- Yefroyev, D.A., Jin, S., 2022. Induced Pluripotent Stem Cells for Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Biomedicines* 10:1–16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020208>.
- Yin, Z., Zhu, G., Zhao, B., Bai, Y., Jiang, Y., Neumann, W.J., Kühn, A.A., Zhang, J., 2021. Local field potentials in Parkinson's disease: A frequency-based review. *Neurobiol. Dis.* 155:105372. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105372>.
- Yoo, K.Y., Park, S.Y., 2012. Terpenoids as potential anti-alzheimer's disease therapeutics. *Molecules* 17:3524–3538. <https://doi.org/10.3390/molecules17033524>.
- Yunes, R. A., Cechinel-Filho, V. 2012. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3. ed. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí.
- Yu, S., Zheng, W., Nie, Y.X., Xin, N., Chi, Z.H., Wang, N.Q., 2010. Curcumin Prevents Dopaminergic Neuronal Death. *Rejuvenation Res.* 13:55–64.
- Zhang, Z.G., Wu, L., Wang, J.L., Yang, J.D., Zhang, Jing, Zhang, Jian, Li, L.H., Xia, Y., Yao, L.B., Qin, H.Z., Gao, G.D., 2012. Astragaloside IV prevents MPP+-induced SH-SY5Y cell death via the inhibition of Bax-mediated pathways and ROS production. *Mol. Cell. Biochem.* 364, 209–216. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1219-1>.
- Zhang, Y.; Zhao, B. 2003. Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry*, 86, 5, 1189–1200–1200.
- Zhou, H., Cheang, T., Su, F., Zheng, Y., Chen, S., Feng, J., Pei, Z., Chen, L., 2018. Melatonin inhibits rotenone-induced SH-SY5Y cell death via the downregulation of Dynamin-Related Protein 1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* 819:58–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.040>.

OBS: As referências foram configuradas com base na Revista Brasileira de Farmacognosia.