



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA
Bougainvillea glabra Choisy FRENTE À
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR PARAQUAT
EM *Drosophila melanogaster***

TESE DE DOUTORADO

Jefferson de Jesus Soares

Uruguaiana, RS, Brasil

2017

JEFFERSON DE JESUS SOARES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *Bougainvillea glabra*
Choisy FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR PARAQUAT
EM *Drosophila melanogaster***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Stricto sensu em Bioquímica da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de **Doutor em Bioquímica**.

Orientador: Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto
Denardin

Uruguaiiana

2017

**Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *Bougainvillea glabra* Choisy FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR PARAQUAT EM *Drosophila melanogaster*

Elaborada por
Jefferson de Jesus Soares

Como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin (UNIPAMPA)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim (UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Fabiane Moreira Farias (UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira (UFSM)

Prof. Dr. Vanderlei Folmer (UNIPAMPA)

Uruguaiana, Agosto de 2017.

*Dedico a toda a minha família em especial a
minha esposa Denise e a minha filha Jéssica*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais, Paulo e Ruth, e aos meus irmãos, Susana e Alexandre, por todo o incentivo e apoio mesmo estando longe. Obrigado pelo carinho, amor e confiança no meu trabalho.

Ao meu sogro e minha sogra, Abigail e Nilda. Obrigado por sempre me apoiarem, pelos ensinamentos de vida e pelo carinho.

Um agradecimento especial à minha esposa Denise, pela paciência durante esses 4 anos. Mais uma vez você acreditou em mim e compreendeu às várias horas que eu dediquei ao Doutorado. Obrigado por todo o apoio e amor. Dedico essa tese a minha filha Jéssica que nasceu no mesmo ano que ingressei no doutorado e que certamente incentivou-me ainda mais para que eu alcançasse os meus objetivos. AMO VOCÊS!

Ao meu orientador Prof. Dr. Elton Denardin, por mais uma vez acreditar no meu trabalho além de me propiciar todos os materiais para a realização desse trabalho. Obrigado por todos os ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Robson Puntel pela ajuda fundamental para responder aos questionamentos dos revisores além de disponibilizar materiais e laboratório para a realização de alguns experimentos desse trabalho. Muito obrigado!

Aos alunos de iniciação científica, Daiane, Jefferson, Verônica e a mestranda Isadora por toda a ajuda no laboratório e pela amizade. A Mayara, aluna de iniciação científica que me ajudou desde o início do doutorado. Muito obrigado por não ter desistido do nosso trabalho, por toda a dedicação e pela amizade. Ao Mateus Gayer, pela ajuda no cultivo das *Drosophilas* e pelas análises no HPLC. Ao Matheus Bianchini, obrigado por todos os ensinamentos com as *Drosophilas* e ajuda nos ensaios bioquímicos, você foi fundamental na realização deste trabalho. A Daniela, Maurício e Mariana pela ajuda neste trabalho.

A todos os professores e servidores envolvidos com o Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Fundação Universidade Federal do Pampa

AValiação DO POTENCIAL TERAPêUTICO DA *Bougainvillea glabra* Choisy FRENTE À NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR PARAQUAT EM *Drosophila melanogaster*

AUTOR: Jefferson de Jesus Soares
ORIENTADOR: Elton Luis Gasparotto Denardin
DATA E LOCAL DA DEFESA: Uruguaiiana, 18 de agosto de 2017.

O herbicida paraquat (PQ) é reconhecido como um dos principais fatores de risco para a manifestação da Doença de Parkinson (DP) por causar destruição dos neurônios dopaminérgicos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. Por isso, o PQ vem sendo utilizado como neurotoxina para a indução de sintomas semelhantes à DP em diferentes modelos experimentais. A DP é caracterizada por alterações motoras oriundas principalmente da perda seletiva e progressiva dos neurônios dopaminérgicos. Como o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da DP, o tratamento com antioxidantes sintéticos e/ou naturais pode ser útil para diminuir a ou prevenir o aparecimento de sintomas da DP. Atualmente há uma intensa busca por antioxidantes naturais oriundos principalmente de plantas medicinais que possam ser eficazes no tratamento dos sintomas da DP. Extratos preparados a partir das folhas da *Bougainvillea glabra* são utilizados na medicina tradicional, no entanto, suas ações no sistema nervoso ainda não foram estudadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito neuroprotetor do extrato etanólico das folhas de *B. glabra* (EBG) sobre alterações comportamentais e bioquímicas em moscas (*Drosophila melanogaster*) expostas ao PQ. Um segundo objetivo desse trabalho foi desenvolver um novo método de exposição a pesticida de modo a suprir as limitações do método tradicional em meio ágar. Com relação ao primeiro objetivo, moscas do tipo selvagem (macho, 1-4 dias de idade) foram concomitantemente expostas a uma dieta contendo PQ (3,5 mM) e EBG (120 µg/mL) por 4 dias. Após o tratamento foram realizadas as análises comportamentais e bioquímicas. As moscas expostas ao PQ tiveram uma diminuição da capacidade locomotora e apresentaram uma maior mortalidade que o grupo controle. A neurotoxicidade do PQ também foi associada a uma diminuição dos níveis de dopamina, aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) além de um aumento da produção de espécies reativas e peroxidação lipídica. A co-exposição com EBG protegeu contra a mortalidade, melhorou o desempenho locomotor, impediu a redução dos níveis de dopamina e diminuiu a atividade da AChE, produção de espécies reativas e peroxidação lipídica. As análises fitoquímicas do EBG revelaram a presença de importantes compostos antioxidantes como fitol, esqualeno, α,γ -tocoferol, stigmasterol, geranilgeraniol, quercetina e ácidos cafeico, vanílico, cumárico e ferúlico. Nossos resultados mostram que as folhas de *B. glabra* podem ser consideradas um agente eficaz na prevenção de distúrbios neurológicos, onde a depleção de dopamina e/ou o estresse oxidativo estão envolvidos com a DP. Com relação ao segundo objetivo, nós desenvolvemos um novo método de exposição da *Drosophila melanogaster* a pesticidas denominado “alimentação líquida contínua” (ALC) visando suprir as limitações existentes no método tradicional de exposição em meio ágar como, incerteza quanto à biodisponibilidade e quantidade de pesticidas ingeridos além da elevada manipulação das moscas em tratamento. Nesse método, a alimentação (junto com o pesticida) é disponível na forma líquida para as moscas através de capilares suspensos no frasco de tratamento. O método ALC apresentou várias vantagens em relação ao método com ágar, tais como: melhor biodisponibilidade da alimentação, menor consumo de reagentes, e pouca manipulação das moscas em tratamento. Nós esperamos que o método ALC possa ser útil em futuras investigações sobre a toxicidade de pesticidas e que também possa ser utilizado em outras áreas que utilizam a *D. melanogaster* como modelo experimental.

Palavras-chave: paraquat, estresse oxidativo, neurotoxicidade, Doença de Parkinson, *Bougainvillea glabra*, *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

THERAPEUTIC POTENTIAL EVALUATION OF *Bougainvillea glabra* Choisy ON PARAQUAT INDUCED-NEUROTOXICITY IN *Drosophila melanogaster*

AUTHOR: Jefferson de Jesus Soares
ADVISOR: Elton Luis Gasparotto Denardin
Date and Place of Defense: Uruguaiana, August, 18th, 2017.

The paraquat herbicide (PQ) is recognized as one of the main risk factors for the manifestation of Parkinson's disease (PD). PQ has already been shown to cause destruction of dopaminergic neurons, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, being used as neurotoxin for the induction of PD-like symptoms in different experimental models. PD is characterized by motor alterations originating mainly from the selective and progressive loss of dopaminergic neurons. As oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of PD, treatment with synthetic and / or natural antioxidants may be useful in slowing or preventing the onset of PD symptoms. Therefore, there is currently an intense search for natural antioxidants derived mainly from medicinal plants that may be effective in the treatment of PD symptoms. Extracts prepared from the leaves of *Bougainvillea glabra* are used in traditional medicine, however, their actions in the nervous system have not yet been studied. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible neuroprotective effect of ethanol extract from *B. glabra* leaves (BG extract) on behavioral and biochemical changes in flies (*Drosophila melanogaster*) exposed to PQ. Wild type flies (male, 1-4 days old) were concomitantly exposed to a diet containing PQ (3.5 mM) and BG extract (120 µg /mL) for 4 days. After the treatment, behavioral and biochemical analyzes were performed. Flies exposed to PQ had a decrease in locomotor capacity and had a higher mortality than the control group. The neurotoxicity of PQ was also associated with a decrease in dopamine levels, increased activity of the acetylcholinesterase enzyme (AChE), and increased production of reactive species and lipid peroxidation. Co-exposure with BG extract prevented mortality, improved locomotor performance, prevented depletion of dopamine levels, and decreased AChE activity, reactive species production and lipid peroxidation. The phytochemical analyzes of BG extract revealed the presence of important antioxidant compounds such as phytol, squalene, α , γ -tocopherol, stigmasterol, geranylgeraniol, quercetin and caffeic, vanillic, coumaric and ferulic acids. Our results show that *B. glabra* leaves can be considered an effective agent in the prevention of neurological disorders, where dopamine depletion and / or oxidative stress are involved in PD. Generally in pesticide toxicity studies with *D. melanogaster*, exposure to pesticides occurs by introducing them into the feed medium in agar medium. Unfortunately, this type of exposure has several limitations such as: uncertainty about the bioavailability and amount of pesticides ingested besides the high manipulation of the flies being treated due to the need of medium exchange. Thus, this work also aimed to develop a new method of exposure to pesticides in order to overcome the limitations of the method using the agar medium. We developed the method called "Continuous Liquid Feeding" (CLF). In this method, feed (along with the pesticide) is available in liquid form to the flies through suspended capillaries in the treatment vial. The CLF method presented several advantages over the agar method, such as: better feed bioavailability, lower reagent consumption, and little handling of the flies under treatment. We hope that the CLF method may be useful in future investigations on the toxicity of pesticides and that it can also be used in other areas that use *D. melanogaster* as an experimental model.

Key-words: paraquat, oxidative stress, neurotoxicity, Parkinson's disease, *Bougainvillea glabra*, *Drosophila melanogaster*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Possíveis mecanismos de neurotoxicidade do paraquat.....	18
Figura 2. Ciclo redox do paraquat.....	19
Figura 3. Representação da estrutura química do MPP ⁺ , paraquat, MPPP e MPTP.....	20
Figura 4. Representação esquemática da via nigroestriatal normal e na DP.....	23
Figura 5. Síntese da dopamina.....	26
Figura 6. Neurotransmissão dopaminérgica.....	28
Figura 7. Metabolismo da dopamina.....	29
Figura 8. Processos fisiológicos que podem levar a neurodegeneração dopaminérgica.....	31
Figura 9. Foto ilustrativa da <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 10. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Figura 11. Regiões do cérebro da <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Figura 12. Foto da espécie <i>Bougainvillea glabra</i> Choisy.....	37
Figura 13. Representação da estrutura química do fitol, esqualeno e vitamina E.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Revisão bibliográfica

6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina

ATP- Trifosfato de adenosina

ALC – Alimentação líquida contínua

AChE – Enzima acetilcolinesterase

DM – *Drosophila melanogaster*

DA - Dopamina

DAT - Transportadores de dopamina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP- Doença de Parkinson

EBG – Extrato etanólico das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FADH2 - Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

MDA - Malondialdeído

MAO-A- Monoamina oxidase A

MAO-B- Monoamina oxidase B

MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridínio

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NOX – NADPH oxidase

OCT3 – Transportador de compostos orgânicos

PQ - Paraquat

SOD – Enzima superóxido dismutase

VMAT- Vesículas de transporte de monoamina

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Pesticidas e a poluição ambiental.....	14
2.2 Relação entre pesticidas e doenças neurodegenerativas.....	16
2.3 Paraquat.....	17
2.4 Doença de Parkinson (DP), estresse oxidativo e terapias antioxidantes	21
2.5 <i>D. melanogaster</i> : modelo para o estudo de compostos naturais com efeito neuroprotetor.....	32
2.6 <i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	36
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	42
4.1 Artigo 1: “Exposição ao paraquat causa sintomas semelhantes a Doença de Parkinson e estresse oxidativo em <i>Drosophila melanogaster</i> : efeito neuroprotetor da <i>Bougainvillea glabra</i> Choisy”	43
4.2 Artigo 2: “Alimentação líquida contínua: novo método para estudar a toxicidade de pesticidas em <i>Drosophila melanogaster</i> ”	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES.....	50
7 PERSPECTIVAS.....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são amplamente utilizados na agricultura visando principalmente aumentar a produtividade agrícola. Entretanto, o uso indiscriminado desses compostos gera graves problemas ambientais além ocasionar uma exposição contínua a organismos não-alvos como os seres humanos. Evidências e estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre a exposição a pesticida e a elevada taxa de manifestação de desordens neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Mostafalou & Abdollahi, 2013).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por perda progressiva e irreversível de neurônios em regiões específicas do cérebro, causando disfunções motoras e cognitivas (Franco et al., 2010). Em muitos casos, estas doenças surgem esporadicamente e as causas são desconhecidas. Entretanto, a agregação anormal de proteínas no citoplasma ou no núcleo das células do cérebro representa uma característica patológica dessas doenças (Franco et al., 2010). Entre as desordens neurodegenerativas mais comuns está a Doença de Parkinson (DP). Este distúrbio de elevada incidência que acomete cerca 1 a 2% da população acima dos 65 anos é caracterizado clinicamente por alterações motoras, tais como: tremor de repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez muscular (Przedborski, 2005). Em termos de etiologia, a DP é definida pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos que apresentam seus corpos celulares na parte compacta da substância negra (SNpc), pela presença de inclusões intracitoplasmáticas ricas em α -sinucleína, denominados corpos de Lewy, nos neurônios da substância negra e por alterações na enzima tirosina hidroxilase (Perez and Hastings, 2004).

A etiologia da DP atualmente ainda é desconhecida, entretanto evidências e estudos demonstram que a doença pode ser o resultado da combinação da exposição a neurotoxinas ambientais (pesticidas e metais) com a predisposição genética do indivíduo (Baltazar et al., 2014). Neste contexto, a exposição ao herbicida paraquat (PQ) é reconhecida como um dos principais fatores de risco para a manifestação da DP. A neurotoxicidade do PQ é atribuída ao seu efeito redox cíclico que gera uma quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) levando ao estresse oxidativo. Esse composto causa a destruição dos neurônios dopaminérgicos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo sendo utilizado como neurotoxina para a indução de sintomas semelhantes à DP em diferentes modelos experimentais.

Diversos modelos animais têm sido empregados para se compreender melhor os mecanismos envolvidos na DP, incluindo primatas e roedores (Belaid et al., 2015; Pan et al., 2015). Entretanto, esses modelos geralmente tem um elevado custo além de restrições relacionado aos comitês de ética animal. Conseqüentemente, existe uma necessidade de modelos experimentais alternativos. A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, tem sido amplamente aceita como um modelo para estudar os mecanismos moleculares envolvidos em doenças neurológicas, incluindo a DP. Essa mosca tem homologia entre 5 dos 6 genes relacionados com a DP em humanos. Além disso, esse invertebrado possui um rápido tempo de regeneração, sistema nervoso bem descrito, similaridade com os mecanismos celulares e moleculares neuronais dos vertebrados e similaridades, em termos de comportamento motor, entre o parkinsonismo induzido em moscas e a DP em humanos (Bagatini et al., 2011; Sudati et al., 2013).

Embora seja bem conhecido que as exposições ambientais e a susceptibilidade genética individual podem determinar o aparecimento de sintomas da DP; o mecanismo celular e molecular responsável pelo processo de neurodegeneração permanece ainda desconhecido (Sudati et al., 2013). Entretanto, uma elevada produção de radicais livres e anormalidades na função mitocondrial podem ser mediadores críticos do dano neuronal na DP (Sudati et al., 2013; Valko et al., 2007). Estudos que realizaram a autópsia de cérebros de pacientes com DP têm demonstrado anormalidades na função mitocondrial além de um aumentado nível de estresse oxidativo nesse órgão (Perfeito et al., 2013). O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido à sua elevada taxa de atividade metabólica e pela baixa a moderada atividade das enzimas de defesas antioxidantes (Wynne et al., 2010; Perfeito et al., 2013). Como o estresse oxidativo desempenha um papel central na DP, muitos estudos têm sido realizados para investigar a possível ação neuroprotetora de antioxidantes em modelos de indução de DP. Apesar da disponibilidade de diversos antioxidantes sintéticos, há uma crescente tendência na busca por antioxidantes naturais derivados de plantas medicinais utilizadas no uso popular (Sudati et al., 2013).

A *Bougainvillea glabra* Choisy é uma espécie de planta da família *Nyctaginaceae* e do gênero *Bougainvillea*, de características subtropicais, oriunda do sul do Brasil. As folhas dessa espécie já demonstraram ter as seguintes propriedades farmacológicas: anti-microbiana, anti-fúngica e anti-hiperglicêmica (Edwin et al., 2006; Senapati et al., 2006; Alanís-Garza et al., 2007), além de possuir compostos com elevada capacidade antioxidante e com importantes

propriedades neurofarmacológicas como o fitol, squaleno e α -tocoferol (Rani et al., 2012; Kabuto et al., 2013; Costa et al., 2014; Salehi et al., 2015).

Nesse sentido, considerando que: (a) a exposição ao paraquat pode levar a degeneração dopaminérgica causando sintomas de DP relatado por diversos autores; (b) as folhas da *Bougainvillea glabra* Choisy possuem compostos com propriedades neurofarmacológicas; (c) ainda não foram explorados as propriedades neuroprotetora dessa espécie. O presente estudo avaliou o possível efeito neuroprotetor de extratos preparados a partir das folhas de *B. glabra* frente à neurotoxicidade induzida por paraquat utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster*. Dentro da área de toxicologia de pesticidas, esse estudo também teve o objetivo de desenvolver um novo método de exposição de *Drosophila melanogaster* a pesticidas visando suprir as limitações dos métodos tradicionais de exposição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas e a poluição ambiental

Os pesticidas, mas comumente conhecidos como agrotóxicos, são compostos bioativos utilizados na agricultura com a finalidade de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos e produtos agrícolas em geral, visando garantir maior produtividade (Galli et al., 2006).

Existem cerca de 600 ingredientes ativos, utilizados na formulação de pesticidas, registrados para uso específico na agricultura. Destes, 350 contribuem com 98% dos pesticidas mais utilizados, sendo que 80% deles são rotineiramente usados na agricultura de países da América do Sul, como o Brasil (Galli et al., 2006). Estes pesticidas compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação. Algumas classes químicas são compostas por organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, derivados de uréia, bipiridílios e nitrocompostos (Unnevehr et al., 1997).

No Brasil, a venda de agrotóxicos saltou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões entre 2001 e 2008, alcançando valores recordes de US\$ 8,5 bilhões em 2011. Assim, já em 2009, alcançamos a indesejável posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, ultrapassando a marca de 1 milhão de toneladas, o que equivale a um consumo médio de 5,2 Kg de agrotóxico por habitante. É importante destacar que a liberação do uso de sementes transgênicas no Brasil foi uma das responsáveis por colocar o país no primeiro lugar do ranking de consumo de agrotóxicos, uma vez que o cultivo dessas sementes geneticamente modificadas exige o uso de grandes quantidades desses produtos (INCA, 2015). O consumo de agrotóxicos aumentou 700% nos últimos quarenta anos, enquanto que a área agrícola aumentou apenas 78% no mesmo período. Os estados brasileiros que mais se destacam quanto à utilização de agrotóxicos são: São Paulo (25%), Paraná (16%), Minas Gerais (12%), Rio Grande do Sul (12%), Mato Grosso (9%), Goiás (8%) e Mato Grosso do Sul (5%). Com relação à quantidade total de ingredientes ativos, as culturas agrícolas brasileiras nas quais mais se aplicam agrotóxicos são: soja, milho, citros e cana-de-açúcar (Spadotto et al., 2004).

A aplicação de pesticidas gera, comumente, grandes problemas: os pesticidas muitas vezes são tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de

hormônios; são aplicados em grandes quantidades, em áreas bastante extensas e, geralmente, possuem grande persistência no meio ambiente, além de gerar sérios problemas de qualidade das águas superficiais e subterrâneas. O efeito e a magnitude decorrentes do uso de pesticidas no ambiente dependem basicamente dos processos de transferência e transformações que ocorrem em cada compartimento do sistema solo-água-planta-atmosfera (Primel et al., 2005). Além disso, resíduos de pesticidas são encontrados frequentemente em diferentes tipos de frutas e vegetais, podendo causar diferentes efeitos tóxicos na saúde humana.

Os grupos de alto risco expostos a pesticidas incluem: trabalhadores de produção, formuladores, pulverizadores, misturadores, carregadores e trabalhadores agrícolas. Durante a fabricação e formulação dos pesticidas o risco é ainda maior uma vez que os trabalhadores manipulam vários produtos químicos tóxicos, incluindo pesticidas, matérias-primas e solventes orgânicos (Aktar et al., 2009). Os pesticidas exibem diferentes graus de toxicidade em humanos, sendo classificados pela Organização Mundial da Saúde e pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, em classe IA – extremamente tóxico, IB – altamente tóxico, II – moderadamente tóxico, III – ligeiramente tóxico e IV – produtos que não apresentam perigos agudos no uso normal. Esses compostos podem induzir toxicidade aguda logo após a exposição a uma dose, sub-crônica, crônica ou ainda, apresentar uma toxicidade tardia após uma exposição contínua. As formas de exposição a pesticidas podem ser dermal, digestiva, pela mucosa respiratória ou conjutiva (Marutescu & Chifiriuc, 2017).

As formulações de pesticidas de um modo geral não contêm somente pesticidas, mas sim uma mistura de pesticida com outros aditivos que podem ser surfactantes, aditivos ácidos ou básicos, entre outros (Marutescu & Chifiriuc, 2017). Os efeitos toxicológicos combinados de dois ou mais componentes de uma mistura de pesticidas podem assumir uma das seguintes formas: independente, adição de dose ou interação. Nem todas as misturas de pesticidas com estruturas químicas semelhantes produzem efeitos aditivos; assim se atuarem em locais múltiplos, as suas misturas podem produzir efeitos tóxicos diferentes. A abordagem aditiva também falha quando se avaliam misturas que envolvem um composto químico secundário que altera a toxicocinética do pesticida resultando uma destoxificação aumentada ou reduzida, o que é seguido por uma toxicidade maior ou menor, respectivamente (Hernandez et al., 2013).

Já foram identificados mais de 95 alvos bioquímicos dos pesticidas, que podem ser afetados tanto em humanos como em animais, tais como enzimas (acetilcolinesterase (AChE), enzimas antioxidantes, citocromo c reductase), canais iônicos, receptores de neurotransmissores (acetilcolina, dopamina, noradrenalina, ácido γ -aminobutírico) e

citoesqueleto (biossíntese da tubulina) (Casida, 2009). Há uma grande quantidade de evidências e estudos sobre a relação entre a exposição a pesticidas e a elevada taxa de manifestação de doenças crônicas, como diferentes tipos de câncer, diabetes, desordens neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, defeitos congênitos e transtornos reprodutivos (Mostafalou & Abdollahi, 2013).

2.2 Relação entre pesticidas e doenças neurodegenerativas

Os distúrbios neurodegenerativos são caracterizados por doenças que apresentam a perda de células neuronais em áreas do córtex, gânglios basais, cerebelo, tronco cerebral e sistemas locomotores, levando a disfunção do sistema nervoso (Brown et al., 2005). A neurodegeneração pode ser encontrada em diferentes níveis de circuitos neuronais variando de molecular para sistêmica. O dano a membranas de organelas por proteínas monoméricas ou oligoméricas podem também contribuir para a manifestação dessas doenças. Como por exemplo, a α -sinucleína pode causar danos a membranas através da indução da curvatura das mesmas. Além disso, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo também possuem um papel importante na patogênese das doenças neurodegenerativas (Khanam et al., 2016).

A etiologia da maioria dos distúrbios neurodegenerativos é multifatorial e consiste em uma interação entre fatores ambientais e predisposição genética. O papel da exposição a pesticidas na manifestação das doenças neurodegenerativas tem sido suscitado há muito tempo, porém, os agentes causadores específicos e os mecanismos moleculares ainda não são completamente compreendidos (Parrón et al., 2011). Para as principais doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP), a Doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica existem evidências que ligam a sua etiologia à exposição em longo prazo/baixa dose a pesticidas, tais como paraquat, maneb, dieldrin, piretróides e organofosforados (Baltazar et al., 2014).

A exposição a baixas concentrações de pesticidas pode afetar as células cerebrais produzindo uma perda de neurônios em regiões específicas do cérebro que resulta em declínio cognitivo e prejuízos na memória, atenção e função motora (Hayden et al., 2010). Os mecanismos de neurotoxicidade dos pesticidas envolvem processos inflamatórios, estresse oxidativo e consequente apoptose celular. A estimulação da produção de radicais livres, indução de peroxidação lipídica e distúrbios na capacidade antioxidante total do organismo são mecanismos de toxicidade da maioria dos pesticidas (Abdollahi et al., 2004; Franco et al., 2009). Parrón et al. (2011) realizaram um estudo na Espanha para avaliar a influência da

exposição ambiental a pesticidas na manifestação de doenças como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, esclerose múltipla e na tentativa de suicídio e psicose afetiva em indivíduos que moravam em áreas de alta e baixa exposição à pesticidas. A determinação da intensidade de exposição foi estabelecida conforme o número de hectares dedicados à agricultura intensiva e a venda de pesticida per capita. Um total de 17 mil casos foram avaliados entre 1998 e 2005. As análises multivariadas dos casos mostraram que a população que vivia em áreas com alto uso de pesticidas apresentava um risco aumentado para desenvolver Doença de Alzheimer e cometer suicídio. Além disso, os homens que viviam nas áreas de alta exposição a pesticidas demonstraram maiores riscos de polineuropatias, distúrbios afetivos e tentativas de suicídio. Segundo os autores, os resultados desse estudo demonstram que a exposição à pesticidas aumenta a incidência de certos distúrbios neurológicos.

2.3 Paraquat

O paraquat é um dos herbicidas mais amplamente utilizados no mundo, aplicado no controle de ervas daninha anuais e perenes em uma grande variedade de culturas, incluindo cereais oleaginosas, frutas e hortaliças. É considerado não-seletivo e de amplo espectro, matando uma ampla gama de gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas (Chagas, 2007). Esse herbicida foi considerado o mais tóxico à saúde humana nos últimos 60 anos, entretanto, ainda é utilizado em aproximadamente 90 países, como a China, Tailândia e Brasil. Nos Estados Unidos é classificado sob uso restrito, enquanto que na União Europeia está proibido desde julho de 2007 (Pizzutti et al., 2016; Singh & Ramassamy, 2012).

Por muitos anos, estudos experimentais com o paraquat avaliaram seus efeitos tóxicos sobre pulmão, fígado e rins, provavelmente porque a toxicidade induzida por este herbicida nesses órgãos é a responsável pela morte após exposição aguda. Entretanto, danos significativos ao cérebro também foram observados em indivíduos que morreram de intoxicação por paraquat (Bové et al., 2005). Ainda, estudos epidemiológicos tem sugerido um aumento do risco em desenvolver a Doença de Parkinson através da exposição ao paraquat (Liou et al., 1997).

Os mecanismos de neurotoxicidade induzida por paraquat ainda não são completamente compreendidos, no entanto, diversos fatores têm sido estudados entre eles: indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, apoptose e autofagia, inibição do sistema ubiquitina-

proteasoma e indução de sinucleinopatia e taupatia (Dinis-Oliveira et al., 2009; Franco et al., 2010) (Figura 1). Dentro do neurônio dopaminérgico, o PQ pode gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio o que pode consequentemente gerar estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode causar defeitos no DNA, peroxidação de lipídios e proteínas, além de desorganizar o citoesqueleto. Através da geração de estresse oxidativo, o PQ pode perturbar de forma indireta a mitocôndria causando a inibição dos complexos I e III, desacoplamento das etapas de fosforilação e variações no potencial de membrana da mitocôndria, eventos que levam a um decréscimo nos níveis de ATP. O PQ pode afetar de forma direta a agregação de proteínas. Todos os processos celulares afetados pelo PQ podem levar a morte celular (Cicchetti et al., 2008).

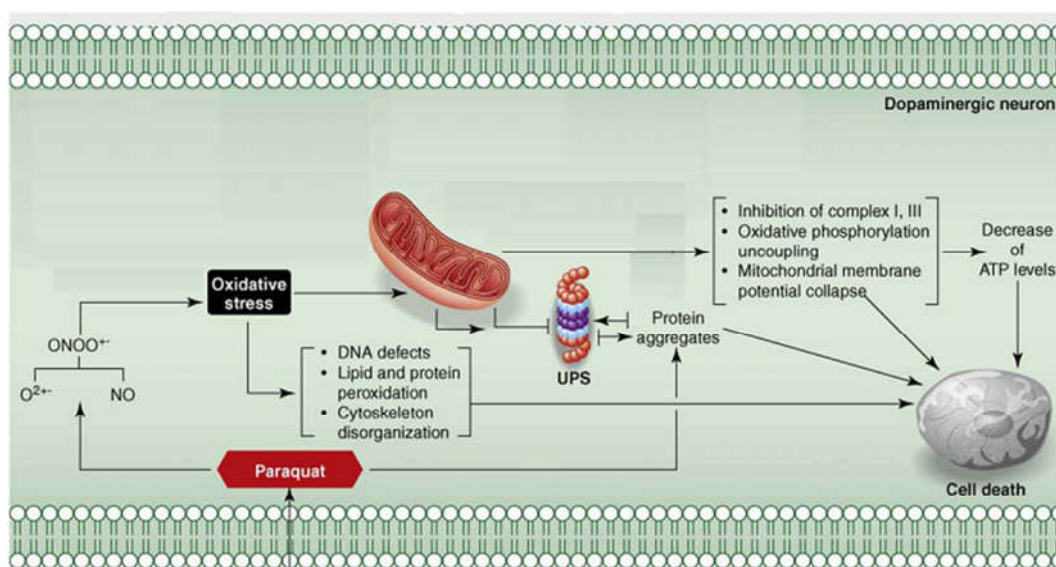


Fig. 1. Possíveis mecanismos de neurotoxicidade do paraquat. Fonte: adaptação de parte do artigo publicado na revista “Trends in Pharmacological Sciences (2008): 475-483 (Cicchetti et al., 2008)”.

O paraquat é um composto redox cíclico comumente utilizado em laboratório para gerar estresse oxidativo. Esse composto é capaz de receber um elétron de várias diaforases celulares (enzimas que transferem elétrons do NAPH), principalmente a NADPH-citocromo P450 redutase, para formar o radical paraquat monocátion (PQ^{•+}). Outras enzimas que são capazes de reduzir o paraquat (PQ²⁺) para PQ^{•+} incluem a NADH:ubiquinona oxiredutase mitocondrial, xantina oxidase (NOS), NAPH oxidases da família NOX e a tiorredoxina redutase (Baltazar et al., 2014). Na presença de oxigênio, o radical PQ^{•+} é rapidamente

reoxidado, regenerando o paraquat dicatiônico (PQ^{2+}) e mais ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Figura 2). O $O_2^{\bullet-}$ produzido pode reagir com o óxido nítrico para formar o peroxidonitrito ($ONOO^{\bullet}$) ou ser dismutado pela superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na presença de Fe^{2+} o H_2O_2 reduzido à radical hidroxil (OH^{\bullet}), a espécie reativa de oxigênio (ERO) mais danosa que rapidamente reage com o DNA, lipídios e proteínas (Halliwell, 1991).

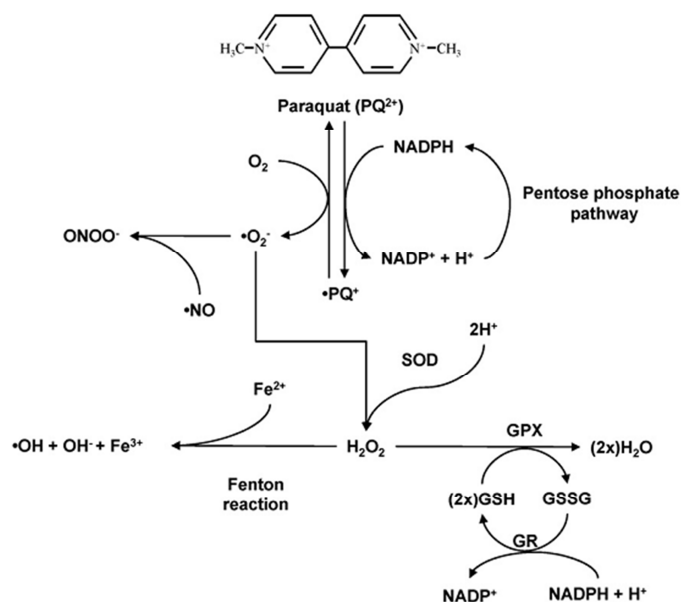


Fig. 2. Ciclo redox do paraquat. Fonte: adaptação de parte do artigo publicado na revista “Chemico-Biological Interactions (2010): 289–300 (Franco et al., 2010)”.

O papel do estresse oxidativo na indução de neurodegeneração pelo PQ tem sido demonstrado por diversos modelos celulares e em modelos *in vivo*. A exposição ao PQ causa a redução dos níveis da glutathiona reduzida (GSH), um importante antioxidante endógeno, e um aumento dos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) na substância negra de camundongos (Kang et al., 2009). Além disso, esse composto pode aumentar os níveis de peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e de DNA fragmentado (Yang and Tiffany-Castiglioni, 2005). Apesar de alguns estudos demonstrarem que o PQ possui baixa afinidade pela mitocôndria (Richardson et al., 2005), Hosamani & Muralidhara (2013) em um estudo com *Drosophila melanogaster*, observaram que a exposição aguda ao paraquat (24 h nas concentrações de 10, 20 e 40 mM) pode causar um aumento na produção de ânion superóxido na mitocôndria levando a ativação da SOD mitocondrial e diminuir significativamente a atividade dos

complexos I-III, II-III e da ATPase. Além disso, o PQ causou uma diminuição robusta na atividade da succinato desidrogenase e um declínio moderado na atividade da citrato sintase sugerindo um efeito específico nas enzimas do ciclo do ácido cítrico.

Outro fator que pode estar diretamente relacionado com a ação neurotóxica do paraquat é a sua similaridade estrutural com o MPP^+ (Figura 3), um metabólito ativo do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Dauer & Przedborski, 2003). O MPTP foi descoberto na década de 80 como um contaminante na produção do MPPP, uma droga ilícita denominada na época como nova “heroína sintética”. Ao utilizar o MPPP, através de injeção intravenosa, os usuários dessa droga também estavam sendo expostos ao MPTP. Após a utilização dessa droga os usuários começaram a desenvolver sintomas semelhantes às da DP (Langston et al., 1983).

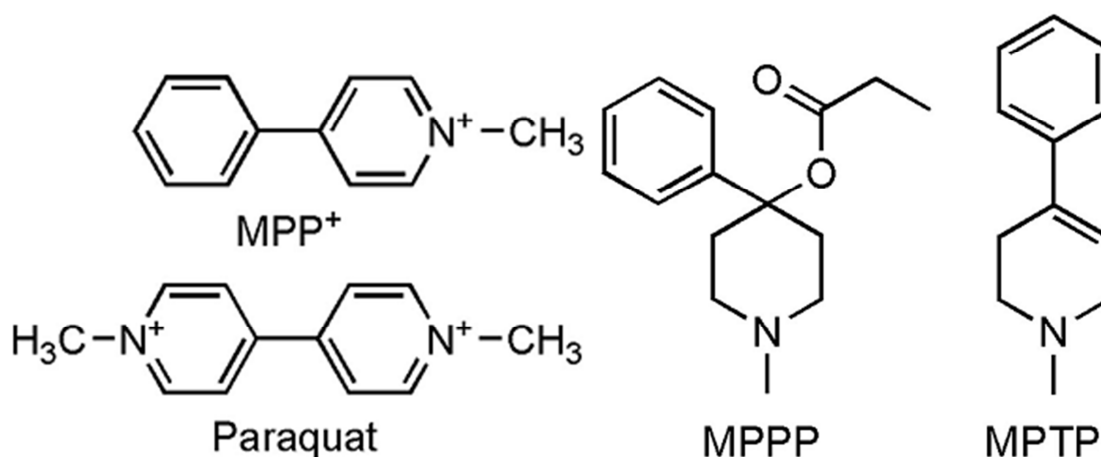


Fig. 3. Representação da estrutura química do MPP^+ , paraquat, MPPP e MPTP. Fonte: adaptação de parte do artigo publicado na revista “NeuroRx (2005): 484-494 (Bové et al., 2005)”.

Atualmente, já é bem estabelecido que o MPTP possui a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, ser distribuído no encéfalo pelos astrócitos e causar a destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos. Desta forma, esse composto é muito utilizado para induzir sintomas de DP em modelos experimentais. Essa destruição seletiva dos neurônios dopaminérgico pelo MPTP ocorre porque o seu metabólito ativo o MPP^+ pode ser

transportado para dentro desses neurônios através dos transportadores de dopamina (DATs) (Dauer & Przedborski, 2003).

Inicialmente por ter uma estrutura similar ao do MPP⁺ (Figura 3), acreditava-se que o paraquat poderia entrar nos neurônios dopaminérgicos através dos DATs. Entretanto, estudos posteriores mostraram que o paraquat não era um substrato para os DATs (Richardson et al., 2005). Outros mecanismos de entrada do paraquat nos neurônios dopaminérgicos foram especulados como através do transportador de aminoácido neutro (Shimizu et al., 2001). Entretanto, Rappold et al. (2011) demonstraram que o PQ na sua forma dicatiônica (PQ²⁺) realmente não é um substrato para os DATs, no entanto quando o PQ²⁺ é convertido ao cátion monovalente PQ⁺ por algum agente redutor ou uma NADPH oxidase da micróglia, esse composto acaba se tornando um substrato para os DATs e pode se acumular no neurônios dopaminérgicos onde pode induzir estresse oxidativo e citotoxicidade. Ainda nesse estudo, os autores demonstraram que o PQ⁺ também é um substrato para o transportador de cátions orgânicos (OCT3), que são expressos em células não dopaminérgicas na região nigroestriatal. Por causar a seletiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta, o PQ é muito utilizado em diversos modelos experimentais para induzir importantes características patológicas da DP.

2.4 Doença de Parkinson (DP), estresse oxidativo e terapias antioxidantes

A DP perpetua o nome de James Parkinson, um médico britânico que em 1817 fez a primeira descrição médica da doença através do trabalho intitulado “Essay on the Shaking Palsy” originalmente definida como “paralisia trêmula”. Já o francês Jean-Martin Charcot foi o responsável por melhor caracterizar a descrição feita em 1817 e divulgar informações sobre a DP no mundo, e junto com Parkinson desempenhou um importante papel na história da DP nos anos de 1800 (Goetz, 2011). A DP é considerada a segunda desordem neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer (De Lau & Breteler, 2006). De acordo com Pringsheim et al. (2014), a prevalência da doença aumenta de acordo com o aumento da idade. Desta forma, cerca de 1 a 2% da população mundial acima de 65 anos é afetada por essa doença (De Lau & Breteler, 2006). No Brasil a prevalência da doença pode ser considerada similar com a encontrada em países americanos, europeus e orientais (Barbosa et al., 2006). A origem étnica das pessoas parece ter uma relação com a incidência da DP. Van Den Eeden et al. (2003) relataram que a doença incide de forma mais elevada em hispânicos,

seguidos (ordem decrescente) por : brancos não hispânicos, asiáticos e negros. Além disso, há uma maior incidência dessa doença em homens com idade avançada. As possíveis causas da diferença entre os gêneros estão relacionadas às propriedades neuroprotetoras dos hormônios esteroides femininos, a diferença dos sexos quanto às exposições ambientais, ocupacionais e a influências genéticas gênero-específicas (Alves et al., 2008; Gillies & McArthur, 2010).

A DP é neuropatologicamente caracterizada por uma degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e pela presença de inclusões intracelulares denominadas corpos de *Lewy* (Figura 4). A morte dos neurônios dopaminérgicos que apresentam seus corpos celulares na parte compacta da substância negra (SNpc), leva a perda dos terminais dopaminérgicos do estriado e também das regiões dos gânglios basais e cortical, resultando em um déficit importante de dopamina nessas regiões (Price et al., 1987; Perez and Hasting, 2004; Przedborski, 2005). A dopamina (DA) é um neurotransmissor que está envolvido no controle da locomoção e cognição (Giros et al., 1996). Desta forma, a DP é clinicamente caracterizada pela presença de disfunções motoras, como tremores de repouso, bradicinesia, acinesia, rigidez e instabilidade postural (Przedborski, 2005). É necessária uma diminuição substancial de cerca de 80% nos níveis de dopamina estriatal para que os sintomas motores se manifestem (Deumens et al., 2002). O tremor parkinsoniano é o sintoma inicial em cerca de 60-70% dos pacientes, sendo a característica mais evidente da doença, embora não seja necessariamente incapacitante (Poewe, 2006). Pacientes com DP também apresentam dificuldades na programação e execução de movimentos, e em estágios mais avançado exibem dificuldades em iniciar os movimentos. Já a rigidez muscular pode ser definida como um aumento da resistência da articulação durante um movimento passivo (Dauer & Przedborski, 2003).

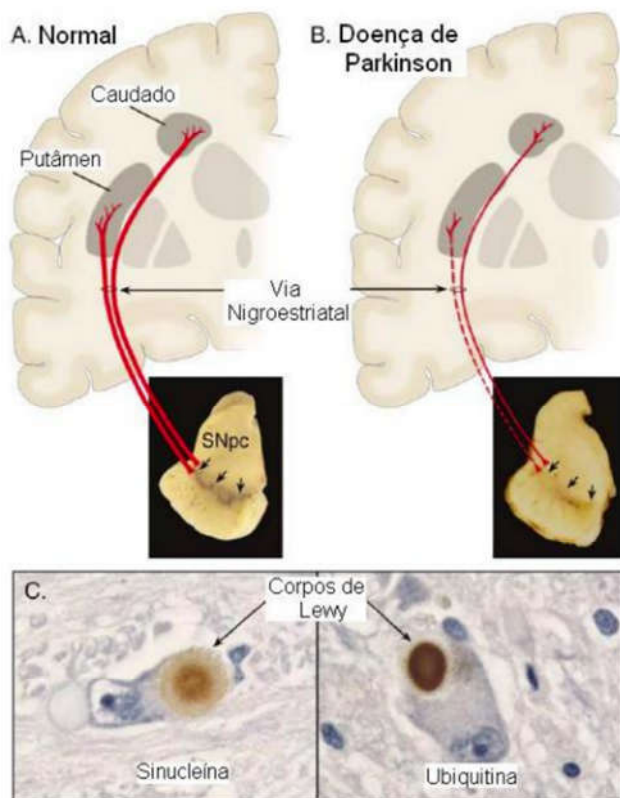


Fig. 4. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). Em (C) imuno-histoquímica marcando inclusões celulares (corpos de *Lewy*) em neurônios dopaminérgicos. Fonte: adaptação de parte do artigo publicado na revista “Neuron (2003): 889-909 (Dauer & Przedborski, 2003)”.

Os corpos de *Lewy* são estruturas esféricas organizadas em um núcleo denso de hialina e circundadas por um halo claro, medindo aproximadamente 15 μm de diâmetro, e compostas por numerosas proteínas, incluindo α -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos. Estas estruturas não são exclusivas da DP e podem ser encontradas em indivíduos com Doença de Alzheimer, na demência com corpos de *Lewy* ou ainda como um achado acidental patológico em pessoas saudáveis de idade avançada (Schulz & Falkenburger, 2004). O papel dos corpos de *Lewy* na morte neuronal, ainda é controverso, mas sabe-se que sua presença perturba o funcionamento normal dos neurônios, interrompendo a ação de importantes mensageiros químicos como, por exemplo, acetilcolina e dopamina (Perez and Hasting, 2004).

Embora a maioria dos casos de DP seja idiopática, a identificação de algumas formas de DP familiar, tanto autossômica dominante como recessiva despertou o interesse para o envolvimento genético na patogênese da DP. Vários são os estudos que investigaram o papel de genes específicos na doença, sendo alguns dos mais conhecidos: *DJ-1*, *SNCA*, *Parkin* (*Park2*), *Pink1* (*Park6*), *Park13* e *LRRK2*.(Abdullah et al., 2014). Além disso, fatores não-genéticos como a exposição a toxinas ambientais como metais e pesticidas podem contribuir para a manifestação da DP (Collins & Neafsey, 2002). Dessa forma, acredita-se que a DP é multifatorial, sendo o resultado de uma interação de fatores genéticos e ambientais. Entretanto é importante ressaltar que fatores endógenos ou exógenos, dependendo da sua intensidade, podem provocar a doença separadamente (Ellwanger, 2015).

Grande parte dos sintomas motores da DP estão relacionados à neurodegeneração dopaminérgica na SNpc. Porém, outros sistemas neurotransmissores e distintas regiões encefálicas também estão envolvidas, incluindo o locus coeruleus, núcleos motores dorsais, substância inominata, campo retrorubral, área tegmental ventral, o sistema nervoso vegetativo e o córtex cerebral; conseqüentemente, é observada uma perda neuronal que vai além dos neurônios dopaminérgicos, incluindo outros sistemas como o serotoninérgico e o colinérgico. A degeneração não-dopaminérgica destaca-se como principal responsável pelo desenvolvimento de sintomas não-motores da DP, como constipação, disfunção olfativa, declínio cognitivo, depressão, ansiedade e distúrbios do sono (Schapira et al., 2006; Obeso et al., 2010; Watson et al., 2010).

Independente da forma de manifestação da DP (idiopática ou genética), o estresse oxidativo é considerado como um mecanismo subjacente que leva a disfunção e morte celular. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (principalmente de oxigênio e nitrogênio) e a habilidade de um determinado sistema biológico em neutralizar essas espécies através de mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos (Dias et al., 2013). No estresse oxidativo, a alta concentração de espécies reativas cria um estado propício para que ocorra o dano celular. Evidências indicam que o dano oxidativo e a disfunção mitocondrial contribuem para a cascata de eventos que levam a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (Dias et al., 2013). Isso é suportado pela análise de cérebros *pos mortem* que mostram aumento dos níveis de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (sub-produto da peroxidação lipídica), 8-hidroxi- 2'-deoxiguanosina e 8-hidroxi-guanosina (produtos de oxidação do DNA e RNA, respectivamente) e de modificações carbonílicas em proteínas solúveis (Yoritaka et al., 1996; Alam et al., 1997; Zhang et al., 1999).

A intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no cérebro pode fornecer uma explicação para a magnitude do papel que essas moléculas reativas desempenham na DP. O cérebro consome cerca de 20% do suprimento de oxigênio do corpo, sendo que uma parcela significativa desse oxigênio é convertida em ERO (Johnson et al., 2012). As ERO podem ser geradas no cérebro por diferentes fontes, tanto nos neurônios como na glia, sendo a cadeia transportadora de elétrons a principal contribuinte a nível mitocondrial (Dumont & Beal, 2011; Yan et al., 2011). Outras fontes de incluem monoamina oxidases (MAO), NADPH oxidase (NOX) e outras flavo-enzimas. Além disso, o cérebro contém altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, que sob condições de estresse oxidativo resultam em peroxidação lipídica gerando produtos tóxicos como o malondialdeído (MDA) e o HNE (Liu et al., 2008).

Devido à presença de enzimas geradoras de ERO como a tirosina hidroxilase e a MAO, os neurônios dopaminérgicos são particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo. Esses neurônios possuem ferro, que catalisa a reação de Fenton, gerando o radical hidroxil (OH^\bullet), que pode contribuir diretamente para o estresse oxidativo. Outra importante fonte geradora de ERO nos neurônios dopaminérgicos é o metabolismo da DA. (Dias et al., 2013). A DA é sintetizada a partir da tirosina no citoplasma do neurônio e, a seguir, é transportada no interior de vesículas secretoras para armazenamento e liberação (Figura 5).

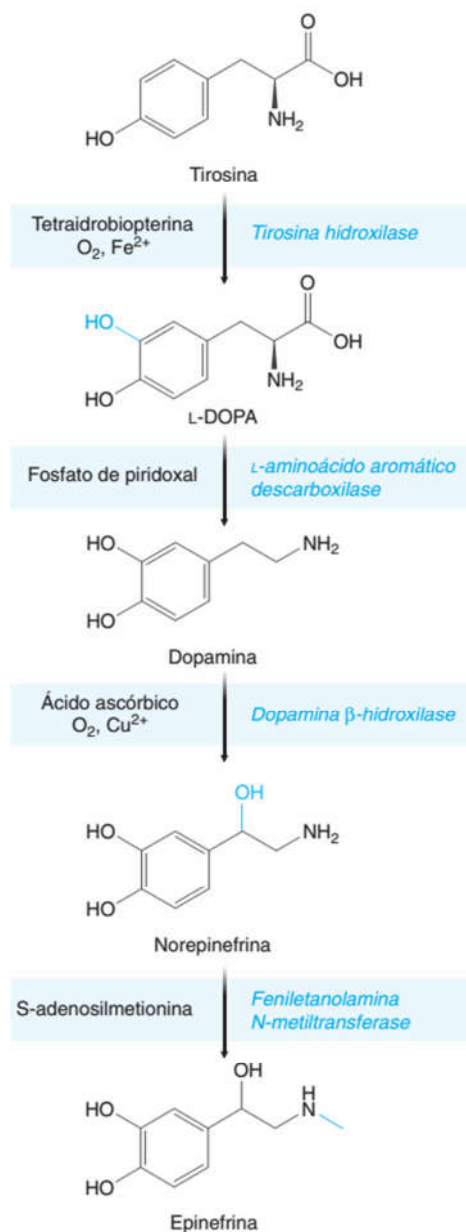


Fig. 5. Síntese da dopamina. A dopamina é sintetizada a partir do aminoácido tirosina através de uma série de reações em etapas. Nas células que contêm dopamina β -hidroxilase, a dopamina pode ser ainda convertida em norepinefrina, nas células que contêm feniletanolamina N-metiltransferase, a norepinefrina pode ser convertida em epinefrina. Fonte: Adaptação do livro “Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia (Golan, 2009).”

São necessárias duas bombas moleculares separadas para o transporte da dopamina nas vesículas sinápticas. Uma ATPase de prótons concentra prótons na vesícula, criando um gradiente eletroquímico caracterizado por pH intravesicular baixo, e um interior eletropositivo na vesícula. Esse gradiente é explorado por um antiportador de prótons, o transportador de monoaminas vesicular (VMAT), que permite o deslocamento de prótons ao longo do gradiente (para fora da vesícula) enquanto efetua o transporte simultâneo de DA para dentro da vesícula, contra o seu gradiente de concentração. Com a estimulação da célula nervosa, as vesículas de armazenamento de DA fundem-se com a membrana plasmática de modo dependente de Ca^{+2} , liberando DA na fenda sináptica. A DA na fenda pode ligar-se tanto a receptores de DA pós-sinápticos quanto a auto-receptores de DA pré-sinápticos (Figura 6).

Existem vários mecanismos para remover a DA sináptica e interromper o sinal produzido pelo neurotransmissor. A maior parte da DA liberada na fenda sináptica é transportada de volta à célula pré-sináptica por uma proteína transmembrana, o transportador de DA (DAT) (Golan, 2009). A DA é uma molécula instável que pode ser metabolizada facilmente pela via da MAO (Figura 7) ou sofrer auto-oxidação formando derivados de dopamina-quinonas e radicais livres. A auto-oxidação da dopamina é catalisada por metais, oxigênio ou enzimas como a tirosinase (Munoz et al., 2012).. Em condições normais, os níveis de dopamina são regulados pela MAO-A, localizada nos neurônios catecolaminérgicos. No entanto, com a degeneração neuronal que ocorre na DP e no envelhecimento, a MAO-B localizada nas células gliais aumenta a atividade e se torna a enzima predominante para metabolizar a dopamina (Dias et al., 2013). Os produtos do metabolismo mediado por MAO-B são: 3,4-dihidroxifenil-acetaldeído, amônia e H_2O_2 . O H_2O_2 é altamente permeável à membrana, entrando em neurônios dopaminérgicos vizinhos, podendo gerar radical hidroxil através da reação de Fenton, causando estresse oxidativo o que pode levar a neurodegeneração (Kumar & Andersen, 2004; Nagatsu & Sawada, 2006).

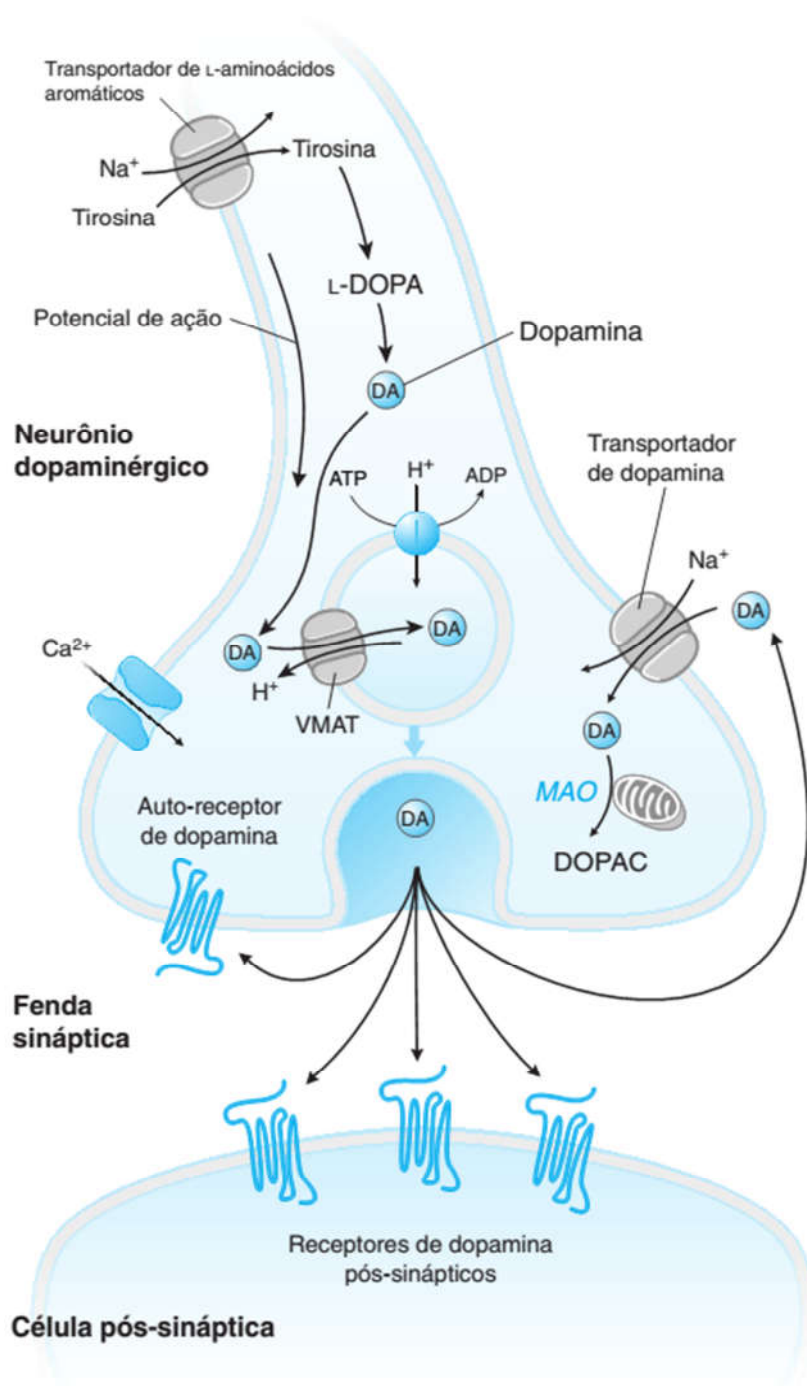


Fig. 6. Neurotransmissão dopaminérgica. A dopamina (DA) é sintetizada no citoplasma e transportada por vesículas secretoras. Com a estimulação da células nervosa, a DA é liberada na fenda sináptica onde estimula receptores dopamínicos pós e pré-sinápticos. A maior parte da DA liberada na fenda sináptica é transportada de volta a célula pré-sináptica, por uma proteína transmembrana, o transportador de DA (DAT). Fonte: Adaptação do livro “Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia (Golan, 2009).”

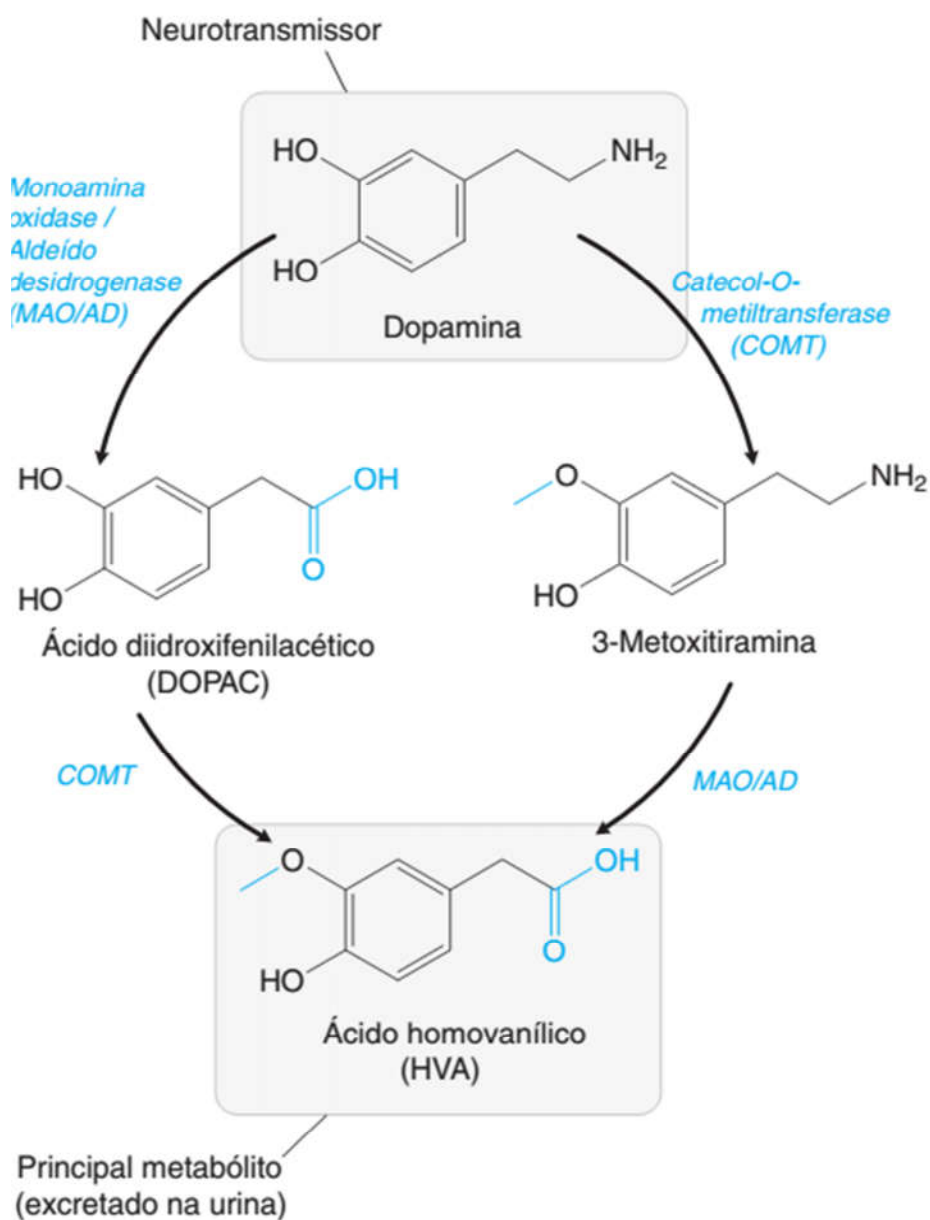


Fig. 7. Metabolismo da dopamina (DA). A DA é metabolizada a ácido homovanílico (HVA) através de uma série de reações. Adaptação do livro “Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia (Golan, 2009).”

Os produtos da auto-oxidação da DA, dopamina-quinonas, também podem contribuir diretamente na neurodegeneração. As dopamina-quinonas podem modificar diversas proteínas relacionadas à DP, como a α -sinucleína, parkin, DJ-1, superóxido dismutase-2 (SOD2) e

UCH-L1, causar disfunção mitocondrial e inativar os transportadores de dopamina (DAT) e a enzima tirosina hidroxilase (Kuhn et al., 1999; Whitehead et al., 2001; Girotto et al., 2012; Zhou et al., 2014). As dopamina-quinonas podem ser oxidadas a aminocromo, cujo ciclo redox leva a depleção de NADPH e a geração de radical superóxido e neuromelanina (Norris et al., 2005; Zecca et al., 2008). A neuromelanina é um polímero insolúvel que confere um pigmento preto a substância negra. Grânulos dessa substância têm sido observados em pacientes jovens com DP, casos idiopáticos de DP, assim como em modelos experimentais onde o MPTP induz sintomas de DP (Blesa et al., 2015). A neuromelanina parece permanecer por muito tempo no espaço extracelular e por isso é considerada uma das moléculas responsáveis por induzir neuroinflamação crônica na DP (Hwang, 2013). A figura 8 mostra um resumo das condições que podem gerar estresse oxidativo levando a neurodegeneração dopaminérgica.

Ainda não existe tratamento adequado para a DP. A terapia atual está restrita ao alívio dos sintomas e nenhuma droga capaz de inibir a degeneração neuronal foi descoberta. O tratamento mais utilizado atualmente para a DP está restrito a reposição da dopamina utilizando seu precursor, a L-DOPA (Figura 5), associada a um inibidor da dopa-descarboxilase (benzerazida, carbidopa), o que gera uma biotransformação para dopamina, compensando o déficit de dopamina no cérebro. Inicialmente essa terapia se mostra bastante eficaz, mas com a continuidade do tratamento ocorrem efeitos colaterais como náuseas vômitos e hipotensão postural (Xu et al., 2005). Outras drogas anticolinérgicas como o biperideno, orfenadrina, difenidramina, benzotropina e prociclidina também são utilizadas para o controle dos tremores, entretanto elas não são totalmente eficazes (Stocchi, 2003; Luchtman et al., 2012). Agonistas dopaminérgicos não seletivos como a cabergolina, lisuride, pramipexol e ropitínoil são utilizados de forma preventiva e nos estágios iniciais da DP. Em estágios precoces podem ser utilizados inibidores da enzima MAO-B, como a selegilina e rasagilina (Miller, 2002; Stocchi, 2003).

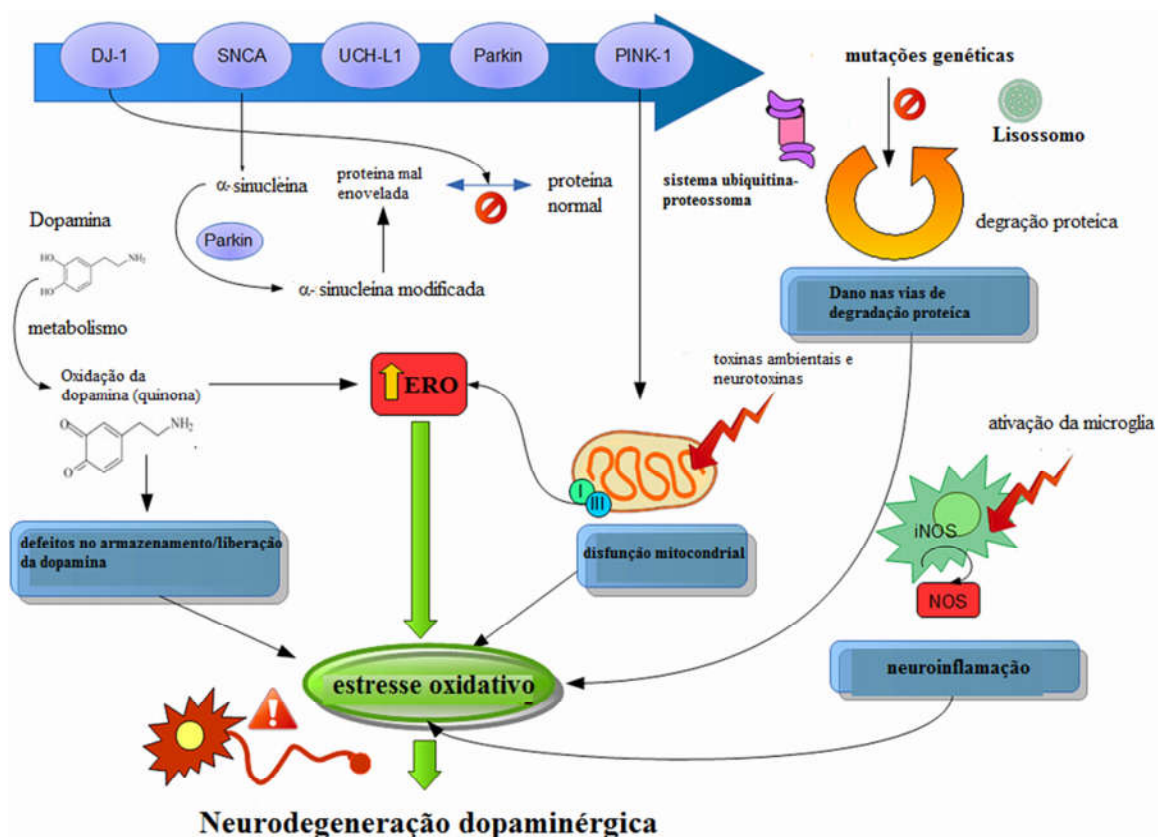


Fig. 8. Processos fisiológicos que podem levar a neurodegeneração dopaminérgica. Fonte: adaptação de parte do artigo publicado na revista “Frontiers in Neuroanatomy (2015): 9, 91 (Blesa et al., 2015)”.

Como o estresse oxidativo possui um papel importante na manifestação da DP, muitos estudos têm sido realizados para investigar a ação neuroprotetora dos antioxidantes em modelos experimentais de DP. Embora vários antioxidantes sintéticos estejam disponíveis, há uma tendência crescente na busca de antioxidantes derivados de plantas medicinais (Sudati et al., 2013). Nesse sentido, Pérez-Barrón et al. (2015) demonstraram que o extrato metanólico da *Buddleja cordata* possui um efeito neuroprotetor em um modelo experimental de DP utilizando o MPP⁺ como indutor. Esse extrato protege dos danos locomotores causados pelo MPP⁺, além de prevenir a diminuição dos níveis de dopamina e diminuir os níveis de peroxidação lipídica. Segundos os autores, esses efeitos podem estar relacionados com a presença de fenilpropanóides presentes no extrato. Compostos isolados que estão presentes na composição de plantas medicinais como o ácido gálico, quercetina, ácido ferúlico, rutina e crisina também possuem efeito neuroprotetor em diferentes modelos experimentais de DP (Haleagrahara et al., 2011; Jeong et al., 2011; Khan et al., 2012; Mansouri et al., 2013; Guo et

al., 2016). Vários modelos biológicos são utilizados para descobrir novos compostos naturais que possam ser utilizados na terapia contra a DP entre eles destaca-se a *Drosophila melanogaster*.

2.5 *D. melanogaster*: modelo para o estudo de compostos naturais com efeito neuroprotetor

A *Drosophila melanogaster* (DM), popularmente conhecida como mosca da fruta, pertence à subespécie Diptera da família Drosophilidae, sendo encontrada em diversas partes do mundo. Durante o curso da evolução, a separação das linhagens artrópode e vertebrada por milhares de anos sugeriu que a *Drosophila* não tivesse nenhuma relação com humanos. Entretanto, análises genéticas, moleculares e comportamentais realizadas ao longo de um século mostraram que a DM (Figura 1) possui uma elevada similaridade com os mamíferos. A DM tem sido utilizada como modelo primordial para estudos experimentais de biologia eucariótica multicelular. Através desse modelo foi possível descobrir os princípios fundamentais da biologia, como a validação da teoria cromossômica da herança e a primeira descrição experimental do gene como unidade funcional (Hirth, 2010).



Fig. 9. Foto ilustrativa da *Drosophila melanogaster*.

A DM é vastamente utilizada como modelo experimental principalmente devido a fatores como: baixo custo, fácil manuseio no laboratório, elevada geração de descendentes geneticamente idênticos e período de vida bastante curto (40 A 120 dias) dependendo da dieta

(Piper et al., 2005; Pletcher et al., 2005). O ciclo de vida da DM dura cerca de 10-12 dias a 25 °C (Figura 2) sendo que uma única fêmea pode colocar de 30-50 ovos por dia (Barnes et al., 2008). Além disso, a DM possui somente 4 pares de cromossomos que podem ser geneticamente manipulados. O sequenciamento do genoma das moscas revelou que a DM possui uma similaridade de 75% com genes relacionados a doenças em humanos, tendo grande potencial para ser utilizada como modelo de doença humana (Panchal & Tiwari, 2017). Neste sentido, nos últimos anos a DM tem sido utilizada como modelo experimental no estudo de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP, uma vez que seu genoma contém de 77% do loci relacionada com as doenças neurológicas em seres humanos e mais de 85% genes associados com deficiências cognitivas (Hirth, 2010; Panchal & Tiwari, 2017). Além disso, a DM possui homologia entre 5 dos 6 genes relacionados à DP com humanos (Whitworth et al., 2006).

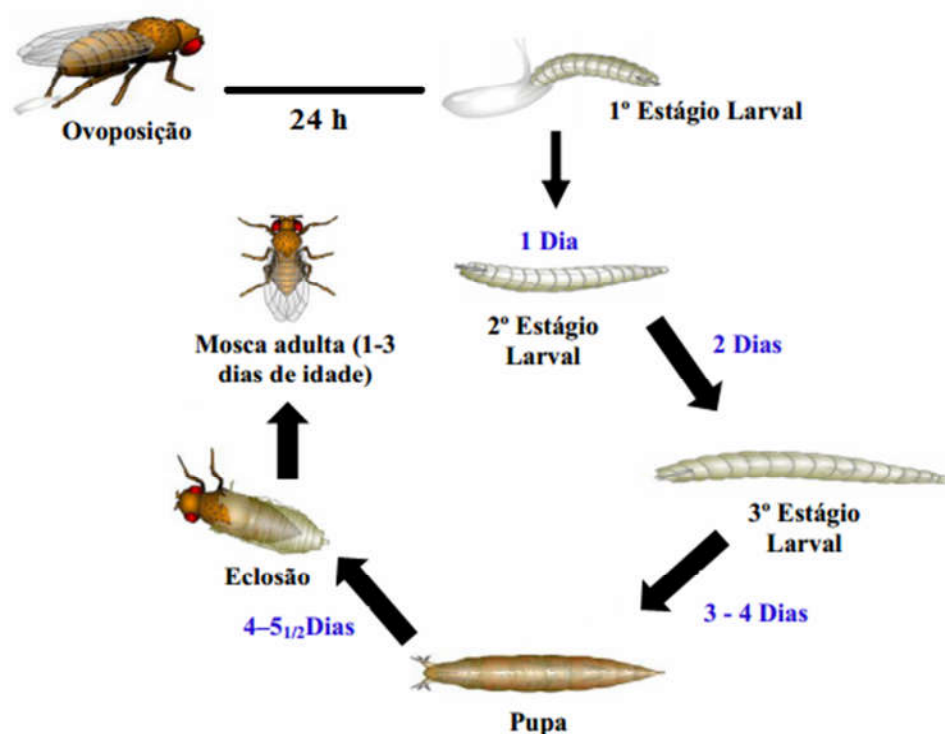


Fig. 10. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Fonte: Adaptado de Ecker, 2014.

O cérebro da mosca adulta possui mais de 100.000 neurônios que formam circuitos discretos e fibras nervosas que medeiam comportamentos complexos, incluindo ritmo

circadiano, o sono, a aprendizagem e a memória. Embora possua uma distribuição de neurônios dopaminérgicos no SNC de forma diferenciada a dos vertebrados, a DM demonstra conservação de muitos processos celulares e moleculares de desenvolvimento e função neuronal (Sang & Jackson, 2005; Pandev & Nichols, 2006). A mosca apresenta em seu sistema nervoso central, seis conjuntos neuronais dopaminérgicos (ppm3, PPL2, PPL1, PAM, PAL e ppm 1/2). (Figura 11). Como ocorre nos humanos, o sistema dopaminérgico presente na mosca também está associado ao controle locomotor. Conseqüentemente, danos causados aos neurônios dopaminérgicos da DM levam a déficits locomotores comparáveis aos que ocorrem na DP (Lima & Miesenbock, 2005). Assim, fármacos empregados no tratamento dos sintomas de DP em humanos também se mostram eficazes em modelos utilizando a DM (Pendleton et al., 2002; Pandev & Nichols, 2006).

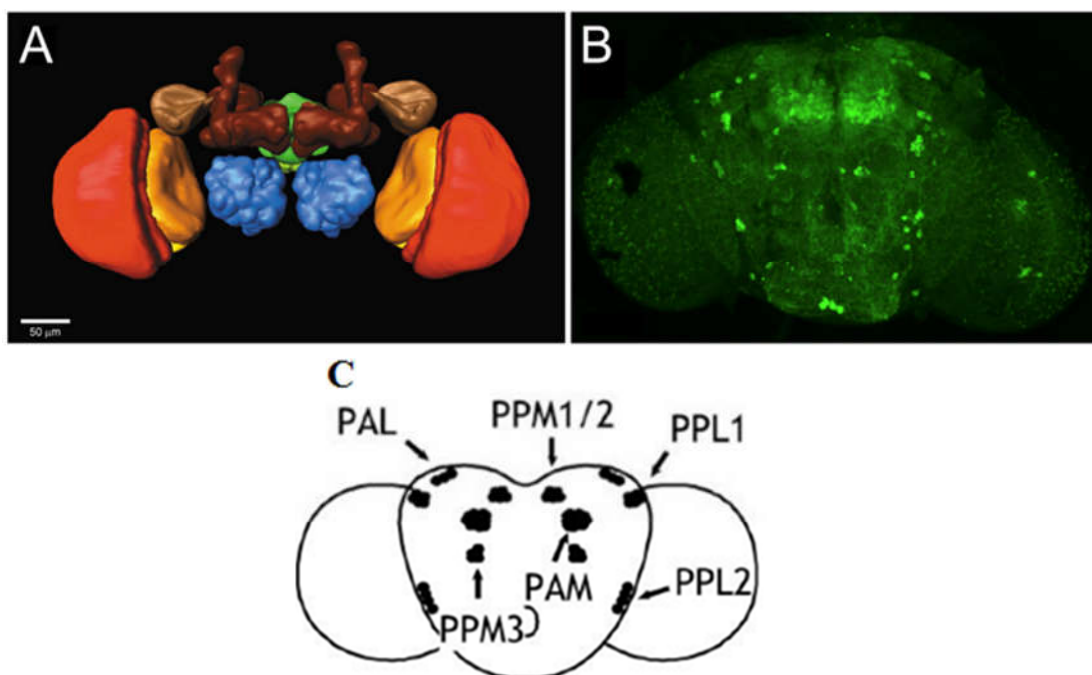


Fig. 11. Regiões do cérebro da *Drosophila melanogaster* (DM). Em (A) as principais regiões estão destacadas nas cores: marrom (corpo do cogumelo); bege (cifre lateral); azul (lóbulo antenal); verde (complexo central); vermelho (medula); laranja (lóbulo) e amarelo (lóbulo prato). (B) Neurônios dopaminérgicos determinados através de marcador para tirosina hidroxilase em microscopia focal. (C) Representação esquemática dos cluster dopaminérgicos: PP1 e PPL2 (junção posterior lateral); PPM1/2 (junção posterior medial 1 e 2); PPM3 (posterior medial 3); PAL (anterior lateral) e PAM (anterior medial). Fonte:

adaptação de parte do artigo publicado na revista “Journal Neuroscience (2004): 10993-10998, (Coloum & Birman, 2004)”.

Este invertebrado permite a rápida triagem de potenciais fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, dentre elas a DP. Estudos com a DM que visam a descoberta de novos compostos naturais com efeito neuroprotetor em relação a DP utilizam moscas geneticamente modificadas ou induzem sintomas da DP através da exposição a neurotoxinas como rotenona e paraquat (Park et al., 2012; Sudati et al., 2013)

Siddique et al. (2013) avaliaram o efeito da suplementação do extrato das folhas de *Eucalytus citriodora* em moscas transgênicas que expressam α -sinucleína nos neurônios. Neste estudo, as moscas transgênicas demonstraram uma diminuição da capacidade locomotora e um aumento do estresse oxidativo em relação a moscas do tipo selvagem, sendo assim, utilizadas como modelo de DP. A suplementação com o extrato por 21 dias melhorou a capacidade locomotora das moscas transgênicas além de diminuir o estresse oxidativo. Segundo os autores, o extrato das folhas de *Eucalytus citriodora* possui potencial para tratar os sintomas da DP.

Jahromi et al. (2013) demonstraram que a exposição ao paraquat na concentração 15 mM por 24 h ocasionou uma diminuição da capacidade locomotora das moscas tratadas além de induzir estresse oxidativo evidenciado pela depleção do conteúdo de glutathiona, aumento da peroxidação lipídica e aumento da atividade de enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase. O pré-tratamento com o extrato da raiz de *Decalepis hamiltonii* por 14 dias preveniu a neurotoxicidade e o estresse oxidativo ocasionado pela exposição ao paraquat. Da mesma forma, Park et al. (2012) demonstraram que a exposição ao paraquat em papel filtro na concentração de 20 mM por 24h ocasionou déficits locomotores, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da atividade da acetilcolinesterase e da superóxido dismutase. A exposição ao paraquat também causou variações na expressão de genes associados com efeitos antioxidantes e anti-envelhecimento. A adição de curcumina, quercetina, extrato de *Sanguisorba officinalis* e extrato de *Zedoariae rhizoma* na alimentação das moscas antes da exposição ao paraquat preveniu o dano oxidativo e locomotor ocasionado pelo paraquat. Além disso, esse fitoquímicos modularam a expressão dos genes *sod1*, *sod2*, *cat*, *gstD1* e *mth* que foram afetados pela exposição ao paraquat. Esses estudos confirmam a utilidade da DM como modelo para investigar estratégias terapêuticas que possam ser promissoras no tratamento de distúrbios de movimento associados à DP.

Nos estudos de toxicidade de pesticidas utilizando como modelo experimental a DM geralmente a exposição ao pesticida ocorre através da incorporação do pesticida no meio de alimentação das moscas. Existem diferentes maneiras de introduzir um determinado pesticida na alimentação das moscas. Os métodos mais conhecidos são os que utilizam papel-filtro, capilar ou ágar. No método utilizando papel filtro, o pesticida é solubilizado em uma solução 5% de sacarose sendo adicionado a um papel filtro fixo no fundo do frasco de tratamento. A desvantagem desse método decorre do fato de não ser possível avaliar o quanto de alimentação é consumido. Além disso, uma dieta com alta concentração de sacarose, mesmo em um curto período de tempo, pode causar variações metabólicas substanciais que podem confundir com os efeitos do pesticida (Rzezniczak et al., 2011). Ja et al. (2007) desenvolveram um método de alimentação através de capilares. Através desse método é possível avaliar a quantidade da alimentação que está sendo ingerida pelas moscas. Entretanto estudos posteriores demonstraram que a alimentação através de capilares reduz substancialmente a deposição de ovos como o tempo de vida das moscas quando comparado com o método tradicional de alimentação em meio ágar (Bass et al., 2007; Lee et al., 2008). Certamente, dos três métodos de alimentação (exposição) o mais utilizado para o estudo de toxicidade de pesticidas em DM é o meio ágar. Nesse método, a alimentação das moscas juntamente com o pesticida é misturada com uma solução de 1 a 2% de ágar para gerar um meio sólido de alimentação. Apesar de ser muito utilizado, esse método apresenta algumas limitações como a incerteza quanto à biodisponibilidade e quantidade ingerida da alimentação pelas moscas. Além disso, esse método necessita a troca do meio de alimentação a cada 2 dias, onde há uma elevada manipulação das moscas em tratamento algo que pode gerar estresse, morte e fuga. Com isso, novos métodos de exposição a pesticidas devem ser desenvolvidos para suprir as limitações dos métodos tradicionais.

2.6 *Bougainvillea glabra* Choisy

Bougainvillea Comm. Ex. Juss é um gênero nativo da América do Sul, sendo seu nome derivado do seu descobridor, Louis Antoine de Bougainville, navegador francês e comandante militar que foi a primeira pessoa a tomar nota deste tipo de planta em 1768. O gênero *Bougainvillea* pertence à família Nyctaginaceae, que possui cerca de 27 espécies, três das quais são horticulturalmente importantes: *Bougainvillea spectabilis* Wild, *Bougainvillea glabra* Choisy (Figura 12) e *Bougainvillea peruviana* (Fawad et al., 2012).



Fig. 12. Foto da espécie *Bougainvillea glabra* Choisy.

Tradicionalmente, as folhas de *B. glabra* são utilizadas para tratar distúrbios como diarreia, acidez estomacal, tosse, bronquite, asma, dor de garganta e hepatite (Vicent et al., 2017). As folhas da *B. glabra* possuem importantes propriedades farmacológicas como: antibacteriana, antihiperlipidêmica, antifúngica, analgésica e anti-inflamatória (Edwin et al., 2006; Alanís-Garza et al., 2007; Gupta et al., 2009; Elumalai et al., 2012). Recentemente, o extrato aquoso das folhas de *B. glabra* foi utilizado para sintetizar nanopartículas de prata eficazes no controle do mosquito *Culex tritaeniorhynchus* que é um importante vetor encefalite (Vicent et al., 2017). Estudos sobre a composição fitoquímica das folhas *B. glabra* ainda são escassos. Entretanto, Rani et al. (2012) demonstraram que as folhas possuem na sua composição saponinas, flavonóides, taninos, esteróides e terpenóides além de compostos bioativos com: fitol, esqualeno e vitamina E (Figura 13).

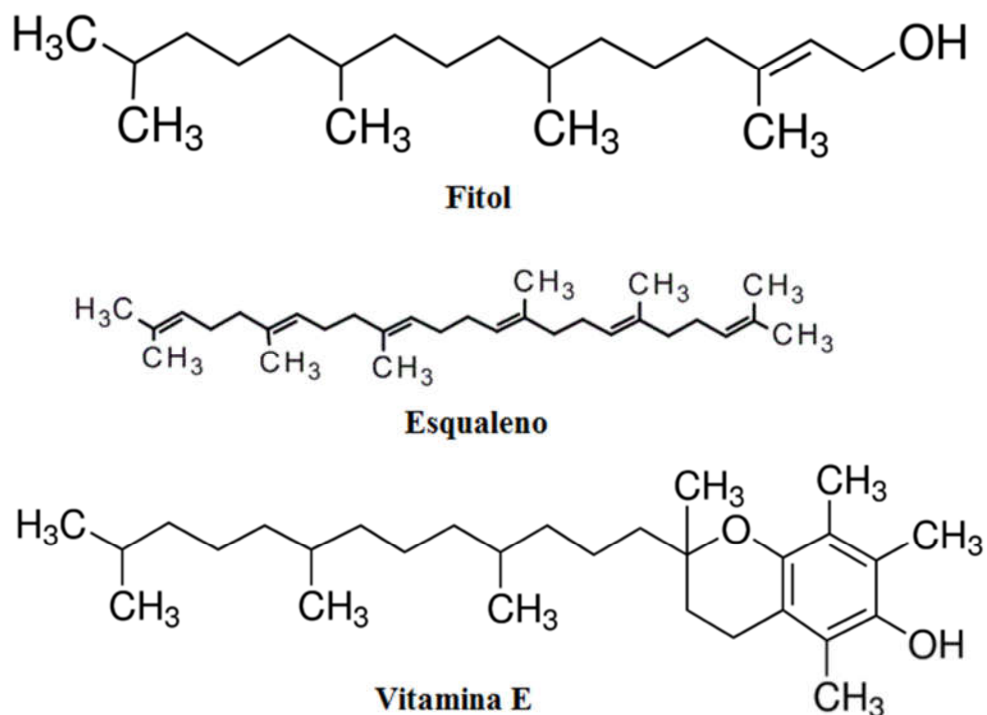


Fig. 13. Representação da estrutura química do fitol, esqualeno e vitamina E.

O fitol é um álcool insaturado de cadeia ramificada pertencente à classe dos diterpenos que está presente na constituição da clorofila (Santos et al., 2013). Esse composto é conhecido por inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e por bloquear os efeitos teratogênicos do retinol (Arnhold et al., 2002; Inoue et al., 2005). Recentemente, estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade neurofarmacológica do fitol. Esse composto possui atividade sedativa, ansiolítica, anti-convulsão (Costa et al., 2014) e possui capacidade de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (Syad et al., 2016), principal alvo terapêutico no tratamento da doença de Alzheimer. Além disso, Santos et al. (2013) demonstraram que o fitol possui capacidade antioxidante e antinoceptiva.

O esqualeno é um triterpeno intermediário da biossíntese de esteróis. Devido aos seus efeitos dietéticos significativos, biocompatibilidade, inércia e outras propriedades vantajosas, o esqualeno tem sido amplamente utilizado em formulações farmacêuticas (Reddy & Couvreur, 2009). Esse composto tem uma capacidade de captura do radical hidroxil muito mais forte em comparação com a glutatona reduzida (GSH) além de possuir atividades preventivas contra o câncer (Das et al., 2003). Kabuto et al. (2013) examinaram os efeitos da

administração oral de esqualeno em um modelo de DP em camundongos, que foi desenvolvido pela injeção intracerebroventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A administração do esqualeno 7 dias antes e 7 dias após a injeção da 6-OHDA preveniu a redução dos níveis de dopamina estriatal, indicando um possível efeito neuroprotetor desse composto.

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que está presente nas folhas verdes dos vegetais e que possui diversas funções biológicas. Vitamina E representa um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados, incluindo os de ocorrência natural e os estereoisômeros biologicamente ativos do α -tocoferol (Salehi et al., 2015). Essa vitamina é o mais importante antioxidante lipossolúvel nas membranas biológicas, e protege as estruturas celulares dos danos causados por espécies reativas de oxigênio e produtos reativos da peroxidação lipídica. Além da atividade antioxidante, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que a vitamina E possui propriedades como: anti-inflamatório, neuroprotetor e antidepressivo (Reiter et al., 2007; Lobato et al., 2010; Salehi et al., 2015).

Apesar das folhas de *B. glabra* possuírem em sua composição compostos com importantes propriedades neurofarmacológicas, ainda são escassos os estudos que visam avaliar essas propriedades utilizando extratos preparados a partir dessa planta. Através da revisão da literatura foi possível encontrar somente um trabalho que relata o efeito inibitório da atividade da enzima acetilcolinesterase pelo extrato de acetato de etila das folhas de *B. glabra* (Feitosa et al., 2011). Assim, trabalhos que investiguem o potencial terapêutico da *B. glabra* em modelos experimentais *in vivo* de desordens neurológicas se tornam importantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse estudo teve dois objetivos principais:

- (1) Avaliar o efeito neuroprotetor do extrato etanólico preparado a partir das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy contra a neurotoxicidade induzida por paraquat utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster*;
- (2) Desenvolver um novo método de exposição de *Drosophila melanogaster* a pesticidas visando suprir as limitações dos métodos de exposição tradicionais;

3.2 Objetivos específicos

Objetivos específicos referentes ao objetivo geral (1):

- Analisar a composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy (EBG) através de técnicas como GC-MS e HPLC-DAD;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EBG;
- Avaliar o efeito do tratamento com EBG sobre a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* (DM) expostas à paraquat (PQ);
- Através de diferentes testes comportamentais, investigar os possíveis efeitos de proteção do EBG sobre alterações motoras em (DM) causadas pela exposição ao PQ;
- Avaliar o efeito do tratamento com EBG sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), níveis de dopamina, níveis de peroxidação lipídica e produção de espécies reativas (ROS) em DM expostas ao paraquat.

Objetivos específicos referentes ao objetivo geral (2):

- Avaliar o consumo de alimento pelas DM (macho e fêmea) alimentadas pelo método desenvolvido, alimentação contínua líquida (ACL), e o método de alimentação em meio ágar (MA);

- Analisar a sobrevivência das moscas (macho e fêmea) alimentadas pelos métodos ACL e AM por 3 dias;
- Comparar os efeitos tóxicos do glifosato, em termos de sobrevivência e atividade locomotora, em moscas expostas a esse herbicida pelos métodos ACL e AM por 5 dias.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se nos próprios artigos.

4.1 Artigo 1: “Exposição ao paraquat causa sintomas semelhantes a Doença de Parkinson e estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*: efeito neuroprotetor da *Bougainvillea glabra* Choisy”

Artigo aceito para publicação na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* ISSN: 0753-3322
doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.073

Paraquat exposure-induced Parkinson’s disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy

Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy

Jefferson J. Soares^a, Daniela T. Rodrigues^c, Mayara B. Gonçalves^a, Maurício C. Lemos^a, Mariana S. Gallarreta^a, Matheus C. Bianchini^b, Mateus C. Gayer^c, Robson L. Puntel^b, Rafael Roehrs^c, Elton L. G. Denardin^{a*}

^a Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil.

^b Grupo de Estudos em Nutrição, Saúde e Qualidade de Vida (GENSQ), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil.

^c Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Prática de Ensino (GIPPE), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil.

* **Corresponding author:** Campus Uruguaiana, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), P.Box 118, 97508-000, Uruguaiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3911-0200 E-mail: eltondenardin@gmail.com

Keywords: *Bougainvillea glabra* Choisy, antioxidants, *Drosophila melanogaster*, paraquat, neurotoxicity, Parkinson's disease like

Abbreviations: BG extract: *Bougainvillea glabra* Choisy leaf extract; PQ: paraquat; AChE: acetylcholinesterase; ROS: reactive oxygen species; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; PD: Parkinson's disease; DA neurons: dopaminergic neurons; OS: oxidative stress; TPC: total phenolic contents; TFC: total flavonoid contents; DAT: dopamine transporter; DAMB: D₁-like dopamine receptor; RT: retention time.

4.2 Artigo 2: “Alimentação líquida contínua: novo método para estudar a toxicidade de pesticidas em *Drosophila melanogaster*”

Artigo aceito para publicação na revista *Analytical Biochemistry* ISSN: 0003-2697

**Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in
*Drosophila melanogaster***

**Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in
*Drosophila melanogaster***

Jefferson J. Soares^a, Mayara B. Gonçalves^a, Mateus C. Gayer^c, Matheus C. Bianchini^b, Aline C. Caurio^a, Susana J. Soares^d, Robson L. Puntel^b, Rafael Roehrs^c, Elton L. G. Denardin^{a*}

^a Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil

^b Grupo de Estudos em Nutrição, Saúde e Qualidade de Vida (GENSQ), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil

^c Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Prática de Ensino (GIPPE), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brazil

^d Laboratório de Design e Seleção de Materiais (LdSM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil

* Corresponding author: Campus Uruguaiana, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), P.Box 118, 97508-000, Uruguaiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3911-0200 E-mail: edenardin@yahoo.com.br

5 DISCUSSÃO

Um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do extrato etanólico preparado a partir das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy contra a neurotoxicidade induzida por paraquat em *Drosophila melanogaster* (DM). Os resultados apresentados no **Artigo 1** demonstram que o paraquat (PQ) causa uma diminuição da sobrevivência, além de danos locomotores em moscas expostas a esse herbicida (Figura 5, Artigo 1). O principal mecanismo de toxicidade do paraquat é por meio da geração de estresse oxidativo resultando na perturbação de diversos processos bioquímicos o que em última instância, leva a morte celular (Park et al., 2012). Nesse estudo, as moscas expostas somente ao PQ demonstraram níveis de espécies reativas (ROS) e peroxidação lipídica (TBARS) superiores aos observados no grupo controle (Figura 6, Artigo 1), mostrando que esse herbicida é um agente gerador de estresse oxidativo algo que pode estar diretamente relacionado com a diminuição da sobrevivência das moscas expostas a esse composto. O co-tratamento com o extrato etanólico das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy (EBG) conseguiu proteger contra a diminuição da sobrevivência ocasionada pela exposição ao paraquat (Figura 5A, Artigo 1). Nós acreditamos que esse efeito pode estar relacionado com a capacidade antioxidante do EBG uma vez que o co-tratamento com o EBG conseguiu reduzir os níveis de ROS e TBARS aos níveis do controle mesmo na presença do PQ (Figura 6, Artigo 1). Além disso, nos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* o EBG demonstrou uma capacidade antioxidante semelhante ao ácido ascórbico, um composto já conhecido pela sua ação antioxidante. Na composição do EBG foram identificados diversos compostos bioativos como o fitol, esqualeno, vitamina E, quercetina e ácidos ferúlico, cumárico, vanílico e caféico (Material suplementar, Artigo 1). O EBG possui também quantidades significativas de fenólicos e flavonóides, compostos com reconhecida ação antioxidante.

A exposição ao PQ é um fator de risco para a manifestação da Doença de Parkinson (DP) uma vez que esse composto pode causar a destruição dos neurônios dopaminérgicos o que gera danos locomotores semelhantes aos observados nos pacientes com DP (Baltazar et al., 2014). Nesse estudo, as moscas expostas ao PQ demonstraram uma diminuição da capacidade locomotora tanto no plano vertical (geotaxia negativa) como no plano horizontal (número de cruzamentos) (Figura 5 B e C, Artigo 1). A fim de avaliar se o dano locomotor ocasionado pelo PQ estava relacionado com o sistema dopaminérgico, o conteúdo de dopamina nas cabeças das moscas foi avaliado após a exposição ao PQ. Uma diminuição significativa dos

níveis de dopamina foi observada nas moscas expostas somente ao PQ (Figura 7B, Artigo 1). Assim, especulamos que a exposição ao PQ causou uma destruição dos neurônios dopaminérgicos, reduzindo os níveis de dopamina causando os danos locomotores observados nos ensaios de comportamento. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram claramente que a exposição ao paraquat pode causar uma destruição dos neurônios dopaminérgicos resultando em danos locomotores (Muthukumaran et al., 2014). Além disso, a exposição ao PQ causou um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Figura 7B, Artigo 1). Estudos prévios demonstram que há um aumento da expressão da AChE durante a apoptose em vários tipos de célula, algo que sugere que essa enzima possa ter um papel importante na morte de células neuronais (Zhang et al., 2013). Desta forma, Zhang et al. (2013) demonstraram que a deficiência ou inibição da acetilcolinesterase pode diminuir o processo de apoptose e proteger os neurônios dopaminérgicos em um modelo de DP com a neurotoxina MPP⁺. No presente estudo, o co-tratamento com o EBG conseguiu manter os níveis da AChE aos mesmos níveis do controle (Figura 7A, Artigo 1). De uma forma geral, os resultados desse trabalho indicam que o efeito neuroprotetor do EBG pode ser devido a sua ação antioxidante o que pode influenciar diretamente na modulação dos sistemas dopaminérgico e colinérgico. Assim, as folhas da *B. glabra* podem ser consideradas um agente efetivo na proteção contra desordens neurológicas, onde a redução dos níveis de dopamina, alterações na AChE e estresse oxidativo estão envolvidos, como na DP.

Ao realizar o estudo publicado no **Artigo 1**, nós observamos que o método de exposição das moscas a pesticidas em meio ágar possuía diversas limitações como: incerteza quanto a biodisponibilidade e quantidade ingerida do pesticida, elevada manipulação das moscas em tratamento e alto consumo de reagentes. Visando suprir essas limitações nós desenvolvemos o método denominado “alimentação líquida contínua” (ALC) descrito no **Artigo 2**. Nesse método, o meio de alimentação (na forma líquida) é injetado em capilares suspensos no frasco de tratamento. Esses capilares possuem uma abertura central onde a alimentação fica exposta para o consumo das moscas (Graphic abstract, Artigo 2). Após testes prévios foi possível perceber que o método era eficiente em disponibilizar a alimentação para as moscas. O próximo passo foi comparar o método desenvolvido com o método tradicional em meio ágar (MA). Para isso, 3 parâmetros foram avaliados utilizando os 2 métodos: quantidade de alimento ingerido em 48h, sobrevivência das moscas alimentadas com um mínimo de alimentação por 72h e avaliação da sobrevivência e atividade locomotora das moscas expostas

ao glifosato (GP) por 5 dias. As moscas de ambos os sexos alimentadas pelo método ALC ingeriram um quantidade de alimento significativamente maior em relação às moscas alimentadas pelo método (MA) (Figura 1, Artigo 2) e também conseguiram sobreviver com uma quantidade mínima de alimento (Figura 2, Artigo 2). Esses resultados demonstram que o método ALC é muito mais eficiente em disponibilizar a alimentação para as moscas do que o método MA. Além disso, é possível controlar a quantidade de alimento que será disponibilizado e o quanto está sendo consumido pelas moscas. A exposição das moscas ao GP pelos dois métodos reforçou ainda mais os resultados encontrados nos parâmetros avaliados anteriormente, pois somente as moscas tratadas pelo método ALC mostraram uma diminuição da sobrevivência e danos locomotores (Tabela 1, Artigo 2). Nós acreditamos que a quantidade de GP ingerida pelas moscas tratadas pelo método AM é inferior à quantidade necessária para causar toxicidade nas moscas. Desta forma, o ALC é um promissor método de exposição para o estudo da toxicidade de pesticidas e também de outras toxinas ambientais como metais utilizando como modelo experimental a DM. Esse método apresenta diversas vantagens em relação ao método MA como: utiliza poucas quantidades de reagentes, não necessita de troca constante do meio de tratamento, baixa manipulação das moscas em tratamento e possibilidade de mensurar e controlar a quantidade de alimento consumida. Por sua simplicidade e praticidade nós acreditamos que o método ALC poderá ser útil em todas as áreas que utilizam a DM como modelo experimental.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados no artigo 1: “Paraquat exposure induced Parkinson’s disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy” pode-se concluir que:

- O extrato etanólico das folhas da *Bougainvillea glabra* (EBG) possui na sua composição diversos compostos bioativos como fitol, esqualeno, α e γ tocoferol, ácido cafêico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico e quercetina.
- O EBG demonstrou capacidade antioxidante similar ao ácido ascórbico nos ensaios de atividade antioxidante *in vitro*.
- O EBG foi eficaz em diminuir a mortalidade e os danos locomotores das moscas expostas ao paraquat (PQ).
- O co-tratamento com EBG também reduziu os níveis de peroxidação lipídica e produção de espécies reativas, além de normalizar a atividade da AChE e proteger contra a diminuição dos níveis de dopamina, parâmetros alterados pela exposição ao PQ;

Baseado nos resultados apresentados no artigo 2: “Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*” pode-se concluir que:

- As moscas (macho e fêmea) alimentadas pelo método “alimentação líquida contínua” (ALC) ingeriram uma quantidade de alimento significativamente maior que as moscas alimentadas pelo método ágar (MA).
- O mínimo de alimento fornecido pelo método MA não foi o suficiente para manter a sobrevivência das moscas alimentadas por esse método em 72 h. Por outro lado com a mesma quantidade de alimento, as moscas alimentadas pelo método ALC demonstraram uma sobrevivência próxima a 100%.
- A exposição ao glifosato pelo método ALC causou uma diminuição da sobrevivência e danos locomotores nas moscas tratadas por esse método, entretanto, o mesmo efeito não foi observado nas moscas tratadas pelo método MA.

7 PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados no manuscrito: “Paraquat exposure induced Parkinson’s disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy” temos as seguintes perspectivas para trabalhos futuros:

- Avaliar se há diferença de neurotoxicidade do paraquat (PQ) em moscas de menor e maior idade;
- Desenvolver um método cromatográfico (HPLC-DAD) para avaliar o dano no DNA do PQ em *Drosophila melanogaster* (DM);
- Avaliar se o extrato etanólico das folhas de *Bougainvillea glabra* Choisy (EBG) consegue proteger contra a destruição dopaminérgica ocasionada pela exposição ao paraquat em moscas transgênicas que possuem esses neurônios marcados por proteína verde fluorescente;
- Avaliar o efeito neuroprotetor do EBG em modelos *in vitro* utilizando homogenatos de cérebro de ratos e diferentes agentes neurotóxicos como: ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio e sulfato ferroso.
- Submeter o EBG a técnicas de separação e isolamento de compostos bioativos, visando separar classes como alcalóides e saponinas para posterior identificação por GC-MS com derivatização da amostra;
- Avaliar a ação neuroprotetor do EBG contra a neurotoxicidade induzida por rotenona em DM;

Baseado nos resultados apresentados no artigo: “Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*” temos as seguintes perspectivas para trabalhos futuros:

- Avaliar o efeito tóxico do arsenito de sódio inserido na alimentação das DM através do método “alimentação líquida contínua” (ALC);
- Avaliar o efeito neurotóxico do pesticida sulfentrazone inserido na alimentação das DM através do método “alimentação líquida contínua”;
- Aprofundar os estudos em relação à toxicidade do glifosato em *Drosophila melanogaster*;

- Utilizar o método ALC para avaliar os efeitos metabólicos em DM ocasionados pela exposição a nanopartículas de prata produzidas a partir de extratos de plantas e compostos fenólicos isolados;
- Utilizar o método ALC para avaliar os efeitos metabólicos em DM ocasionados pela exposição à etilmercúrio;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. **Medicinal Science Monitor**, 10, 141–147.
- Abdullah, R., Basak, I., Patil, K. S., Alves, G., Larsen, J. P., Møller, S. G. (2014). Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. **Experimental Gerontology**, 68, 33-38.
- Aktar, M. W., Sengupta, D., Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, 2(1), 1-12.
- Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., Lees, A. J., Cairns, N., Marsden, C. D., Jenner, P., Halliwell B. (1997). Oxidative DNA damage in the Parkinsonian brain: An apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. **Jornal of Neurochemistry**, 69, 1196–1203.
- Alanís-Garza, B. A., González-González, G. M., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., Rivas-Galindo, V. M. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. **Journal Ethnopharmacology**, 114, 468-471.
- Alves, G., Forsaa, E. B., Pedersen, K. F., Gjerstad, M. D., Larsen, J. P. (2008). Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, 255, 18-32.
- Arnhold, T., Elmazar, M. M. A., Nau, H. (2002). Prevention of vitamin A teratogenesis by phytol or phytanic acid results from reduced metabolism of retinol to the teratogenic metabolite, all-trans-retinoic acid. **Toxicological Sciences**, 66(2), 274–282.
- Bagatini, P. B., Saur, L., Rodrigues, M. F., Bernardino, G. C., Paim, M. F., Coelho, G. P., Silva, D. V., de Oliveira, R. M., Schirmer, H., Souto, A. A., Vianna, M. R., Xavier, L. L. (2011). The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. **Invertebrate Neuroscience**, 11, 43-51.

- Baltazar, M. T., Dinis-Oliveira, R. J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A. M., Duarte, J. A., Carvalho, F. (2014). Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases – a mechanistic approach, **Toxicology Letters**, 230, 85-103.
- Barbosa, M. T., Caramelli, P., Maia, D. P., Cunningham, M. C., Guerra, H. L., Lima-Costa, M. F., Cardoso, F. (2006). Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, 21(6), 800-808.
- Barnes, A.I., Wigby, S., Boone, J. M., Partridge, L., Chapman, T. (2008). Feeding, fecundity and lifespan in female *Drosophila melanogaster*, **Proceedings Biological Sciences**, 275, 1675–1683.
- Bass, T. M., Grandison, R.C., Wong, R., Martinez, P., Partridge, L. (2007). Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila*. **The journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, 62, 1071–1081.
- Belaid, H., Adrien, J., Karachi, C., Hirsch E. C., François, C. (2015). Effect of melatonin on sleep disorders in a monkey model of Parkinson's disease. **Sleep Medicine**, 16 (10), 1245-1251
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, 9, 91.
- Brown, R.C., Lockwood, A.H., Sonawane, B.R. (2005). Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. **Environmental Health Perspectives**, 113, 1250–1256
- Bové, J., Prou, D., Perier, C., Przedborski. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's Disease. **NeuroRX**, 2(3), 484-494.
- Casida, J. E. (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticides action. **Chemical Research in Toxicology**, 22(4), 609-619.
- Chagas, 2007. Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba/SP.
- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., Gross, R. E. (2008). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacological Sciences**, 30 (2008) 475-483.
- Collins, M.A., Neafsey, E. J. (2002). Potential neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson's disease. **Neurotoxicology and Teratology**, 24(5), 571-577.

- Costa, J. P., Oliveira, G. A., Almeida, A. A., Islam, M. T., Sousa, D. P., Freitas, R. M. (2014) Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, 14, 34-42.
- Das, B., Yeager, H., Baruchel, H., Freedman, M. H., Koren, G., Baruchel, S. (2003). *In vitro* cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: implications in cancer chemotherapy. **European Journal of Cancer**, 39, 2556-2565.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 39(6), 889-909.
- De Lau, L. M. L., Breteler, M. M. B. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, 5(6), 525-535.
- Deumens, R., Blokland, A., Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, 175(2), 303-317.
- Dias, V., Junn, E., Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, 3(4), 461-491.
- Dinis-Oliveira, R. J., De Pinho, P. G., Santos, L., Texeira, H., Magalhaes, T., Santos, A., de Lourdes Bastos, M., Remião, ., Duarte, J. A., Carvalho, F. (2009). Postmortem analyses unveil the poor efficacy of decontamination, anti-inflammatory and immunosuppressive therapies in paraquat human intoxications. **PLoS ONE**, 4, e7149.
- Dumont, M., Beal, M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 51, 1014-1026.
- Ecker, 2014. Efeitos do consumo de sacarose sobre parâmetros metabólicos, desenvolvimentais e antioxidantes em *Drosophila melanogaster*: papel das plantas *Syzygium cumini* e *Bauhinia forficata*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica toxicológica). Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS.
- Edwin, E., Edwin, S., Amalraj, A. (2006). Antihyperglycemic activity of *Bougainvillea glabra* Choisy, **Planta Indica**, 2, 25-26.
- Ellwanger, 2015. Efeitos do selênio sobre a neurotoxicidade, genotoxicidade, função locomotora e alterações teciduais em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental do doença de Parkinson induzida por paraquat. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular). Universidade de Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- Elumalai, A., M. Eswaraiah, M. C., Lahari, K. M., Shaik, H. Á. (2012). *In vivo* screening of *Bougainvillea glabra* leaves for its analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, 2, 85-87.

- Fawad, S. A., Khalid, N., Asghar, W., Suleria, H. A. R. (2012). *In vitro* comparative study of *Bougainvillea spectabilis* “stand” leaves and *Bougainvillea variegata* leaves in terms of phytochemicals and antimicrobial activity. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 10(6), 441-447.
- Feitosa, C. M., Freitas, R. M., Luz, N. N. N., Bezera, M. Z. B., Trevisan, M. T. S. (2011). Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Biology**, 71(3), 783-789.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. **Mutation Research**, 674, 3–22
- Franco, R., Li, S.M., Rodriguez-Rocha, H., Burns, M., Panayiotidis, M.I. (2010). Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson’s disease. **Chemico-Biological Interactions**. 188, 289–300.
- Galli, A., De Souza, D., Garbellini, G. S., Coutinho, C. F. B., Mazo, L. H., Avaca, L. A., Machado, S. A. S. (2006). Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, 29(1), 105-112.
- Gillies, G. E., McArthur, S. (2010). Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. **Pharmacological Reviews**, 62, 155-198.
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., Caron, M. G. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, 379, 606-612.
- Giroto, S., Sturlese, M., Bellanda, M., Tessari, I., Cappellini, R., Bisaglia, M., et al. (2012). Dopamine-derived quinones affect the structure of the redox sensor DJ-1 through modifications at Cys-106 and Cys-53. **Journal Biological Chemistry**, 287, 18738–18749.
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's Disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 1(1). a008862. doi:10.1101/cshperspect.a008862.
- Golan, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- Guo, B., Zheng, C., Cai, W., Cheng, J., Wang, H., Li, H., Sun, Y., Cui, W., Wang, Y., Han, Y., Lee, S. M., Zhang, Z. (2016). Multifunction of Chrysin in Parkinson's Model: Anti-Neuronal Apoptosis, Neuroprotection via Activation of MEF2D, and Inhibition of Monoamine Oxidase-B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64(26), 5324-33.

- Gupta, V., George, M., Joseph, L., Singhal, M., Singh, H. P. (2009). Evaluation of antibacterial activity of *Bougainvillea glabra* 'snow white' and *Bougainvillea glabra* 'choicy'. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 1(1), 233-237.
- Haleagrahara, N., Siew, C. J., Mitra, N. K., Kumari, M. (2011). Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. **Neuroscience Letters**, 500(2), 139-43.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **American Journal of Medicine**, 91, 14-22.
- Hayden, K.M., Norton, M.C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P.P., Breitner, J.C., WelshBohmer, K.A. (2010). Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. **Neurology**, 74, 1524–1530.
- Hernández, A. F., Parrón, T, Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects os pesticides mixtures at a molecular level: their relevance to human health. **Toxicology**. 307, 136-145.
- Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**, 9, 504-523.
- Hosamani, R., Muralidhara. (2013). Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 83(1), 25-40.
- Hwang, O. (2013). Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, 22(1), 11–17.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. (2015). Posicionamento do INCA acerca dos agrotóxicos. N° 10, Ministério da Saúde, Brasil.
- Inoue, Y., Hada, T., Shiraishi, A., Hirose, K., Hamashima, H., Kobayashi, S. (2005). Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49(5), 1770–1774.
- Jahromi, S. R., Haddadi, M., Shivanandappa, T., Ramesh, S. R. (2013) Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: biochemical and behavioral evidences. **Neurochemical Research**, 38, 2616-2624.
- Ja, W. W., Carvalho, G. B., Mak, E. M., de la Rosa, N. N., Fang, A. Y., Liong, J. C., Brummel, T., Benzer, S. (2007). Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, 8253–8256.

- Jeong, C. H., Jeong, H. R., Choi, G. N., Kim, D.O., Lee, U., Heo, H. J. (2011) Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, 6, 2-9.
- Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L., Mieyal, J. J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. **Nutrients**, 4, 1399–1440.
- Kabuto, H., Yamanushi, T. T., Janjua, N., Takayama, F., Mankura, M. (2013). Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model, **Journal of Oleo Science**, 62, 21-28.
- Kang, M. J., Gil, S. J., Koh, H. C. (2009). Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. **Toxicology Letters**, 188, 148-152.
- Khan, M. M., Raza, S. S., Javed, H., Ahmad, A., Khan, A., Islam, F., Safhi, M. M., Islam, F. (2012). Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology Research**, 2012, 22(1), 1-15.
- Khanam, H., Ali, A., Asif, M. Shamsuzzaman. (2016). Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 124, 1121-1141.
- Kumar M. J., Andersen, J. K. (2004). Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease - where do we go from here? **Molecular Neurobiology**, 30, 77–89.
- Kuhn, D. M., Arthur, R. E., Thomas, D. M., and Elferink, L. A. (1999). Tyrosinehydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redoxcycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 73, 1309–1317.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, 219, 979-980.
- Lee, K. P., Simpson, S. J., Clissold, F. J., Brooks, R., Ballard, J. W. (2008). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105, 2498–2503.
- Lima, S. Q., Miesenbock, G. (2005). Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. **Cell**, 121, 141-152.
- Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y., Chen, R. C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's Disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology**. 48(6), 1583-1588.

- Lobato, K. R., Cardoso, C. C., Binfaré, R. W., Budni, J., Wagner, C. L., Brocardo, P. S., Souza, L. F., Brocardo, C., Flesch, S., Freitas, A. E., Dafré, A. L., Rodrigues, A. L. (2010) α -Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behaviour Brain Research**, 209(2), 249-259.
- Liu, X., Yamada, N., Maruyama, W., Osawa, T. (2008). Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids: Mechanism for Parkinson disease. **Journal of Biological Chemistry**, 283, 34887–34895.
- Luchtman, D. W., Meng, Q., Song, C. (2012). Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, 226, 386–396.
- Mansouri, M. T., Farbood, Y., Sameri, M. J., Sarkaki, A., Naghizadeh, B., Rafeirad, M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**, 138, 1028-1033.
- Marutescu, L., Chifiriuc, M. C. (2017). Molecular mechanisms of pesticides toxicity. **New Pesticides and Soil Sensors**, 393-435.
- Miller, J.L. (2002). Parkinson's Disease Primer. **Geriatric Nursing**, 23, 69-75.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 268, 157-177.
- Munoz P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J. (2012). Dopamine oxidation and autophagy. **Parkinson's Disease**, 2012, 920-953.
- Nagatsu, T., Sawada, M. (2006). Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase inhibitors to Parkinson's disease: Possible implications of glial cells. **Journal of Neural Transmission**, 71, 53–65.
- Norris, E. H., Giasson, B. I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J. Q., Ischiropoulos, H., Lee V. M. (2005) Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. **Journal Biological Chemistry**, 280, 21212–21219.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature Medicine**. 16, 653-661.
- Pan, X., Chen, C., Huang, J., Wei, H., Fan, Q., (2015). Neuroprotective effect of combined therapy with hyperbaric oxygen and madopar on 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. **Neuroscience Letters**, 600, 220-225.

- Panchal, K., Tiwari, A. K. (2017). *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 89, 1331–1345.
- Pandey, U. B., C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, 63, 411–436.
- Park, J. H., Jung, J. W., Ahn, Y. J., Kwon, H. W. (2012). Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, 104, 118–125.
- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F., Alarcón, R. (2011). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 256, 379–385.
- Pendleton, R. G., Parvez, F., Sayed, M., Hillman, R. (2002). Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 300(1), 91–96.
- Perez, R. G., Hastings, T. G. (2004). Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? **Journal of Neurochemistry**, 89(6), 1318–24.
- Pérez-Barrón, G., Avila-Acevedo, J. G., García-Bores, A. M., Montes, S., García-Jiménez, S., León-Rivera, I., Rubio-Osornio, M., Monroy-Noyola, A. (2015). Neuroprotective effect of *Buddleja cordata* methanolic extract in the 1-methyl-4-phenylpyridinium Parkinson's disease rat model. **Journal of Natural Medicines**, 69(1), 86–93.
- Perfeito, R., Cunha-Oliveira, T., Cristina Rego, A. (2013). Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease - resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radical Biology and Medicine**, 53(9), 1791–1806.
- Piper, M. D., Skorupa, D., Partridge, L. (2005). Diet, metabolism and lifespan in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, 40, 857–862.
- Pletcher, S. D., Libert, S., Skorupa, D. (2005). Flies and their golden apples: the effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age-dependent gene expression. **Ageing Research Review**, 4, 451–480.
- Pizzutti, I. R., Vela, G. M. E., De Kok, A., Scholten, J. M., Dias, J. V., Cardoso, C. D., Concenço, G., Vivian, R. (2016). Determination of paraquat and diquat: LC-MS optimization and validation. **Food Chemistry**, 209, 248–255.
- Poewe, W. (2006). The natural history of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, 253 Suppl 7:VII2–6.

- Price KS, Farley IJ, Hornykiewicz O. (1987). Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, 19, 293-300.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T. D. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, 29(13), 1583-1590.
- Primel, E. G., Zanella, R., Kurz, M. H. S., Gonçalves, F., Machado, S. O., Marchezan, E. (2005). Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, 28(4), 605-609.
- Przedborski S. (2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 11 Suppl 1:S3-7.
- Rani, J. M. J., Chandramohan, G., Renganathan, R. (2012). Antioxidant activity, preliminary phytochemical investigation and GC-MS study of *Bougainvillea glabra choicy* leaves, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4, 12-16.
- Rappold, P. M., Cui, M., Chesser, A. S., Tibbett, J., Grima J. C., Duan, L., Sen, N., Javitch, J. A., Tieu, K. (2011). Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108, 20766-20771.
- Reddy, L. H., Couvreur, P. (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 61, 1412-1426.
- Reiter, E., Jiang, Q., Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of α and γ tocopherol. **Molecular Aspects Medicine**, 28, 668-691.
- Richardson, J. R., Quan, Y., Sherer, T. B., Greenamyre, J. T., Miller, G. W. (2005). Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicological Sciences**, 88(1), 193-201.
- Rzeczniczak, T. Z., Douglas, L. A., Watterson, J. H., Merritt, T. J. S. (2011). Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. **Analytical Biochemistry**, 419, 345-347.
- Schapira, A. H. V., Bezard, E., Brotchie, J., Calon, F., Collingridge, G. L., Ferger, B. et al. (2006). Novel Pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, 5, 845-854.
- Salehi, I., Karamian, R., Komaki, A., Tahmasebi, L., Taheri, M., Nazari, M., Shahidi, S., Sarihi, A. (2015). Effects of vitamins E on lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. **Brain Research**, 1629, 270-281.

- Sang, T. K., Jackson, G. R. (2005). *Drosophila* Models of Neurodegenerative Disease. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 2,438-446.
- Santos, C. M. P., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., Almeida, A. A. C., Oliveira, G. A. L., Costa, J. P., Sousa, D. P., Freitas, R. M., Almeida, R. N. (2013). Antinoceptive and antioxidant activities of phytol *in vivo* and *in vitro* models. **Neuroscience Journal**, 1, 1-10.
- Schulz, J. B., Falkenburger, B. H. (2004). Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 135-147.
- Syad, A. N., Rajamohamed, B. S., Shunmugaiah, K. P., Kasi, P. D. (2016). Neuroprotective effect of the marine macroalga *Gelidiella acerosa*: identification of active compounds through bioactivity-guided fractionation. **Pharmaceutical Biology**, 54(10), 2073-2081.
- Siddique, Y. H., Mujtaba, S. F., Jyoti, S., Naz, Falaq. (2013). GC-MS analysis of *Eucalyptus citriodora* leaf extract and its role on the dietary supplementation in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, 55, 29-35.
- Singh, M., Ramassamy, C. (2012). Environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Alzheimer Disease & Parkinsonism**. 2(3), 1-2.
- Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., Suno, M., Ogawa, K., Hayase, N., Kimura, K., Shiono, H. (2001). Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Research**, 906(1-2), 135-42.
- Spadotto, C. A., Gomes, M. A. F., Luchini, L. C., Andrea, M. M. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42, 29p.
- Stocchi, F. (2003). Prevention and treatment of motor fluctuations. **Parkinsonism and Related Disorders**, 9, 73-81.
- Sudati, J. H., Vieira, F. A., Pavin, S. S., Dias, G. R. M., Seeger, R. L., Golombieski, R., Athayde, M. L., Soares, F. A., Rocha, J. B. T., Barbosa, N. V. (2013). *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**, 37, 118-126.
- Unnevehr, L. J., Pingali, P. L., Zilberman, D. Changing pesticides policies: introduction. **Food Policy**, 22(2), 105-106.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44-84.

- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, 157(11), 1015-1022.
- Vicent, S., Kovendan, K., Chandramohan, B., Kamalakannan, K., Kumar, P. M., Vasugi, C., Praseeja, C., Subramaniam, J., Govindarajan, M., Murugan, K., Benelli, G. (2017) Swift fabrication of silver nanoparticles using *Bougainvillea glabra*: potential against Japanese encephalitis vector, *Culex tritaeniorhynchus* Giles (diptera: Culicidae). **Journal of Cluster Science**, 28, 37-58.
- Watson, G. S., Leverenz, J.B. (2010). Profile of cognitive impairment in Parkinson's disease. **Brain Pathology**, 20, 640-645.
- Whitehead, R. E., Ferrer, J. V., Javitch, J. A., and Justice, J. B. (2001). Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. **Journal of Neurochemistry**, 76, 1242–1251.
- Whitworth, A. J., Wes, P. D., Pallanck, L. J. (2006) *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. **Drug Discovery Today**, 11, 119–26.
- Wynne, A., Kanwar, R.K., Khanna, R., Kanwar, J.R. (2010). Recent advances on the possible neuroprotective activities of Epstein-Barr virus oncogene BART1 protein in chronic inflammatory disorders of central nervous system. **Current Neuropharmacology**, 8, 268-275.
- Yan, M. H., Wang, X., Zhu, X. (2011). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 62, 90–101.
- Yang, W.S., Tiffany-Castiglioni, E., (2005). The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. **Journal of Toxicology and Environmental Health part A**, 68,1939–1961.
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E., Mizuno, Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93, 2696–2701.
- Xu, K., Bastia, E., Schwarzschild, M. (2005). Therapeutic potential of adenosine A(2A) receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, 105, 267-310.
- Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknacht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. **Acta Neuropathology**, 116, 47–55.

- Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. (1999). Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and rna in substantia nigra neurons. **The American Journal of Pathology**, 154, 1423–1429.
- Zhang X, Lu L, Liu S, Ye W, Wu J, Zhang X. (2013). Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 45, 265–272.
- Zhou, Z. D., Refai, F. S., Xie, S. P., Ng, S. H., Chan, C. H. S., Ho, P. G. H., et al. (2014). Mutant PINK1 upregulates tyrosine hydroxylase and dopamine levels, leading to vulnerability of dopaminergic neurons. **Free Radical Biology and Medicine**, 68, 220–233.