

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

NATHALIE SAVEDRA GOMES CHAVES

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE β -CAROTENO
SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDO POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster***

Uruguaiana, RS, Brasil

2020

NATHALIE SAVEDRA GOMES CHAVES

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE β -CAROTENO
SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDO POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*
em Bioquímica da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

Orientador: **Prof. Dr. Gustavo Petri
Guerra.**

Coorientadora: **Prof^a. Dr^a. Marina Prigol**

Uruguaiiana, RS, Brasil

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

C274e Chaves, Nathalie Savedra Gomes
EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE B-CAROTENO SOBRE O
MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR
ROTENONA EM *Drosophila melanogaster* / Nathalie Savedra Gomes
Chaves.
93 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2020.
"Orientação: Gustavo Petri Guerra".

1. -caroteno . 2. Nanotecnologia. 3. Parkinson. 4.
Drosophila melanogaster. 5. Rotenona. I. Título.

NATHALIE SAVEDRA GOMES CHAVES

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE β -CAROTENO
SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDO POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster***

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

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 25 de Março de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr.ª Ana Flávia Furian

UFSM

Prof. Dr.ª Simone Pinton

UNIPAMPA

“E agora, que a glória seja dada a Deus, o qual, por meio do seu poder que age em nós, pode fazer muito mais do que nós pedimos ou até pensamos! ”.

Efésios 3:20 – Bíblia sagrada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Jesus a qual me permitiu chegar até aqui e por ter feito muito mais do que eu imaginei, toda honra e glória seja dada a ti!

Agradeço também minha mãe Cibeli Savedra que foi minha rocha nos momentos que pensei em desistir, sempre me incentivou e fez eu me manter calma diante dos obstáculos que passei durante esses dois anos, obrigada mãe pelas suas orações e por sempre enxugar as minhas lágrimas.

Agradeço ao meu esposo Jeferson Chaves pela compreensão das ausências, pelo apoio e por sempre estar disposto a me ajudar nos afazeres domésticos, pois isso me deu tempo livre para me dedicar aos estudos, você é uma benção na minha vida, e ainda mais por ter me dado nossa filha Liesel como presente no fim do mestrado, amo muito nossa família que está se formando!

Agradeço também as orações, o carinho e o apoio do meu padraсто Erodi, minha irmã Lauren, minha sobrinha que é um presente de Deus a Livia, meu irmão Eliézer e meu avô Urias, vocês fazem parte dessa jornada, obrigada por tudo.

Agradeço ao meu sogro Osório Chaves que sempre foi como um pai para mim, que Deus te recompense juntamente com minha sogra Maria Adelaide.

Agradeço ao meu orientador Gustavo Guerra pela paciência e por ter aceitado me orientar num momento difícil, aprendi muito contigo, muito obrigada.

Agradeço a professora Marina pelo seu jeito alegre e por nós abraçar como minha coorientadora, te admiro muito, também a professora Silvana por toda ajuda, muito obrigada. Não poderia esquecer do meu orientador da iniciação científica professor Cristiano Jesse, por me ajudar a conhecer o mundo da pesquisa e por toda ajuda, obrigada!

Em especial as minhas amigas Dieniffer Janner, Franciele Polet e Márcia Poetini, só Deus para recompensar vocês por tudo que fizeram por mim, sentirei muita falta de vocês, das nossas viagens, das conversas e dos dias que passamos juntas no laboratório, também agradeço a Elize, Stéfani, Vandrezza, Kétnne e o Pedro, nesse último ano vocês se tornaram muito especiais para mim, muito obrigada por tudo!

Agradeço a CAPES pela bolsa que permitiu dois anos de formação acadêmica diferenciada e de qualidade, ao PPG Bioquímica, a UNIPAMPA e em especial o Laftambio, muito obrigada.

E por fim agradeço também a minha banca Ana Flávia Furian e Simone Pinton por aceitarem o convite e contribuírem com a minha formação, obrigada.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é classificada como uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva que induz ao comprometimento motor e não motor. O estresse oxidativo é um fator que contribui para a DP, desse modo os antioxidantes são um coadjuvante para o tratamento da doença. Os carotenoides têm sido bastante investigados como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos. O β -caroteno, um potente antioxidante, é um dos principais carotenoides com atividade de pró-vitamina A. Como o β -caroteno tem caráter hidrofóbico a nanoencapsulação se torna uma alternativa promissora para aumentar sua solubilidade em água e absorção, protegendo da degradação e melhorando a biodisponibilidade. O objetivo do estudo foi investigar um possível efeito neuroprotetor de nanopartículas carregadas de β -caroteno sobre alterações comportamentais e bioquímicas causadas pela exposição de *Drosophila melanogaster* a rotenona. Foram utilizadas moscas de ambos os sexos com 2 a 4 dias de idade, onde avaliamos a concentração-resposta do β -caroteno livre e das nanopartículas carregadas de β -caroteno, após 7 dias de tratamento foram avaliados os testes comportamentais geotaxia e open-field. Logo após definir a concentração que não causa toxicidade avaliamos o efeito das nanopartículas carregadas de β -caroteno na co-exposição com rotenona por 7 dias. As moscas foram divididas em quatro grupos: (controle); (nanopartículas carregadas de β -caroteno 20 μ M); (Rotenona 500 μ M) e (nanopartículas carregadas de β -caroteno 20 μ M e Rotenona 500 μ M). Após a exposição as moscas foram avaliadas na porcentagem de sobrevivência, geotaxia, open-field, fototaxia aversiva e consumo alimentar. Também foi avaliada a atividade da AChE, estresse oxidativo e viabilidade celular. A exposição das moscas as nanopartículas carregadas de β -caroteno melhoraram a atividade locomotora e a sobrevivência, além disso atenuou o dano na atividade da AChE, reduziu o estresse oxidativo e aumentou as enzimas antioxidantes CAT e SOD. Com isso, concluímos que as nanopartículas carregadas de β -caroteno atenuam o dano e a neurotoxicidade causada pela rotenona, e que pode ser usado como uma alternativa tal como coadjuvante no tratamento da DP.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Mosca-da-fruta; Parkinson; antioxidantes; carotenoides.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is classified as a chronic and progressive neurodegenerative disease that induces motor and non-motor impairment. Oxidative stress is a factor that contributes to PD, therefore, antioxidants are a complement to the treatment of the disease. Carotenoids have been extensively investigated as chemopreventive agents, functioning as antioxidants in biological systems. β -carotene, a potent antioxidant, is one of the main carotenoids with pro-vitamin A activity. As β -carotene has a hydrophobic character, nanoencapsulation becomes a promising alternative to increase its solubility and absorption in water, protecting from degradation and improving bioavailability. The aim of the study was to investigate a possible neuroprotective effect of nanoparticles loaded with β -carotene on the behavioral and biochemical changes caused by the exposure of *Drosophila melanogaster* to rotenone. Flies of both sexes with 2 to 4 days of age were used, where we evaluated the response-concentration of free β -carotene and β -carotene-loaded nanoparticles, after 7 days of treatment the behavioral tests of geotaxy and open field were evaluated. Right after defining the concentration, that does not cause toxicity; we evaluated the effect of β -carotene-loaded nanoparticles in coexposure with rotenone for 7 days. The flies were divided into four groups: (control); (β -carotene-loaded nanoparticles 20 μ M); (500 μ M Rotenone) and (β -carotene-loaded nanoparticles 20 μ M and 500 μ M Rotenone). After exposure, the flies were evaluated for survival percentage, geotaxis, open field, aversive phototaxy and food consumption. AChE activity, oxidative stress and cell viability were also evaluated. Flies' exposure to β -carotene-loaded nanoparticles improved locomotor activity and survival, in addition to mitigating damage to AChE activity, reducing oxidative stress and increasing the antioxidant enzymes CAT and SOD. Thus, we conclude that β -carotene-loaded nanoparticles attenuate the damage and neurotoxicity caused by rotenone and that they can be used as an alternative adjuvant in the treatment of PD.

Keywords: Nanotechnology; fruit fly; antioxidants; carotenoids; Parkinson's disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Sintomas típicos da Doença de Parkinson	05
Figura 2 - Morte neuronal na Doença de Parkinson	06
Figura 3 – Neurotransmissão dopaminérgica.	09
Figura 4 – Síntese e hidrólise da acetilcolina.....	10
Figura 5 – Dano celular induzido por estresse oxidativo	12
Figura 6 - <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Figura 7 - Distribuição de neurônios dopaminérgicos	15
Figura 8 - Estrutura química e clivagem do β-caroteno.	18
Figura 9 - Nanopartículas de β-caroteno dispersas em água (esquerda) e β-caroteno disperso em água (direita)	20

LISTA DE ABREVIATURAS

(Referentes a Revisão bibliográfica)

Acetil-COA – Acetilcoenzima-A
AChE – Acetilcolinesterase
ADMP - Protocerebro dorsomedial anterior
ADP - Adenosina difosfato
ALP - Protocerebro lateral anterior;
ATP - Trifosfato de adenosina
Ca²⁺ - Cálcio
CAT – Catalase
COMT – Catecol-O-metiltransferase
DA – Dopamina
DAT – Transportadores de dopamina de alta afinidade
DOPAC - Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP – Doença de Parkinson
DSC - Deutocerebral
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
H⁺ - Hidrogênio
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
ICOMT – Inibidor Catecol-O-metiltransferase
IMAO-B – Inibidores de monoaminoxidase
IP - Protocerebral medial inferior
LP - Protocerebro lateral
LPP - Protocerebro lateral posterior
MAO – Monoamina oxidase
MDA – Malondialdeído
MEV - Gânglio subesofágico medial
Na⁺ - Sódio
PAL - Lateral anterior protocerebral
PAM - Medial anterior protocerebral
PLP - Protocerebro lateral posterior

PMPD - Protocerebro medial posterior dorsal

PMPM - Medial posterior medial posterior

PPL1 - Neurônios dopaminérgicos

PPM - Medial posterior protocerebral

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SEL - Lateral subesofágico

SN – Substância negra

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido Dismutase

SOG - Gânglio subesofágico

T1 - Torácico 1

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

VMAT – Antiportador de prótons não-seletivo de monoaminas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.1 Doença de Parkinson	3
2.1.2 Manifestações clínicas	3
2.1.3 Patogênese	6
2.1.4 Dopamina	7
2.1.5 A enzima Acetilcolinesterase (AChE)	10
2.1.6 Estresse Oxidativo	11
2.1.7 Tratamento	13
2.1.8 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal para DP	13
2.1.9 Rotenona	16
2.1.10 Nanopartículas carregadas de β-caroteno	17
3. JUSTIFICATIVA	21
4. OBJETIVOS	22
4.1.1 Objetivo geral	22
4.1.2 Objetivos específicos	22
5. MANUSCRITO CIENTÍFICO	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7. PERSPECTIVAS	67
8. REFERÊNCIAS	68

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** está descrita uma breve revisão de literatura sobre os temas abordados nesta dissertação seguida pelo item **OBJETIVOS**.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, os quais são apresentados no item **MANUSCRITO CIENTÍFICO**. As seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*, encontra-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica “Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology” para a qual será submetido.

Os itens **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS** encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica.

1. INTRODUÇÃO

Doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson (TEIVE, 1998), é um distúrbio neurológico progressivo, principalmente pela degeneração das células (neurônios) da camada ventral da parte compacta da substância negra (SN) e do lócus ceruleus. A característica patológica da DP é a acumulação de inclusões citoplasmáticas filamentosas consistindo principalmente em agregações de α -sinucleína, que é uma proteína de 140 aminoácidos enriquecida em terminais nervosos pré-sinápticos (IWAI et al., 1995). A fosforilação e a fibrilação da α -sinucleína levam à formação de corpos de Lewy e induzem a morte dos neurônios (GORBATYUK et al., 2008; LUK; LEE, 2014; VOLPICELLI-DALEY et al., 2011). A doença também afeta o sistema da dopamina (DA), um neuromodulador essencial no sistema nervoso central dos mamíferos que está envolvido na atenção, controle do movimento, motivação e cognição (SHALTIEL-KARYO et al., 2012). A DP é definida principalmente por seus sintomas motores, incluindo tremor, bradicinesia e acinesia, mas pode demonstrar uma série de sintomas não motores, como declínio cognitivo, depressão, ansiedade, distúrbios do sono e disautonomia (HAYES, 2019). Em geral, a evolução da DP possui quatro estágios, no inicial, podem ocorrer sintomas leves como tremores unilaterais, alteração na postura e expressões faciais. No estágio intermediário, são comuns dificuldades para caminhar em linha reta e manter o equilíbrio. No estágio avançado, observa-se rigidez e bradicinesia (lentidão dos movimentos). No estágio final ocorre o comprometimento dos movimentos físicos, o paciente geralmente é incapaz de ficar em pé ou caminhar (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). Estima-se que a doença afeta 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos e 4 milhões de pessoas em todo o mundo (DEXTERA; JENNER, 2013). Não há cura para a DP e os tratamentos permanecem sintomáticos com agentes que aumentam a concentração de neurônios dopaminérgicos como a levodopa (BOURQUE; MORISSETTE; DI PAOLO, 2019), e que podem causar efeitos colaterais como alucinações, delírios, sonolência, distonia e principalmente discinesias (HAYES, 2019).

Dado o papel do estresse oxidativo na patogênese da DP, o potencial das moléculas antioxidantes como estratégia preventiva contra a DP ganhou grande interesse (HEMMATI-DINARVAND et al., 2019). Sugere-se que os carotenoides da dieta, pigmentos vegetais lipofílicos presentes na natureza, proporcionam benefícios à saúde na diminuição do risco de doenças crônicas (JOHNSON, 2002). É estabelecido que os carotenoides têm importantes funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, regulação da transcrição de genes e a

capacidade de melhorar a função imunológica (COOPERSTONE; SCHWARTZ, 2016). Entre os carotenoides, o β -caroteno é um dos mais extensivamente estudados devido aos seus benefícios relacionados à saúde, incluindo atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (LIANG et al., 2013). O β -caroteno é o único carotenoide que apresenta dois radicais β -ionona, que ao romper-se forma duas moléculas de pró-vitamina A (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Devido sua natureza lipofílica, encapsular o β -caroteno é um método útil para proteção contra degradação e assim melhorar sua absorção (ZHOU et al., 2018). Para alcançar biodisponibilidade oral suficiente de drogas, uma das estratégias mais promissoras é desenvolver sistemas de entrega oral com o uso de nanopartículas transportadoras que são feitas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis (GRUNE et al., 2010). As principais vantagens das nanopartículas são sua capacidade de proteger o material encapsulado e estabilidade no trato digestivo, facilitando a captação celular e liberação controlada de drogas no local alvo (DES RIEUX et al., 2006).

A nanoencapsulação do β -caroteno pode representar um aumento na sua biodisponibilidade e absorção, sendo uma alternativa para o tratamento de doenças, como a DP. Com isso o estudo sobre o efeito de nanopartículas carregadas de β -caroteno na DP, tem como objetivo melhorar a sobrevivência, atividade locomotora e minimizar os efeitos do estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster* expostas a rotenona, Assim, é importante determinar os efeitos das nanopartículas carregadas de β -caroteno, um possível candidato no tratamento da DP e seus mecanismos de ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença no qual se encontra uma complexa desordem neurológica. A primeira descrição detalhada da DP foi feita há quase dois séculos, mas a conceituação da doença continua a evoluir (TEIVE, 1998). Em sua essência, é uma doença neurodegenerativa com morte precoce proeminente de neurônios dopaminérgicos (BILGIÇ; HANAĞASI; EMRE, 2010). A deficiência de dopamina (DA) resultante dentro dos gânglios da base leva a um distúrbio do movimento caracterizada por sintomas motores parkinsonianos clássicos (BARNHAM; MASTERS; BUSH, 2004). A presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy em neurônios, do lócus ceruleus, do núcleo motor dorsal do vago e do córtex cerebral é considerada o marcador biológico da doença (KALIA; LANG, 2015). Esses agregados proteicos insolúveis formam fibrilas e são constituídos principalmente pela proteína α -sinucleína (SCHULZ-SCHAEFFER, 2010).

A DP tem sido considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da Doença de Alzheimer (SPILLANTINI et al., 1998). Sua incidência é rara antes dos 50 anos, mas aumenta com a idade, atingindo aproximadamente 1% da população na faixa dos 60-70 anos e cerca de 4% da população com mais de 80 anos de idade (ELBAZ et al., 2016). No Brasil, a prevalência é estimada em cerca de 3,3% em pessoas com idade acima de 65 anos (BARBOSA et al., 2006). Sendo que a prevalência e a incidência aumentam quase exponencialmente com o avançar da idade, com o pico após os 80 anos de idade (PRINGSHEIM et al., 2014). Esta tendência tem importantes implicações na saúde pois, com o envelhecimento da população e aumento da expectativa de vida em todo o mundo, o número de pessoas com a doença deverá aumentar em mais de 50% (KALIA; LANG, 2015).

Outros fatores de risco também estão correlacionados como: a exposição a pesticidas, traumatismo craniano, uso de β -bloqueadores, tabagismo, uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais, uso de bloqueadores dos canais de cálcio e consumo de álcool (IRANZO et al., 2013).

2.1.2 Manifestações clínicas

Devido a grande reserva funcional do sistema dopaminérgico, os principais sintomas da

DP só se tornam aparentes quando há uma extensa degeneração da via nigrostriatal (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). O tremor de repouso geralmente ocorre nas partes distais de um dos membros superiores. Tremores nos lábios, na cabeça e nas pernas podem ocorrer, mas são menos comuns (SCHENCK; BOEVE; MAHOWALD, 2013). Os tremores podem aumentar enquanto o paciente caminha e experimenta situações estressantes, sendo que os mesmos desaparecem durante o sono ou a realização de algum movimento voluntário (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). Alguns pacientes podem também relatar a sensação de tremor interno não associado à ocorrência de tremor visível (SCHENCK; BOEVE; MAHOWALD, 2013).

A bradicinesia consiste na dificuldade de planejamento, início e execução de movimentos. Está relacionada também à dificuldade para desempenhar diferentes atividades simultaneamente ou em sequência. Geralmente, esses sintomas ficam evidentes na dificuldade do paciente em realizar atividades cotidianas ou podem apresentar redução da gesticulação, da expressão facial, do piscar e do movimento dos braços ao caminhar (VALLS-SOLÉ; VALLDEORIOLA, 2002).

A rigidez é caracterizada pela resistência na realização de um movimento, sendo conhecida como o fenômeno de "engrenagem" presente em movimentos de flexão, extensão ou rotação de um membro. Pode ser acentuada pela realização de movimento pelo membro contralateral e em membros que apresentam tremor de repouso (PROCHAZKA et al., 1997).

A instabilidade postural está geralmente associada com os estágios mais tardios da doença e compromete atividades diárias dos pacientes, como caminhar, girar o corpo e levantar-se. Em função da dificuldade em manter o equilíbrio postural, os pacientes estão sujeitos a quedas e consequentes fraturas (MORRIS et al., 2000).

A progressão da DP é caracterizada por uma piora nas características motoras, que inicialmente podem ser administrados com terapias sintomáticas, no entanto, como a doença avança, há um surgimento de complicações relacionadas com a longo prazo sintomático ao tratamento, incluindo flutuações motoras e não motoras, discinesia e psicose (HELY et al., 2005).

Essas complicações relacionadas ao tratamento se apresenta como um desafio quanto ao manejo clínico do estágio avançado da DP (NALLS et al., 2014). Em estágio avançado, características motoras e não motoras são proeminentes e incluem sintomas motores axiais, como instabilidade postural, congelamento da marcha, quedas, disfagia, disfunção da fala (GOLDMAN et al., 2012). Os sintomas típicos da DP estão ilustradas abaixo na figura 1.

Sintomas típicos da Doença de Parkinson



Figura 1- Sintomas típicos da Doença de Parkinson

Fonte: página <https://goobjoog.com/english/interrupting-parkinsons-disease/>

213 Patogênese

A característica patológica da DP é uma diminuição nas projeções do sistema nervoso central (SNC) para os núcleos caudado e putamen (neostriado), devido à morte acentuada da população de neurônios dopaminérgicos daquele núcleo (Figura 2) (DARDEN, 2007).

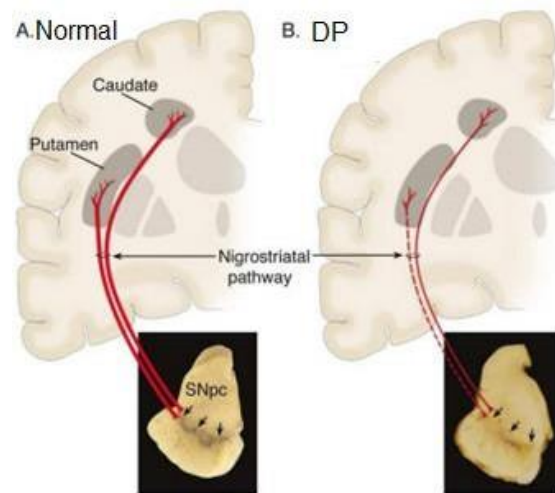


Figura 2 - Morte neuronal na DP. A) via nigroestriatal normal; B) o esquema mostra a via nigroestriatal de um paciente com DP.

Fonte: (DARDEN, 2007)

Inclusões fibrilares no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos remanescentes, conhecidas como corpos de Lewy, são as marcas citopatológicas da doença. Os sinais clínicos tornam-se evidentes quando cerca de 80% da DA estriatal e cerca de 60% da população de neurônios dopaminérgicos são perdidos (BERG et al., 2014). Os corpos de Lewy não estão confinados na substância negra (SN) e podem ser vistos em outras regiões, assim como em patologias diversas, tanto no SNC (córtex, amígdala, locus cerúleos, núcleo vagal) quanto no sistema nervoso periférico (DARDEN, 2007).

Estudos patológicos relacionados à neurodegeneração na DP sugerem um conjunto de achados característicos. Primeiro, a perda de neurônios dopaminérgicos associada à DP tem uma característica distinta do padrão visto no envelhecimento normal. Na DP, a perda celular está concentrada nas porções caudal e ventrolateral do SNC, enquanto que durante o

envelhecimento normal, a porção dorsomedial da SN é a região mais afetada (PROCHAZKA et al., 1997). Segundo, o grau da perda de terminais neuronais no estriado é maior do que a perda de neurônios na SN. Terceiro, o mecanismo fisiológico de remoção da DA parece ser mais dependente de seu transportador no estriado do que no córtex pré-frontal, onde outros transportadores monoaminérgicos e a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) desempenham um papel maior no término das ações da DA (DARDEN, 2007). Adicionalmente, observa-se no estriado uma drástica redução nos níveis de DA, seus metabólitos - ácidos homovanílico e 3,4-dihidroxifenilacético - e receptores (SHIMOHAMA et al., 2003).

Embora a marca patológica da DP seja a perda de neurônios dopaminérgicos, este processo degenerativo se estende para outras populações neuronais. A neurodegeneração e a formação de corpos de Lewy são também observadas nos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico (locus coeruleus), serotoninérgico (núcleo da rafe) e colinérgico (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do nervo vago), assim como no córtex cerebral (especialmente os córtices cingulados e entorrinal), bulbo olfatório e no sistema nervoso autônomo (DARDEN, 2007). De todos esses sítios, acredita-se que a neurodegeneração observada em estruturas do hipocampo e nos inputs corticais colinérgicos contribuem de maneira especialmente relevante para os quadros de demência elevada, observada especialmente quando a DP se manifesta em pacientes mais idosos (GOLDMAN et al., 2012).

Resultados de meta-análise de dados de associação do genoma completo, identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único dentro da região do antígeno leucocitário humano que afeta o risco do desenvolvimento da DP, sugerindo susceptibilidade genética relacionada ao sistema imunológico (NALLS et al., 2014).

214 Dopamina

No sistema nervoso central (SNC) existem neurônios que liberam neurotransmissores diferentes como a serotonina, GABA, glutamato, DA e outros (REIS et al., 2009). A DA foi identificada como um potencial neurotransmissor no cérebro no final da década de 1950 por Carlsson (CARLSSON, 1959). Logo depois, verificou-se que a DP era acompanhada por uma diminuição dramática no conteúdo de DA do núcleo de putâmen e caudado (GIRAULT; GREENGARD, 2004). Os corpos celulares dos neurônios da DA que inervam o núcleo caudado e o putâmen estão localizados na SN, enquanto os dos neurônios que inervam o estriado ventral e o córtex pré-frontal têm uma localização mais medial na área tegmentar ventral (GIRAULT; GREENGARD, 2004). Os corpos celulares da SN são responsáveis pela produção e descarga

de DA no estriado (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016). A DA desempenha múltiplas funções no cérebro, sendo que o papel da DA na modulação do comportamento e cognição; Movimento voluntário; motivação; punição e recompensa; inibição da produção de prolactina; dormir; sonhar; humor; atenção; memória de trabalho; e aprendizado (CALABRESI et al., 2007).

A neurotransmissão dopaminérgica ocorre através de sinapses, a DA liga-se a receptores DA pós-sinápticos ou pré-sinápticos ou a ambos. Essa ligação, independentemente do receptor, gera um potencial elétrico na célula pré-sináptica (MÜLLER, 2014). No caso de receptores DA pós-sinápticos, o sinal é propagado para o neurônio pós-sináptico, enquanto, no caso de receptores DA pré-sinápticos, o sinal pode excitar a célula pré-sináptica ou inibi-la (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016). Os receptores pré-sinápticos com potencial inibitório, também conhecidos como auto receptores, inibem a síntese e a liberação de neurotransmissores e, portanto, funcionam para manter os níveis normais de DA (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016). Após realizar sua função sináptica, o DA é retomado no citosol pelas células pré-sinápticas através das ações dos transportadores DA de alta afinidade (DAT) ou dos transportadores de monoamina da membrana plasmática de baixa afinidade (SCHMITT; ROTHMAN; REITH, 2013). A neurotransmissão dopaminérgica está ilustrada na figura 3 abaixo.

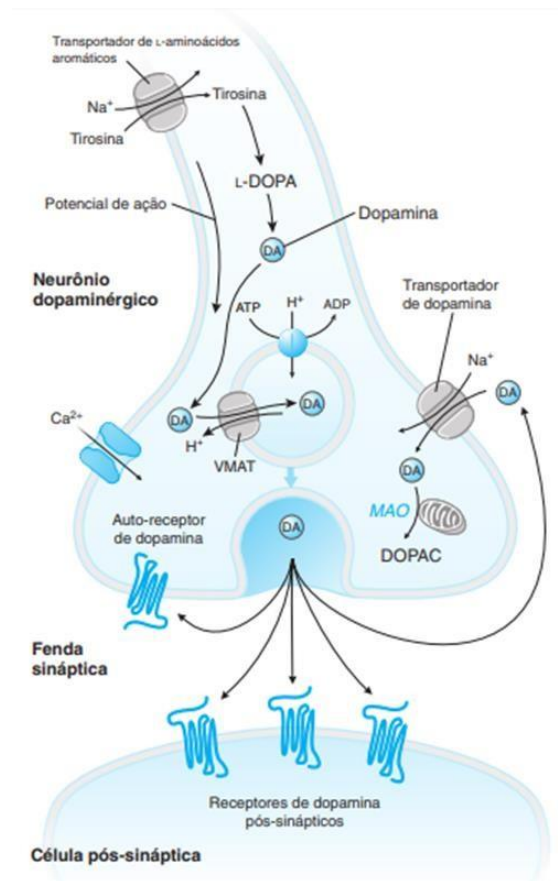


Figura 3 – Neurotransmissão dopaminérgica.

A DA é sintetizada no citoplasma e transportada em vesículas secretoras pela ação de um antiportador de prótons não-seletivo de monoaminas (VMAT), que é impulsionado pelo gradiente eletroquímico criado por uma ATPase de prótons. Com estimulação da célula nervosa, a DA é liberada na fenda sináptica, onde o neurotransmissor pode estimular receptores dopamínicos pós-sinápticos e auto receptores dopamínicos pré-sinápticos. A DA é transportada para fora da fenda sináptica pelo transportador de DA (DAT) seletivo acoplado ao Na⁺. A DA citoplasmática é retransportada para dentro das vesículas secretoras pelo VMAT ou degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO).

Fonte: (DAVID G. STANDAERT E JOSHUA M. GALANTER, 2010).

A perda neuronal na SN compacta é cerca de 45% na DP, ao contrário de uma pessoa normal que é de 4,7% no processo de envelhecimento e conseqüentemente leva ao não suprimento de DA para os neurônios dopaminérgicos o que na via direta dos gânglios da base reduz a atividade das áreas motoras do córtex cerebral, diminuindo os movimentos voluntários (CHINTA; ANDERSEN, 2005). Quando o efeito da DA é diminuído a DP tende a manifestar-se, pois a falta da mesma resulta no aumento global da acetilcolina levando a um desequilíbrio entres estes neurotransmissores e ativando o processo de contração muscular, que ocorre

quando há uma redução de 25% da atividade dos neurônios dopaminérgicos (ESKOW JAUNARAJIS et al., 2015). A degeneração da via nigrostriatal na DP está associada ao estresse oxidativo (INDEN et al., 2011). Como consequência a natureza expansiva do dano oxidativo inclui disfunção mitocondrial, auto-oxidação de DA, agregação de α -sinucleína, ativação de células gliais e alterações na sinalização de cálcio e ferro (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016).

215 A enzima acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor bastante difundido por todo o sistema nervoso. Os neurônios colinérgicos estão relacionados com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória, e todas essas ações exercidas pela ACh estão prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor (VINUTHA et al., 2007).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável por hidrolisar o neurotransmissor ACh nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro (PEREZ-LLORET; BARRANTES, 2016). Na fenda sináptica a AChE é responsável por degradar a ACh, uma molécula simples que possui um grupo éster e uma amina quaternária (COLOVIC et al., 2013). No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula da ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica, onde ela sofre hidrólise catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina conforme a figura 4 (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

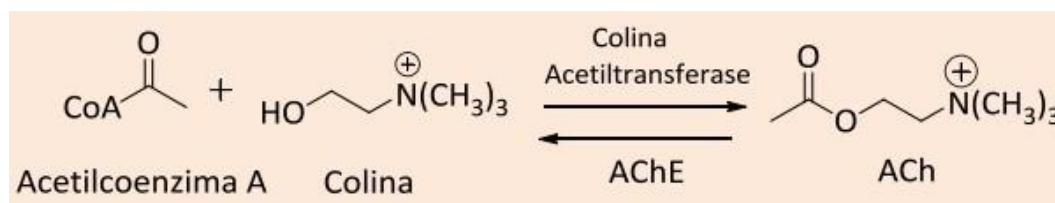


Figura 4 – Síntese e hidrólise da acetilcolina (ACh)

Fonte: (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Além disso, estudos demonstram que ROS podem inibir a atividade da AChE, que por sua vez afeta a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas (MUTHULAKSHMI et al., 2018; RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2015; SCHALLREUTER et al., 2004). Quando os organismos são expostos a pesticidas organofosforados como a rotenona, desencadeia a produção de ROS com isso causa alterações na atividade da AChE (RAHIMI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2006; SHADNIA et al., 2005; SRIN; RUDOLPH, 2010).

2.16 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio redox, proveniente tanto do processo inflamatório, quanto dos demais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP, especialmente da disfunção mitocondrial, promove um quadro de estresse oxidativo, caracterizado por aumento na formação de espécies reativas e redução nos níveis de antioxidantes endógenos (DEXTERA; JENNER, 2013; LEE MOSLEY et al., 2006; SANDERS; GREENAMYREN, 2013).

Os radicais livres são espécies químicas, altamente instáveis e extremamente reativas, que, por terem um número ímpar de elétrons no seu orbital externo, são ávidos por interagir com outras substâncias em busca de um elétron para atingir a estabilidade. Em sistemas biológicos, a maioria destes radicais são as ROS, sendo as mais comuns o radical aniônico superóxido e o radical hidroxila (COTINGUIBA et al., 2013).

As células possuem sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos, que tem por finalidade catalisar reações para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e radicais livres, produzidos durante o metabolismo da respiração aeróbica e oxidação de substrato, sendo a primeira linha de defesa da célula contra o excesso das espécies reativas de oxigênio que tem a ação detoxificadora dos agentes oxidantes, antes que eles causem lesões (Barbosa, 2010). As defesas antioxidantes enzimáticas são constituídas pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona reduzida (GSH) e a glutatona peroxidase (GPx). Essas enzimas são capazes de neutralizar os agentes oxidantes e mantê-los em níveis adequados no organismo (BYSTROM; GUZMAN; RIVELLA, 2014; URBANSKA et al., 2014).

A SOD e a CAT são enzimas que desempenham um papel importante na desintoxicação intracelular, protegendo o organismo contra o dano oxidativo de componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (ROCHA et al., 2018). A SOD faz parte do mecanismo de defesa biológica antioxidante e converte os radicais superóxido em H_2O_2 . Uma deficiência na atividade da SOD tem sido relacionada a doenças humanas, como esclerose lateral

amiotrófica, câncer, catarata e DP (DORAN et al., 2017). CAT está presente em todos os organismos aeróbicos vivos e uma das suas funções é decompor o H_2O_2 em água e oxigênio (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Danos oxidativos mediados por radicais livres ocorrem em vários locais das células, como a peroxidação de lipídica da membrana celular, resultando na geração de produtos tóxicos, incluindo malondialdeído (MDA) (YORITAKA et al., 1996). Níveis elevados de MDA, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram encontrados na SN na DP (FLOOR; WETZEL, 2002; YORITAKA et al., 1996). O envolvimento das espécies reativas de oxigênio na progressão da DP levou a investigação sobre a utilização potencial de antioxidantes no tratamento dessa doença (ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008). Uma vez que atividades reduzidas de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos podem ser responsáveis pela progressão da DP (CHEN et al., 2009; DICKSON et al., 2009), a figura abaixo demonstra o dano celular induzido pelo estresse oxidativo.

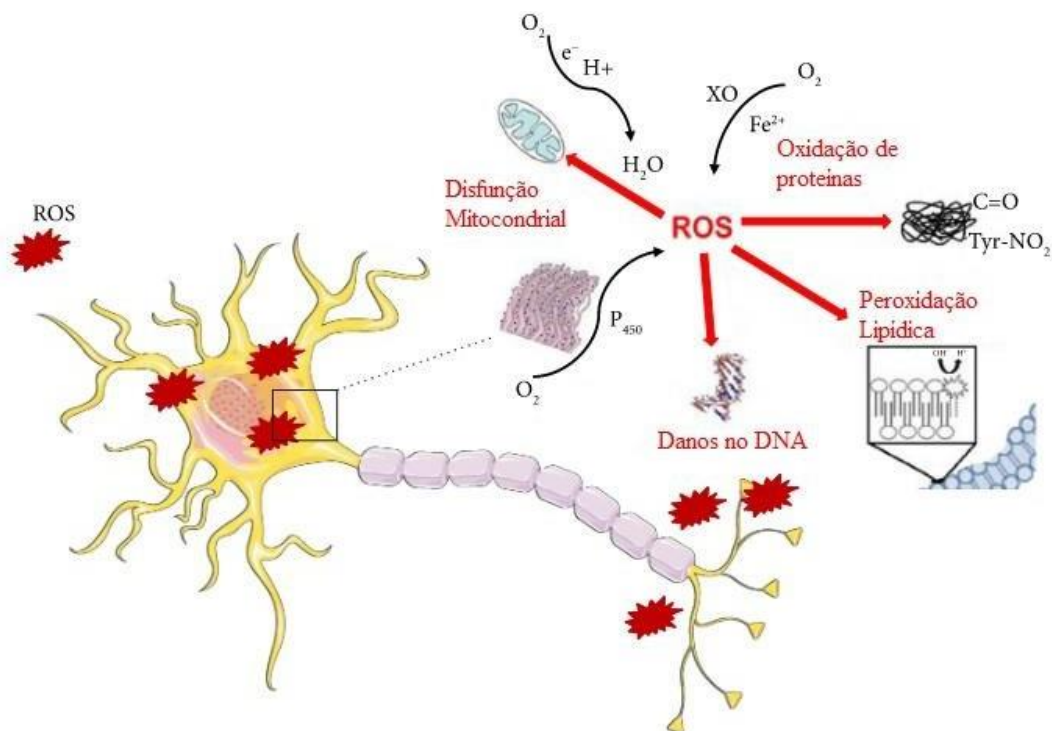


Figura 5- Dano Celular induzido por estresse oxidativo.

Dano celular induzido por estresse oxidativo: oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, dano ao DNA, disfunção mitocondrial e perturbação do retículo endoplasmático.

Fonte: (TRAMUTOLA & CASCELLA, 2020).

217 Tratamento

Os tratamentos farmacológicos atuais não têm a capacidade de impedir a progressão da doença. O seu objetivo passa por aliviar os sintomas, tentando melhorar a qualidade de vida dos pacientes (CONNOLLY; LANG, 2014). As opções de tratamento disponíveis passam por: uma combinação de Levodopa (ou L-DOPA, o fármaco mais eficaz) e carbidopa/benserazida; inibidores da monoaminoxidase B (IMAO-B); inibidores da catecol-O-metil-transferase (ICOMT); anticolinérgicos e amantadina (BAILA; AT, 1999).

A maioria dos pacientes faz uso da levodopa, considerada o padrão ouro no tratamento da DP (EMBORG, 2004). A levodopa é uma amina precursora de DA, oralmente ativa e absorvida no intestino delgado, sendo logo descarboxilada pela enzima dopa descarboxilase e apenas uma pequena dose chega inalterada no SNC. A meia vida plasmática da levodopa é muito curta, não passando de 90 minutos (CURTZE et al., 2015). Assim, uma alta dose é requerida para que haja efeito, o que leva a vômitos e náuseas nos pacientes. Para bloquear os efeitos periféricos da DA e aumentar a biodisponibilidade da levodopa, ela é coadministrada com a carbidopa ou a benserazida, que são inibidores da descarboxilase do ácido amino aromático (FUNKIEWIEZ et al., 2003).

Apesar destes efeitos, a levodopa reduz os sintomas motores da DP, no entanto, não diminui outros sintomas, nem impede a degeneração nigroestriatal (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007). A terapia com a levodopa é altamente efetiva durante os primeiros estágios do tratamento, no entanto, a longo-prazo causa discinesias que é caracterizada por diversos tipos de movimentos musculares anormais, involuntários, excessivos, diminuídos ou ausentes (BARGIOTAS; KONITSIOTIS, 2013).

Apesar da pesquisa farmacológica intensiva e dos avanços realizados nas últimas décadas, os tratamentos disponíveis não alteram a progressão do processo neurodegenerativo da DP. A maioria dos pacientes irá ainda sofrer eventualmente durante o tratamento, com complicações motoras que são difíceis de controlar e significativamente diminuem a qualidade de vida, sendo, portanto, necessária a descoberta de estratégias neuroprotetoras para diminuir ou parar a progressão da doença.

218 *Drosophila melanogaster* como modelo animal para DP

A mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, tornou-se uma ferramenta muito usada para investigar processos biológicos ao longo dos 100 anos (KASTURE et al., 2018). O ciclo

de vida da *Drosophila melanogaster* consiste em quatro estágios: ovo, larva, pupa e mosca. A duração do ciclo de vida depende da temperatura e é concluída em cerca de dez dias quando as moscas são mantidas a 25 °C (KASTURE et al., 2018). *Drosophila* enriqueceu bastante nossa compreensão da biologia e da medicina humanas. Devido ao seu ciclo de vida muito curto, à disponibilidade de ferramentas genéticas ricas e sofisticadas, à facilidade de manutenção e à maior (ou mais) importante relação custo-benefício, a *Drosophila* incorpora um organismo modelo “ideal” (KASTURE et al., 2018).

Acredita-se que aproximadamente 65% dos genes que causam doenças humanas tenham um homólogo funcional em *Drosophila melanogaster* (CHIEN, 2002; YAMAMOTO et al., 2014) e uma fração significativa desses homólogos é expressa em tecidos de *Drosophila* que desempenham a função do tecido humano equivalente (CHINTAPALLI; WANG; DOW, 2007).

A complexidade reduzida e a facilidade de estudar o sistema nervoso da *Drosophila* permitem uma avaliação aprofundada da função dos genes e das redes neuronais. Muitos ensaios diferentes foram desenvolvidos para avaliar a função neuronal. Estes incluem testes de audição, vôo, aprendizado e memória e ritmos diurnos, bem como, inúmeros testes comportamentais altamente específicos (BRANSON et al., 2009; INAGAKI; KAMIKOUCHI; ITO, 2010; MCGUIRE; DESHAZER; DAVIS, 2005; SIMON; DICKINSON, 2010). Nas últimas duas décadas, *Drosophila* tem sido cada vez mais utilizada para modelar disfunções neurológicas, incluindo a neurodegeneração (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016).

A mosca adulta possui estruturas que desempenham as funções equivalentes do coração, cérebro, pulmão, rim, intestino e aparelho reprodutor dos mamíferos. O cérebro da mosca adulta é bastante notável. Mais de 100.000 neurônios formam circuitos discretos que mediam comportamentos complexos, incluindo ritmos circadianos, sono, aprendizado e memória, namoro, alimentação, agressão, limpeza e de voo. A resposta das moscas a muitos medicamentos que atuam no sistema nervoso central é semelhante aos efeitos observados nos sistemas de mamíferos (ANDRETIC et al., 2008; BAINTON et al., 2000; MCCLUNG; HIRSH, 1998; NICHOLS; SANDERS-BUSH, 2002; ROTHENFLUH; HEBERLEIN, 2002; SATTA; DIMITRIJEVIC; MANEV, 2003; WOLF; HEBERLEIN, 2003).

A *Drosophila melanogaster* apresenta deficiências motoras associadas à DP (PENDLETON et al., 2002), O cérebro da *Drosophila* possui cerca de 127 neurônios dopaminérgicos, estes estão espalhados por oito grupos por hemisfério, compostos por 4 a 13 neurônios individuais (Figura 6 e 7) (MAO; DAVIS, 2009). A adição da mosca ao processo de descoberta de novas drogas, melhora a taxa de descoberta a custos reduzidos, para identificar

potencialmente novos alvos terapêuticos (PANDEY; NICHOLS, 2011). Com isso, a *Drosophila melanogaster* está sendo empregada como modelo animal de doenças humanas que afetam o sistema nervoso, como a DP (HIRTH, 2010).

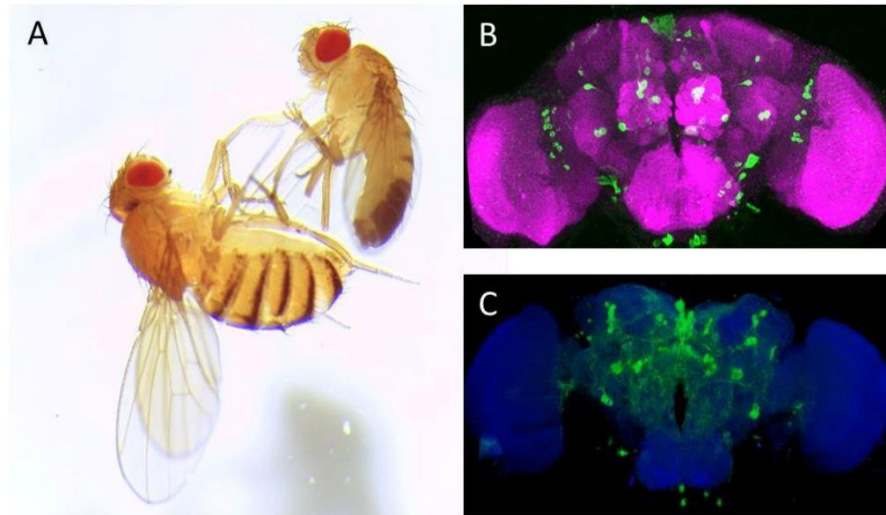


Figura 6 - *Drosophila melanogaster* (A) e cérebro de mosca adulta (B, C).

A): Imagem de fêmea adulta (esquerda) e masculina (direita) Canton-S *Drosophila melanogaster*; (B): Vista anterior do cérebro de mosca adulta carregando proteína transportadora de serotonina. (C): neurônios dopaminérgicos.

Fonte: (KASTURE et al., 2018).

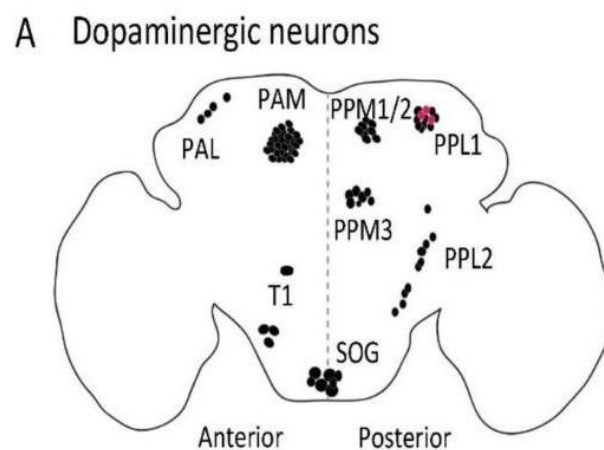


Figura 7 - Distribuição de neurônios dopaminérgicos (A) no cérebro de moscas adultas.

Os neurônios dopaminérgicos estão distribuídos em vários aglomerados no cérebro da mosca. PAM: medial anterior protocerebral; PAL: lateral anterior protocerebral; LPP: Protocerebro lateral posterior; PPM: medial

posterior protocerebral; T1: torácico 1; SOG: Gânglio subesofágico; PLP: protocerebro lateral posterior; ADMP: protocerebro dorsomedial anterior; ALP: protocerebro lateral anterior; LP: protocerebro lateral; PMPM: medial posterior medial posterior; SEL: lateral subesofágico; DSC: Projeção contralateral, serotonina imunorreativa, deutocerebral; MEV: gânglio subesofágico medial; PMPD: protocerebro medial posterior dorsal; IP: Protocerebral medial inferior. Ponto vermelho: neurônios dopaminérgicos PPL1 (A). Ponto preto: corpos celulares dopaminérgicos (A).

Fonte: (KASTURE et al., 2018)

219 Rotenona

A rotenona é um composto lipofílico de ocorrência natural, derivado principalmente das raízes e caules das espécies *Lonchocarpus* e *Derris*, possui uma fórmula molecular de $C_{23}H_{22}O_6$ e um peso molecular de 394,42 (GUPTA; MILATOVIC, 2014). É o mais potente composto da família dos rotenóides. A rotenona atua como um forte inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BEAL, 2001). O mecanismo de ação compreende a inibição da transferência de elétrons dos centros ferro-enxofre do complexo I para a ubiquinona, levando a um bloqueio da fosforilação oxidativa com síntese limitada de ATP (GUPTA; MILATOVIC, 2014). Além disso, a transferência incompleta de elétrons para o oxigênio pode levar à formação de ROS (LI et al., 2003). Essa produção de ROS é induzida pela rotenona, com um dano presumido dos componentes da mitocôndria, incluindo o DNA mitocondrial, que pode eventualmente levar à apoptose (FATO et al., 2009). Além dos efeitos no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, vários estudos demonstraram que a rotenona inibe a montagem de microtúbulos independentemente de uma etapa específica que requer energia, através da ligação da tubulina, resultando em parada mitótica e inibição da proliferação celular (BRINKLEY et al., 1974; MARSHALL; HIMES, 1978; SRIVASTAVA; PANDA, 2007). Devido a esse mecanismo de ação e a alta lipofilicidade, a rotenona atravessa facilmente as membranas biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica (BETARBET; SHERER; TIMOTHY GREENAMYRE, 2002; UVERSKY, 2004).

A rotenona tornou-se interessante para a pesquisa da DP. A função mitocondrial defeituosa, principalmente a diminuição da atividade do complexo I e o aumento do estresse oxidativo, foi demonstrada em um subconjunto de pacientes com DP (SCHAPIRA, 2008; SCHAPIRA et al., 1990). Devido ao seu importante papel na polaridade neuronal, transporte axonal e plasticidade sináptica, a disfunção dos microtúbulos também pode desempenhar um papel na progressão da DP (CAPPELLETTI et al., 2015; MILLECAMPS; JULIEN, 2013). Além disso, foi demonstrado que a exposição à rotenona se correlaciona com a

ocorrência de vários sintomas semelhantes à DP em humanos (TANNER et al., 2011). A administração crônica de rotenona causou degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos nigrais com características histopatológicas de DP e sintomas locomotores semelhantes a DP em modelos animais (BETARBET et al., 2000). Este modelo contribui para elucidar mecanismos patogênicos da neurodegeneração na DP, com os papéis de estresse oxidativo, apoptose, disfunção mitocondrial, inflamação e comprometimento das vias de degradação de proteínas (BOVÉ; PERIER, 2012).

2.1.10 Nanopartículas carregadas de β -caroteno

O β - caroteno é o membro mais proeminente do grupo de carotenoides, corantes naturais que ocorrem na dieta humana (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 2008). Como tetraterpenóide, consiste em 40 átomos de carbono em uma estrutura central de ligações duplas conjugadas substituídas por anéis 2- β - ionona. Devido ao seu sistema estendido de 9 ligações duplas totalmente conjugadas, o β - caroteno mostra um pico de absorção principal no espectro visível com um máximo em 450 nm, responsável pela cor laranja ao vermelho do composto (TOMITA et al., 2002). O all-trans- β -caroteno é o precursor mais adequado e importante para a vitamina A (KRINSKY; JOHNSON, 2005). Isso se deve principalmente à sua estrutura simétrica, porque o all-trans- β -caroteno é o único carotenóide capaz de produzir 2 moléculas de all-trans-retinol após a clivagem oxidativa da ligação carbono-carbono central 15,15', que é catalisada pela p-caroteno monooxigenase (OLSON; NAGAO, 1994). Estrutura química e clivagem do β -caroteno se encontra na figura 8 abaixo.

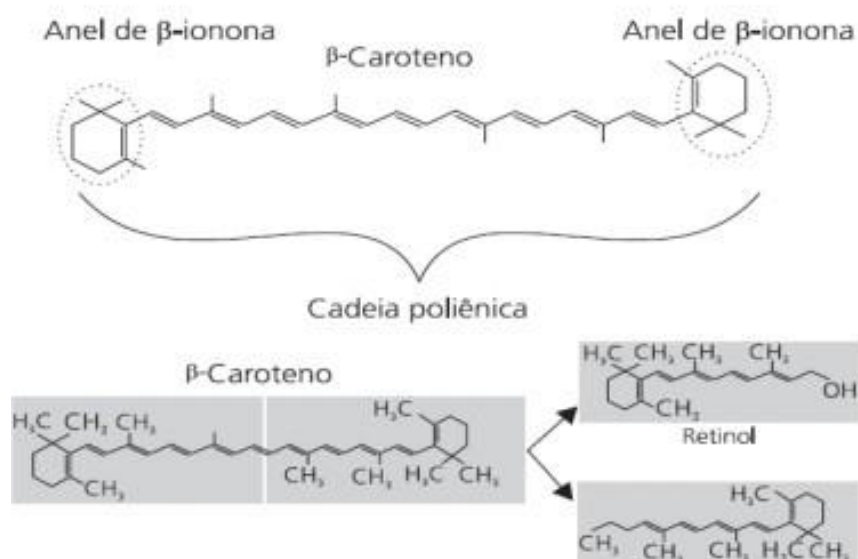


Figura 8 - Estrutura química e clivagem do β -caroteno.

Fonte: (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006).

Por razões estruturais e com base em dados experimentais, o β -caroteno foi designado como antioxidante (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 2008; BURTON; INGOLD, 1984; KRINSKY; JOHNSON, 2005; STAHL; SIES, 2005). Devido à sua estrutura única e eficácia de clivagem, o β -caroteno é o carotenoide provitamina A mais eficiente (GRUNE et al., 2010). Pois o composto tem a capacidade de eliminar o oxigênio molecular singlete no qual elimina as espécies reativas de oxigênio (GRUNE et al., 2010).

Estudos epidemiológicos têm revelado que um aumento no consumo de carotenoides na dieta está correlacionado com a diminuição do risco de muitas doenças degenerativas (MAYNE; TAYLOR, 1996; STAHL; SIES, 2005; WATZL et al., 2005; ZHANG; OMAYE, 2001). El-Agamey et al. (2004), demonstrou no estudo em animais *in vitro* que o β -caroteno pode prevenir danos oxidativos, contrariando os efeitos dos radicais livres, que podem estar envolvidos no processo patológico de muitas doenças crônicas.

O efeito protetor tem sido associado à sua capacidade antioxidante, protegendo células e tecidos de danos oxidativos (SIES; STAHL, 1995). Além disso, os carotenoides demonstraram ter a capacidade anti-inflamatória (MITCHELL; PAIVA; HEATON, 1999; WU et al., 2015). Yang et al. (2017), prospectivamente relacionou o consumo de β -caroteno na dieta com a capacidade antioxidante e o risco reduzido de DP em duas coortes de base populacional (38.937 mulheres e 45.837 homens). Os resultados sugeriram que o uso constante de suplementos antioxidantes, como o β -caroteno, pode exercer um efeito protetor na DP através

da redução do dano oxidativo, neutralizando o efeito das ROS. Ono e Yamada (2007), avaliaram as atividades antifibrilogênicas e desestabilizadoras de fibrilas in vitro do β -caroteno e vitamina A, impedindo a degeneração dos neurônios na DP. Etminan (2005), estudaram o efeito da ingestão de β -caroteno no risco de DP por meio de uma meta-análise de estudos observacionais, mas eles não conseguiram destacar nenhum efeito protetor do β -caroteno, provavelmente devido ao pequeno número de estudos que incluíram dados sobre a ingestão alimentar de esse carotenoide. Kim et al. (2017), observou que os níveis séricos de alguns carotenoides como, α -caroteno, β -caroteno e licopeno, eram mais baixos em pacientes com DP. Como o β -caroteno possui capacidade hidrofóbica e é oxidado quando exposto à presença de oxigênio, luz e calor (GUL et al., 2015; KOHNO et al., 2016), alguns processos tecnológicos, como a nanoencapsulação podem exercer influência positiva na biodisponibilidade e estabilidade de carotenoides (NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016). Em um estudo as nanopartículas de β -caroteno demonstraram proteção contra danos celulares no organismo e, portanto, potencializam seus sistemas endógenos de defesa antioxidante (GST, SOD e CAT) (ROCHA et al., 2018). Com isso, as técnicas de encapsulamento oferecem soluções possíveis para aumentar a biodisponibilidade, a solubilidade em água e a estabilidade dos carotenoides hidrofóbicos como demonstrado na figura 9 abaixo (RASCÓN et al., 2011; SUTTER; BUERA; ELIZALDE, 2007). E assim sendo possível investigar o efeito das nanopartículas carregadas de β -caroteno nos danos causados pela DP, pois o β -caroteno pode ser útil para melhorar a memória e sugere seu potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas (HIRA et al., 2019).

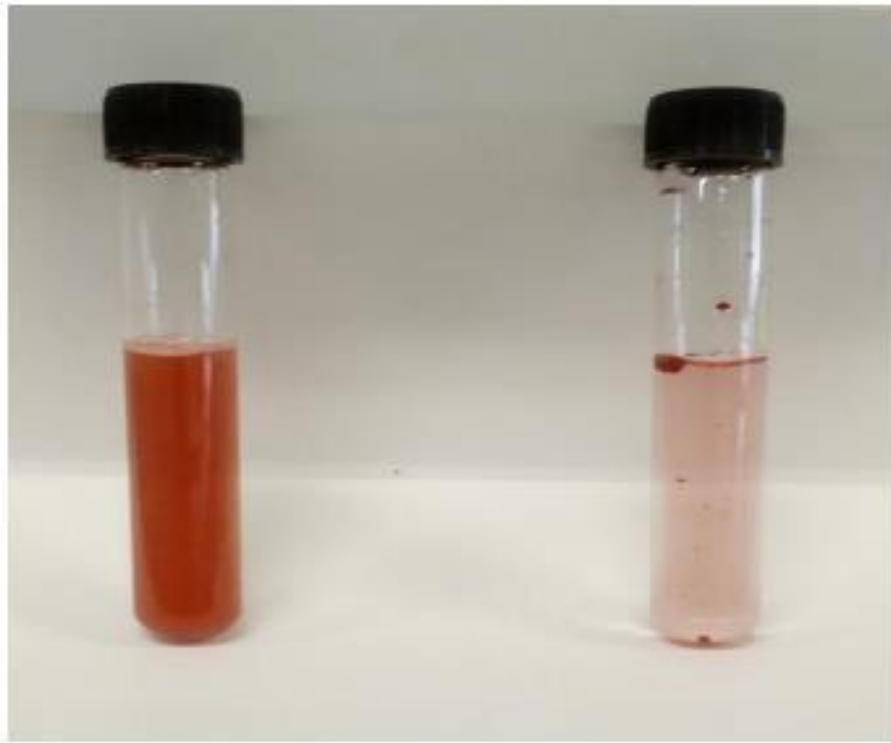


Figura 9 - Nanopartículas de β -caroteno dispersas em água (esquerda) e β -caroteno disperso em água (direita).

Fonte: (ROCHA et al., 2018)

3. JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida da população idosa, existe um aumento no número de casos de doenças neurodegenerativas como a DP, por isso, é necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que tenham como objetivo a prevenção e tratamento da doença, ou pelo menos amenize os sintomas. Diante disto, é importante estudarmos os efeitos terapêuticos de nanopartículas carregadas de β -caroteno, pois ainda não existem dados suficientes na literatura que associem as nanopartículas carregadas de β -caroteno e os danos da DP, além de demonstrar os mecanismos envolvidos no possível efeito farmacológico do carotenoide.

4. OBJETIVOS

4.11 Objetivo geral

Investigar um possível efeito neuroprotetor de nanopartículas carregadas de β -caroteno sobre alterações comportamentais e neuroquímicas causadas pela exposição de *Drosophila melanogaster* a rotenona.

4.12 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do β -caroteno na forma livre e na forma de nanopartículas sobre o comportamento motor de *Drosophila melanogaster*;
- Analisar possíveis alterações motoras em *Drosophila melanogaster* após exposição a rotenona e tratamento com nanopartículas carregadas de β -caroteno;
- Avaliar a taxa de sobrevivência e consumo alimentar da *Drosophila melanogaster* após exposição a rotenona e ao tratamento com nanopartículas carregadas de β -caroteno;
- Avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e dos indicadores de estresse oxidativo no corpo e na cabeça em *Drosophila melanogaster* submetidas as nanopartículas carregadas de β -caroteno e a rotenona.
- Avaliar a viabilidade celular no teste de redução de resazurina no corpo e na cabeça em *Drosophila melanogaster* submetidas as nanopartículas carregadas de β -caroteno e a rotenona.

5. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto na forma que será submetido na revista “Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology”.

Manuscrito:

“ β -carotene-loaded nanoparticles reverse neuromotor damage and oxidative stress in a model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*”

β -carotene-loaded nanoparticles reverse neuromotor damage and oxidative stress in a model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*

Nathalie Savedra Gomes Chaves^{a,b}; Dieniffer Espinosa Janner^{a,b}; Marcia Rósula Poetini^{a,b}; Kétnne Hanna Poletto^{a,b}; Francielli Polet de Almeida^{a,b}; Pedro Honchar Diatel Neto^a; Fernanda Vitória Leimann^c; Odinei Hess Gonçalves^c; Bruna Piaia Ramborger^d; Rafael Roehrs^d; Marina Prigol^{a,b}; Gustavo Petri Guerra^{a,b,*}

^aLaboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio, Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, 97650-000, Itaqui, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, 97508-000, Uruguaiana, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Campo Mourão, 87301-006, Campo Mourão, PR, Brasil.

^dGrupo Interdisciplinar de Pesquisa em Prática de Ensino (GIPPE), Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, 97508-000, Uruguaiana, RS, Brasil.

*Corresponding author. Address: Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui. Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Itaqui, Rio Grande do Sul, CEP 97650-000, Brasil. Phone number: +55 55 98140 9003

E-mail address: petriguerra@gmail.com (G.P. Guerra)

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that exhibits motor symptoms, which are accompanied by the loss of dopaminergic neurons and Lewy body aggregation, which can be triggered by the action of free radicals. β -carotene is a carotenoid found in yellow-orange fruits and vegetables and is an important exogenous antioxidant that has two β -ionone radicals, which decompose to form two pro-vitamin A molecules, where they inhibit free radical-mediated chain reactions and this can be a mechanism to repair the damage caused by PD. Therefore, nanoencapsulation of β -carotene improves efficiency and absorption, increasing its aqueous solubility, protecting it from degradation, controlling release and improving bioavailability. Thus, it is important to investigate a possible neuroprotective effect of β -carotene-loaded nanoparticles caused by exposure of *Drosophila melanogaster* to rotenone. Flies of both sexes, from 2 to 4 days old, were divided into four groups: (1) standard diet (control); (2) a diet containing either rotenone (500 μ M); (3) β -carotene-loaded nanoparticles (20 μ M); (4) β -carotene-loaded nanoparticles and rotenone exposed for 7 days. After the exposure to those diets, survival test, behavioral assays (geotaxis, open field and aversive phototaxis), food consumption and *ex vivo* analyzes: acetylcholinesterase (AChE) activity, reactive species levels (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), protein thiol (PSH) and non-protein thiol (NPSH) content and resazurin were performed. The flies' exposure to β -carotene-loaded nanoparticles managed to reverse the deficits induced by rotenone, such as improving motor function and mortality and attenuating cholinergic deficits. In addition, β -carotene-loaded nanoparticles also reduced the levels of ROS and TBARS and restored the activity of the antioxidant enzymes SOD

and CAT after exposure to rotenone. The results obtained showed that β -carotene-loaded nanoparticles have antioxidant action and are effective in reducing the toxicity induced by rotenone in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: carotenoids; geotaxis; nanoencapsulation; neuroprotective; rotenone.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, its prevalence increases with age, affecting people over 60 years (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Described by James Parkinson in 1817, PD is a chronic neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, which leads to decreased levels of dopamine in the striatum and disrupted motor control. Neuronal eosinophilic inclusions known as Lewy bodies and aggregation of alpha-synuclein protein are hallmarks of the disease (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Many other neuronal cell populations are also affected and account for the presence of non-motor symptoms. The main pathophysiological mechanisms of disease, include mitochondrial dysfunction, oxidative stress and changes in the dopaminergic and cholinergic system (OBESO et al., 2010; ZHU et al., 2008). Evidence has shown reduced activity of AChE resulting in increases in the AChE availability in the synaptic cleft in neurodegenerative disorders such as PD (ZHU et al., 2008). Although substantial efforts have been made to understand the pathogenesis of PD, detailed molecular and cellular mechanisms remain largely unknown (SONG et al., 2017).

The main treatment of PD is drug therapy and its main objective is to increase dopaminergic activity in the basal ganglia (MARCHI et al., 2013). Levodopa was the first effective drug for PD and is still the most used. Because it is the immediate precursor to dopamine, it can cross the blood-brain barrier and allow the depleted number of dopaminergic neurons to produce more dopamine and relieve symptoms (HADDAD et al., 2018). The symptoms tend to increase over time due to the progression of the degenerative process on the substantia nigra and with this come

the side effects of the drug such as hallucinations, delusions, drowsiness, dystonia and especially dyskinesias, which often limit the dose that can be taken (HAYES, 2019).

Thus, new strategies are needed aiming treatment to reduce the progression of symptoms. Once symptomatic treatment is needed, new pharmacological strategies should produce functional improvement with minimal adverse effects. However, the new therapeutic options are not intended to propose a unique way to treat patients with PD, but to contribute to those that already exist. With potential antioxidant and anti-inflammatory effects, carotenoids receive special attention in studies related to PD (KIM et al., 2017; LEE; KIM; LEE, 2011; ZHANG et al., 2002). So, it has been suggested that oxidative and inflammatory damage play an important role in the progression of neurodegenerative diseases such as PD (DEXTERA; JENNER, 2013). In addition, the level of carotenoids in the serum of PD patients is reduced compared to normal individuals (KIM et al., 2017).

β -carotene, the main carotenoid present in the human diet, is found in yellow-orange fruits and vegetables and known for its antioxidant activity that allows eliminating free radicals due to the structure of conjugated double bonds (GRUNE et al., 2010; ELLIOTT, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). In humans, β -carotene regulates the cell proliferation and differentiation and acts on intracellular communications (GUDAS; WAGNER, 2011). In this sense, higher intake of β -carotene is associated with better cognitive performance in older subjects (JAMA et al., 1996) and with lower PD risk in both women and men (MIYAKE et al., 2011; YANG et al., 2017). Furthermore, an important property of β -carotene is to present two β -ionone radicals, which decompose to form two pro-vitamin A molecules (ELLIOTT, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Interestingly, the dopaminergic system, which

constitutes a well-documented pathway involved in PD is one of the targets of vitamin A action in the CNS (BORRELLI; CHAMBON, 1999).

Despite numerous properties, its structure, composed of double bonds conjugated with a center of symmetry, results in a highly hydrophobic character, decreasing its solubility in water (KOHNO et al., 2016). Thus, technological approaches are needed to improve the solubility and bioavailability of β -carotene in hydrophilic media (NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016). The nano-encapsulation techniques offer possible solutions to increase the water solubility, stability and bioavailability of hydrophobic carotenoids (RASCÓN et al., 2011; SUTTER; BUERA; ELIZALDE, 2007).

Thus, it is important to investigate a possible neuroprotective effect of β -carotene-loaded nanoparticles on the behavioral damage caused by the exposure of *Drosophila melanogaster* to rotenone, as well as possible mechanisms of action.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

β -carotene (97% purity, Sigma-Aldrich), was dissolved in canola oil immediately before use. β -carotene in the form of nanoparticles was prepared in according to (ROCHA et al., 2018). Polyvinylpyrrolidone nanoparticles (PVP, 40,000 g · mol⁻¹, Sigma-Aldrich), Tween 80 (Dynamics) and ethanol (99.5%, Neon). Rotenone and quinine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2 *Drosophila melanogaster* stock

The experiments were performed using wild type *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) obtained from the National Species Center (Bowling Green, Ohio, USA). The flies were reared and maintained for about 4 days in an incubator (BOD) in a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ controlled temperature environment and 60-70% humidity with a 12/12 hour light dark cycle. The flies were kept in glass jars containing 10 mL of standard food containing cornmeal (76.59%), wheat germ (8.51%), sugar (7.23%), milk powder (7.23%), salt (0.43%), antifungal (Nipagin) and a hint of dry yeast.

2.3. Experimental design

2.3.1 Experiment 1: Effect of β -carotene or β -carotene-loaded nanoparticles on locomotor and exploratory activity

A concentration-response curve for β -carotene was performed to evaluate the effect on locomotor and exploratory activity and to define the concentration for subsequent experiments. The flies of both sexes from 2 to 4 days of age, were divided into ten groups (50 flies each) exposed to a standard diet (control group), a diet containing canola oil at a final concentration of 0.5%, free nanoparticles (100 μM) dissolved in water, β -carotene (2, 20 or 60 μM), dissolved in canola oil or β -carotene-loaded nanoparticles, dissolved in water (2, 20 or 60 μM) for 7 days. After the exposure to the diet, the flies were submitted to negative geotaxis and open field tests to evaluate locomotor and exploratory activity. The treatment schedule is depicted in Figure 1A.

2.3.2 Experiment 2: Effect of β -carotene-loaded nanoparticles on locomotor and exploratory deficit induced by exposure to rotenone, percentage of survival, food consumption, acetylcholinesterase (AChE) and oxidative stress indicators

After experiment 1 determined that β -carotene-loaded nanoparticles at a concentration of 20 μM do not alter the locomotor activity in *Drosophila melanogaster*, we assessed whether this concentration of β -carotene-loaded nanoparticles protects against the damage induced by rotenone. The flies were divided into four groups (50 flies each) exposed to a standard diet (control), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM), diet containing rotenone (500 μM), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) plus rotenone (500 μM) for 7 days. After exposure to the diet, the flies were subjected to negative geotaxis and open field test, assess locomotor and exploratory activity and aversive phototaxis to assess memory. In addition, the percentage of survival, during 7 days of exposure, and food consumption were evaluated. The concentration of rotenone (500 μM) was selected based on a previous study (ARAUJO et al., 2015; SUDATI et al., 2013). The diet treatment consisted of 1% w/v beer yeast, 2% w/v sucrose, 1% w/v powdered milk, 1% agar w/v and 0.08% w/v methylparaben. The total food medium in all groups contained a volume of 0.5% ethanol. After the behavioral test, the flies were used to determine AChE activity, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (TBARS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), protein thiol content (PSH) and non-protein thiol (NPSH) and cell viability (resazurin) in the head and body of *Drosophila melanogaster*. The treatment schedule is shown in Figure 2A.

2.4 In vivo assays

2.4.1 Survival Rate

The percentage of survival was evaluated daily for 7 days, where the number of live flies per day was counted until the end of the experimental period, 500 flies were included in each group; with the total number of flies representing the sum of ten independent experiments (50 flies/each replicated treatment).

2.4.2 *Negative geotaxis assay*

Test that evaluates the locomotor and climbing capacity of flies with some modifications (FEANY; BENDER, 2000). In summary, after 7 days of treatment, 15 flies from each group were briefly anesthetized with ice and placed individually in a vertical glass test tube with a diameter of 1.5 cm. After 10 min. of recovery from ice exposure, the flies were lightly tapped on the bottom of the tube. We measured the time taken by each fly to reach the top of the column (6 cm) and the flies that remained at the bottom were counted separately, with a maximum evaluation time of 120 seconds. The test was repeated five times for each fly, with an interval of 1 min, and the data were analyzed according to time.

2.4.3 *Open field test*

According to the method described by (CONNOLLY, 1966), and modifications by (MUSACHIO et al., 2020), we evaluated the exploratory activity, in the open field test with 15 flies from each group, each fly was kept in a Petri dish divided by squares measuring 1x1 cm each, maintained for a recovery period of 10 min. before the start of the test and the number of crosses was determined over a period of 60 seconds.

2.4.4 *Aversive Phototaxy*

The aversive phototaxy test was applied according to the methodologies described by (LE BOURG; BUECHER, 2002; SEUGNET et al., 2009), with some adaptations. The test was performed to assess the memory of the flies, considering that cognitive impairment is established as a non-motor characteristic of PD (LEROI et al., 2012). The test was developed based on the natural phototaxy instinct of the flies, and the quinine repellent action, used as a negative reinforcement due to the dodge of

the flies. First, it was observed whether the flies responded to light stimuli (phototaxy), which is an important factor for the test. Then, individually, the flies were placed in a dark cylindrical tube for one minute for adaptation. Subsequently, another tube (of the same size) was attached, fully illuminated by a 150W lamp. If the fly remained on the dark side, phototaxy impairment was found and it was excluded from the test. If the fly went within a minute to the lighted side, phototaxy was proven and that fly would be able to move on to the next step to complete the test. In the second moment, flies were trained. Then, a filter paper moistened with 320 μL of 10^{-1} M quinine hydrochloride solution was added to the clear side of the tube. The fly had up to 10 seconds to go towards the light. This test was then repeated five times. At the end of the training, in the sequence, the flies were placed back on the apparatus to assess whether the training was effective, however, the quinine was removed from the lighted side. The permanence of the flies on the dark side means that it was memorized that the light repelled them. Six hours after training, each fly was evaluated in 5 attempts again in the same way as before, and the number of times the fly avoided the lighted bottle was recorded. This approval rate is recorded as 6 hours after conditioning, which is an indicator of long-term memory.

2.4.5 Food consumption

Food consumption was assessed according to (LUSHCHAK et al., 2011) with some adaptations. First, the four groups with 15 flies were left without food and water for 30 min. Shortly after starvation, the flies were placed in the same food exposed with 0.55 FCF Brilliant Blue dye (FD & C Blue Dye no. 1) for 2 hours. After the feeding period, each group of flies was euthanized with ice and after that the head was separated from the body. Then, 15 bodies of the flies of each group were homogenized

in 200 μ L of 20 mM HEPES, pH 7.5 and centrifuged at 14,288-x g for 15 min. The supernatant was measured with a 629 nm microplate reader. The optical density of the homogenates of the flies that consumed the diet without dye was used as a standard curve.

2.5 *Ex vivo* assays

2.5.1 Sample Preparation

Immediately after the behavioral evaluations the flies were euthanized on ice and homogenized in HEPES buffer (20 mM, pH 7.0), 10:1 (flies/volume μ L) for 2 min., with or without head according to each analysis to be performed. The resulting homogenate was then centrifuged according to each protocol analysis and the supernatant fraction (S1) was used for the determination of enzymatic and non-enzymatic indicators of oxidative stress, AChE activity and cell viability. The protein content was measured colorimetrically using the Bradford method (BRADFORD, 1976) and bovine serum albumin (1 mg/mL) was used as the standard.

2.5.2 Determination of acetylcholinesterase (AChE) activity

AChE activity was measured using the method described by (ELLMAN et al., 1961). Twenty heads and 20 bodies from each group were homogenized in 200 μ L and 800 μ L of HEPES buffer (20 mM, pH 7.0) respectively and centrifuged (78-x g for 10 min.) using acetylthiocholine iodide as a substrate in fly head and body homogenates. Each sample was analyzed in triplicate. The hydrolysis rate of acetylthiocholine iodide was measured at 412 nm for 2 min. spectrophotometrically through the release of thiol compounds, which reacted with 5,5'-dithiobis-(2-

nitrobenzoic acid) (DTNB), producing the colored product thionitrobenzoic acid. The data were expressed in $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

2.5.3 Determination of reactive species (ROS) levels

The level of reactive species was determined by the spectrofluorometric method, according to (PÉREZ-SEVERIANO et al., 2004). Therefore, 10 flies per group were euthanized on ice and the heads were homogenized in 500 μL of 10 mM Tris buffer (pH 7.0). Subsequently, the head homogenate was centrifuged at 1,000-x g for 5 min. at 4 ° C and the supernatant was removed and used for quantification of the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation test. The fluorescence emission of the DCF resulting from the oxidation of the DCF-DA was monitored after 1 h with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 520 nm using a fluorescence spectrometer. The results were expressed as a percentage of the formation of the DCF control in arbitrary units (AU). The average of three to four independent experiments was used (30 to 40 flies for each group).

2.5.4 Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels.

Lipid peroxidation was estimated by TBARS measurement and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method described by (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). In this method, MDA, a final product of lipid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. Briefly, the heads of 20 flies from each group were homogenized in a 120 μL HEPES buffer and the bodies were homogenized in a 400 μL HEPES buffer (pH 7.0) and centrifuged at 78-x g for 10 min. (4°C). TBARS content was measured in a medium containing 50 μL of tissue homogenate from the head or body of the flies, 50 μL of 1.2% sodium

dodecyl sulfate (SDS), 12 μ L of acetic acid buffer (0.45 M, pH 3.4) and 125 μ L of thiobarbituric acid (TBA, 8%). The mixture was then heated to 95°C for 120 min. in a water bath. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm. The results were calculated as nmol MDA/mg protein.

2.5.5 Determination of catalase (CAT) activity

The activity of the catalase enzyme (CAT) was tested according to (AEBI, 1987), with modifications according to (PAULA et al., 2014). Briefly, homogenates containing 20 heads and 20 bodies of flies from each group were centrifuged at 15,366-x g for 10 min. at 4°C. CAT activity was estimated by adding 30 μ L of head or body sample to a reaction mixture containing buffer phosphate (0.25 M/2.5 mM EDTA, pH 7.0), hydrogen peroxide (10 mM, H₂O₂) and Triton X-100 (0.012%). The decomposition of H₂O₂ was monitored at 412 nm for 2 min. and the activity was expressed in U/mg of protein (1U decomposes 1 μ mol of H₂O₂/min. at pH 7.0 and 25°C) and was determined of four independent experiments.

2.5.6 Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by monitoring the inhibition of quercetin auto-oxidation, according to (KOSTYUK; POTAPOVICH, 1989), with modifications (FRANCO et al., 2009). The homogenates containing 20 heads and 20 flies from each group were centrifuged at 15,366-x g for 10 min. at 4°C. The sodium phosphate buffer reaction mixture (0.025 M/0.1 mM EDTA, pH 10), N, N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED) was added (1 mL) along with 10 μ L of sample diluted in 90 μ L of HEPES buffer and 50 μ L of quercetin were monitored at 406 nm for 2 min. to assess their autoxidation. They represent the average of the amount of

protein required to inhibit quercetin oxidation by 50% at 26°C. The SOD activity was expressed as U/mg protein.

2.5.7 Determination of thiol content

The determination of protein (PSH) and non-protein (NPSH) thiol content was estimated based on spectrophotometry, according to (ELLMAN, 1959). To determine the thiol content (PSH), the heads of 35 flies were homogenized in 350 µL of Tris buffer (pH 8.0) and the bodies of 35 flies were homogenized in 1,400 µL of Tris buffer (pH 8.0). For the evaluation of non-protein thiol (NPSH), the 300 µL homogenate was precipitated from the head or body with 100 µL of 0.5M PCA, followed by centrifugation at 7840g (4°C for 5 min.). Subsequently, 50 µL of supernatant and 190 µL of 0.5 M Tris/HCl buffer (pH 8.0) were used. For both tests, the absorbance was measured by spectrophotometry at 412 nm after a 15 min. incubation with 10 µL of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 5 mM at room temperature (25°C). The results are shown as a percentage of the control group.

2.5.8 Cell Viability Assessment

Cell viability assay was performed using samples from 10 fly heads and bodies homogenized in 100 mL of 20 mM Tris buffer (pH 7.0) and centrifuged at 999-x g for 10 min. at 4°C. The supernatant was removed and 20 µL of the sample was added to an acrylic microplate, together with 180 µL of 20 mM Tris (pH 7.0) and 10 µL of resazurin for 2 hours, readings were performed at 573 nm. This method consists of the cells' ability to reduce resazurin to resorufin, which is a fluorescent molecule, where it assesses cell viability (FRANCO et al., 2009). The results were expressed as the percentage of the control.

2.6 Statistical analysis

The GraphPad Prism 7 software was used for statistical analysis and plotting graphs. Statistical analyses were performed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's *post hoc* test, depending on the experiment. Lifespan measurement was determined by comparing the survival curves with a log-rank (Mantel–Cox) test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All data are expressed as the mean and S.E.M.

3. Results

3.1 Experiment 1

Figure 1 (B and C) shows the effect of the exposure to β -carotene (2, 20, 60 or 100 μM) or β -carotene loaded nanoparticles (2, 20 or 60 μM), for 7 days, on the climbing time and crossing number in the geotaxis and open field test respectively of *Drosophila melanogaster*. Statistical analysis (one-way ANOVA) did not show a significant difference between groups for climbing time, however, it revealed that exposure to β -carotene-loaded nanoparticles significantly increased the crossing number [$F_{(9,40)} = 3.89$; $P < 0.05$]. *Post hoc* comparisons showed that β -carotene loaded nanoparticles at the 2 and 60 μM concentrations improved locomotor and exploratory activity in the open field test (Fig. 1C), compared to the control group. In addition, β -carotene loaded nanoparticles at the 60 μM concentrations improved locomotor and exploratory activity, compared to the β -carotene (60 μM) group.

3.2 Experiment 2

Figure 2 (B-G) shows the effect of the exposure to rotenone (500 μM), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) and the co-exposure to rotenone and β -carotene-loaded nanoparticles, for 7 days, on the survival percentage, climbing time (geotaxis test) and crossing number (open field test), aversive phototaxy and Food consumption of *Drosophila melanogaster*. Statistical analysis revealed that exposure to rotenone, significantly decreased the percent survival of flies over experimental period compared to the control group. However, β -carotene-loaded nanoparticles co-exposure protected the flies against the rotenone-induced mortality (Fig. 2B). Statistical analysis (two-way ANOVA) also revealed a significant effect for the interaction factor (β -carotene-loaded nanoparticles versus rotenone) on the climbing time [$F_{(1,20)}= 11.20$; $P<0.05$], the crossing number [$F_{(1,24)}= 26.21$; $P<0.05$] and the aversive phototaxy [$F_{(1,8)}= 28.52$; $P<0.05$; in the training] and [$F_{(1,8)}= 122.4$; $P<0.05$; in the 6 hours after conditioning]. *Post hoc* comparisons demonstrated that, β -carotene-loaded nanoparticles co-exposure protected the flies against the locomotor and exploratory damage in the geotaxis (Fig. 2C) and open field test (Fig. 2D) and against the long-term memory deficit induced by rotenone (Fig. 2 E and F). Statistical analysis (two way ANOVA) did not show a significant difference between groups for Food consumption of the flies (Fig. 2G).

3.3 Determination of AChE activity

Figure 3 (A and B) shows the effect of the exposure to rotenone (500 μM), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) and the co-exposure to rotenone and β -carotene-loaded nanoparticles, for 7 days, on AChE activity in the head and body of *Drosophila melanogaster*. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant effect for the interaction factor (β -carotene-loaded nanoparticles versus rotenone) on

AChE activity in the head [$F_{(1,16)} = 2.788$; $P < 0.05$], however, it did not show a significant difference between groups in the body. *Post hoc* comparisons demonstrated that the exposure to rotenone decreased AChE activity in the head. The co-exposure with β -carotene-loaded nanoparticles protected the flies against the AChE activity decrease induced by rotenone in the head (Fig. 3A).

3.4 Determination of oxidative stress indicators

Figures 4 (A-D) and 5 (A-H) show the effect of the exposure to rotenone (500 μ M), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μ M) and the co-exposure to rotenone and β -carotene-loaded nanoparticles, for 7 days, on oxidative stress indicators (ROS, TBARS, CAT, SOD, NPSH and PSH) in the head and body of *Drosophila melanogaster*. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant effect for the interaction factor (β -carotene-loaded nanoparticles versus rotenone) on oxidative stress indicators: ROS [$F_{(1,16)} = 4.520$; $P < 0.05$], TBARS [$F_{(1,16)} = 13.73$; $P < 0.05$], CAT [$F_{(1,16)} = 31.02$; $P < 0.05$] and SOD [$F_{(1,20)} = 12.57$; $P < 0.05$] in the head and ROS [$F_{(1,16)} = 11.06$; $P < 0.05$], TBARS [$F_{(1,16)} = 8.729$; $P < 0.05$] and SOD [$F_{(1,20)} = 33.80$; $P < 0.05$] in the body. *Post hoc* comparisons demonstrated that β -carotene-loaded nanoparticles co-exposure protected the flies against the ROS production and lipid peroxidation increases and antioxidant enzymes decreases induced by rotenone in the head (ROS, Fig. 4A; TBARS, Fig. 4C; CAT, Fig. 5A and SOD, Fig. 5C) and in the body (ROS, Fig. 4B; TBARS, Fig. 4D and SOD, Fig. 5D). Rotenone did not induce any alterations for CAT in the body (Fig. 5B), NPSH and PSH in the head and body (Fig. 5 E-H).

3.5 Determination of cell viability by reduction resazurin

Figure 6 (A-B) shows the effect of the exposure to rotenone (500 μM), β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) and the co-exposure to rotenone and β -carotene-loaded nanoparticles, for 7 days, on cell viability by the reduction of resazurin in the head and body of *Drosophila melanogaster*. Statistical analysis (two-way ANOVA) did not show a significant difference between groups for reduction of resazurin.

4. Discussion

In the present study, we suggested the protector effect of β -carotene-loaded nanoparticles on PD model induced by rotenone in *Drosophila melanogaster*. Our results showed that β -carotene-loaded nanoparticles (2 and 60 μM) per se improved locomotor and exploratory activity in the open field test in *Drosophila melanogaster*, compared to the control group, as well as, when compared to β -carotene itself in its non-encapsulated form (60 μM). This suggests a greater potential for β -carotene in the form of nanoparticles. β -carotene is highly insoluble in the aqueous system and prone to degrade under various environmental conditions, which makes different delivery systems, such as nanoparticles, necessary to protect β -carotene from degradation (CHUACHAROEN et al., 2016). The nanoparticles can increase the solubility and stability and decrease toxicity of bioactive compounds, improving their absorption and consequently circulation in the central nervous system, which improves its biological effects (BONIFÁCIO et al., 2014). In this sense, the better locomotor performance of flies exposed to β -carotene-loaded nanoparticles in relation to control group may suggest, at least in part, to be a consequence of an increase in bioavailability caused

by the encapsulation of β -carotene. Corroborating studies that show greater bioavailability of β -carotene after nanoencapsulation (ROCHA et al., 2018).

Our results showed that rotenone exposure decreased the survival rate, caused locomotor damage in the geotaxis and open field tests, and also memory deficit in the aversive phototaxy test in the flies. These behavioral changes are likely to be provoked by rotenone-induced neurotoxicity, since alterations in AChE activity and oxidative stress indicators (CAT, SOD, TBARS and ROS) were also observed in the head and body of *Drosophila melanogaster*. It is known that rotenone can induce mitochondrial dysfunction through inhibition of complex I of electron transport chain and increase the ROS production, causing changes similar to DP. (RAMACHANDIRAN et al., 2007; SCHULER; CASIDA, 2001; SWARNKAR et al., 2010). Impaired mitochondrial function occasionally affects neurons, behavioral and accelerates the neurodegenerative process (NAVARRO et al., 2002; ZEEVALK et al., 2005). Previous reports have shown that the administration of rotenone has effects in rats that resemble human PD, suggesting that rotenone is more suitable for establishing a model of PD (BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2003).

Interestingly, nanoparticles loaded with β -carotene (20 μ M) showed a protective effect against increased mortality, locomotor damage and memory deficit induced by rotenone in *Drosophila melanogaster*. In this sense, reduced levels of β -carotene in the serum of patients with PD indicate that carotenoids may be associated with pathogenesis and the progression of PD (KIM et al., 2017). Previous studies revealed that in treatment with β -carotene it would be able to improve locomotor deficit in rats with spinal cord injury (ZHOU et al., 2018). Furthermore, Food consumption of β -carotene is able to help decrease the risk of Alzheimer's disease (LI; SHEN; JI, 2012).

Epidemiological studies have shown a significant reduction in the risk of PD in individuals that consume foods containing β -carotene compared to the control group (MIYAKE et al., 2011). Based on this evidence, we believe that β -carotene has a potential neuroprotective effect against neurodegenerative diseases, including PD.

Several studies show that PD is more than a motor disorder, but a set of problems that also cover cognitive deficits and psychiatric disorders, that significantly affect memory (DEGOS et al., 2018; GROGAN et al., 2018; LEROI, 2017). According to (SEUGNET et al., 2009) flies in the intermediate stage of PD demonstrate persistent short-term memory deficits. In the present study, β -carotene-loaded nanoparticles managed to protect against the rotenone-induced memory deficit in the aversive phototaxy test. This suggests that β -carotene-loaded nanoparticles have a protective capacity not only against motor damage, but also against non-motor damage induced by rotenone, such as memory deficit.

The main report described in the present study was that β -carotene-loaded nanoparticles avoided the rotenone-induced damage on AChE activity and oxidative stress indicators in *Drosophila melanogaster*. The repair of these neurochemical damages appears to be responsible for attenuated behavioral deficits after exposure to β -carotene-loaded nanoparticles and rotenone.

The evidence suggested a significant role for cholinergic neurons in the pathophysiology of neurodegenerative diseases (ZHANG et al., 2013). Acetylcholine is a neurotransmitter present in the central nervous system, widely distributed in the brain (ZHANG et al., 2013). The enzyme AChE hydrolyzes acetylcholine in choline and acetate and regulate availability of the neurotransmitter in the synaptic cleft (VINUTHA et al., 2007). In our study, β -carotene-loaded nanoparticles restored AChE activity in

Drosophila melanogaster exposed to rotenone. The ability of bioactive compounds to modulate AChE is important because this enzyme is related to several neurodegenerative diseases (LI et al., 2017). AChE is a very susceptible enzyme that can be inhibited due to increased generation of free radicals (HASAN et al., 2019). β -carotene can modulate AChE activity due to its antioxidant property and may have the ability to treat disorders related to neurodegeneration (HIRA et al., 2019).

Oxidative stress plays a central role in the pathogenesis and progression of PD (ANGLADE, 1997), furthermore, it is able to favor the decrease in AChE activity (LIU et al., 2017). It is known that high levels of ROS are found in the substantia nigra of patients with PD and the antioxidant treatment is considered as a potential therapy for the disease (CICCONE, 1998; DI MATTEO; ESPOSITO, 2003). The flies exposed to β -carotene-loaded nanoparticles showed a significant decrease in the oxidative stress (TBARS and ROS) induced by rotenone, as well as the restoration of antioxidant enzymes (CAT and SOD), suggesting the potential antioxidant effect of β -carotene-loaded nanoparticles against the deleterious effects of oxidative stress. Similarly, β -carotene attenuates the levels of free radicals, including ROS, NO and MDA in rats with spinal cord injury (ZHOU et al., 2018). Previous research suggests that β -carotene exhibits antioxidant activity and anti-inflammatory capacity and that its effect is involved in the molecular mechanisms against various diseases, due to the potential functions on oxidative stress in the onset and progression of PD (HOSSEINI et al., 2010; WU et al., 2015). The antioxidant activity of β -carotene can be attributed to its high number of conjugated dienes, which act as potent inhibitors of free radicals (FIEDOR et al., 2005; NISHINO; YASUI; MAOKA, 2017).

Regarding food consumption, there was no significant difference between the groups, demonstrating that the flies consume the same amount of food regardless of the treatment added. This suggests that any effect obtained is due to neurochemical changes caused by the compound present in each treatment and not due to the fact that the fly consumes more or less the drug responsible for causing the damage.

In conclusion, our results revealed that nanoparticles loaded with β -carotene have the ability to protect against the locomotor damage and memory deficit induced by rotenone, in which involve AChE activity restoration and oxidative stress inhibition. These results suggest that β -carotene-loaded nanoparticles can be an alternative in the development of new drugs for the treatment of PD or to be used synergistically with drugs already established, potentiating the effect. However more research is needed to investigate the role of β -carotene-loaded nanoparticles in the treatment of symptoms of Parkinson's disease.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (421769/2018-1). N.G.C. Savedra, D. E. Janner, M.R. Poetini and F.P. de Almeida are the recipient of a FAPERGS or CAPES fellowship. All of the experiments comply with the current laws of Brazil.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Aebi, H., 1987. Catalase invitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Anglade, P., 1997. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol. Histopathol.* 12, 603–610.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., Mackenzie, G., Garcia-osuna, M., Panov, A. V, Greenamyre, J.T., 2000. Chronic systemic pesticide exposure produces pd symptoms Betarbet. *Nat. Neurosci.* 26, 1301–1306.
- Bonifácio, B.V., Silva, P.B. da, Ramos, M.A. dos S., Negri, K.M.S., Bauab, T.M., MarlusChorilli, 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines : a review. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1–15.
- Borrelli, E., Chambon, P., 1999. Control of transcription and neurological diseases. *Mol. Psychiatry* 4, 112–114. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000491>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chuacharoen, T., Sabliov, C.M., Paula, M.T. De, Rósula, M., Silva, P., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., Meichtry, L.B., Paula, A., Zemolin, P., Wallau, G.L., Jesse, C.R., Franco, J.L., Posser, T., Prigol, M., 2016. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016, 302–309. <https://doi.org/10.1155/2016/4018157>
- Ciccione, C.D., 1998. Free-radical toxicity and antioxidant medications in Parkinson's

disease. *Phys. Ther.* 78, 313–319. <https://doi.org/10.1093/ptj/78.3.313>

Connolly, K., 1966. Locomotor activity in *Drosophila*. II. Selection for active and inactive strains. *Anim. Behav.* 14, 444–449. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(66\)80043-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(66)80043-X)

Degos, B., Ameqrane, I., Rivaud-Péchoux, S., Pouget, P., Missal, M., 2018. Short-term temporal memory in idiopathic and Parkin-associated Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25751-8>

Dextera, D.T., Jenner, P., 2013. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>

Di Matteo, V., Esposito, E., 2003. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.* 2, 95–107. <https://doi.org/10.2174/1568007033482959>

Elliott, R., 2005. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1740, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.009>

Ellman, G.L., 1959. Tissue Sulfhydryl Groups. *Am. J. Anal. Chem.* 70–77.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

- Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398. <https://doi.org/10.1038/35006074>
- Fiedor, J., Fiedor, L., Haeßner, R., Scheer, H., 2005. Cyclic endoperoxides of β -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1709, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2005.05.008>
- Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., Bainy, A.C.D., Marques, M.R., Dafre, A.L., Farina, M., 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013>
- Grogan, J.P., Knight, L.E., Smith, L., Irigoras Izagirre, N., Howat, A., Knight, B.E., Bickerton, A., Isotalus, H.K., Coulthard, E.J., 2018. Effects of Parkinson's disease and dopamine on digit span measures of working memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 235, 3443–3450. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5058-6>
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A.C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., Biesalski, H.K., 2010. Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, et al. Betacarotene is an important vitamin A source. *American Society for Nutrition. The Journal of Nutrition.* 2010:2268S-85S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024.ants>
- Gudas, L.J., Wagner, J.A., 2011. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226, 322–330. <https://doi.org/10.1002/jcp.22417>
- Haddad, F., Sawalha, M., Khawaja, Y., Najjar, A., Karaman, R., 2018. Dopamine and

levodopa prodrugs for the treatment of Parkinson's disease. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23010040>

Hayes, M.T., 2019. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am. J. Med.* 132, 802–807. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>

Hira, S., Saleem, U., Anwar, F., Sohail, M.F., Raza, Z., Ahmad, B., 2019. β -Carotene: A Natural Compound Improves Cognitive Impairment and Oxidative Stress in a Mouse Model of Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom9090441>

Hosseini, F., Naseri, M.K.G., Badavi, M., Ghaffari, M.A., Shahbazian, H., Rashidi, I., 2010. Effect of beta carotene on lipid peroxidation and antioxidant status following renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 70, 259–263. <https://doi.org/10.3109/00365511003777810>

Jama, J.W., Launer, L.J., Witteman, J.C.M., den Breeijen, J.H., Breteler, M.M.B., Grobbee, D.E., Hofman, A., 1996. Dietary Antioxidants and Cognitive Function in a Population-based Sample of Older Persons: The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 144, 275–280. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008922>

Kim, J.H., Hwang, J., Shim, E., Chung, E.J., Jang, S.H., Koh, S.B., 2017. Association of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. *Nutr. Res. Pract.* 11, 114–120. <https://doi.org/10.4162/nrp.2017.11.2.114>

Kohno, Y., Kato, Y., Shibata, M., Fukuhara, C., Maeda, Y., Tomita, Y., Kobayashi, K., 2016. Fixation and stability enhancement of beta-carotene by organo-modified

mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Mater.* 220, 1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.08.019>

Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., 1989. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int.*

Le Bourg, É., Buecher, C., 2002. Learned suppression of photopositive tendencies in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Learn. Behav.* 30, 330–341.

<https://doi.org/10.3758/BF03195958>

Lee, D.H., Kim, C.S., Lee, Y.J., 2011. Astaxanthin protects against MPTP/MPP+-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 49, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.029>

Leroi, I., 2017. Disrupted identities: Movement, mind, and memory in Parkinson's disease. *Int. Psychogeriatrics* 29, 879–881. <https://doi.org/10.1017/S1041610217000370>

Leroi, I., McDonald, K., Pantula, H., Harbishettar, V., 2012. Cognitive impairment in parkinson disease: Impact on quality of life, disability, and caregiver burden. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 25, 208–214. <https://doi.org/10.1177/0891988712464823>

Li, F., Shen, L., Ji, H., 2012. Dietary Intakes of Vitamin E , Vitamin C , and β -Carotene and Risk of Alzheimer ' s Disease : 31, 253–258. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120349>

Li, Q., Yang, H., Chen, Y., Sun, H., 2017. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med.*

Chem. 132, 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.062>

Liu, H., Wu, J., Yao, J.Y., Wang, H., Li, S.T., 2017. The role of oxidative stress in decreased acetylcholinesterase activity at the neuromuscular junction of the diaphragm during sepsis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9718615>

Lushchak, O. V., Rovenko, B.M., Gospodaryov, D. V., Lushchak, V.I., 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.04.019>

Marchi, K.C., Chagas, M.H.N., Tumas, V., Miasso, A.I., Crippa, J.A.S., Tirapelli, C.R., 2013. Adherence to medication among patients with Parkinson's disease treated at a specialized outpatient unit | Adesão à medicação em pacientes com doença de Parkinson atendidos em ambulatório especializado. *Cienc. e Saude Coletiva* 18, 855–862. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000300031>

Miyake, Y., Fukushima, W., Tanaka, K., Sasaki, S., Kiyohara, C., Tsuboi, Y., Yamada, T., Oeda, T., Miki, T., Kawamura, N., Sakae, N., Fukuyama, H., Hirota, Y., Nagai, M., 2011. Dietary intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan. *Eur. J. Neurol.* 18, 106–113. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03088.x>

Musachio, E.A.S., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., de Freitas Couto, S., Dahleh, M.M.M., Poetini, M.R., Jardim, E.F., Meichtry, L.B., Ramborger, B.P., Roehrs, R., Petri Guerra, G., Prigol, M., 2020. Bisphenol A exposure is involved in the development

- of Parkinson like disease in *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 137, 111128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111128>
- Navarro, A., Sánchez Del Pino, M.J., Gómez, C., Peralta, J.L., Boveris, A., 2002. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 282, 985–992. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00537.2001>
- Nishino, A., Yasui, H., Maoka, T., 2017. Reaction and scavenging mechanism of β -carotene and zeaxanthin with reactive oxygen species. J. Oleo Sci. 66, 77–84. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16107>
- Nwachukwu, I.D., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2016. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. Trends Food Sci. Technol. 49, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.005>
- 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.V., Halliday, G., 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. Nat. Med. 16, 653–661. <https://doi.org/10.1038/nm.2165>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Paula, M.T., Zemolin, A.P., Vargas, A.P., Golombieski, R.M., Loreto, E.L.S., Saidelles, A.P., Picoloto, R.S., Flores, E.M.M., Pereira, A.B., Rocha, J.B.T., Merritt, T.J.S.,

- Franco, J.L., Posser, T., 2014. Effects of Hg(II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*. *Environ. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/tox.21788>
- Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Ríos, C., Segovia, J., 2004. Increased Formation of Reactive Oxygen Species, but No Changes in Glutathione Peroxidase Activity, in Striata of Mice Transgenic for the Huntington's Disease Mutation. *Neurochem. Res.* 29, 729–733. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000018843.83770.4b>
- Ramachandiran, S., Hansen, J.M., Jones, D.P., Richardson, J.R., Miller, G.W., 2007. Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: Oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol. Sci.* 95, 163–171. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl125>
- Rascón, M.P., Beristain, C.I., García, H.S., Salgado, M.A., 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>
- Raza, C., Anjum, R., Shakeel, N. ul A., 2019. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 226, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
- Rocha, F., Yumi Sugahara, L., Leimann, F.V., De Oliveira, S.M., Da Silva Brum, E., Calhelha, R.C., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., Porto Ineu, R., Gonçalves, O.H., 2018. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. *Food Funct.* 9, 3698–3706.

<https://doi.org/10.1039/c8fo00804c>

- Rodriguez-Amaya, D.B., 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J. Food Compos. Anal.* 23, 726–740. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>
- Schuler, F., Casida, J.E., 2001. Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1506, 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00183-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00183-9)
- Seugnet, L., Galvin, J.E., Suzuki, Y., Gottschalk, L., Shaw, P.J., 2009. Persistent short-term memory defects following sleep deprivation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Sleep* 32, 984–992. <https://doi.org/10.1093/sleep/32.8.984>
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Greenamyre, J.T., 2003. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 23, 10756–10764. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-34-10756.2003>
- Song, L., He, Y., Ou, J., Zhao, Y., Li, R., Cheng, J., Lin, C.H., Ho, M.S., 2017. Auxilin Underlies Progressive Locomotor Deficits and Dopaminergic Neuron Loss in a *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *Cell Rep.* 18, 1132–1143. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.005>
- Sutter, S.C., Buera, M.P., Elizalde, B.E., 2007. β -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *Int. J. Pharm.* 332, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.023>

- Swarnkar, S., Singh, S., Mathur, R., Patro, I.K., Nath, C., 2010. A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. *Toxicology* 272, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.019>
- Tysnes, O.B., Storstein, A., 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 124, 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S.L., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., Deepak, M., 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* 109, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.014>
- Wu, T.C., Huang, S.Y., Chan, S.T., Liao, J.W., Yeh, S.L., 2015. Combination of β -carotene and quercetin against benzo[a]pyrene-induced pro-inflammatory reaction accompanied by the regulation of antioxidant enzyme activity and NF- κ B translocation in Mongolian gerbils. *Eur. J. Nutr.* 54, 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0719-7>
- Yang, F., Wolk, A., Håkansson, N., Pedersen, N.L., Wirdefeldt, K., 2017. Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts. *Mov. Disord.* 32, 1631–1636. <https://doi.org/10.1002/mds.27120>
- Zeevalk, G.D., Bernard, L.P., Song, C., Gluck, M., Ehrhart, J., 2005. Mitochondrial inhibition and oxidative stress: Reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxidants Redox Signal.* 7, 1117–1139. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1117>

- Zhang, S.M., Hernán, M.A., Chen, H., Spiegelman, D., Willett, W.C., Ascherio, A., 2002. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology* 59, 1161–1169. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000028688.75881.12>
- Zhang, Xuejin, Lu, L., Liu, S., Ye, W., Wu, J., Zhang, Xuejun, 2013. Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.11.015>
- Zhou, L., Ouyang, L., Lin, S., Chen, S., Liu, Y.J., Zhou, W., Wang, X., 2018. Protective role of β -carotene against oxidative stress and neuroinflammation in a rat model of spinal cord injury. *Int. Immunopharmacol.* 61, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.022>
- Zhu, W., Wang, D., Zheng, J., An, Y., Wang, Q., Zhang, W., Jin, L., Gao, H., Lin, L., 2008. Effect of (R)-salsolinol and N-methyl-(R)-salsolinol on the balance impairment between dopamine and acetylcholine in rat brain: Involvement in pathogenesis of Parkinson disease. *Clin. Chem.* 54, 705–712. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097725>

Legends

Figure 1. (A) Experimental design of the β -carotene concentration-response curve. Effect of exposure to β -carotene (2, 20, 60 or 100 μM) and β -carotene-loaded nanoparticles (2, 20 or 60 μM) for 7 days, on behavioral assessments in *Drosophila melanogaster*. (B) negative geotaxis; (C) open field. Data are mean + SEM, for $n = 5$ in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the control group. & Indicates a significant difference ($P < 0.05$) of β -carotene-loaded nanoparticles compared to the β -carotene group (60 μM).

Figure 2. (A) Experimental design. Effect of co-exposure of β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) and rotenone (500 μM) for 7 days on (B) percentage of survival; (C) negative geotaxis; (D) open field; (E and F) aversive phototaxy training and after 6 hours of conditioning; (G) food consumption in *Drosophila melanogaster*. Data are mean + SEM, for $n = 3-7$ in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the control group. # Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the rotenone group.

Figure 3. Effect of co-exposure of β -carotene-loaded nanoparticles (20 μM) and rotenone (500 μM), for 7 days, on AChE activity in the (A) head and (B) body of *Drosophila melanogaster*. Data are mean + SEM, for $n = 5-4$ in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the control group. # Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the rotenone group.

Figure 4. Effect of co-exposure of β -carotene-loaded nanoparticles (20 μ M) and rotenone (500 μ M), for 7 days, on levels of reactive oxygen species (ROS) in the (A) head and in the (B) body, and levels of lipid peroxidation by TBARS assay in the (C) head and (D) body of *Drosophila melanogaster*. Data are mean + SEM, for n = 6-5 in each group. * Indicates a significant difference (P <0.05) compared to the control group. # Indicates a significant difference (P <0.05) compared to the rotenone group.

Figure 5. Effect of co-exposure of β -carotene-loaded nanoparticles (20 μ M) and rotenone (500 μ M), for 7 days, on activity of CAT in the (A) head and (B) body; SOD in the (C) head and (D) body; PSH protein in the (E) head and (F) body and of the non-protein NPSH thiol in the (G) head and (H) body of *Drosophila melanogaster*. Data are mean + SEM, for n = 5 in each group. * Indicates a significant difference (P <0.05) compared to the control group. # Indicates a significant difference (P <0.05) compared to the rotenone group.

Figure 6. Effect of co-exposure of β -carotene-loaded nanoparticles (20 μ M) and rotenone (500 μ M), for 7 days, on cell viability by resazurin reduction in the head (A) and body (B) of *Drosophila melanogaster*. Data are mean + SEM, for n = 5 in each group.

Figures:

Figure 1

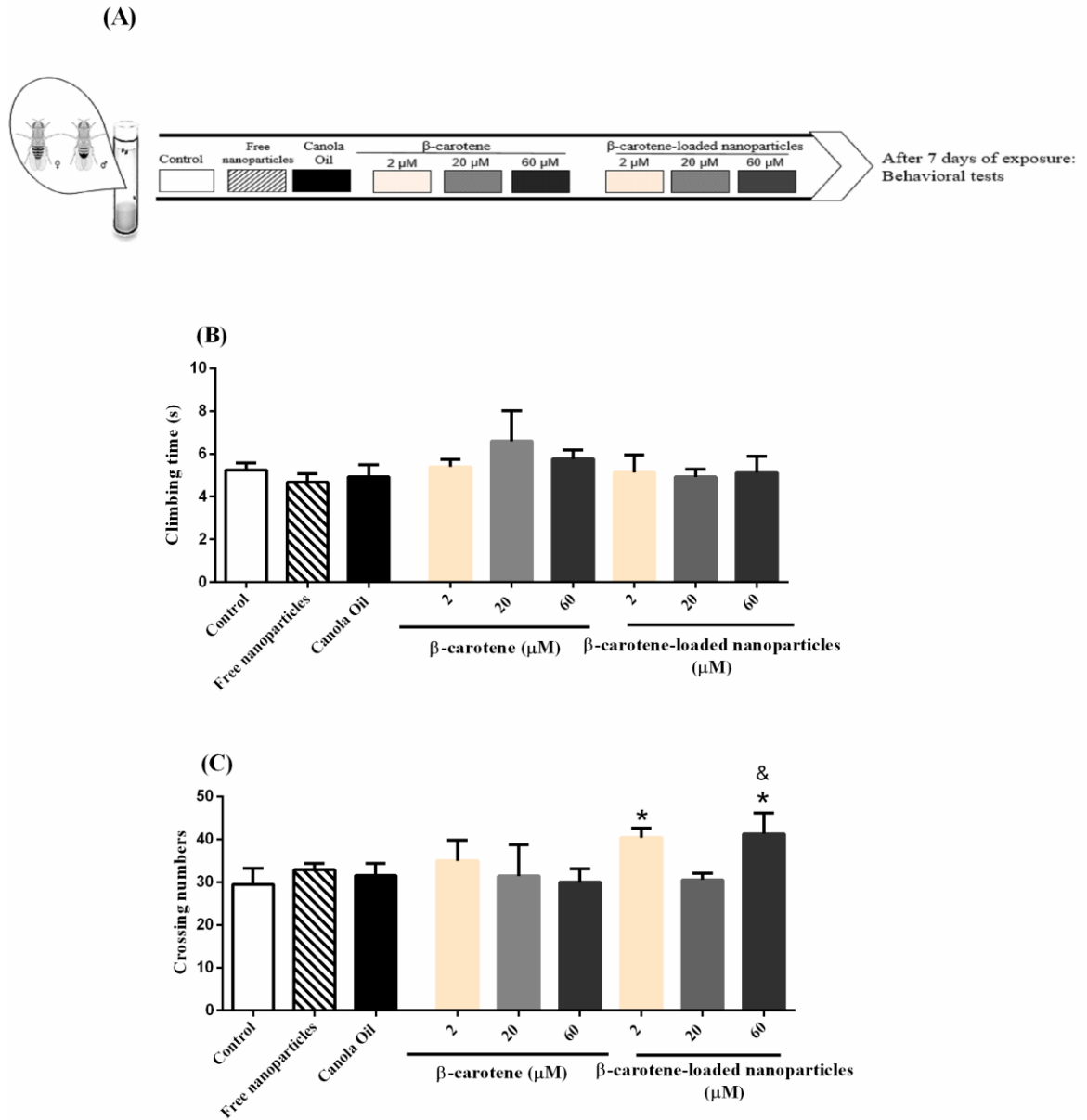
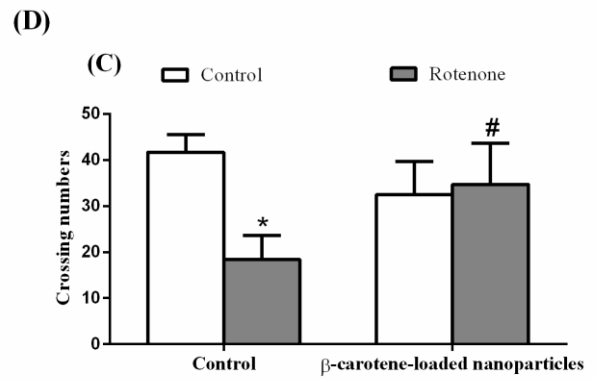
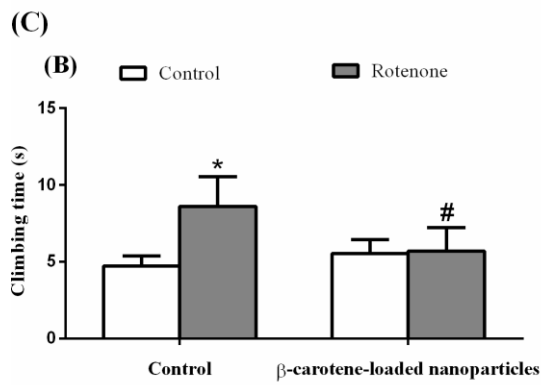
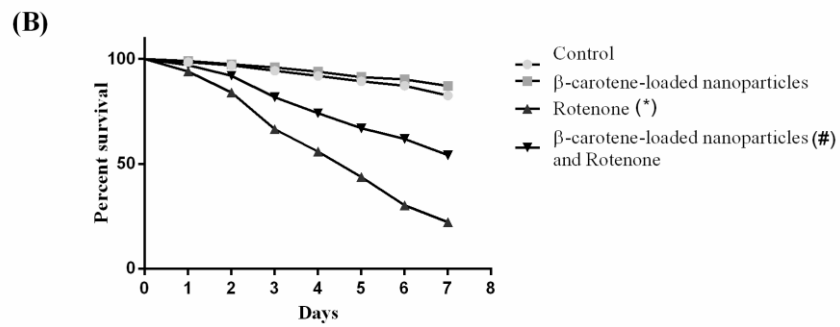
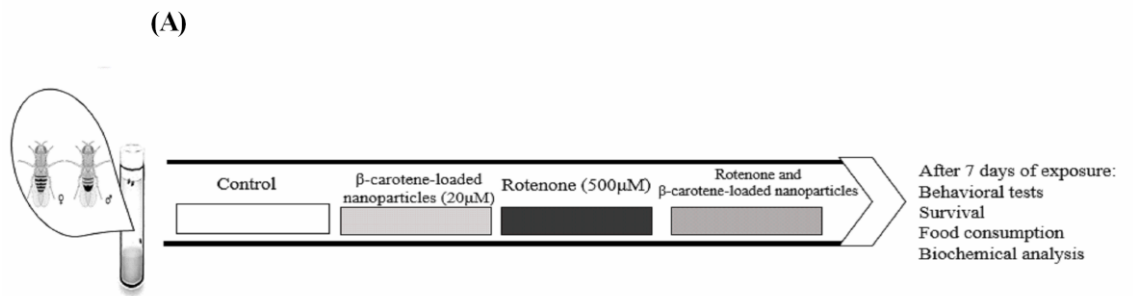


Figure 2



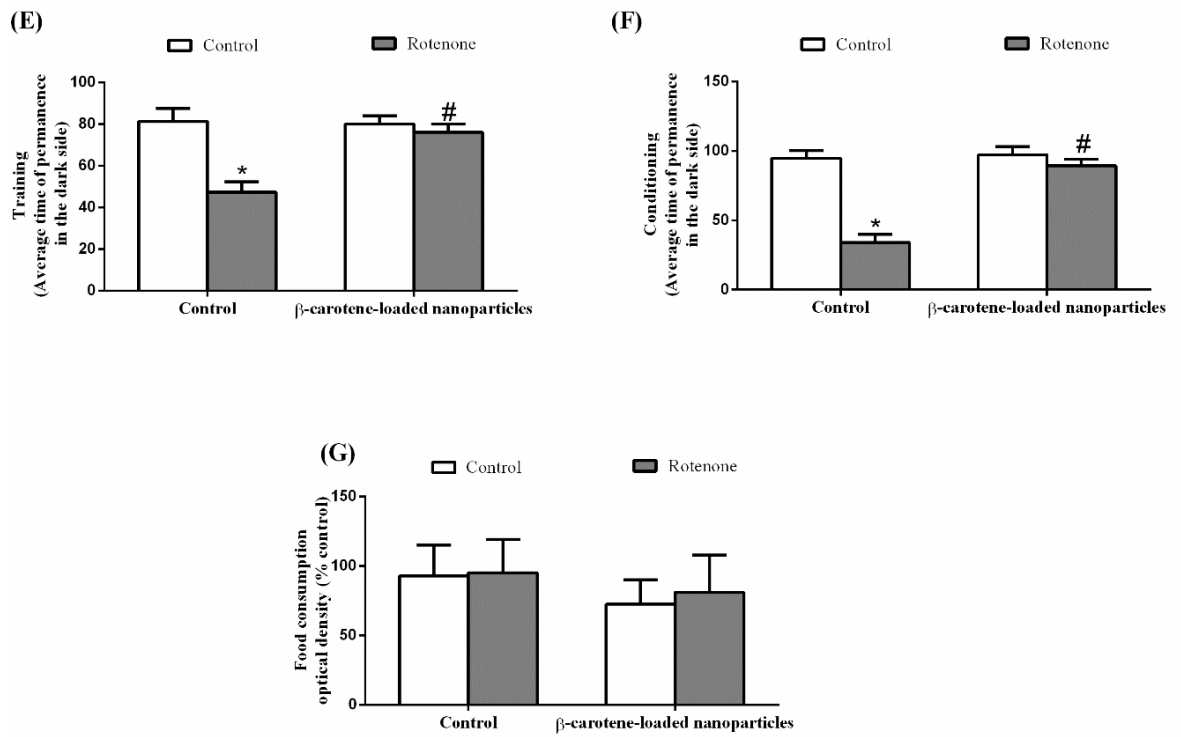


Figure 3

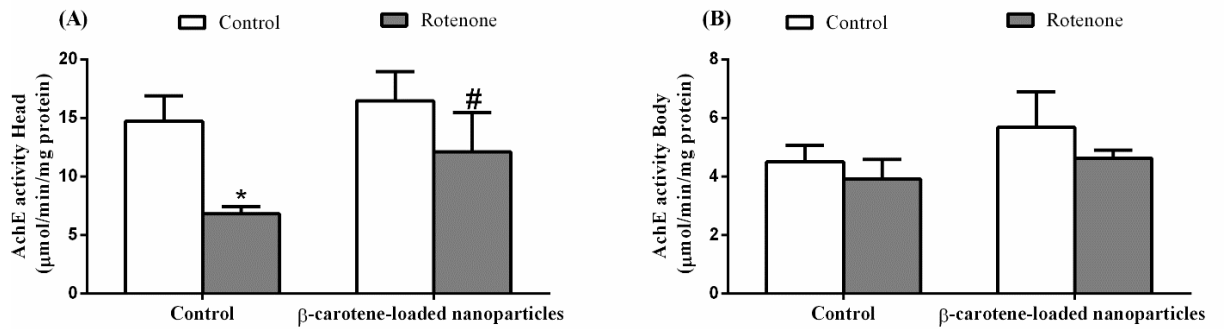


Figure 4

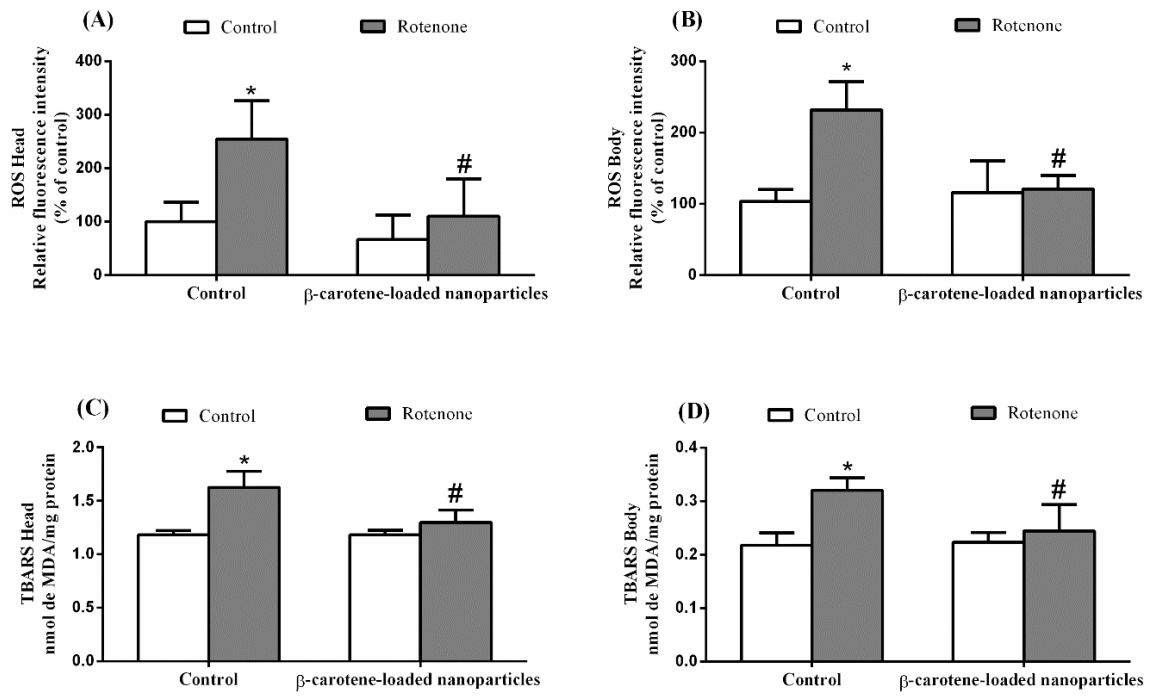


Figure 5

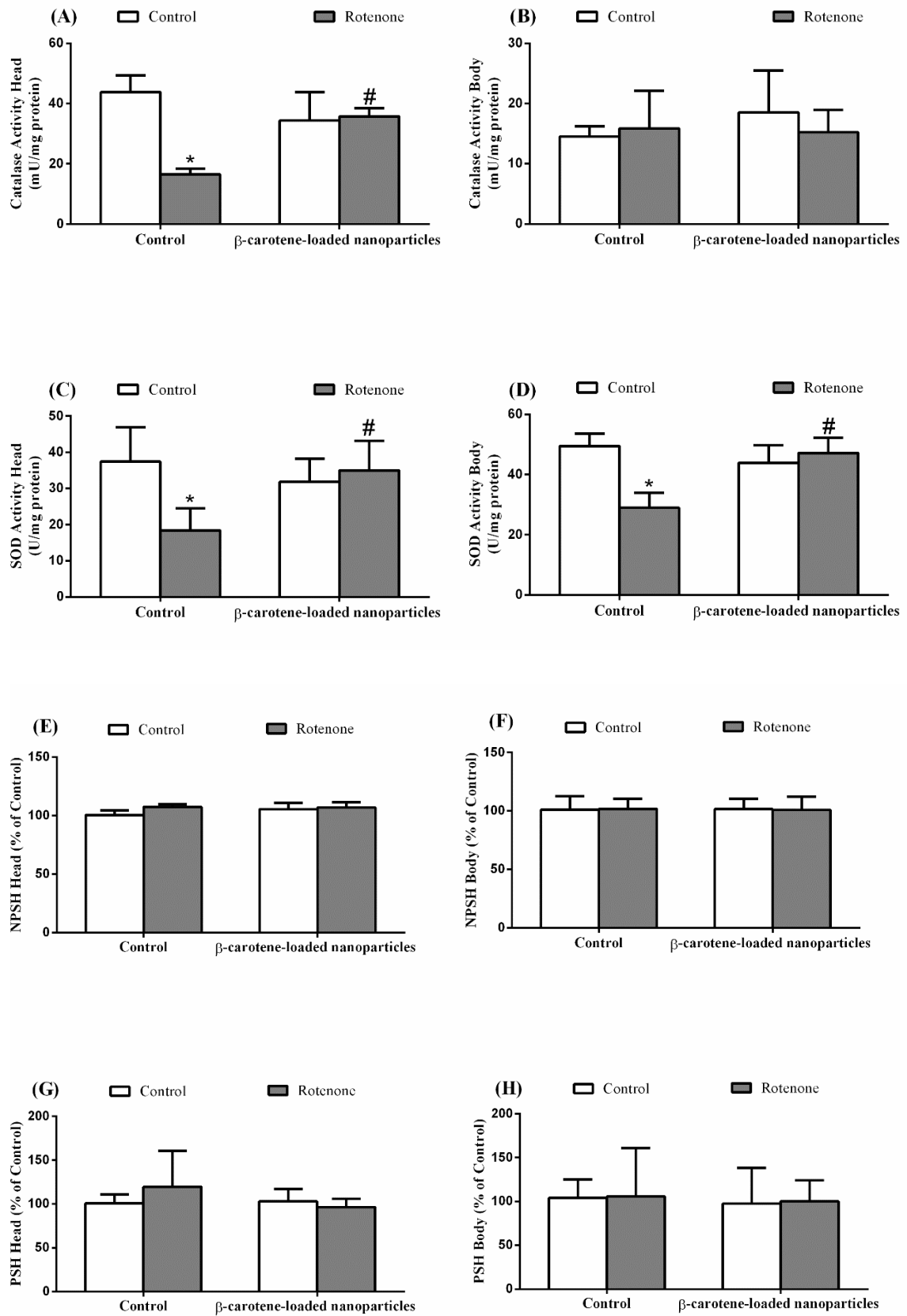
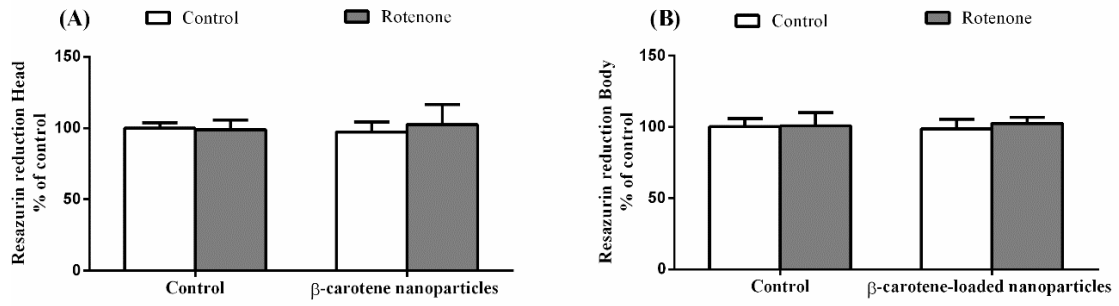


Figure 6



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nos resultados apresentados nesta dissertação, pode-se concluir que:

- As nanopartículas carregadas de β -caroteno melhoraram atividade locomotora da *Drosophila melanogaster* nos testes de geotaxia e campo aberto, comparadas ao β -caroteno livre na curva de concentração-resposta.
- As nanopartículas carregadas de β -caroteno na concentração de 20 μ M protegeram as moscas expostas a rotenona dos danos locomotores nos testes de geotaxia, campo aberto e fototaxia aversiva, também foi observado melhora na taxa de sobrevivência.
- Em relação ao consumo alimentar, não houve diferença significativa entre os grupos, o que demonstra que as moscas consomem a mesma quantidade da dieta em todos os grupos. Isso sugere que o efeito obtido é devido as alterações neuroquímicas causadas pelo composto presente em cada tratamento e não pelo fato da mosca consumir mais ou menos a dieta.
- As moscas expostas a rotenona apresentaram inibição da atividade da AChE, no qual afeta a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas causando déficits cognitivos e funcionais, no entanto as nanopartículas carregadas de β -caroteno conseguiram atenuar esses déficits na atividade da AChE na cabeça da *Drosophila melanogaster*, também diminuíram os níveis de ROS e TBARS tanto na cabeça como no corpo, e foram capazes de restaurar os níveis das enzimas antioxidantes na cabeça (CAT) e na cabeça e corpo (SOD).
- Inesperadamente não houve diferença significativa na avaliação de PSH, NPSH e na viabilidade celular nas moscas expostas a rotenona e as nanopartículas carregadas de β -caroteno.

Nossos resultados sugerem que a exposição a rotenona causa danos locomotores e aumento do estresse oxidativo assim como na DP. Com tudo, as nanopartículas

carregadas de β -caroteno melhoraram a taxa de sobrevivência, atividade locomotora, atenuaram os déficits na atividade da AChE e protegeram contra os danos do estresse oxidativo. Esses achados sugerem que as nanopartículas carregadas de β -caroteno podem ser uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos já estabelecidos, potencializando seu efeito. No entanto faz-se necessários mais estudos para esclarecer o papel das nanopartículas carregadas de β -caroteno no tratamento dos sintomas da doença de Parkinson.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nessa dissertação, poderíamos realizar estudos com o seguinte propósito:

Avaliar a concentração de vitamina A na *Drosophila melanogaster*, após a exposição a rotenona e as nanopartículas carregadas de β -caroteno.

Considerar os mecanismos inflamatórios envolvidos na DP, e a capacidade anti-inflamatória das nanopartículas carregadas de β -caroteno.

Verificar o possível envolvimento da via do BDNF (homólogo DNT1) relacionada a DP na *Drosophila melanogaster* exposta a rotenona e das nanopartículas carregadas de β -caroteno.

8. REFERÊNCIAS

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. DE A. C. E S.; FARO, Z. P. DE. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233–243, 2006.

ANDRETIC, R. et al. Drosophila D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 51, p. 20392–20397, 2008.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

BAILA, H.; AT, P. Tratamento da Doença de. v. 7, n. 1, p. 6–12, 1999.

BAINTON, R. J. et al. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in Drosophila. **Current Biology**, v. 10, n. 4, p. 187–194, 2000.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006.

BARGIOTAS, P.; KONITSIOTIS, S. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: Emerging treatments. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, p. 1605–1617, 2013.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 205–214, 2004.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 325–332, 2001.

BERG, D. et al. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 4, p. 454–462, 2014.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure produces pd symptoms Betarbet. **Nature neuroscience**, v. 26, p. 1301–1306, 2000.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; TIMOTHY GREENAMYRE, J. Animal models of Parkinson's disease. **BioEssays**, v. 24, n. 4, p. 308–318, 2002.

BILGIÇ, B.; HANAĞASI, H. A.; EMRE, M. Parkinson's disease dementia. **Neuropsychiatric and Cognitive Changes in Parkinson's Disease and Related Movement Disorders: Diagnosis and Management**, v. 363, p. 177–191, 2010.

BOURQUE, M.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Repurposing sex steroids and related drugs as potential treatment for Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 147, p. 37–54, 2019.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRANSON, K. et al. High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. **Nature Methods**, v. 6, n. 6, p. 451–457, 2009.

BRINKLEY, B. R. et al. Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. **Experimental Cell Research**, v. 85, n. 1, p. 41–46, 1974.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Special Molecules, Special Properties. **Carotenoids**, v. 4, p. 1–6, 2008.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, n. 4649, p. 569–573, 1984.

BYSTROM, L. M.; GUZMAN, M. L.; RIVELLA, S. Iron and ROS: Friends or Foes of Cancer Cells? **Antioxidants & redox signaling**, v. 4, p. 1–34, 2014.

CALABRESI, P. et al. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 211–219, 2007.

CAPPELLETTI, G. et al. Linking microtubules to Parkinson's disease: The case of parkin. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, p. 292–296, 2015.

CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacological Reviews**, v. 11, n. 2, p. 490–

493, 1959.

CHEN, C. M. et al. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 3, p. 429–435, 2009.

CHIEN, S. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 149–151, 2002.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Dopaminergic neurons. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 5 SPEC. ISS., p. 942–946, 2005.

CHINTAPALLI, V. R.; WANG, J.; DOW, J. A. T. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 715–720, 2007.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 16, p. 1670–1683, 2014.

COOPERSTONE, J. L.; SCHWARTZ, S. J. Recent Insights Into Health Benefits of Carotenoids. [s.l.] **Elsevier Ltd**, 2016.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. UNOPAR Cient., **Ciênc. biol. saude**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2013.

CURTZE, C. et al. Levodopa Is a Double-Edged Sword for Balance and Gait in People With Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 10, p. 1361–1370, 2015.

DARDEN, L. **Mechanisms and models**, 2007. (Nota técnica).

DAVID G. STANDAERT E JOSHUA M. GALANTER. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica, 2010.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of

proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303–317, 2002.

DEXTERA, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DICKSON, D. W. et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 12, p. 1150–1157, 2009.

DORAN, M. L. et al. Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 323–334, 2017.

EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, n. 1, p. 37–48, 2004.

ELBAZ, A. et al. Epidemiology of Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 14–26, 2016.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, n. 2, p. 121–143, 2004.

ESKOW JAUNARAJIS, K. L. et al. Striatal cholinergic dysfunction as a unifying theme in the pathophysiology of dystonia. **Progress in Neurobiology**, v. 127–128, p. 91–107, 2015.

ETMINAN, M.; GILL, S. S.; SAMII, A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 6, p. 362–365, 2005.

FATO, R. et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1787, n. 5, p. 384–392, 2009.

FLOOR, E.; WETZEL, M. G. Increased Protein Oxidation in Human Substantia Nigra Pars Compacta in Comparison with Basal Ganglia and Prefrontal Cortex Measured with an Improved Dinitrophenylhydrazine Assay. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 1, p. 268–275, 2002.

FUNKIEWIEZ, A. et al. Acute psychotropic effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation and Levodopa in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 5, p. 524–530, 2003.

GOLDMAN, S. M. et al. Head injury, alpha-synuclein Rep1, and Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 71, n. 1, p. 40–48, 2012.

GONZALEZ-COLOMA, Azucena et al. Natural product-based biopesticides for insect control. 2013.

GORBATYUK, O. S. et al. The phosphorylation state of Ser-129 in human α -synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 763–768, 2008.

GRUNE, T. et al. Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, et al. Betacarotene is an important vitamin A source. American Society for Nutrition. **The Journal of Nutrition**. 2010:2268S-85S. 2010.

GUL, K. et al. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -caroteno - A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, 2015.

GUPTA, R. C.; MILATOVIC, D. Insecticides. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2014.

HAYES, M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **American Journal of Medicine**, v. 132, n. 7, p. 802–807, 2019.

HELY, M. A. et al. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: Non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. **Movement Disorders**, v. 20, n. 2, p. 190–199, 2005.

HEMMATI-DINARVAND, M. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. **Neuroscience Letters**, v. 709, n. February, 2019.

HIRA, S. et al. β -Carotene: A Natural Compound Improves Cognitive Impairment and Oxidative Stress in a Mouse Model of Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2019.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 504–23, ago. 2010.

HÖHN, Annika; TRAMUTOLA, Antonella; CASCELLA, Roberta. Proteostasis Failure in Neurodegenerative Diseases: Focus on Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

INAGAKI, H. K.; KAMIKOUCHI, A.; ITO, K. Protocol for quantifying sound-sensing ability of *Drosophila melanogaster*. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 26–30, 2010.

INDEN, M. et al. Protection against dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease-model animals by a modulator of the oxidized form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 117, n. 3, p. 189–203, 2011.

IRANZO, A. et al. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: An observational cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 5, p. 443–453, 2013.

IWAI, Akihiko et al. Non-A. beta. Component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. **Biochemistry**, v. 34, n. 32, p. 10139-10145, 1995.

JEAN-ANTOINE GIRAULT, MD, PHD; PAUL GREENGARD, P. The Neurobiology of Dopamine Signaling. **Arch Neurol**, v. 5, n. 61, p. 641–644, 2004.

JOHNSON, E. J. The role of carotenoids in human health. Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University, v. 5, n. 2, p. 56–65, 2002.

JUÁREZ OLGUÍN, H. et al. The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015.

KASTURE, A. S. et al. Big lessons from tiny flies: *Drosophila melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

KIM, J. H. et al. Association of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. **Nutrition Research and Practice**, v. 11, n. 2, p. 114–120, 2017.

KOHNO, Y. et al. Fixation and stability enhancement of beta-carotene by organo-modified mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 220, p. 1–6, 2016.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

LEE MOSLEY, R. et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 5, p. 261–281, 2006.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009.

LI, N. et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8516–8525, 2003.

LIANG, R. et al. Stability and bioaccessibility of β -carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 1249–1257, 2013.

LUK, K. C.; LEE, V. M. Addition of exogenous α -Synuclein Pre-formed fibrils to Primary.pdf. **Nature Protocols**, v. 9, n. 9, p. 2135–2146, 2014.

MAO, Z.; DAVIS, R. L. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 3, n. JUL, p. 1–17, 2009.

MARSHALL, L. E.; HIMES, R. H. Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *BBA - General Subjects*, v. 543, n. 4, p. 590–594, 1978.

MAYNE, S. Taylor. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, v. 10, n. 7, p. 690-701, 1996.

MCCLUNG, C.; HIRSH, J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in drosophila. *Current Biology*, v. 8, n. 2, p. 109–112, 1998.

MCGUIRE, S. E.; DESHAZER, M.; DAVIS, R. L. Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Progress in Neurobiology*, v. 76, n. 5, p. 328–347, 2005.

MILLECAMPS, S.; JULIEN, J. P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, n. 3, p. 161–176, 2013.

MITCHELL, J. J.; PAIVA, M.; HEATON, M. B. The antioxidants vitamin e and β -carotene protect against ethanol- induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol*, v. 17, n. 2, p. 163–168, 1999.

MORRIS, M. et al. Postural instability in Parkinson's disease: A comparison with and without a concurrent task. *Gait and Posture*, v. 12, n. 3, p. 205–216, 2000.

MÜLLER, Thomas. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of rasagiline mesylate for Parkinson's disease. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 10, n. 10, p. 1423-1432, 2014.

MUTHULAKSHMI, S. et al. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, v. 198, p. 111–121, 2018.

NALLS, M. A. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, v. 46, n. 9, p. 989–993, 2014.

NICHOLS, C. D.; SANDERS-BUSH, E. A single dose of lysergic acid diethylamide influences gene expression patterns within the mammalian brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 5, p. 634–642, 2002.

NWACHUKWU, I. D.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 74–84, 2016.

OLSON, A.; NAGAO, A. Enzymatic from formation isomers retinals of 13-carotene. **FASEB Journal**, v. 8, p. 968–973, 1994.

ONO, K.; YAMADA, M. Vitamin A potentially destabilizes preformed α -synuclein fibrils in vitro: Implications for Lewy body diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 25, n. 2, p. 446–454, 2007.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PENDLETON, R. G. et al. Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 91–96, 2002.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PROCHAZKA, A. et al. Measurement of rigidity in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 12, n. 1, p. 24–32, 1997.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: A meta-analysis of clinical trials. **Human and Experimental Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 157–162, 2006.

RASCÓN, M. P. et al. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 549–557, 2011.

REIS, H. et al. Neuro-Transmitters in the Central Nervous System & their Implication in Learning and Memory Processes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 796–840, 2009.

ROCHA, F. et al. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. **Food and Function**, v. 9, n. 7, p. 3698–3706, 2018.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. et al. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 172–173, p. 19–25, 2015.

ROTHENFLUH, A.; HEBERLEIN, U. Drugs, flies, and videotape: The effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 6, p. 639–645, 2002.

SAMII, A., NUTT, J. G., & RANSOM, B. R. *Parkinson's disease*. **The Lancet**, 363(9423), 1783–1793. (2004). doi:10.1016/s0140-6736(04)16305-8.

SANDERS, L. H.; GREENAMYREN, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 111–120, 2013.

SATTA, R.; DIMITRIJEVIC, N.; MANEV, H. *Drosophila* metabolize 1,4-butanediol into γ -hydroxybutyric acid in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, n. 2–3, p. 149–152, 2003.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: More evidence for oxidative stress in vitiligo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 2, p. 502–508, 2004.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 1, p. 97–109, 2008.

SCHAPIRA, A. H. V. et al. Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 3, p. 823–827, 1990.

SCHENCK, C. H.; BOEVE, B. F.; MAHOWALD, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: A 16-year update on a previously reported series. **Sleep Medicine**, v. 14, n. 8, p. 744–748, 2013.

SCHMITT, K. C.; ROTHMAN, R. B.; REITH, M. E. A. Nonclassical pharmacology of the dopamine transporter: Atypical inhibitors, allosteric modulators, and

partial substrates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 346, n. 1, p. 2–10, 2013.

SCHULZ-SCHAEFFER, W. J. The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 2, p. 131–143, 2010.

SHADNIA, S. et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. **Human and Experimental Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 439–445, 2005.

SHALTIEL-KARYO, R. et al. A novel, sensitive assay for behavioral defects in Parkinson's disease model drosophila. **Parkinson's Disease**, v. 2012, 2012.

SHIMOHAMA, S. et al. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 360–365, 2003.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6 SUPPL., 1995.

SIMON, J. C.; DICKINSON, M. H. A new chamber for studying the behavior of *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p. 29–44, 2007.

SPILLANTINI, M. G. et al. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6469–6473, 1998.

SRAIN, B.; RUDOLPH, A. Acetylcholinesterase activity, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the clam *Semele solida*: Can this species be used as a bioindicator? **Revista de biología marina y oceanografía**, v. 45, n. 2, 2010.

SRIVASTAVA, P.; PANDA, D. Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4788–4801, 2007.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 101–107, 2005.

SUTTER, S. C.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. β -Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1–2, p. 45–54, 2007.

TANNER, C. M. et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p. 866–872, 2011.

TEIVE, H. A. G. O papel de charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 1, p. 141–145, 1998.

TOMITA, Yoshifumi et al. Conversion of intravenously administered β -cryptoxanthin to a β -carotene-like compound in mouse lung. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 48, n. 6, p. 443–447, 2002.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. Drosophila tools and assays for the study of human diseases. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 2016.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: Understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 225–241, 2004.

URBANSKA, Aleksandra M. et al. Physiological and pathological role of reactive oxygen species in the immune cells. **In: Immunology of Aging. Springer, Berlin, Heidelberg**, 2014. p. 309–321.

VALLS-SOLÉ, J.; VALLDEORIOLA, F. Neurophysiological correlate of clinical signs in Parkinson's disease. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, n. 6, p. 792–805, 2002.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359–363, 2007.

VOLPICELLI-DALEY, L. A et al. Alpha Syn Fibrils. **Neuron**, v. 72, n. 1, p.

57–71, 2011.

WATZL, B. et al. A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 5, p. 1052–1058, 2005.

WOLF, F. W.; HEBERLEIN, U. Invertebrate models of drug abuse. **Journal of Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 161–178, 2003.

WU, T. C. et al. Combination of β -carotene and quercetin against benzo[a]pyrene-induced pro-inflammatory reaction accompanied by the regulation of antioxidant enzyme activity and NF- κ B translocation in Mongolian gerbils. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 397–406, 2015.

YAMAMOTO, S. et al. A *drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 200–214, 2014.

YANG, F. et al. Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts. **Movement Disorders**, v. 32, n. 11, p. 1631–1636, 2017.

YORITAKA, A. et al. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 2696–2701, 1996.

ZHANG, P.; OMAYE, S. T. β -Carotene: Interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 38–45, 2001.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 93–104, 2008.

ZHOU, L. et al. Protective role of β -carotene against oxidative stress and neuroinflammation in a rat model of spinal cord injury. **International Immunopharmacology**, v. 61, n. May, p. 92–99, 2018.