

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

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

**EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE HESPERIDINA SOBRE A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FERRO EM *Drosophila melanogaster***

Urugaiana, RS, Brasil

2017

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).

SSI586e Silva, Márcia Rósula Poetini
EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE HESPERIDINA SOBRE A
TOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FERRO EM
Drosophila melanogaster / Márcia Rósula Poetini Silva.
82 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.
"Orientação: Marina Prigol".

1. Flavonoide Cítrico. 2. Ferro. 3. Mosca da Fruta.
4. Estresse oxidativo. 5. Dopamina. I. Título.

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

**EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE HESPERIDINA SOBRE A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FERRO EM *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Bioquímica**.

Orientadora: **Profa. Dra. Marina Prigol**

Coorientador: **Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse**

Uruguaiana, RS, Brasil

2017

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

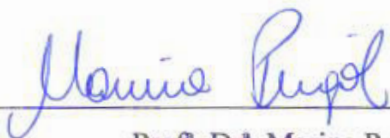
**EFEITO PROTETOR DO FLAVONOIDE HESPERIDINA SOBRE A TOXICIDADE
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FERRO EM *Drosophila melanogaster***

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

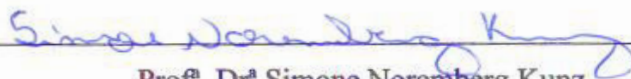
Área de concentração: Bioquímica toxicológica

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de fevereiro de 2017.

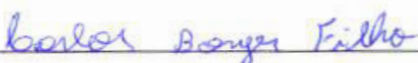
Banca examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Marina Prigol
Orientadora
(UNIPAMPA)



Prof.^a. Dr.^a Simone Noremborg Kunz
(UNIPAMPA)



Dr. Carlos Borges Filho
(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho ao meu amado
esposo Neicí e aos meus queridos filhos
Cristhian Matheus e Bruno, pelo incentivo
e apoio em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, à UNIPAMPA pelas bolsas de estudo concedidas durante o período de graduação e pelo apoio até este momento e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade. Também, ao CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marina Prigol, que sempre foi fonte inesgotável de apoio e incentivo em todos os momentos. Pela orientação, pelo carinho, pela amizade e por ser um exemplo a ser seguido, muito obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, por todos os ensinamentos.

À família Laftambio e a todas as “Marinetes” pela companhia em todos os momentos. Muito obrigada!

Ao meu amado esposo, Neicí, por entender os meus momentos de ausência e nervosismo, sempre me apoiando, com carinho, amor e paciência. Por ser meu exemplo de esforço, dedicação e superação.

Aos meus queridos filhos Cristhian Matheus e Bruno que souberam compreender meus momentos de ausência e pelo amor incondicional. Amo vocês!

À minha mãe Neila e aos meus irmãos Peri, Ceci, André e Estela.

Muito obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

Os flavonoides são compostos naturais presentes em diversos tipos de plantas, são quimicamente classificados como polifenóis e geralmente encontrados em sua forma livre ou glicosilada. A Hesperidina (Hsd) é um flavonoide cítrico, encontrado principalmente em frutas cítricas como a laranja e o limão, classificado como flavanona glicosídica e possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais, hipolipidêmica, entre outras. O ferro (Fe) é um nutriente fundamental para todas as células vivas, mas em excesso pode ser tóxico, por causar danos oxidativos através da formação de radicais livres, como a reação de fenton, os quais resultam em fenômenos de estresse oxidativo. Uma desregulação no metabolismo do Fe está associado com dano celular e também a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Alzheimer. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neuroprotetor da hesperidina na exposição aguda ao ferro na forma de sulfato ferroso em *Drosophila melanogaster* adultos macho. As moscas foram divididas em quatro grupos: 1) controle, 2) hesperidina (10 µM), 3) Fe (20 mM) na forma de sulfato ferroso, 4) hesperidina (10 µM) + Fe (20 mM). As moscas foram concomitantemente expostas ao Fe e Hsd na dieta em papel filtro (dissolvidos em sacarose 1 %) por 48 horas, de acordo com seus respectivos grupos. Para as análises *in vivo* foram avaliadas a sobrevivência e os comportamentos (testes como geotaxia negativa, campo aberto e base/topo) e *ex vivo* a atividade da acetilcolinesterase (AChE) na cabeça e no corpo, viabilidade celular e mitocondrial e determinação dos níveis de dopamina na cabeça das moscas. A atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST), os níveis de peroxidação lipídica (TBARS), níveis de espécies reativas (ER), o teor de tióis não protéicos (NPSH), os tióis totais e os níveis de ferro na cabeça e no corpo de *Drosophila melanogaster* também foram avaliados. A exposição ao Fe aumentou significativamente a mortalidade das moscas, enquanto que as sobreviventes apresentaram déficit locomotor significativo com atividade aumentada de AChE. No entanto, a suplementação dietética com Hsd causou uma diminuição significativa na mortalidade, melhora da atividade locomotora e restauração da atividade da AChE em moscas expostas ao Fe. O metal também causou decréscimo nos níveis de tióis totais e não proteicos e na atividade das enzimas SOD, CAT e GST, acompanhadas com aumento significativo na geração de ER e TBARS, assim como aumento nos níveis de Fe na cabeça e no corpo e redução nos níveis de dopamina na cabeça das moscas expostas ao elemento. Efeitos esses prevenidos pela hesperidina. A hesperidina apresentou o potencial antioxidante e amenizou o efeito causado pela exposição aguda ao Fe em *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: Flavonoides cítricos. Ferro. Mosca da fruta. Estresse oxidativo. Dopamina.

ABSTRACT

Flavonoids are natural compounds present in many plant types, are chemically classified as polyphenols and are generally found in their free or glycosylated form. Hesperidin (Hsd) is a citrus flavonoid, found mainly in citrus fruits such as orange and lemon, classified as flavanone glycosidic and has antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antiviral, hypolipidemic properties, among others. Iron (Fe) is a fundamental nutrient for all living cells, but in excess it can be toxic because it causes oxidative damage through the formation of free radicals, such as fenton reaction, which result in phenomena of oxidative stress. Deregulation in the metabolism of Fe is associated with cellular damage and also neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's. The objective of this study was to evaluate the neuroprotective effect of hesperidin on acute exposure to iron in the form of ferrous sulfate in adult male *Drosophila melanogaster*. The flies were divided into four groups: 1) control, 2) hesperidin (10 μ M), 3) Fe (20 mM) as ferrous sulfate, 4) hesperidin (10 μ M) + Fe (20 mM). Flies were concomitantly exposed to Fe and Hsd in the diet on filter paper (dissolved in 1% sucrose) for 48 hours, according to their respective groups. Survival and behaviors (tests such as negative geotag, open field and base / top) and ex vivo acetylcholinesterase (AChE) activity in head and body, cell and mitochondrial viability and determination of dopamine on the head of flies. The activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST), levels of lipid peroxidation (TBARS), reactive species levels (RS), non-protein thiol content (NPSH), total thiols and iron levels in the head and body of *Drosophila melanogaster* were also evaluated. Exposure to Fe significantly increased fly mortality, while survivors had significant locomotor deficits with increased AChE activity. However, dietary supplementation with Hsd caused a significant decrease in mortality, improvement of locomotor activity and restoration of AChE activity in Fe-exposed flies. The metal also caused a decrease in the levels of total and non-protein thiols and in the activity of SOD enzymes, CAT and GST, accompanied with a significant increase in RS and TBARS generation, as well as increase in Fe levels in the head and body and reduction in dopamine levels in the head of the flies exposed to the element. These effects prevented by hesperidin. Hesperidin presented the antioxidant potential and attenuated the effect caused by the acute exposure to Fe in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Citric flavonoid. Iron. Fruit fly. Oxidative stress. Dopamine.

LISTA DE FIGURAS

A) Revisão Bibliográfica

Figura 1- Estrutura básica dos flavonoides	21
Figura 2 – Estruturas moleculares de flavonoides	22
Figura 3 – Estrutura química da hesperidina, hesperitina e hesperidina G (glicosil hesperidina)	23
Figura 4 - Estrutura química da hesperidina	24
Figura 5 – Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 6 - Diagrama esquemático de clusters neuronais dopaminérgicos em <i>Drosophila melanogaster</i>	33

B) Manuscrito científico

Figura 1 - Effect of Hesperidin (Hsd) on survival of the flies exposed to Fe	63
Figura 2 - Effect of Hsd in response to geotaxis (climbing) and exploratory activity in flies exposed to Fe in 48 hours.	64
Figura 3 - Effect of hesperidin (Hsd) in alterations induced for Fe in activity of acetylcholinesterase (AChE) in adult <i>Drosophila melanogaster</i>	65
Figura 4 - Effect of Hsd in alterations induced for Fe in activity of dopamine levels in the head of adult <i>Drosophila melanogaster</i>	66

Figura 5 - Effect of Hsd exposure to Fe flies for 48 hours, on the metabolic activity and dehydrogenase activity in total homogenate of flies.	66
Figura 6 - Effect of Hsd homogenate flies treated with Fe on assay cell viability performed by reduction with resazurin.	67
Figura 7 - Effect Hsd for 48 hours in alterations induced for Fe, in endogenous markers of oxidative stress.	68
Figura 8 - Effect Hsd for 48 hours Fe induced changes in antioxidant enzyme activities in the entire body homogenate <i>Drosophila melanogaster</i> adult male.	69
Figura 9 - Effect of Hsd in alterations induced for Fe, in the graphic (A) protein thiols and graphic (B) content of nonprotein thiols homogenate.	70
Figura 10 - Quantification of levels iron in body (graph A) and head (graph B) the flies	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL - Corpos de Lewy
CSF - Cefalorraquidiano
Cu – Cobre
D.melanogaster- Drosophila melanogaster
DA – Doença de Alzheimer
DMT-1 – Transportador de metal bivalente -1
DP- Doença de Parkinson
ER - Espécies reativas
EROs - Espécies reativas de oxigênio
Fe – Ferro
Fe²⁺ - Íon ferroso
Fe³⁺ - Íon férrico
Fe – Sulfato ferroso
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
Hsd – Hesperidina
Hst – Hesperitina
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
Mn – Manganês
MPTP - 1-metil 4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
O₂⁻ - Radical superóxido
OH[•] - Radical hidroxil
ROO⁻ - Radical peroxil
SNC - Sistema nervoso central
SNpc - Substância negra parte compacta
Tf - Transferrina
α-sin - Alfa-sinucleína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1. Flavonoides	20
4.1.1. Estrutura e subclasses.....	20
4.1.2. Flavononas	22
4.1.3. Hesperidina.....	23
4.2. Ferro	24
4.2.1. Absorção, transporte e armazenamento.....	26
4.2.2. Toxicidade do ferro	27
4.3. Doença de Parkinson.....	29
4.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	29
4.4.1. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	30
4.4.2. Parkisonismo em <i>Drosophila melanogaster</i>	32
4.4.3. Parkisonismo em <i>Drosophila melanogaster</i> induzido por ferro	34
5. Manuscrito Científico	36
1. Introduction	39
2. Materials and Methods	40
2.1 Materials.....	40
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> stock and culture.....	41
2.3. Experimental Protocol.....	41
2.3.1. Exposure treatment with ferrous sulphate and hesperidin.....	41
2.4. <i>In vivo</i> assays.....	41
2.4.1. Survival	42
2.4.2. Negative geotaxis - climbing test.....	42
2.4.3. Negative geotaxis - Test Base Top.....	42
2.4.4. Test open field.....	42
2.5. <i>Ex vivo</i> assays.....	43
2.5.1. Homogenized preparation	43
2.5.2. Determination of the Fe levels	43

2.5.3.	Analysis of dopamine concentrations by high-performance liquid chromatography (HPLC)	43
2.5.4.	Dehydrogenases activity of <i>Drosophila melanogaster</i>	43
2.5.5.	Metabolic activity of fractions enriched with mitochondria	44
2.5.6.	Evaluation of cell viability	44
2.5.7.	Thiol Determination	45
2.5.8.	Determination of DCF-DA oxidation: Reactive species levels (RS)	45
2.5.9.	Determination of Lipid Peroxidation	45
2.6.	Activities of Antioxidant Enzymes	46
2.6.1.	Determination of catalase (CAT) activity	46
2.6.2.	Determination of superoxide dismutase (SOD) activity	46
2.6.3.	Determination of Glutathione-S-transferase (GST) activity	46
2.6.4.	Activity of acetylcholinesterase (AChE).....	47
2.7.	Protein determination	47
2.8.	Statistical analysis	47
3.	Results.....	47
3.1.	Hsd improves the survival rate in <i>Drosophila melanogaster</i>	47
3.2.	Locomotor performance and activity of acetylcholinesterase	48
3.3.	Effect of Hsd on the depletion of the levels of dopamine induced by Fe.....	48
3.4.	Metabolic activity of cellular and enriched fraction mitochondria in iron exposed to flies.....	48
3.5.	Effect of Hsd on resazurin reduction assay in homogenate of flies exposed to Fe	48
3.6.	Biomarkers of Oxidative Stress.....	49
3.7.	Antioxidant Enzymes Activities.....	49
3.8.	Thiols level.....	49
3.9.	Iron levels in head and body of flies	49
4.	Discussion	49
5.	Reference	54
	Legends:.....	61
	Figures:	64
6.	CONCLUSÕES.....	73
7.	PERSPECTIVAS.....	74
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

APRESENTAÇÃO

Nos itens **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, consta uma revisão de literaturas sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

A metodologia aplicada, os resultados e discussões obtidos que compõem esta dissertação estão escritos sob a forma de artigo, os quais são apresentados no item **MANUSCRITO CIENTÍFICO** o qual consta das seguintes seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*.

Os itens **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**, encontrados no final desta dissertação, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico incluído neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de ferro (Fe) é invariavelmente encontrado em pacientes com a DP. Estudos recentes mostraram que os mutantes e α -sinucleína de tipo selvagem podem ter uma interação diferencial com o Fe e a toxicidade da α -sinucleína mutante poderia ser preferencialmente exacerbada pelo metal, a sobrecarga deste poderia induzir neuropatologia e doenças distintas fenóticas em moscas que expressam α -sinucleína (ZHU et al., 2016). No entanto, o excesso de Fe é um potente fonte de danos oxidativos através de formação de radicais livres (BELAIDI & BUSH, 2016), como a reação de Fenton e Haber-Weiss, as quais resultam em fenômenos de estresse oxidativo (SIQUEIRA et al., 2006). A desregulação no metabolismo do Fe está associada com dano celular e estresse oxidativo, o tema tem sido relatado como um evento comum em várias doenças neurodegenerativas, dentre elas o Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (BELAIDI & BUSH, 2016).

A doença de Parkinson (DP) é a doença neurodegenerativa caracterizada por sintomas motores graves, incluindo tremor incontrolável, desequilíbrio, lentidão de movimento e rigidez. Entre as alterações patológica observadas na DP é a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta do mesencéfalo central, embora a neuropatologia da doença não se limita a esta região (BRAAK & DEL TREDICI, 2008). A perda de células nos neurônios dopaminérgicos é geralmente associada à presença de inclusões intraneuronais conhecidas como corpos de Lewy (CL), que são compostos principalmente de α -sinucleína (OBESO et al., 2010). A homeostase cerebral do Fe é cada vez mais reconhecida como um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias para distúrbios relacionados com o envelhecimento, entre os quais podemos citar os flavonoides (BELAIDI & BUSH, 2016).

Os flavonoides são um grande grupo de compostos fenólicos que estão amplamente distribuídos em plantas e a eles são atribuídos algumas propriedades, incluindo antioxidantes, anti-câncer e anti-inflamatórias, entre outras (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; PIETTA, 2000). Hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo) (Hsd) é um glicosídeo flavanona (uma subclasse de flavonoides) que é encontrado em abundância em frutas cítricas, tais como o limão e a laranja. Tem sido relatado que a Hsd possui atividades farmacológicas, incluindo antioxidantes, analgésicas, anti-carcinogênicas, anti-hipertensivas, anti-virais e anti-inflamatórias (KAMISLI et al., 2013; ROSS & KASUM, 2002). A hesperidina (Hsd) foi isolada primeiramente a partir da casca de citrinos pelo químico francês Lebreton (GARG et al., 2001), devido suas várias atividades biológicas, Hsd também é chamada de bioflavonóide.

Estudos com animais invertebrados, como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, tem produzido grandes avanços nos fundamentos de muitas doenças neurológicas e neurodegenerativas, não apenas fornecendo compreensão de caminhos biológicos prejudicados na doença, mas também o alicerce para estratégias de intervenções em sistemas de mamíferos (MCGURK et al., 2015). A introdução da mosca como modelo para as doenças neurodegenerativas rapidamente levou a modelos adicionais; entre estes foi um modelo de doença de Parkinson imitado pela expressão de α -sinucleína (FEANY & BENDER, 2000). Os modelos da doença de Parkinson em *Drosophila* são caracterizados por dois fenótipos principais: a perda específica de neurônios dopaminérgicos no cérebro envelhecido e alterações no comportamento motor (WHITE et al., 2010). Antunes et al., (2014) demonstrou em seu estudo que a hesperidina atuou como agente protetor na neurotoxicidade induzida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em camundongos idosos, indicando que a hesperidina pode ser útil na terapia para o tratamento da DP.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se as alterações comportamentais, bioquímicas e neuroquímicas promovidas pela exposição aguda ao ferro em *Drosophila melanogaster* serão amenizadas pelo tratamento concomitante com a hesperidina.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com hesperidina sobre a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro.

Investigar o efeito da hesperidina na atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*.

Analisar o efeito do tratamento com a hesperidina sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo de *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro.

Avaliar a atividade das desidrogenases mitocondriais em *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro e submetidas ao tratamento com hesperidina.

Analisar os níveis de dopamina na cabeça das *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro e submetidas ao tratamento com hesperidina.

Analisar os níveis de ferro na cabeça e corpo das *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro e submetidas ao tratamento com hesperidina.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Flavonoides

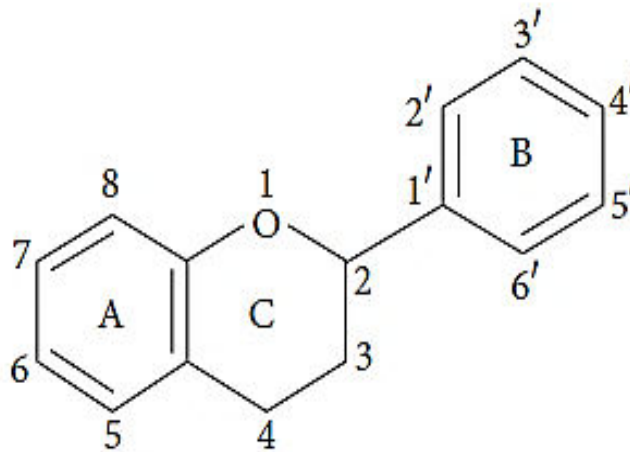
Os flavonoides são conhecidos como pigmentos de plantas por mais de um século. Originalmente, despertam o interesse de cientistas por serem componentes fenólicos muito distribuídos nas plantas e participarem da sua fisiologia, especialmente no seu papel relacionado a pigmentação e ao sabor de frutas e vegetais. Esses compostos também estão envolvidos com o crescimento e reprodução das plantas e com a proteção contra patógenos e predadores (ROSS & KASSUM, 2002). Por possuírem largo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, têm despertado interesse desde a década de 1990 no meio científico em relação a possíveis benefícios sobre a saúde humana (METODIEWA et al., 1997). A natureza química dessas substâncias também está relacionada com a proteção contra os radicais livres, sendo os principais agentes antioxidantes presentes na nossa dieta auxiliam na prevenção de doenças (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000; NÚNEZ-SÉLLES, 2005). Até agora, mais de 8.000 variedades de flavonoides foram identificados (GROOT & RAUEN, 1998). Pelo seu potencial antioxidante, podem inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), atuando como agentes redutores; extinguindo a doação de moléculas como o hidrogênio e oxigênio singlete; quelando íons e metais de transição, reduzindo a capacidade de formação de radicais livres pelos metais (FUHRMAN & AVIRAM, 2001).

4.1.1. Estrutura e subclasses

Diversas moléculas apresentam uma estrutura polifenólica, como por exemplo, alguns grupamentos hidroxilas em anéis aromáticos. Essas moléculas são metabólicos secundários de plantas que geralmente estão envolvidas na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (ROSS & KASSUM, 2002). Esses compostos podem ser classificados em diferentes grupos, em função do número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais que ligam esses anéis fenólicos e os anéis entre si. Dessa forma, são encontrados quatro grupos distintos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenes e ligninas (MANACH & DONOVAN, 2004).

Os flavonoides são as estruturas mais comuns, consistem em dois anéis aromáticos (A e B), que são ligados por três átomos de carbonos formando um heterociclo oxigenado (C), como descrito na figura 01.

Figura 1- Estrutura básica dos flavonoides.

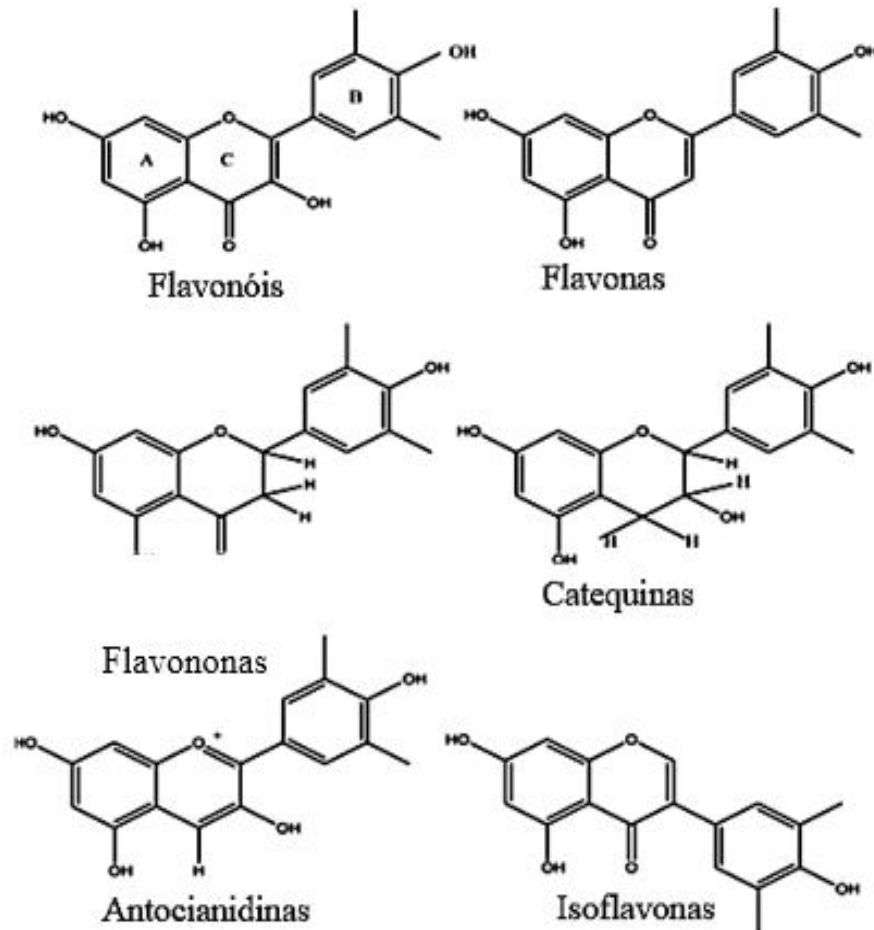


Fonte: Kumar & Pandey, 2013.

A atividade antiinflamatória de flavonoides cítricos está altamente relacionada à sua estrutura individual (MANTHEY, GUTHRIE & GROHMANN, 2001). Os flavonoides são considerados como antioxidantes devido à capacidade de eliminar radicais livres; inibir a oxidação de lipídios ou quelar os íons metálicos (TRIPOLI et al., 2007).

Os flavonoides podem ser subdivididos em seis classes: flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianinas, flavononas e flavanóis (catequinas e proantocianinas), como descrito na figura 02 (MANACH et al., 2004). Normalmente estão ligados a açúcares (forma glicosilada), sendo assim, solúveis em água. Ocasionalmente, também podem ser encontrados como agliconas (BRAVO, 1998).

Figura 2 - Estruturas moleculares de flavonoides. A estrutura básica consiste no anel fundido A e C, com o anel fenilo B ligado através da sua posição 10 para a posição 2 do anel C (numerado a partir do oxigênio pirano).



Fonte: Adaptado de Tripoli et al., 2007.

4.1.2. Flavononas

Na alimentação humana, as flavononas são encontradas em tomates e certas plantas aromáticas, como hortelã. No entanto, estão presentes em maior concentração apenas em sucos cítricos. As principais agliconas desse grupo são a naringenina, no grapefruit (*Citrus paradisi* Macf), a hesperitina e a hesperidina, nas laranjas, e o eriodictiol, em limões. Dentre esses flavonoides a hesperidina possui a capacidade de atravessar a barreira hemato encefálica, dessa forma, modulando as funções cerebrais em doenças neurodegenerativas (DIMPFL, 2006). A quantidade de flavononas glicosiladas em um copo de suco de laranja contém cerca de 40 a 140 mg (TOMAS-BARBERAN & CLIFFORD, 2000). Todavia, a parte sólida do fruto cítrico

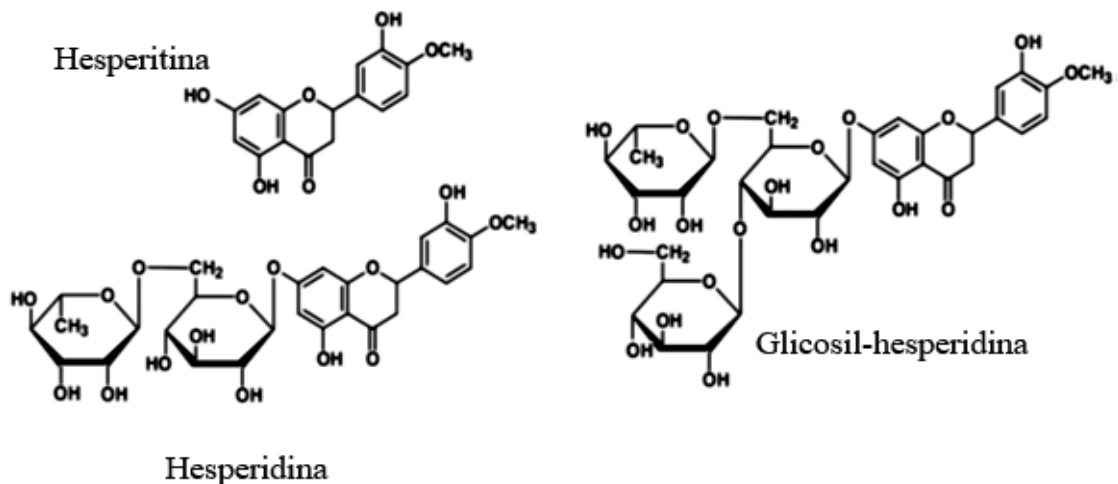
(particularmente o albedo, que é a porção branca e esponjosa) e a membrana que separa os segmentos possuem maior concentração de flavononas; sendo assim, a fruta inteira contém cinco vezes mais flavononas do que um copo do suco (DOLINSK, 2009).

4.1.3. Hesperidina

A pesquisa de novos fármacos com ação antioxidante possibilita a identificação de princípios ativos que diminuam a formação de radicais livres no organismo. Essas buscas têm levado à descoberta de novas substâncias com mecanismo de ação importantes em várias doenças (COSTA & ROSA, 2010).

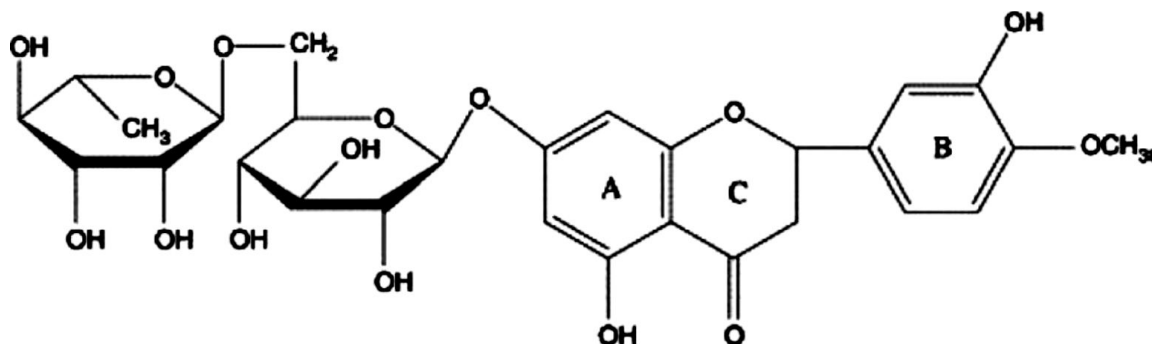
A hesperidina (3,5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosida) (Hsd), conforme demonstrado na figura 3, é um bioflavonoide farmacologicamente ativo encontrado em frutas cítricas (SUAREZ et al., 1998; GARG et al., 2001; PARHIZ et al., 2015), especialmente as frutas de uva, a casca de laranja amarga e laranja doce (CROZIER et al., 2009), com boa eliminação de radicais livres e propriedades de peroxidação anti-lipídica em membranas biológicas (SUAREZ et al., 1998). A Hsd é um subproduto abundante de citrinos e isolada da laranja originária *Citrus aurantium* e de outras espécies do gênero *Citrus* (KAKADIYA et al., 2010). Os tipos mais comuns de flavonoides encontrados nos citrinos são hesperidina, naringina, narirutina, eriocitrina e tangeritina (SUN et al., 2013).

Figura 3 - Estrutura química da Hesperidina; Hesperetina e Hesperidina G (Glucosil Hesperidina).



Hesperidina é uma substância sólida com baixa solubilidade em água. É, entretanto, muito mais solúvel na água do que sua aglicona a hesperetina. A fórmula molecular de hesperidina (figura 4) é $C_{28}H_{34}O_{15}$ e o seu peso molecular é 610,57 Da. (KALPANA et al., 2009). Vários estudos mostraram que a Hsd neutralizou as espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo ânions superóxido, radicais hidroxila, peroxinitrito e radicais de óxido nítrico (GARG et al., 2001, WILMSEN et al., 2005). Também mostrou propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias (PARHIZ et al., 2015), anti-cancerígenas e anti-alérgicas (GARG et al., 2001). A atividade antioxidante e as propriedades de eliminação de radicais da Hsd, além do seu efeito inibitório sobre a reação de Fenton derivada de superóxido e, mais importante, a sua capacidade de penetrar na barreira hematoencefálica (SAID et al., 2012), fazem da hesperidina um fármaco de grande interesse científico.

Figura 4 - Estrutura molecular da hesperidina.



Fonte: Kalpana, 2009.

4.2. Ferro

O ferro (Fe) é um elemento químico, que desempenha um papel fundamental nas funções de manutenção fisiológica no cérebro, participando de muitas funções celulares (BELAIDI and BUSH, 2016). Este elemento existe em abundância na crosta terrestre, mas sua absorção pelo corpo humano é dificultada pelo mecanismo protetor da intoxicação celular. O Fe não é excretado normalmente na urina, sendo, em grande parte, reaproveitado e por isso a necessidade individual de Fe deve ser suficiente para repor as perdas do organismo (CUNHA

et al., 1998). O corpo humano contém de 2 a 4 g de ferro ou 38 mg/Kg de peso corporal para mulheres e 50 mg/Kg de peso corporal para os homens. Mais de 65% de Fe do corpo é encontrado na hemoglobina, até 10% encontram-se como mioglobina, cerca de 1% a 5% estão como parte de enzimas, e o restante encontram-se no sangue ou armazenado (GROPPER, 2011).

A diversidade e a essencialidade das funções as quais o Fe está relacionado tornaram esse metal do grupo 8 da classificação periódica um dos micronutrientes mais estudados e de melhor caracterização quanto ao seu metabolismo. Há quatro classes de proteínas contendo ferro: proteínas que contêm heme, como hemoglobina, mioglobina e citocromos; enzimas contendo ferro e enxofre, flavoproteínas, heme flavoproteínas; proteínas de transporte e armazenamento, transferrina, lactoferrina e hemossiderina, entre outros. Os ligantes mais comuns do Fe no sistema biológico são oxigênio, nitrogênio e enxofre. Portanto, as funções mais importantes deste metal estão ligadas às funções dessas proteínas no organismo, como o transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina nos eritrócitos e mioglobina nos músculos. Na hemoglobina e na mioglobina está presente como Fe^{2+} , quando é oxidado para Fe^{3+} se transforma em meta-hemoglobina, perdendo a sua habilidade para o transporte de oxigênio. Essa metaemoglobina (cerca de 1% no organismo humano) pode ser novamente reduzida por enzimas nos eritrócitos, voltando à sua forma Fe^{2+} ativa. Nos citocromos, participa das reações de oxidação e redução como um carreador de elétrons, mantendo-se entre as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} (COZZOLINO, 2012).

O papel das proteínas no transporte e no armazenamento do ferro é importante por causa de sua da atividade redox. A ligação do elemento às proteínas serve como um mecanismo de proteção. Quando não ligado, a atividade redox do ferro pode levar a geração de radicais livres resistentes. O íon ferroso livre (Fe^{2+}), por exemplo, reage prontamente com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma reação conhecida como reação Fenton:



Essa reação gera um ânion hidroxil e um radical hidroxil livre ($\cdot\text{OH}$), que é extremamente reativo e nocivo às células. Como pró-oxidante, o íon ferroso livre pode catalisar a reação não enzimática Fenton. Nessa reação, o Fe ferroso reage com peróxido de hidrogênio para gerar íon férrico e o radical hidroxil livre ($\cdot\text{OH}$). Em uma reação conhecida como Haber Weiss, radical superóxido, O_2^- , reage com o peróxido de hidrogênio para gerar oxigênio

molecular e radicais hidróxis livres ($\cdot\text{OH}$). Os radicais hidróxis são perigosos oxidantes da membrana (GROPPER, 2011).

4.2.1. Absorção, transporte e armazenamento

O balanço do ferro é controlado inicialmente pela absorção intestinal, mais o mecanismo exato ainda não está claro. O processo de absorção pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, inicialmente o Fe solúvel do lúmen é captado pela célula da mucosa, na superfície apical, envolvendo receptores específicos, como transportador de metal bivalente DMT-1 (*divalent metal transporter – 1*) para o Fe não heme, e receptores de Fe heme, como a recém-identificada proteína de membrana HCP1 (*heme carrier protein – proteína carreadora do heme*), que promove a absorção do elemento como metaloporfirina intacta (SHAYEGHI et al., 2005). Na segunda fase, dentro da célula da mucosa, o Fe heme sofre ação da heme oxigenase, liberando o Fe da porfirina e segue a incorporação em compartimentos funcionais ou de armazenamento, como a ferritina. Na terceira fase, o Fe é transportado para o plasma através da membrana basolateral (serosa), possivelmente envolvendo um homólogo da ceruloplastina ou é removido do organismo quando a célula intestinal é descamada (ROUGHEAD et al., 2002).

O Fe não heme será absorvido na forma ferrosa (Fe^{2+}), portanto, compostos redutores presentes no lúmen no momento da absorção terão efeito positivo. O Fe ligado à transferrina (Tf) da circulação sistêmica é endocitado pelas células endoteliais cerebrais na sua forma férrica (Fe^{+3}). No endossoma é convertido à forma ferrosa (Fe^{+2}) em pH ácido (ROUAULT & COOPERMAN, 2006). Observou-se também que a expressão da DMT-1 é regulada pela quantidade de Fe presente na célula intestinal. Já o Fe heme, apesar de haver evidências de sua absorção por difusão ao longo de membrana por meio de receptores específicos, via transporte saturável, em um processo mediado por carreador. O Fe absorvido só se acumula na célula intestinal até que haja apoferritina livre (COZZOLINO, 2012). Ocorrendo um excesso ou desregulação na homeostase do Fe em áreas cerebrais relevantes, aumenta o dano oxidativo induzido por ferro, levando a processos neurodegenerativos com consequente morte neuronal (BERG & YODIM, 2006).

4.2.2. Toxicidade do ferro

Em geral, mesmo uma dieta que inclua alimentos enriquecidos, não representa nenhum risco especial de toxicidade por Fe (HEATH et al., 2003). Porém, foram observadas sobrecargas acidentais (toxicidade) de Fe em crianças após a ingestão de pílulas de Fe ou de vitaminas e minerais. Outras pessoas suscetíveis a uma sobrecarga de Fe possuem uma desordem genética conhecida como hemocromatose (GROPPER, 2011), e normalmente é causada por um distúrbio genético que aumenta a sua absorção (FLEMING et al., 2002). Estima-se que 50 a cada 10 mil pessoas nos Estados Unidos sejam homozigotas para essa desordem (GROPPER, 2011). Antes considerada rara, a sobrecarga de Fe surgiu como um distúrbio importante de metabolismo e regulamento. O elemento em excesso pode causar hemossiderose, uma condição caracterizada por grandes depósitos da proteína de armazenamento de Fe hemossiderina no fígado e em outros tecidos. A hemocromatose não tratada agrava os riscos de diabetes, câncer hepático, doenças cardíacas e artrite. A sobrecarga de Fe é mais comum em homens que em mulheres e é duas vezes mais frequente entre homens que a sua deficiência (WHITNEY & ROLFES, 2008). Não há mecanismo fisiológico no organismo para a remoção do excesso de Fe e, embora o maior problema mundial de saúde pública seja a anemia por deficiência em Fe, há várias condições que podem causar acúmulo perigoso de reservas do metal no organismo (COZZOLINO, 2012).

O Fe desempenha um papel fundamental em muitas funções fisiológicas (COZZOLINO, 2012) incluindo metabolismo neuronal, um componente de proteínas envolvidas em processos celulares tais como a síntese de DNA, transporte de oxigênio e respiração mitocondrial. Isto também é fundamental nos processos cerebrais como a neurotransmissão e mielinização. Por exemplo, o Fe serve como um co-fator para a enzima tirosina hidroxilase que é envolvidos na via de síntese da dopamina. A versatilidade do Fe está relacionada à sua capacidade de servir como um doador ou acceptor de elétrons. Nos organismos vivos pode ocorrer quer no seu estado Fe^{2+} reduzido quer no estado Fe^{3+} oxidado. A toxicidade do Fe ocorre na presença deste na célula. Isto ocorre quando as concentrações de Fe excedem as capacidades de ligação da transferrina. É, portanto, geralmente sequestrado nas células. Assim, a sobrecarga de Fe pode provocar síntese de uma cascata de eventos celulares deletérios (SIAN-HÜLSMANN et al., 2011).

O Fe é transferido ao sistema nervoso central através da barreira hemato-encefálica, existem várias formas de transferência, incluindo a captação mediada pelo receptor de transferrina, o cation divalente transportador de metal (DCT1) e receptor de lactoferrina

(PONKA, 2004). Estudos que utilizam transferrina de Fe radiomarcada (MOOS & MORGAN, 2004) sugerem que o transporte de Fe através da barreira hemato-encefálica ocorre principalmente via endocitose mediada pelo receptor de transferrina. Em seguida, o endotélio capilar cerebral das células absorvem transferrina ligada ao Fe a partir do endocitose mediada por receptores. Isto é seguido pela liberação do metal do endossomo para o fluído do interstício cerebral pelo Fe exportador de ferroportina (WU et al., 2004). Uma vez no interstício cerebral, o metal pode se ligar a grandes moléculas tais como transferrina ou lactoferrina. Além disso, a transferrina secretada dos oligodendrócitos desempenha um papel vital na ligação e transporte do elemento no interstício cerebral. A presença de receptores de transferrina em neurônios e não em células, pode sugerir que a glia pode absorver o metal através de um mecanismo não envolvendo receptor de transferrina. Na verdade, a presença de ferritina na glia indica que essas células adquirem o Fe. A homeostase do Fe celular é largamente mantida pela expressão de proteínas associadas à sua captação, utilização e armazenamento.

Um recente estudo *in vitro* relatou que o aumento de L-dopa induziu a expressão de DCT1 e, portanto, um aumento de sugere que o Fe ativo também pode estar associado a neurotoxicidade relacionada à L-dopa em neurônios corticais (FANG et al., 2009). Mais importante ainda, uma expressão isoforma de DCT1 foi encontrada em SNC em DP (SALAZAR et al., 2008). Isto pode ser atribuído ao mecanismo associado a acumulação de ferro observada no transtorno. Similarmente em MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), houve uma expressão aumentada de DCT1 no mesencéfalo central e correspondente deposição de Fe e a perda de células dopaminérgicas. Assim, o DCT1 desempenha um papel instrumental no acúmulo de Fe oxidativo mediado por células. A administração intranigral de ferro produz efeitos seletivos dopaminérgicos e perda neuronal e, conseqüentemente, induz parkinsonismo (YOUDIM, 2003). A deposição de Fe no núcleo subtalâmico tem sido associado com a duração da doença, isso pode refletir com uma associação na deposição de Fe e manifestação clínica da DP. Assim, o aumento do Fe nigral na DP pode correlacionar diretamente com a gravidade dos sintomas clínicos. Existem duas barreiras para a entrada de elemento no cérebro: 1) a barreira do cérebro-líquido cefalorraquidiano (CSF) e 2) a barreira hemato-encefálica (MCCARTHY & KOSMAN, 2015). Um perfeito sincronismo entre absorção, utilização e estoque de Fe é essencial para a manutenção do equilíbrio desse metal no organismo. Alterações nesses processos podem levar tanto à deficiência como ao seu acúmulo, duas situações com repercussões clínicas e laboratoriais importantes para o paciente (GROTTO, 2008).

Baseado no exposto acima, o Fe tem sido descrito como um elemento importante na patogênese dos mecanismos da neurodegeneração. O entendimento do seu metabolismo e das disfunções relacionadas ao estresse oxidativo é fundamental para desvendar a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP) e a demência de Alzheimer (DA), cada vez mais prevalentes no nosso meio devido ao aumento da expectativa de vida (FERMANDES et al., 2007).

4.3. Doença de Parkinson

Em 1817, James Parkinson descreveu os sintomas da paralisia da agitação, uma doença que posteriormente foi definida em maior detalhe e nomeada após Parkinson. Após a publicação esperava-se uma rápida elucidação do substrato anatômico da paralisia da agitação; no entanto, este processo levou quase um século. Em 1912, Fritz Heinrich Lewy identificou os agregados de proteínas que define a doença de Parkinson (DP) em algumas regiões do cérebro fora a substância negra. Em 1919, Konstantin Nikolaevich Tretiakoff encontrou agregados semelhantes na substância negra depois de Lewy. Na década de 1990, α -synucleína foi identificado como o principal constituinte da patologia Lewy. Em 2003, foi introduzido um esquema de preparo para DP idiopática, segundo a qual, patologia da α -synucleína origina-se no núcleo motor do nervo vagal dorsal e progride de lá para outras regiões do cérebro, incluindo a substância negra (GOEDERT et al., 2013).

A doença de Parkinson é a doença de transtorno do movimento comum e é caracterizada por tremor, bradicinesia (movimento lento), com comprometimento do equilíbrio e rigidez muscular. Patologicamente, a doença envolve a degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra e é acompanhado por proteínas intracelulares generalizadas e acúmulos de α -sinucleína chamados corpos de Lewy e Lewy Neurites (GOEDERT et al., 2013, IRWIN et al. 2013).

4.4. *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster foi descrito pela primeira vez por Meigen em 1830. Subsequentes taxonomistas descreveram esta espécie sob 10 nomes diferentes de 1830 a 1946. A profusão de nomes foi provavelmente devido à rápida disseminação desta espécie em todo o mundo como resultado do comércio de frutas. A pesquisa com *Drosophila* começou no início de 1900,

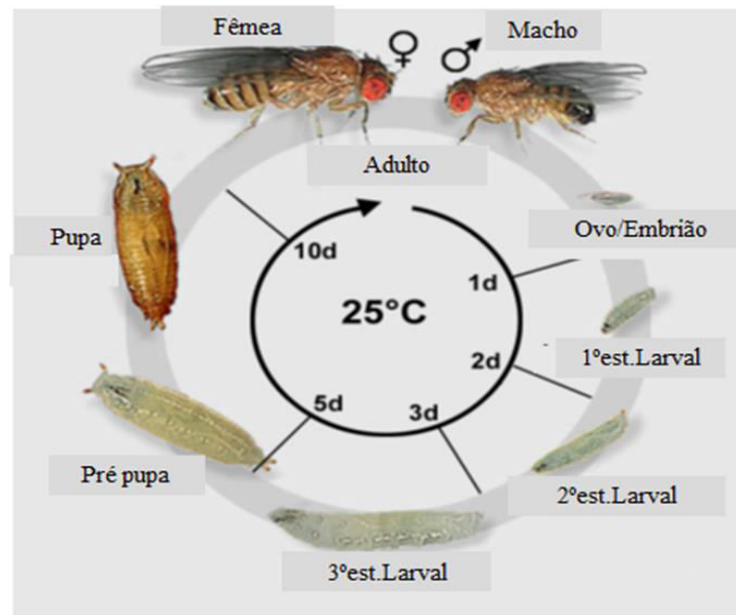
quando um número de cientistas, mais notavelmente Thomas Hunt Morgan, começou a usar *D. melanogaster* como um organismo modelo para estudos de genética. Foi o grupo Morgans da Universidade da Colômbia, no entanto, que aproveitou plenamente esta espécie como modelo de pesquisa. Morgan, até então, tinha experimentado com invertebrados marinhos em um esforço para compreender um número de processo de desenvolvimento. Ele estava à procura de uma espécie pequena e de rápido desenvolvimento, que produzia um grande número de progênes e que fosse fácil, barato de manter e rápido de manipular no laboratório. Em 1912, o grupo de Morgans tinha isolado cerca de duas dúzias de mutantes. Morgan e seus colegas começaram a usar esses mutantes para fornecer provas experimentais para a teoria cromossômica de herança e eles inventaram métodos para mapeamento de genes que ainda são usados hoje. *Drosophila* era um organismo modelo importante durante todo o século XX. Ed Lewis começou a trabalhar em mutantes homeóticos na década de 1950. Seu trabalho centrou-se no complexo do gene bithorax. O Nusslein-vollard e Wieschaus no início de 1980 avançou ainda mais na utilização de *D. melanogaster* como um sistema modelo para estudar o desenvolvimento e o mapeamento de muitos dos genes envolvidos na formação do eixo corporal em quase todos os metazoários. O gênero *Drosophila*, e *D. melanogaster* em particular, continua a ser um sistema modelo importante na pesquisa biológica. O genoma da *Drosophila* foi totalmente sequenciado em 2000 e atualizações e revisões frequentes deste genoma melhoraram nossa compreensão de regiões heterocromáticas, elementos transponíveis e expressão gênica. Recentemente, 11 outras espécies de *Drosophila* foram sequenciadas (*Drosophila* 12 Genomes Sequencing Consortium, 2007). O Bloomington Stock Centes tem cerca de 20.000 linhas diferentes, principalmente mutantes de *D. melanogaster* e o Centro de Estoque de Espécies mantém cerca de 2000 culturas de quase 300 espécies da família Drosophilidae (RESH, 2009).

4.4.1. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

A *D. melanogaster* originou-se na África ocidental tropical e se espalhou em todo o mundo. Foi registrado pela primeira vez na costa leste da América do Norte na década de 1870 após o fim da Guerra Civil Americana e a expansão do comércio de frutas. Como todos os outros membros da Família Drosophilidae, *D. melanogaster* é holometábolo e sofre uma metamorfose completa. Os tempos de desenvolvimento variam, dependendo da temperatura. Os laboratórios típicos da *Drosophila* mantêm moscas entre 18 e 25 °C. Os estoques ou estirpes

raramente usadas são geralmente mantidos a temperaturas mais baixas para retardar o desenvolvimento e reduzir a quantidade de troca de estoque necessária. O desenvolvimento completo leva 3 semanas a 18 °C e a 25 °C, o desenvolvimento embrionário é completado aproximadamente 1 dia após o ovo ser posto.

A mosca passa então por três fases larvais antes da pupação, conforme demonstrado na figura 5. As larvas são dotadas de motilidade e trabalham seu caminho através dos meios alimentares, alimentando-se de leveduras e bactérias (RESH., 2009). Essas larvas passam por vários estágios larvais, as larvas do terceiro estágio rastejam para cima do frasco longe do meio de cultura. Lá elas param e sua cutícula larval endurece formando uma pupa cor marrom escuro. A metamorfose ocorre durante a fase pupal. Os tecidos das larvas degeneram e reorganizam para a formação de uma mosca adulta dentro do estágio pupal. Quando a metamorfose é completa, a mosca adulta emerge do estágio pupal. Depois que a mosca emerge, as asas se expandem e secam, o abdômen torna-se mais rotundo e a cor do corpo escurece (MORGAN et al., 1925). Após 4 dias, as larvas entram em estágio estacionário pupal. A pupação leva aproximadamente 4 dias, após esse período os adultos emergem do casulo pupal. Depois que elas eclodem, as fêmeas levam cerca de 2-3 dias para desenvolver ovos maduros (RESH, 2009). Portanto, a 25 °C é necessário cerca de 10 ou 11 dias para completar um ciclo de ovo ao adulto (MORGAN et al., 1925). Em temperaturas mais elevadas (29-30°C), ocorre a letalidade da pupa e a esterilidade feminina têm efeito na viabilidade da cultura. Após a eclosão, leva entre 6 e 12 para machos e fêmeas para começar matting. Cruzamentos genéticos requerem paternidade conhecida. As fêmeas são coletadas antes de atingir a maturidade sexual e isoladas dos machos, assim os cruzamentos controlados podem ser bem sucedidos. A duração média da vida adulta é de 40-50 dias, embora alguns indivíduos possam viver até 80 dias. Uma única fêmea pode colocar até 75 ovos no dia, e pode chegar a um total de 500 ovos em um período de 10 dias (RESH, 2009).

Figura 5 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

Fonte: Adaptado de Roote e Prokop, 2013.

Uma combinação de vários fatores chave faz com que a mosca seja um modelo animal excepcionalmente utilizado na pesquisa de neurociência. Em primeiro lugar, a *Drosophila* tem um ciclo de vida curto. Segundo, a manipulação genética em *Drosophila* pode ser rápida e relativamente simples. Terceiro, para o estudo do sistema nervoso, a mosca também oferece vantagens únicas. Embora menos complicado do que o mamífero, o cérebro da mosca tem um complexo sistema nervoso central com neurônios e glia, sendo protegido por uma barreira hematoencefálica e compartilha semelhanças organizacionais do cérebro com os vertebrados. Em quarto lugar, o tamanho menor do genoma de *Drosophila* (1.2×10^8 pares de bases) em comparação com o genoma humano (3.3×10^9 pares de base). Em *Drosophila*, a complexidade reduzida do genoma permite uma interpretação mais fácil dos estudos de perda de função. Tomado em conjunto, estas vantagens exemplificam as razões pelas quais a *Drosophila* tem gerado contribuições primordiais para a pesquisa biológica em geral e à pesquisa em neurociência em particular (MCGURK et al., 2015).

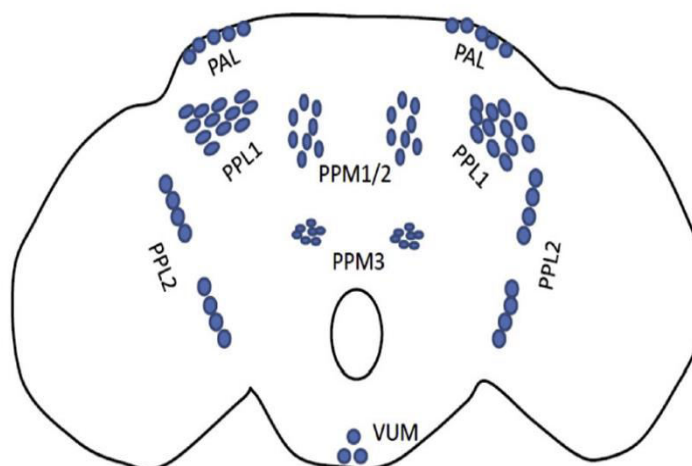
4.4.2. Parkinsonismo em *Drosophila melanogaster*

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* foi introduzida na pesquisa biológica a mais de 100 anos e rapidamente se tornou uma ferramenta valiosa que tem auxiliado na compreensão de genes, cromossomos e hereditariedade da informação gênica (BELLEN et al., 2010).

A síntese do neurotransmissor dopamina é conservada entre *Drosophila* e humanos e clusters distintos de neurônios dopaminérgicos são detectável no cérebro de mosca em desenvolvimento e adulta (MONASTIRIOTI, 1999). Comparável com a condição humana, o sistema dopaminérgico em *Drosophila* também está envolvido no controle locomotor (YELLMAN et al., 1997; LIMA & MIESENBOCK, 2005), embora os detalhes dos circuitos neurais subjacentes são desconhecidos. A perda de neurônios dopaminérgicos pode afetar a locomoção em *Drosophila* comparável à situação em DP. De fato, a perda de subconjuntos de neurônios dopaminérgicos no cérebro, bem como defeitos de locomoção são os dois principais fenótipos de tipo parkinsoniano utilizados que caracterizam modelos de moscas com DP (FEANY & BENDER, 2000; SEUGNET et al., 2009).

É amplamente aceito que os sintomas motores na DP são causados principalmente pela perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos (BARZILAI & MELAMED, 2003; KATZENSCHLAGER & LEES, 2002). Existem 13 tipos bem definidos de aglomerados de neurônios em *Drosophila* (WANG et al., 2006; WHITE et al., 2010). Entre todos os Clusters dopaminérgicos (figura 6), os neurônios dopaminérgicos na região dorsomedial, que incluem os agregados da PPM1/2 e PPM3, são frequentemente relatados como sendo mais sensíveis a toxicidade da α -sinucleína e a perda de neurônios dopaminérgicos em PPL1 também foram relatados (BARONE & BOHMANN, 2013; THINH et al., 2008).

Figura 6 - Diagrama esquemático de clusters neuronais dopaminérgicos em *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Zhu et al., 2016.

4.4.3. Parkinsonismo em *Drosophila melanogaster* induzido por ferro

De acordo com estudos clínicos, existem diferenças significativas entre modelos animais transgênicos super-expressando diferentes formas de α -sinucleína. Por exemplo, *Drosophila* expressando A30P α -sinucleína perdem significativamente a capacidade de escalar mais cedo do que moscas que expressam A53T ou α -sinucleína de tipo selvagem (WT) (FEANY & BENDER, 2000).

Os biometais como o ferro (Fe), manganês (Mn) e o cobre (Cu) foram associados à doença de Parkinson (DP) e Parkinsonismo (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011) e na gênese de doenças neurodegenerativas (DEL-RÍO & VÉLEZ-PARDO, 2004). O acúmulo de ferro tem sido constantemente encontrado na substância negra de pacientes com DP (QIAN & WANG, 1998; KE & QIAN, 2003). A sobrecarga de ferro é conhecida por ser tóxica devido à formação de radicais livres via reação de Fenton dependente de Fe. Foi relatado que o tratamento com Fe pode levar a perda de neurônios dopaminérgicos e sintomas motores parkinsonianos em roedores e *Drosophila*, indicando o potencial papel patogênico da sobrecarga de Fe em DP (JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010; BONILLA-RAMIREZ et al., 2011). Experimentos *in vitro* sugeriram que o Fe também se liga à α -sinucleína, facilitando a sua agregação e aumentando a toxicidade, numa ordem similar à potência de agregação intrínseca (OSTREROVA-GOLTS et al., 2000). Curiosamente, recentemente foi descoberto que formas mutadas de α -sinucleína podem aumentar a atividade da ferriredutase, que converte o íons Fe^{3+} a íons Fe^{2+} mais tóxicos que participam da reação de Fenton (DAVIES et al., 2011; BROWN, 2013). Entretanto, permanece desconhecido se a interação diferencial de Fe com diferentes variantes de α -sinucleína poderia induzir neuropatologia distintiva e, portanto, fenótipos diferenciais da doença em portadores mutantes de α -sinucleína (ZHU et al., 2016).

A sobrecarga de Fe leva a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos e está relacionado com o declínio motor. O acúmulo de Fe é encontrado na substância negra de pacientes com DP e pode ser um fator diferencial crucial que contribui para a neuropatologia clínica (ZHU et al., 2016). O acúmulo de metal na cabeça das moscas está associada à neurodegeneração de vários aglomerados neuronais minérgicos. Os metais como o ferro, o manganês e cobre são capazes de destruir neurônios dopaminérgicos no cérebro da mosca, prejudicando assim sua capacidade de movimento. Metal como o Fe induz sintomas como Parkinson em *D. melanogaster* (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011; 2013) e metais pesados são causadores de DP (DICK et al., 2007; JONES & MILLER et al., 2008).

Neurônios dopaminérgicos de *D. melanogaster* são vulneráveis de forma semelhante aos neurônios dopaminérgicos humanos, para estresse oxidativo e morte celular induzida por compostos xenobióticos em modelos *in vivo* como o paraquat (CHAUDHURI et al., 2007), rotenona (COULOM & BIRMAN, 2004) e ferro (BEN-SHACHAR & YODIM, 1991; SENGSTOCK et al., 1994). Uma possível explicação para essa sensibilidade poderia estar relacionada ao fato de que o Fe acelera a oxidação da dopamina, produzindo assim espécies reativas de oxigênio, tais como H₂O₂ que, por sua vez, com íons Fe²⁺ que geram radicais hidroxila (OH), uma molécula reativa em direção a proteínas, RNA e DNA (HATTORI et al., 2009).

O Fe pode ser um fator potencial causador ambiental de DP esporádica. No entanto, ainda é desconhecido se o Fe pode ser um fator causal ou secundário na doença de Parkinson (JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010). A desregulação no metabolismo do Fe está associada com dano celular e estresse oxidativo, e tem sido relatado como um evento comum em várias doenças neurodegenerativas, dentre elas o Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington. No entanto, o excesso de Fe é uma potente fonte de danos oxidativos através de formação de radicais livres (BELAIDI et al., 2016), como a reação de Fenton e de Haber-Weiss, as quais resultam em fenômenos de estresse oxidativo (SIQUEIRA et al., 2006). A homeostase cerebral de Fe é cada vez mais reconhecida como um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias com drogas para distúrbios relacionados com o envelhecimento (BELAIDI et al., 2016).

O acúmulo de Fe tem sido constantemente encontrado na substância negra de pacientes com DP (KE & QIAN, 2003). A sobrecarga deste elemento é conhecida por ser tóxica devido à síntese de radicais livres oxidativos, via reação de Fenton dependente de Fe. O tratamento com Fe ou a perda induzida de neurônios dopaminérgicos e sintomas motores parkinsonianos em roedores e *Drosophila*, indicam o papel patogênico da sobrecarga do Fe em DP (JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010; BONILLA-RAMIREZ et al., 2011).

Este trabalho visa aumentar o entendimento sobre os efeitos da hesperidina e um possível mecanismo protetor sobre a neurotoxicidade induzido pelo ferro utilizando um modelo de estudo alternativo com *Drosophila melanogaster*.

5. Manuscrito Científico

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio manuscrito. O **manuscrito** está disposto na forma que será submetido a revista “Neurotoxicology”.

**Hesperidin Protects Against Mortality, Locomotor Deficits and Oxidative Stress in
Drosophila melanogaster Model of Iron-Induced Neurotoxicity**

Márcia Rósula Poetini^a, Stéfani Machado Araujo^a, Mariane Trindade de Paula^a, Vandrezza Cardoso Bortolotto^a, Luana Meichtry^b, Bianca Santos Bertolazi^a, Francielli Polet de Almeida^a, Franciane Cabral Pinheiro^a, Cristiano Ricardo Jesse^{a,b}, Marina Prigol^{a,b*}

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

^bDepartment of Nutrition, UNIPAMPA- Campus Itaqui, RS, Brazil

*Corresponding author at: Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa. CEP 97.650-000 Itaqui, RS, Brazil. Tel.: +55-55-3433-1669.

E-mail addresses: marinaprigol@gmail.com (M. Prigol)

Abstract

Hesperidin (Hsd) is a flavonoid mainly found in citrus fruits like orange and lemon, these flavonoids are well described in the literature because they have antioxidant activity, anti-inflammatory, anticancer, antiviral, hypolipidemic, among others. This study evaluated the effect of flavonoid hesperidin on the toxic effects caused by the intake of ferrous sulfate (Fe) in *Drosophila melanogaster*. Male adult flies, aged 1 to 3 days, were divided into four groups of 50 each: (1) control, (2) Hsd 10 μ M, (3) Fe 20 mM 4) Hsd 10 μ M + Fe 20 mM. During the exposure protocol, flies were exposed to a diet containing Hsd and or Fe for 48 hours. Survival and behavior analyses were carried out *in vivo*, and *ex vivo* analyses involved acetylcholinesterase activity (AChE), iron levels, determination of dopaminergic levels, cellular and mitochondrial viability, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), reactive species levels (RS), lipid peroxidation (TBARS) and contents of total thiols and non-proteic thiols (NPSH). Our results show for the first time that Hsd reduced the toxic effects caused by iron exposure, by ameliorates iron induced mortality, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Hsp treatment also promotes decrease in iron concentration, restores dopamine levels and cholinergic activity in brain of flies and improves motor function caused by iron. The results together demonstrate the neuroprotective effect of Hsp and suggest that this flavonoid acts in different ways to protect against the iron damage, such as the direct scavenging of reactive oxygen species, iron chelating activity and activation of antioxidant enzymes.

Keywords: Citric Flavonoid, Iron, Fruit fly, Oxidative stress, Dopamine.

1. Introduction

Flavonoids are a group of naturally occurring, low molecular weight polyphenolic compounds, distributed as secondary plant metabolites and to which some properties are attributed, including antioxidants (PIETA, 2000; HARBONE and WILLIAMS, 2000; GARG et al., 2001). Hesperidin (3,5,7-trihydroxy flavanone-7-rhamnoglucoside) (Hsd) is a pharmacologically active bioflavonoid found in citrus fruits, which acts on the elimination of free radicals (SUAREZ et al., 1998). The Hsd has been reported to have pharmacological activities, including antioxidants (GARG et al., 2001; ANTUNES et al., 2014; PARHIZ et al., 2015; ROOHBAKHSH et al., 2015), anti-carcinogenic (GARG et al., 2001; KAMARAJ et al., 2010), antidepressive (SOUZA et al., 2013; FILHO et al., 2013; DONATO et al., 2014), anti-hypertensive, anti-viral, anti-inflammatory (GARG et al., 2001; KAMISLI et al., 2013; ROSS and KASUM, 2002), antimicrobial, analgesic, immunomodulatory (GARG et al., 2001) and hepatoprotective (NATHIYA et al., 2016). The Hsd has great power to reduction, and chelating activity on Fe^{2+} , hydrogen radical scavenging and hydrogen peroxide scavenging activities when compared with natural and synthetic antioxidants (HUSSEIN et al., 2011). Dimpfel (2006) demonstrated in his study the neuroprotective potential of Hsd where he used his metabolite hesperetin (Hst) that has the capacity to cross the blood brain barrier making it ideal natural candidate for the treatment of different disorders of the central nervous system. In this perspective, several studies confirm the neuroprotective effects of hesperidin (GARG et al., 2001).

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease, causing the degeneration of dopaminergic neurons in the mesencephalon of the substantia nigra (LEV et al., 2013; WEST et al., 2015), presents a slow progression that leads to failure, voice changes during speech and swallowing (LUCCHESI et al., 2015). It is characterized by the death of neurons that produce dopamine, a substance that controls and regulates the movements of the human body. The main symptoms are involved in the pathology rigidity, bradykinesia, tremor and changes in balance and posture (SHUMAN et al., 2011). Mitochondrial dysfunction is one of the main culprits in neurodegeneration; neurons with impaired mitochondrial function inevitably suffer from oxidative stress and eventually cell death (LEE, 2016), oxidative stress is believed to be an important factor for the onset of PD (JAROHMI et al., 2015).

Neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's, and Huntington's are associated with cellular damage and oxidative stress where iron metabolism dysregulation is reported as a common event present in the development of these (BELAIDI and BUSH, 2016).

The iron is one of the most important elements and at the same time can be toxic if excess in the human body. Uncontrolled increase in forms catalytically active iron in the blood and parenchymal organs drives the oxidative damage and disease (PIETRANGELO, 2016). The iron to ferrous iron transition through the Fenton reaction, generation of reactive species production, which can damage cell membranes. This mechanism is known as the main cause of cell damage and organ in Fe overload (JOMOVA and VALKO, 2011). In a study by BONILLA-RAMIREZ et al. (2013), where flies may observe an accumulation of Fe in the head of flies and this is associated with dopaminergic neurodegeneration in several neural clusters and neurodegeneration disease induced by metals (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011). Rising metal levels in the brain are associated with high oxidative stress mediated by the ability of metals to catalyze redox reactions, resulting in abnormal neurobehavioral function and progression of neurodegenerative diseases (MENON et al., 2016).

The iron accumulation affects especially dopaminergic system of the flies this possible explanation for this sensitivity may be related to the fact that Fe accelerate the oxidation of dopamine by the Fenton reaction, by producing reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, which in turn react with Fe^{2+} radical generating hydroxyl (OH) molecule which strongly reacts with proteins, such as ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid (JIMENEZ DEL RIO et al., 2010). The fruit fly *Drosophila melanogaster* has been used as an efficient study model to evaluate the concentration of biometals. According to JIMENEZ DEL-RIO et al., (2010), BONILLA-RAMIREZ et al., (2011), BONILLA-RAMIREZ et al., (2013) it can be observed that the supply of metal acutely or chronically to the flies causes the levels of these biometals to be increased in the brains of these flies being associated with neurodegeneration of various dopaminergic neuronal groups.

Based on expose above, the aim of this study is to evaluate the effect of the flavonoid hesperidin on the neurotoxic effects caused by acute ingestion of Fe in *Drosophila melanogaster*. Our working hypothesis is that hesperidin can attenuate mortality, locomotor deficits, and oxidative stress induced by acute Fe exposure in flies.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Hesperidin (Hsd), ferrous sulphate (Fe), 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1- thanesulfonic acid (HEPES), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Thiobarbituric acid (TBA), mannitol, 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), acetylthiocholine iodide, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide (Resazurin), quercetin and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. *Drosophila melanogaster* stock and culture

Drosophila melanogaster (strain Harwich) was obtained from the National Center (Bowling Green, Ohio, USA). The flies were kept in incubator (BOD) temperature-controlled at 25 ° C (± 2 °) and 60% humidity with 12 hours light/dark cycle and fed a standard diet (80.82% corn flour, 8.98% wheat germ, 9.0% sugar, 0.67% milk powder, 0.53% salt and 0.08% nipagim).

2.3. *Experimental Protocol*

2.3.1. *Exposure treatment with ferrous sulphate and hesperidin*

Drosophila melanogaster (male) with up to 3 days of age were divided into four groups of 50 flies each: (1) control, (2) Hsd 10 μ M (3) Fe 20 mM, (4) Hsd 10 μ M + Fe 20 mM. The flies were exposed to a diet containing Fe in the form of ferrous sulfate and Hsd on filter paper are added to the final concentration of 20 mM and 10 μ M, respectively, and both were given 1% sucrose for 48 hours according to the respective groups. The Fe (20 mM) was diluted in sucrose 1%, the concentration was similar to the dose used for (Bonilla-Ramirez et al., 2011; Jimenez-Del-Rio et al., 2010). The Hsd concentration was chosen based on the pilot study: flies were exposed to different concentrations of Hsd, such as 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M to determine the effect of Hsd alone and with iron on survival of the flies during the experimental period. However, only the concentration of 10 μ M was used in experiments, since it was effective and did not show toxicity to flies.

2.4. *In vivo assays*

2.4.1. *Survival*

The survival rate of the flies exposed to treatments were evaluated daily by counting the amount of the number of live flies in relation in the number of dead flies at end of the experimental period (48 h). Approximately 200 flies per group are included in the survival data and the total number of flies represent the sum of four independent experiments (50 flies per group).

2.4.2 *Negative geotaxis - climbing test*

The flies were exposed to Fe, and after the experimental protocol were transferred to a falcon tube (15 cm length and 1.5 cm in diameter). After 10 minutes of recovery to exposure to ice. The negative geotaxis assay of the flies was determined according to Jimenez Del-Rio et al., (2010), by recording the time spent by each fly to achieve an 8 cm, measured from the bottom of a glass test tube with a diameter of 1.5 cm. The test was repeated five times for each fly and 10 flies are separated from each group to be evaluated. The data were analyzed according to the average time of each fly. The scaling test was performed at 48 hours of treatment, four independent experiments were performed (40 flies per group).

2.4.3. *Negative geotaxis - Test Base Top*

The flies were exposed to Fe, and after the experimental protocol were transferred to a falcon tube (15 cm length and 1.5 cm in diameter). After 10 minutes of recovery to exposure to ice, 10 flies were subjected to the tube bottom and the number of flies that rise mark column of 6 cm in 5 secs, and those that remained below the mark will be recorded (COULOM and BIRMAN, 2004). The procedure was repeated three times for each treatment group at 1 min intervals. Four independent experiments were performed (40 flies per group).

2.4.4. *Test open field*

To evaluate the behavior and exploratory activity of each fly, a total of ten flies were used in each group, were assessed every fly individually after submited into a Petri dish divided with squares measuring one centimeter by one as described by Hirth (2010). Fly activity

and movement were recorded and evaluated and the resulting trajectory for the time (60 s). The total number of flies was calculated according to the number of crossed / square exploited. Four independent experiments were performed (40 flies per group).

2.5. *Ex vivo assays*

2.5.1. *Homogenized preparation*

Twenty male flies per group were separated and immobilized by freezing in ice for approximately 1 min, then the flies were manually homogenized in HEPES buffer (20 mM, pH 7.0) with or without head according to each protocol analysis. After centrifugation the supernatant was removed and used for biochemical assays. All experiments were performed in duplicate.

2.5.2. *Determination of the Fe levels*

For the determination of Fe levels in head and body of flies it was used colorimetric method of orthophenanthroline (ABNT, 1997), with adaptations according SALAZAR et al. (2008). The flies are first weighed (50 mg) and for the occurrence of an acidic aperture 250 μ L of nitric acid (PA) was subsequently added, then the samples are kept in a water bath ($\pm 95^\circ$ C) for 1 hour. The samples were spectrophotometric reading at 510 nm. Fe levels are expressed relative to the flies weight (metal ng/g body weight).

2.5.3. *Analysis of dopamine concentrations by high-performance liquid chromatography (HPLC)*

The analysis of the concentrations of dopamine were performed by HPLC as described (DALPIAZ et al., 2007). Twenty flies per treatment group had their heads homogenized in 100 μ L of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 1 mM EDTA, followed by centrifugation at 25000 x g for 10 min at 4 $^\circ$ C. The supernatant is used to estimate the levels of dopamine by HPLC. Four independent experiments were performed (50 flies per group).

2.5.4. *Dehydrogenases activity of *Drosophila melanogaster**

Dehydrogenases activity of analysis was based on Franco et al. (2009). The method is based in the ability of viable cells to reduce resazurin to resorufin, a fluorescent molecule. About twenty flies per group were homogenized in 1 mL of 10 mM Tris buffer (pH 7.0) and centrifuged at 3570 rpm for 10 min at 4 °C. Subsequently, 20 µL of sample was incubated in ELISA plates with 180 µL 10 mM Tris buffer (pH 7.0) and 10 µL of resazurin for 1 hour. The fluorescence is recorded using a plate reader EnsPireR (Perkin Elmer, USA), excitation at 579 nm and emission at 584 nm, respectively. Four independent experiments were performed (50 flies per group).

2.5.5. *Metabolic activity of fractions enriched with mitochondria*

The flies are weighed (60 mg) and kept on ice, following were homogenized in 1000 µL of Tris buffer (0.25 M, pH 7.4) and subsequently centrifuged at 1000 x g for five minutes (4 °C). Mitochondria were obtained by centrifuging the post nuclear supernatant at 10,000 x g for 10 minutes (4 °C). After the pellet, will be washed in HEPES-mannitol-sucrose buffer and resuspended in 200 µL of suspension buffer. The mitochondrial fraction (200 µL) is obtained from 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT (x% solution) for 30 minutes at 37 °C. Subsequently, the samples are centrifuged at 10,000 x g for five minutes. The pellet was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), then the samples were incubated for 30 minutes at 37 °C and the absorbance measured at 540 nm. Assessment of mitochondrial viability will be isolated from the whole body of the flies by the modified differential centrifugation method (HOSAMANI and MURALIDHARA, 2013). The results are expressed as a percentage of control. Four independent experiments were performed.

2.5.6. *Evaluation of cell viability*

Cellular viability was measured using MTT 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay as described by HOSAMANI and MURALIDHARA, (2013). The flies were incubated in MTT for 60 min (37 °C), after the MTT removal, the sample was incubated in DMSO for 30 min (37 °C). The absorbance from formazan dissolution by the addition of DMSO was monitored in an EnsPireR multimode plate reader (Perkin Elmer, USA) at 540 nm.

2.5.7. *Thiol Determination*

Ten flies of each group were manually homogenized, after added of 0.5 M PCA and subsequently was centrifuged at 10.000 rpm for 5 min at 4 °C. For non-protein thiol measures, the supernatant was used (the sediment should be reserved for later use) and after was added 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 5 mM, waiting 15 min at room temperature, protected from light and the reading will be a spectrophotometer at 412 nm. For non-protein thiols measures of previous samples the pellet is resuspended in Tris/HCl 0.5 M (pH 8.0), the supernatant was removed and adding 5 mM DTNB, maintained 15 minutes at room temperature protected from light and reading it was carried out by spectrophotometry at 412 nm. The determination thiol protein and non-protein were estimated based on spectrophotometry using Ellmann reagent (1959).

2.5.8. *Determination of DCF-DA oxidation: Reactive species levels (RS)*

Twenty flies per group are used. They were subsequently homogenized in 1 mL of 10 mM Tris-buffer, pH 7 and centrifuged at 1000 x g for 5 minutes at 4 °C. The assay quantification of 2',7'-dichloro fluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation will be monitored, as a general index of oxidative stress according to the protocol proposed by Perez-Severiano et al. (2004). After one hour the resulting fluorescence emission of DCF-DA oxidation is monitored, reading will take place in excitation at 485 nm and emission at 530 nm in the espectrophotometer using a microplate reader multimode EnsPireR (Perkin Elmer, USA). The rate of DCF formation was calculated as a percentage of the fluorescence of the treatments in relation to the control group. Four independent experiments were performed (50 flies per treatment group).

2.5.9. *Determination of Lipid Peroxidation*

Lipid peroxidation (LPO) was measured by the test substances reactive to thiobarbituric acid - TBARS test (OHKAWA et al., 1979), with minor modifications. Ten flies in each group are homogenized in 500 µL of HEPES buffer 20 mM, pH 7.0 and centrifuged at 1000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was removed and is added after the thiobarbituric acid (TBA 0.8%, pH 3.2), acetic acid/HCL (20%, pH 3.5) and sodium sulphate (SDS 8,1%). After the samples are incubated for two hours at 95 °C and after measuring the absorbance at 532 nm. Results represent the mean of four independent experiments were performed (50 flies per

group). The TBARS values were normalized by protein concentration and are expressed as a percentage of TBARS production in relation to the control groups.

2.6. *Activities of Antioxidant Enzymes*

2.6.1. *Determination of catalase (CAT) activity*

Catalase activity is measured following the method proposed by AEBI, (1984) with minor modifications according to Paula et al. (2014). Ten flies from each group are homogenized in 500 μ L HEPES buffer 20 mM (pH 7.0) and centrifuged at 14000 rpm for 30 min at 4 °C. Subsequently, a potassium phosphate buffer solution (0.25 M / EDTA (2.5 mM, pH 7.0) was prepared, 30% hydrogen peroxide (H₂O₂) and Triton X-100. This solution was added to the supernatant and samples were monitored at 240 nm for 1 min. Four independent experiments (50 flies per group) were performed.

2.6.2. *Determination of superoxide dismutase (SOD) activity*

Ten flies from each group are homogenized in 500 μ L 20 mM HEPES pH 7.0 buffer and centrifuged at 14000 rpm for 30 min at 4 °C. The reaction mixture contained sodium phosphate buffer (0.025 M/EDTA 0.1 mM, pH 10), N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 10 μ L sample and it was started by adding 0.15% quercetin dissolved in dimethyl formamide. The time of samples reading is added quercetin and monitored for 2 min at 406 nm. The SOD activity is measured by monitoring the inhibition of autoxidation of quercetin, second KOSTYUK and POTAPOVICH, (1989) with minor modifications according to Franco et al., (2010). The results are expressed in terms of the amount of protein required for 50% inhibition of oxidation of quercetin. Four independent experiments were performed (50 flies per group).

2.6.3. *Determination of Glutathione-S-transferase (GST) activity*

Ten flies from each group are homogenized in 500 μ L HEPES buffer 20 mM (pH 7.0) and centrifuged at 14000 rpm for 30 min at 4 °C. After removing the supernatant, the samples will be prepared containing buffer 0.25M/EDTA (2.5 mM, pH 7.0), distilled water and 100 mM

GSH, after 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (CDNB 50 mM) is added as substrate and monitored at 340 nm for 2 min. Assay of GST activity is performed according to the procedure of HABIG et al. (1974). Four independent experiments were performed (50 flies per group).

2.6.4. Activity of acetylcholinesterase (AChE)

Ten flies from each group are homogenized in 500 μ L HEPES buffer 20 mM (pH 7.0) and centrifuged at 1000 rpm for 5 min at 4 °C. Subsequently be prepared containing solution phosphate buffer 0.25M (pH 8.0) and DTNB 5 mM and after a supernatant aliquot 50 μ L was added in 25 μ L acetylthiocholine iodide of (7.25 Mm) immediately after the reading was performed for 2 minutes at 412 nm. The enzymatic activity is expressed as nmol of protein / mg / min. The activity of AChE is determined according to the method of Ellmann (1961). Four independent experiments were performed (50 flies per group).

2.7. Protein determination

Protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical analysis

All experimental results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test where appropriate. Differences were considered significant between groups at $p < 0.05$, and the GraphPad Prism 5 program was used.

3. Results

3.1. Hsd improves the survival rate in *Drosophila melanogaster*

Flies exposed to iron showed a decrease in survival after 24 hours and more intensely after 48 hours of exposure. Hesperidin had a protective effect on flies after 24 hours of exposure to Fe and partially protected after 48 hours of exposure (Fig 1).

3.2. Locomotor performance and activity of acetylcholinesterase

Adult male flies exposed to Fe have deleterious impact on locomotor behavior, with reductions in climbing rate compared to the control group. This effect was attenuated by treatment with Hsd since it flies in this group had better results in climbing (Fig. 2 A and B). Regarding the open field test (Fig. 2 C), the group exposed to Fe had lower exploration activity compared to the control group and Hsd, indicating locomotor deficit. However, protective effect of Hsd was effective in open field test partly (Fig. 2C).

There was a significant increase in AChE in head and body of flies exposed to Fe, the treatment with Hsd resulted in a significant decrease in AchE activity when compared with flies exposed to Fe (Fig. 3A head and 3B body), restoring the control levels.

3.3. Effect of Hsd on the depletion of the levels of dopamine induced by Fe

The flies of the Fe group showed a depletion of 50 % in the levels of dopamine in the head compared to the control group and Hsd. Treatment with Hsd protected against the reduction of dopamine levels in the head caused by Fe in flies (Fig. 4.).

3.4. Metabolic activity of cellular and enriched fraction mitochondria in iron exposed to flies

Dehydrogenases activity was assessed by metabolic activity (Fig. 5 A) and by MTT assay (Fig. 5 B) by resazurin reduction test. In both tests showed a significant reduction in metabolic activity of dehydrogenases and in the group exposed to Fe. The Hsd was effective protect in reduction in metabolic activity of dehydrogenases and resazurin reduction test (Fig. 5 A and 5 B).

3.5. Effect of Hsd on resazurin reduction assay in homogenate of flies exposed to Fe

Cell viability measured by the rezaruzin reduction test showed a significant drop in cell viability for the group exposed to Fe compared to the control group, confirming the toxicity in cell levels by Fe. This effect can be reversed by a treatment with Hsd (Fig. 6).

3.6. Biomarkers of Oxidative Stress

In our study to quantify the oxidation DCFDA was evaluated as a general indicator of oxidative stress and reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) as an indicator of lipid peroxidation (LPO) (Fig. 7 A and B, respectively). The Fe significantly increased DCFDA oxidation (Fig. 7 A) and lipid peroxidation (Fig. 7 B). The administration of Hsd was effective in reducing the increase on DCFDA oxidation and lipid peroxidation.

3.7. Antioxidant Enzymes Activities

The activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) were determined in flies exposed to the respective experimental treatments for 48 hours. Group exposed to Fe result in an inhibition of GST, SOD and CAT activities when compared to the control group and Hsd. The treatment with Hsd was effective in reducing the inhibition of GST, SOD and CAT (Fig. 8 A, B and C, respectively).

3.8. Thiols level

The content of protein and non-protein thiols (Fig. 9 A and B, respectively). The group exposed to Fe showed a reduction in levels of thiols, which reversed this damage by Hsd compound.

3.9. Iron levels in head and body of flies

The Fe administration for flies resulted in a significant increase in Fe concentrations in head and body. However, Hsd prevented Fe levels increased when compared to their respective control, only in head, but not in body. (Fig.10 A and B).

4. Discussion

The iron plays a key role in physiological maintenance functions in the brain by participating in many cellular functions, however, the excess is a potent source of oxidative damage through the formation of free radicals (BELAIDI and BUSH, 2016) as Fenton and

Haber-Weiss reaction, resulting in a phenomenon that oxidative stress (SIQUEIRA et al., 2006). Iron is a well-known inducer of reactive species (RS) (PARI et al., 2015) and the increase of reactive species may also facilitate metal accumulation when neurons are under oxidative stress (LAN et al., 2016). Based on the above, the objective of the present study was to evaluate the protective role of hesperidin against iron-induced neuronal damage in *Drosophila melanogaster* males. Our results demonstrated that Hsd improved the locomotor performance and survival of flies exposed to Fe. It also improved dopamine level and the acetylcholinesterase activity in the heads of flies. In addition, hesperidin enhanced antioxidant defenses, prevented mitochondrial dysfunction, oxidative stress and mortality of the flies exposed to iron. Also, showed a beneficial effect on the head of flies, reducing iron levels.

Jimenez Del-Rio et al. (2010) demonstrated in their study that high Fe concentrations were able to induce Parkinsonism-like effects in *Drosophila*. The acute and chronic Fe exposure in *Drosophila* reduced survival and locomotor activity (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011; JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010; ORTEGA-ARELLANO et al., 2011). Fagundes et al. (2015) noted in their study that *Caenorhabditis elegans* exposed to Fe had a decrease in locomotor activity and mechanical sensitivity, suggesting a dysfunction in the nervous system and changes in the dopaminergic system. Our results showed that flies exposed to the Fe presented increased mortality, survivors had significant locomotor deficits with increased AChE activity, corroborating with the above studies. Treatment with Hsd was effective in reducing the neuromotor deficits, negative geotaxis test (climbing) and in the open field test (classification of exploratory capacity).

Additionally, in our study, flies exposed to Fe, had an increase on the activity of AChE, similar data were found by acute exposure of newly flies hatched to manganese, it presented significant decrease in climbing activity with concomitant increase in the activity of AChE (ADEDARA et al., 2016). In the present study, there was an increase in AChE activity in the group exposed to Fe, which may lead to reduced levels of acetylcholine in the synaptic cleft, and because of that, lead to a reduction in the cholinergic neurotransmitter efficiency leading to deficiency in the activity of climbing in flies, however, hesperidin attenuated this damage by preventing the increase of AChE.

Iron, at least in experimental conditions may be able to achieve the dopaminergic neurons in the fly, where Fe has been shown to be extremely toxic to *Drosophila melanogaster* (JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010). In our study, there was a decrease in dopamine levels in the head of flies exposed to Fe. In fact, dopamine is a very reactive molecule and when in high extracellular levels can self-oxidize and induce the formation of superoxide and peroxide. In

addition, one possible cause dopaminergic neurodegeneration can be derived from these oxidative insults. Dopamine depletion in Parkinson's disease has traditionally been considered as one of the underlying mechanisms that contribute to the motor symptoms, such as rigidity, tremor and bradykinesia (CHONG et al, 2015). The metabolism of monoamine oxidase (MAO) produces H_2O_2 that can participate in the Fenton reaction, which Fe (II) generate reactive species involved in neuronal death in the nigra substance. It can be attributed to the compound hesperidin antioxidant and chelating ability, which was able to significantly reduce oxidative damage, restoring of normal physiological functions (PARI et al., 2015). In the study by Araújo et al. (2015) the flies exposed to rotenone presented a significant reduction of dopamine levels in comparison with the control flies. An important result of our study is that cotreatment with hesperidin was able to prevent the depletion of dopamine, proving to be a potential neuroprotective agent. In this view, several studies demonstrate the neuropharmacological properties of the citrus flavonoids Hsd and its metabolite Hst. These studies showed that Hsd and Hst enhanced learning and memory through various mechanisms such as elevating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and reversing the disruptive effect of global cerebral on memory (GAUR and KUMAR, 2010; OZTANIR et al., 2014). Hsd and Hst showed antidepressant activities via mechanisms that, some of them, differ from those of conventional antidepressant drugs (DONATO et al., 2014), and these two flavonoids protect against the neurotoxicity induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in aged mice (ANTUNES et al., 2014).

The present study demonstrated a state of oxidative stress in the iron treated flies, as evidenced by a significant increase in RS and TBARS production with concomitant decrease in thiols levels, as well as in CAT, SOD and GST activities. Iron is a well-known inducer of reactive oxygen species (PARI et al., 2015). Iron (II) ion is oxidized to ferric (Fe III) in the presence of peroxide stimulates the Fenton reaction to form the hydroxyl radical (OH^\cdot) (WINTERBOURN, 1995). Oxidative stress, in turn, can trigger pathological changes in the central nervous system. In this study, treatment with hesperidin restored antioxidant defenses and prevented the oxidative damage. In this view, hesperidin presents a good scavenger to iron ions (SHACKELFORD et al., 2004) as well as anti-lipid peroxidation properties in biological membranes (SUAREZ et al., 1998). It also possesses highest reducing power, chelating activity on Fe^{2+} , hydrogen radical scavenging and hydrogen peroxide scavenging activities when compared with natural and synthetic antioxidants such as α -tocopherol, ascorbic acid, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and trolox (HUSSEIN and OTHMAN, 2011). PARI et al. (2015) demonstrated that Hsd had protective role in reducing toxic effects of oxidative damage induced by Fe in the liver and kidney in rats, which could be

a duo its antioxidant potential by scavenging free radicals, additionally Kang and Parvez (2015) showed that depletion of cellular levels of antioxidants was reduced by treatment with Hsd, leading to a reduction in oxidative markers, which clearly indicates antioxidant capacity of Hsd in brain of Wistar rats.

Flies exposed to Fe, in our study, showed a decrease in metabolic activity of dehydrogenases compared to the control group and Hsd, indicating that activity of dehydrogenases was compromised, resulting in high mortality of exposed flies to Fe over a period of 48 hours exposure. It is well established that free radicals and intermediate peroxidation products are capable of damaging the integrity of the membrane by changing its function and may lead to the development of several pathological processes. Other metals can lead to decrease on cell viability, Ternes et al. (2014) in their study showed decreased cell viability in flies exposed to manganese. An important result is that treatment with Hsd resulted in higher activity of dehydrogenases, a lower incidence of mortality of flies treated with Hsd, indicating the antioxidant capacity of Hsd compound, suggesting that suppression of free radicals lead a up-regulation of antioxidant status. Chen et al. (2010) demonstrated that hesperidin increases cellular antioxidant defense capacity through induction of HO-1 (hemoxygenase-1) through ERK/Nrf2 signaling. This induction can also increase the level of antioxidant enzymes such as CAT, SOD and GST.

An important result of this study is that hesperidin was effective in reduces iron level in the head of flies. It is well knowing that accumulation of Fe in tissues is the basis for cell damage. Fe preferentially binds to the membrane and disturb the redox state of the cells. Thus, the Fe retention time in tissues and increased oxidative state promoted by Fe may lead to a breakdown in the integrity of the membrane, and other pathological alterations (PARI et al., 2015). Several studies demonstrated the hability of hesperidin to chelate Fe and its antioxidant proprieties. Colpo et al. (2016) in their study demonstrated that the polyphenols present in the yerba mate showed metal chelating activity. In our study, we believe that the polyphenol components present in hesperidin may be acting as a metal chelator. Furthermore, the hydroxyl groups of hesperidin or its active metabolites can bind with Fe and increasing the excretion of Fe, which consequently reduces the Fe accumulation in the head of flies and reducing the toxic effects of Fe (PARI et al., 2015). The Fe levels on the body of flies was partially reduced by hesperidin treatment, this was probably due to the large amount of Fe (20 mM) present in the diet of flies.

In conclusion, hesperidin protects against induced toxicity by Fe, reducing of mortality, increasing activity locomotor, inhibition of lipid peroxidation, restoring the levels of dopamine

and acetylcholinesterase activity and increasing antioxidant status in *Drosophila melanogaster*. The protective action of hesperidin was partially associated with its actions to eliminate free radicals and its antioxidant potential.

5. Reference

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13934. AGO 1997. Água – Determinação de ferro – Método colorimétrico da ortofenantrolina.

ADEDARA, I. A., ABOLAJI, A. O., ROCHA, J. B., FAROMBI, E. O., 2016. Diphenyl Diselenide protects against mortality, locomotor deficits and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* model of manganese-induced neurotoxicity. *Neurochemical research*, 41(6), 1430-1438. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11064-016-1852-x>.

AEBI, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.

ANTUNES, M. S., GOES, A. T., BOEIRA, S. P., PRIGOL, M., Jesse, C. R., 2014. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. *Nutrition*, 30(11), 1415-1422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.024>.

ARAUJO, S. M., DE PAULA, M. T., POETINI, M. R., MEICHTRY, L., BORTOLOTTI, V. C., ZARZECKI, M. S., PRIGOL, M., 2015. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. *Neurotoxicology*, 51, 96-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.09.003>.

BELAIDI, A. A., BUSH, A. I., 2016. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of neurochemistry*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.13425/pdf>.

BONILLA-RAMIREZ, L. B., JIMENEZ-DEL-RIO, M., PARDO, C.V., 2011. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometals*. 24, 1045–1057. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10534-011-9463-0>.

BONILLA-RAMIREZ, L., JIMENEZ-DEL-RIO, M., VELEZ-PARDO, C., 2013. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: Implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Gene*, 512(2), 355-363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.120>.

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.* 72, 248–254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.027>.

CARLOS FILHO, B., DEL FABBRO, L., DE GOMES, M. G., GOES, A. T., SOUZA, L. C., BOEIRA, S. P., JESSE, C. R., 2013. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *European journal of pharmacology*, 698(1), 286-291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.003>.

CHEN, M. C., YE, Y. Y., JI, G., LIU, J. W., 2010. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(6), 3330-3335. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf904549s>

CHONG, T.T., BONNELLE, V., MANOHAR, S., VEROMANN, K.R., MUHAMMED, K., TOFARIS, G.K., HU, M., HUSAIN, M., 2015. Dopamine enhances willingness to exert effort for reward in Parkinson's disease. *Cortex* 69, 40–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2015.04.003>.

COULOM, H., BIRMAN, S., 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>

COLPO, A. C., ROSA, H., LIMA, M. E., PAZZINI, C. E. F., CAMARGO, V. B., BASSANTE, F. E., FOLMER, V., 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food chemistry*, 209, 185-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>

DALPIAZ, A., FILOSA, K., CAPRARIIS, P., CONTE, G., BORTOLOTTI, F., BIONDI, C., PAVAN, B., 2007. Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycosyl conjugate. *Int. J. Pharm.* 336, 133–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.051>.

DIMPFEL, W., 2006. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in vitro. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58, n. 3, 375-379. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/jpp.58.3.0012/epdf>

DONATO, F., DE GOMES, M. G., GOES, A. T. R., BORGES FILHO, C., DEL FABBRO, L., ANTUNES, M. S., JESSE, C. R., 2014. Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: Possible role of L-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. *Brain research bulletin*, 104, 19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.03.004>

ELLMAN, A., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

ELLMANN, G.E., COURTNEY, K.D., ANDERSON, V., 1961. A new calorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

FRANCO, J. L., POSSER, T., DUNKLEY, P. R., DICKSON, P. W., MATTOS, J. J., MARTINS, R., FARINA, M., 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 449-457. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013>

FRANCO, J. L., TREVISAN, R., POSSER, T., TRIVELLA, D. B., HOPPE, R., ROSA, J. M., MARQUES, M. R. F., 2010. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and environmental safety*. v. 73, n. 5, p. 864-872. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.03.002>

GARG, A., GARG, S., ZANEVELD, L. J. D., SINGLA, A. K., 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 8, p. 655-669. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1074/epdf>

GAUR, V., KUMAR, A., 2010. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacological Reports*, v. 62, n. 4, p. 635-648. [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70321-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70321-2)

HABIG, W. H., PABST, M. J., JAKOBY, W. B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139. <http://www.jbc.org/content/249/22/7130.short>

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 481-504. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

HATTORI, N., WANG, M., TAKA, H., FUJIMURA, T., YORITAKA, A., KUBO, S. I., MOCHIZUKI, H., 2009. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 15, S35-S38. [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70010-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70010-0)

HIRTH, F., 2010. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 504–523. <http://dx.doi.org/10.2174/187152710791556104>.

HOSAMANI, R., MURALIDHARA., 2013. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Arch. Insect Biochem. Physiol. 83 (1), 25–40. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.21094>.

HUSSEIN, M. A.; OTHMAN, S. M. Structure activity relationship of antioxidative property of hesperidin. International Journal of Pharmaceutical Research and Development, v. 3, n. 8, p. 19-29, 2011.

JAHROMI, S. R., HADDADI, M., SHIVANANDAPPA, T., RAMESH, S. R., 2015. Attenuation of neuromotor deficits by natural antioxidants of *Decalepis hamiltonii* in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. Neuroscience, 293, 136-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.048>.

JIMENEZ DEL-RIO, M., MARTINEZ, C., PARDO, C.V., 2010. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. Neurochem. Res. 35, 227–238. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-009-0046-1>.

JOMOVA, K., VALKO, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology, 283(2), 65-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>

KAMARAJ, S., A. P., JAGAN, S., RAMAKRISHNAN, G., DEVAKI, T., 2010. Modulatory effect of hesperidin on benzo (a) pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. European journal of pharmacology, 649(1), 320-327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.017>

KAMISLI S., CIFTCI O., KAYA K., CETIN A., KAMISLI O., OZCAN C., 2013. Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin-induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats. Toxicol Ind Health. <http://dx.doi:10.1177/0748233713483192>.

KHAN, M. H. A., PARVEZ, S., 2015. Hesperidin ameliorates heavy metal induced toxicity mediated by oxidative stress in brain of Wistar rats. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 31, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.03.002>

KOSTYUK, V.A., POTAPOVICH, A.I., 1989. Superoxide driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. Biochem. Int. 19, 117–1124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.03.014>.

LAN, A. P. et al. The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *BioMetals*, v. 29, n. 4, p. 665-678, 2016. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10534-016-9942-4>

LEE, J., 2016. Mitochondrial drug targets in neurodegenerative diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(3), 714-720. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.032>

LEV, A. I., 2013. *Transgender emergence: Therapeutic guidelines for working with gender-variant people and their families*. Routledge.

LUCHESE, K. F., KITAMURA, S., MOURÃO, L. F., 2015. Dysphagia progression and swallowing management in Parkinson's disease: an observational study. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 81(1), 24-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.09.006>

MENON, A. V., CHANG, J., KIM, J., 2016. Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. *Toxicology*, 339, 58-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.11.001>

NATHIYA, S., RAJARAM, S., ABRAHAM, P. Hesperidin alleviates antitubercular drug induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver. *International Journal of Biomedical Research*, v. 7, n. 7, p. 439-446, 2016. <http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v7i7.3414>

OHAKAWA, H., OHISHI, U., YAGI, K., 1979. Assay of lipid peroxidation in rat tissues by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* 95, 145-149. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

ORTEGA-ARELLANO, H., F., JIMENEZ-DEL-RIO, M., VELEZ-PARDO, C., 2011. Life span and locomotor activity modification by glucose and polyphenols in *Drosophila melanogaster* chronically exposed to oxidative stress-stimuli: implications in Parkinson's disease. *Neurochemical research*, v. 36, n. 6, p. 1073-1086. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11064-011-0451-0>

OZTANIR, M. N., CIFTCI, O., CETIN, A., ALADAG, M. A., 2014. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurological Sciences*, 35(9), 1393-1399. doi:10.1007/s10072-014-1725-5

PARHIZ, H. R. A., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323-331. Doi: 10.1002/ptr.5256

PARI, L., KARTHIKEYAN, A., KARTHIKA, P., RATHINAM, A., 2015. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Toxicology Reports*, 2, 46-55.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.11.003>

PAULA, M. T., ZEMOLIN, A. P., VARGAS, A. P., GOLOMBIESKI, R. M., LORETO, E. L. S., SAIDELLES, A. P., MERRITT, T. J. S., 2014. Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in *D. melanogaster*. *Environmental toxicology*. v. 29, n. 6, p. 621-630. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.21788/epdf>

PÉREZ-SEVERIANO, F., SANTAMARIA, A., PEDRAZA-CHAVERRI, J., MEDINA-CAMPOS, O.N., RIOS, 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.* v. 29 (4), 729–733.
<http://dx.doi.org/10.1023/B:NERE.0000018843.83770.4b>

PIETRANGELO, A., 2016. Mechanisms of iron hepatotoxicity. *Journal of hepatology*, 65(1), 226-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.037>

PIETTA, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np9904509>

ROOHBAKHSH, A., PARHIZ, H., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M., 2014. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—a mini-review. *Life sciences*, 113(1), 1-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.029>

ROSS J.A., KASUM C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* v. 22:19–34. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957

SALAZAR, R. F. S., CARROCCI, J. S., T. K. ANDRADE, MARCIEL, R. F., BRANDÃO, J. J., GUIMARÃES, O. L., IZÁRIO FILHO, H. J., 2008. Validação do método fenantrolina para determinação de íon ferroso em efluente lácteo por análise comparativa. Em: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO. 2008. Anais, São José dos Campos, SP.

SHACKELFORD, R. E., MANUSZAK, R. P., JOHNSON, C. D., HELLRUNG, D. J., LINK, C. J., WANG, S., 2004. Iron chelators increase the resistance of Ataxia telangeictasia cells to oxidative stress. *DNA repair*, 3(10), 1263-1272.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.01.015>

SHULMAN, J. M., DE JAGER, P. L., FEANY, M. B., 2011. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 193-222. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130242

SIQUEIRA E., ALMEIDA S.G., ARRUDA S., 2006. Papel adverso do sulfato ferroso. *Comun Ciênc Saúde*. v. 17(3):229-36, 2006. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130242

SUAREZ, J.; HERRERA, M. D.; MARHUENDA, E., 1998. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neo hesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*, v. 5, n. 6, p. 469-473. [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80044-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80044-5)

TERNES, A. P. L., ZEMOLIN, A. P., DA CRUZ, L. C., DA SILVA, G. F., SAIDELLES, A. P. F., DE PAULA, M. T., PEREIRA, A. B., 2014. *Drosophila melanogaster* an embryonic model for studying behavioral and biochemical effects of manganese exposure. *EXCLI journal*, 13, 1239.

WEST, R. J., ELLIOTT, C. J., WADE, A. R., 2015. Classification of Parkinson's disease genotypes in *Drosophila* using spatiotemporal profiling of vision. *Scientific reports*, 5. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsrep16933>

WINTERBOURN, Christine C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology letters*, v. 82, p. 969-974. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)

Legends:

Fig. 1. Effect of Hesperidin (Hsd) on survival of the flies exposed to ferrous sulphate (Fe). Data were collected every 24 hours from each group were submitted to 48 hours of exposure (n = 50 flies per experiment, four different experiments were performed). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to the control group; # Significant difference between Fe and Fe + Hsd (p < 0.05).

Fig. 2. Effect of Hsd in response to geotaxis (climbing) and exploratory activity in flies exposed to Fe in 48 hours. Graphic **A**) assay negative geotaxis, **B**) negative geotaxis test base/top and **C**) open field test (n = 20 flies per experiment, four different experiments were performed). Values are mean ± standard deviation. It was used in the statistical analysis of variance (ANOVA) followed by two-way Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # Significant difference between Fe and Hsd + Fe (p< 0.05).

Fig. 3. Effect of hesperidin (Hsd) in alterations induced for Fe in activity of acetylcholinesterase (AChE) in adult *Drosophila melanogaster*. The AChE activity was determined in two structure: head (A) and body (B) Effect of Hsd in alterations induced for Fe, in the graphic (A) protein thiols and graphic (B) content of nonprotein thiols homogenate. The results were expressed as a percentage (%) of the control group (mean ± standard deviation and p<0.05). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe (p< 0.05).

Fig. 4. Effect of Hsd in alterations induced for Fe in activity of dopamine levels in the head of adult *Drosophila melanogaster*. Values are mean ± SE (n = 20 flies per replicate, four replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between Fe and Fe+ Hsd (p < 0.05).

Fig. 5. Effect of Hsd exposure to Fe flies for 48 hours, cell viability by MTT. The graph (A) mitochondrial cell viability and graph (B) cell viability. Values are mean ± standard deviation (n = 50 flies per replicate, four replications were used). *Significant difference in the control

group; # significant difference between Fe and Hsd + Fe groups. The results were displayed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and $p > 0.05$).

Fig. 6. Effect of Hsd homogenate flies treated with Fe on assay cell viability performed by reduction with resazurin. Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate, four treatments were performed). Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between Fe and Hsd + Fe groups. The results were expressed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and $p < 0.05$).

Fig. 7. Effect Hsd for 48 hours in alterations induced for Fe, in endogenous markers of oxidative stress. The graphic (A) reactive species levels (RS), and (B) levels of lipid peroxidation (LPO). Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate, four treatments were performed). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

Fig. 8. Effect Hsd for 48 hours Fe induced changes in antioxidant enzyme activities in the entire body homogenate *Drosophila melanogaster* adult male. The graphic (A) glutathione S-transferase (GST), (B) superoxide dismutase (SOD) and (C) catalase (CAT). Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate four treatment were performed). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

Fig. 9. Effect of Hsd in alterations induced for Fe, in the graphic (A) protein thiols and graphic (B) content of nonprotein thiols homogenate. The results were expressed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and $p < 0.05$). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

Fig. 10. Quantification of Fe in body (A) and head (B) the flies in both of groups: Hsd + Fe and Fe. The values were expressed (ng metal/g wet mass). * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

Figures:

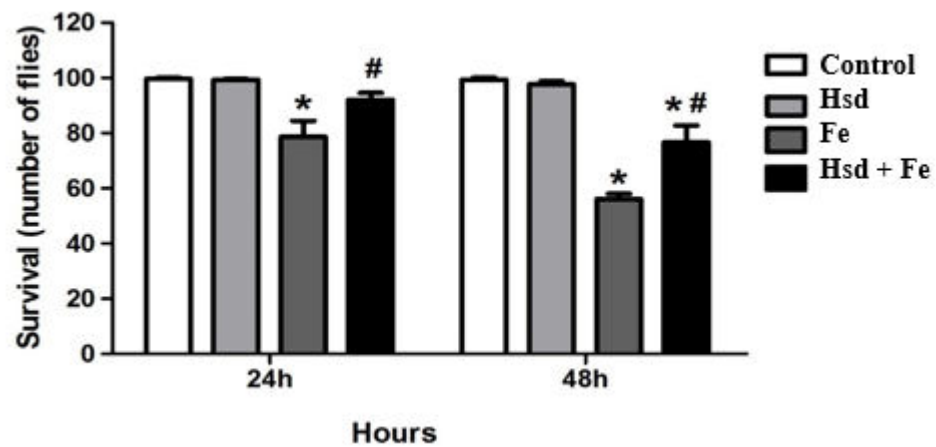


Fig. 1. Effect of Hesperidin (Hsd) on survival of the flies exposed to Fe. Data were collected every 24 hours from each group were submitted to 48 hours of exposure (n = 50 flies per experiment, three experiments were performed for group). The survival measure was determined by comparing the survival curve. * Significant difference from the control group, # difference between Fe and Hsd + Fe.

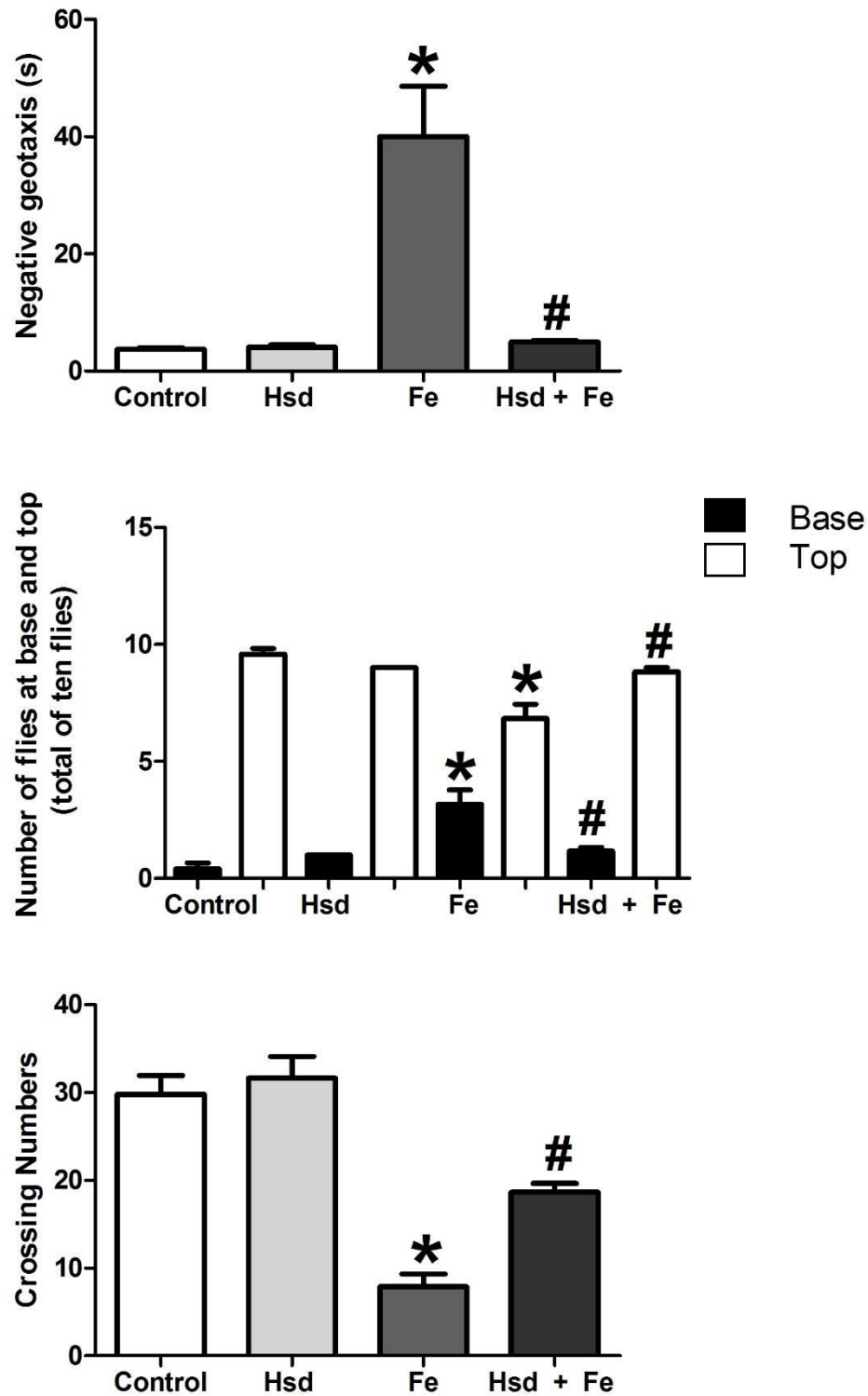


Fig. 2. Effect of Hsd in response to geotaxis (climbing) and exploratory activity in flies exposed to Fe in 48 hours. Graphic **A)** assay negative geotaxis, **B)** negative geotaxis test base/top and **C)** open field test (n = 20 flies per experiment, four different experiments were performed). Values are mean \pm standard deviation. It was used in the statistical analysis of variance

(ANOVA) followed by two-way Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # Significant difference between Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

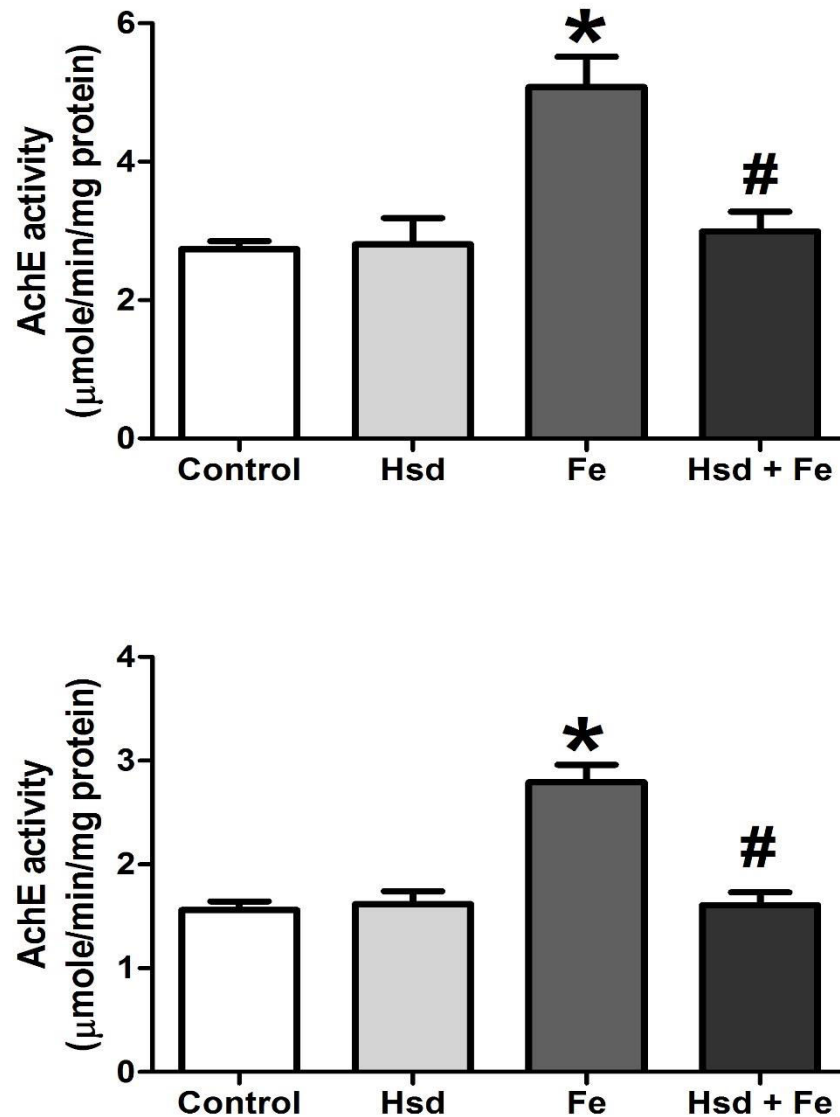


Fig. 3. Effect of hesperidin (Hsd) in alterations induced for Fe in activity of acetylcholinesterase (AChE) in adult *Drosophila melanogaster*. The AChE activity was determined in two structure: head (A) and body (B). Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per sample, used four replicates). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference in relation to the control group; # Significant difference between Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

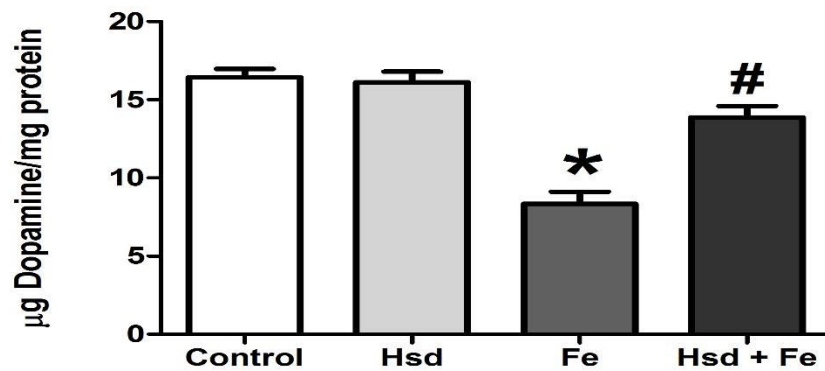


Fig. 4. Effect of Hsd in alterations induced for Fe in activity of dopamine levels in the head of adult *Drosophila melanogaster*. Values are mean \pm SE (n = 20 flies per replicate, four replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to the control group; # Significant difference between Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

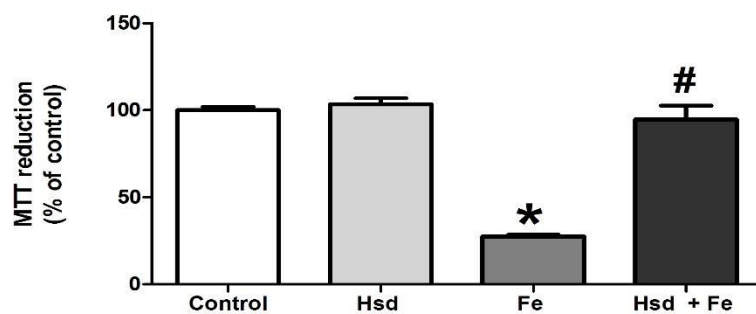
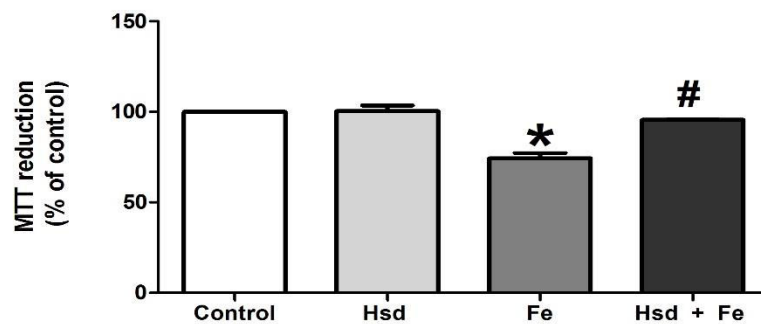


Fig. 5. Effect of Hsd exposure to Fe flies for 48 hours, on the metabolic activity and dehydrogenase activity in total homogenate of flies. The graph (A) metabolic activity by MTT assay and graph (B) activity cell. Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate, four replications were used). *Significant difference in the control group; # significant difference between Fe and Hsd + Fe groups. The results were displayed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and $p < 0.05$).

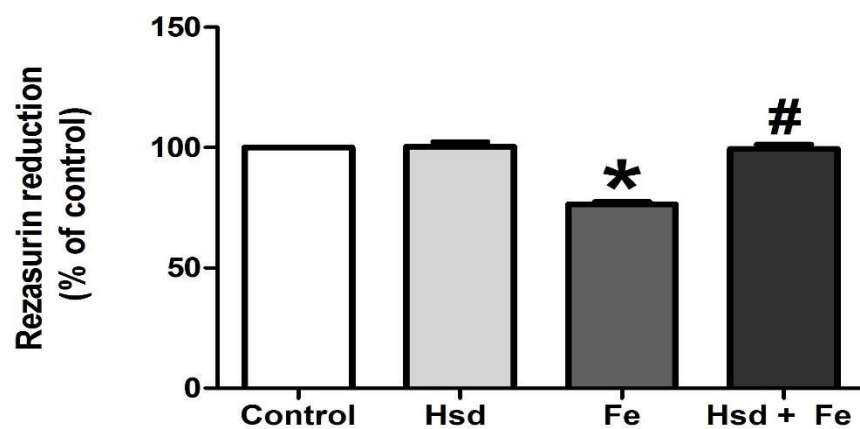


Fig. 6. Effect of Hsd homogenate flies treated with Fe on assay cell viability performed by reduction with resazurin. Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate, four treatments were performed). Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between Fe and Hsd + Fe groups. The results were expressed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and $p < 0.05$).

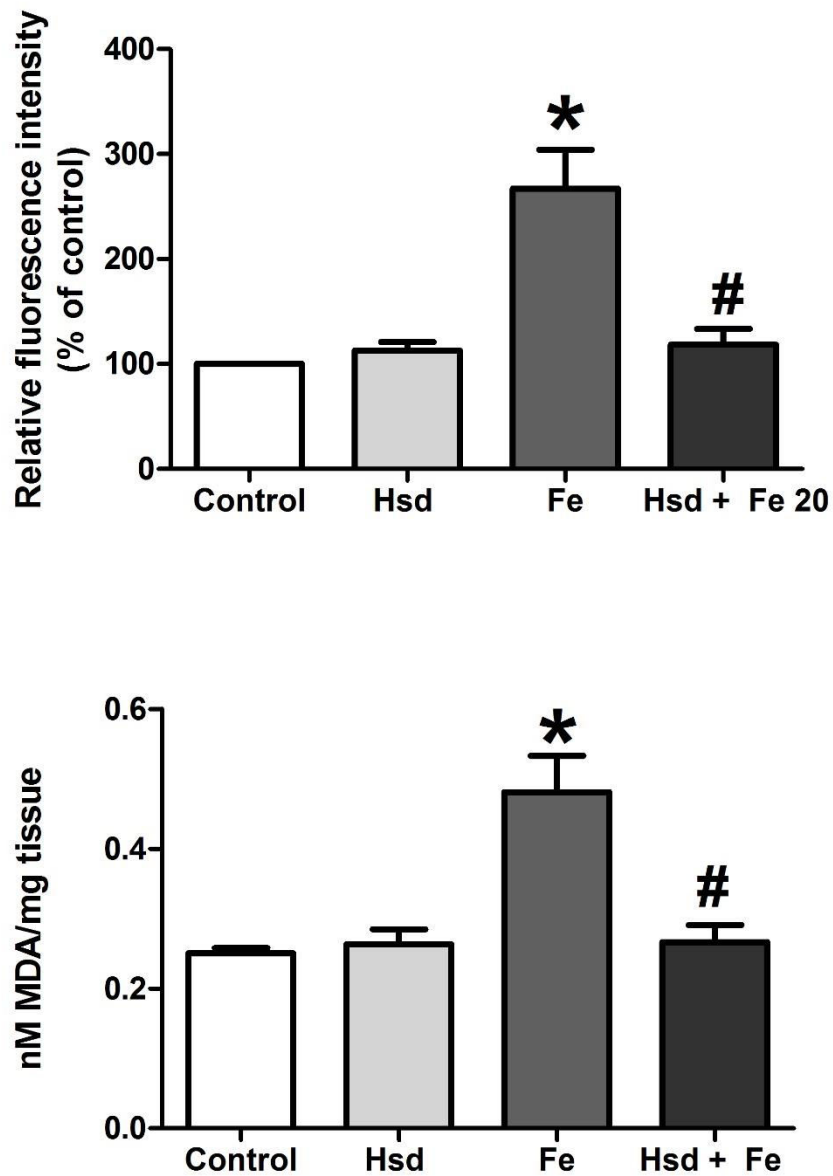


Fig. 7. Effect Hsd for 48 hours in alterations induced for Fe, in endogenous markers of oxidative stress. The graphic (A) reactive species levels (RS), and (B) levels of lipid peroxidation (LPO). Values are mean \pm standard deviation ($n = 50$ flies per replicate, four treatments were performed). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

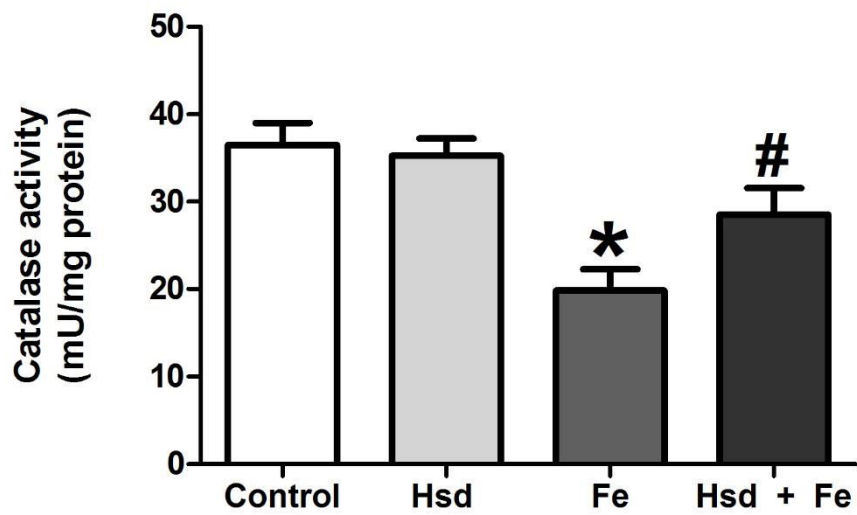
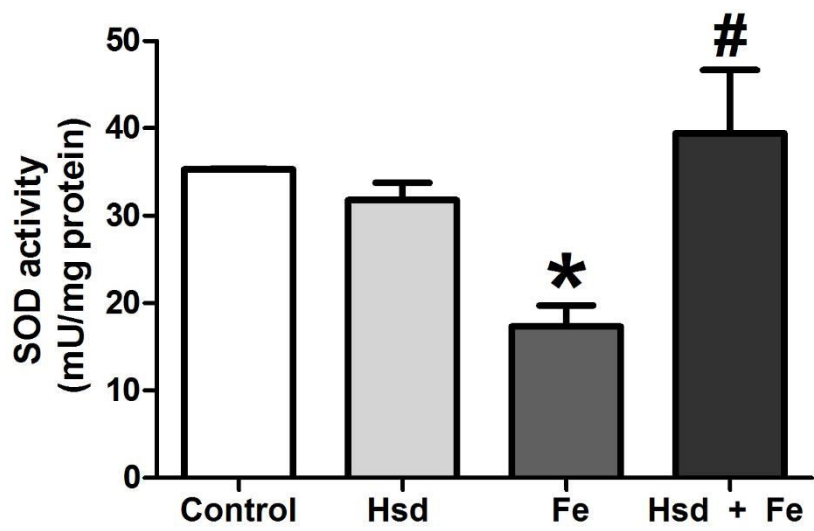
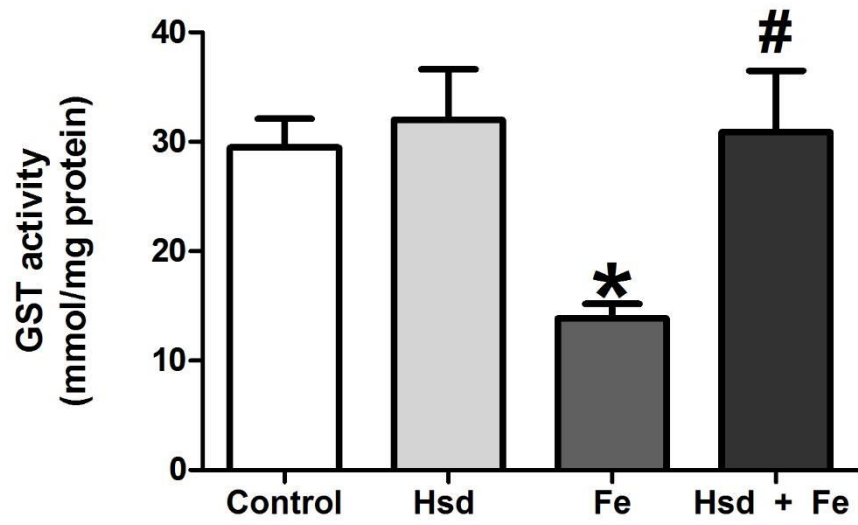


Fig. 8. Effect Hsd for 48 hours Fe induced changes in antioxidant enzyme activities in the entire body homogenate *Drosophila melanogaster* adult male. The graphic (A) glutathione S-transferase (GST), (B) superoxide dismutase (SOD) and (C) catalase (CAT). Values are mean \pm standard deviation (n = 50 flies per replicate four treatment were performed). The significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe (p<0.05).

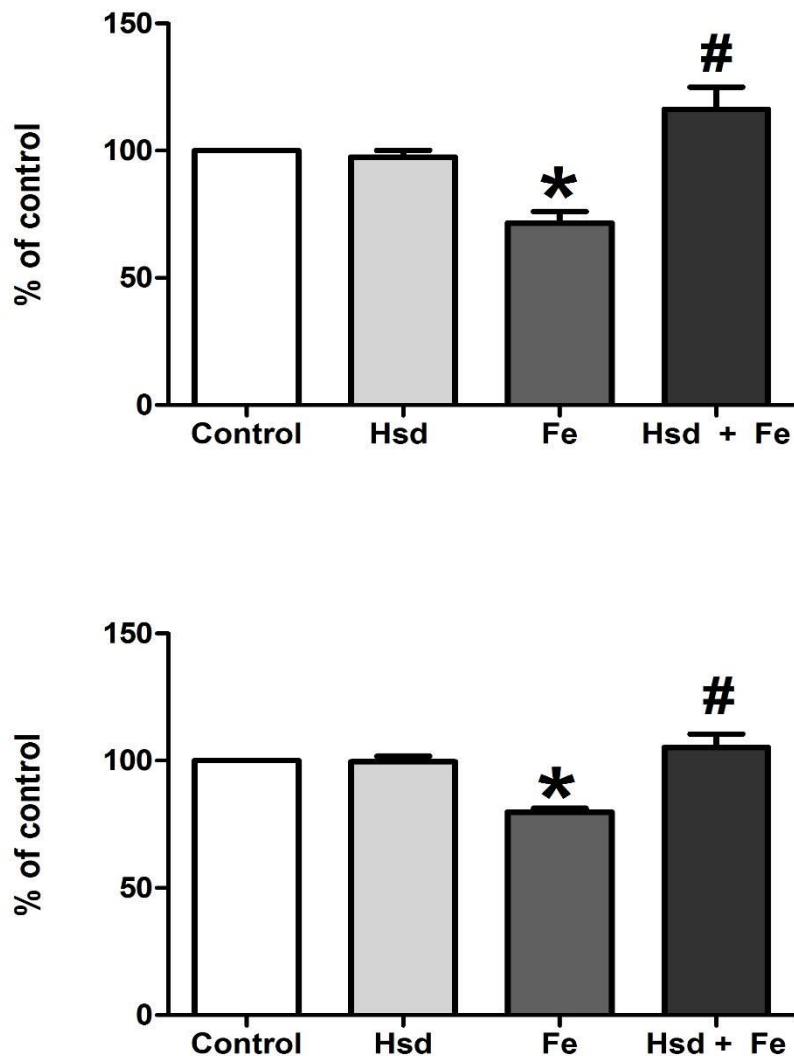


Fig. 9. Effect of Hsd in alterations induced for Fe, in the graphic (A) protein thiols and graphic (B) content of nonprotein thiols homogenate. The results were expressed as a percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation and p<0.05). The significance was determined

by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

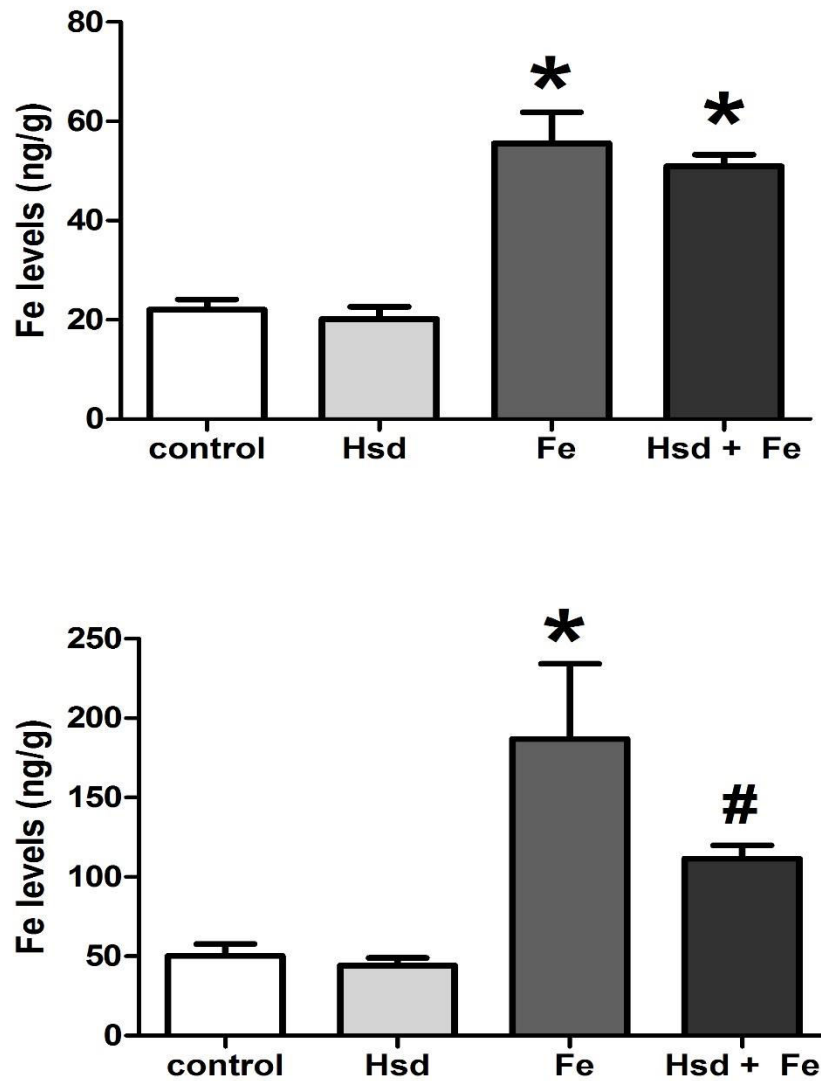


Fig. 10. Quantification of iron in body (graph A) and head (graph B) the flies in both of groups: Hsd + Fe and Fe. The values were expressed (ng metal/g wet mass). * Significant difference compared to the control group; # significant difference between the groups Fe and Hsd + Fe ($p < 0.05$).

6. CONCLUSÕES

Em nosso estudo observamos que a hesperidina protegeu contra a toxicidade induzida pelo ferro, reduzindo a mortalidade, aumentando a atividade locomotora e os níveis de dopamina, restaurando a atividade da acetilcolinesterase, inibindo a peroxidação lipídica e aumentando o status antioxidante em *Drosophila melanogaster*. A ação protetora da hesperidina foi associada com suas ações de eliminação de radicais livres, quelante do metal ferro e antioxidante.

7. PERSPECTIVAS

A fim de obter um melhor entendimento a respeito dos mecanismos de ação da hesperidina e da hesperitina em *Drosophila melanogaster*, este trabalho terá continuidade no doutorado.

Avaliar os efeitos pré e pós-tratamento com hesperidina e hesperitina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e neuroquímicos em *Drosophila melanogaster* expostas ao ferro.

Avaliar outros metais como o manganês e o cobre submetido a um tratamento agudo e crônico nos modelos experimentais de *Drosophila melanogaster* e camundongos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARONE, Maria Cecilia; BOHMANN, Dirk. Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 74, p. e50339-e50339, 2013.

BARZILAI, Ari; MELAMED, Eldad. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 3, p. 126-132, 2003.

BELAIDI, Abdel A.; BUSH, Ashley I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, 2016.

BELLEN, Hugo J.; TONG, Chao; TSUDA, Hiroshi. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 514-522, 2010.

BEN-SHACHAR, D.; YODIM, M. B. H. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical “parkinsonism” in rats. **Journal of neurochemistry**, v. 57, n. 6, p. 2133-2135, 1991.

BERG, Daniela; YODIM, Moussa BH. Role of iron in neurodegenerative disorders. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 17, n. 1, p. 5-17, 2006.

BONILLA-RAMIREZ, Leonardo; JIMENEZ-DEL-RIO, Marlene; VELEZ-PARDO, Carlos. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. **Biometals**, v. 24, n. 6, p. 1045-1057, 2011.

BONILLA-RAMIREZ, Leonardo; JIMENEZ-DEL-RIO, Marlene; VELEZ-PARDO, Carlos. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: Implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 355-363, 2013.

BRAAK, Heiko; DEL TREDICI, Kelly. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, n. 20, p. 1916-1925, 2008.

BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROWN, David R. α -Synuclein as a ferrireductase. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 6, p. 1513-1517, 2013.

CHAUDHURI, Anathbandhu et al. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 10, p. 2457-2467, 2007.

COSTA, Neuza M. Brunoro, ROSA, Carla de Oliveira Barbosa. **Alimentos funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro. Editora Rubio, p. 59-73, 2010.

COULOM, Hélène; BIRMAN, Serge. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10993-10998, 2004.

COZZOLINO, Silvia M. Franciscato. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4ª ed. Atual. e amp. Barueri, SP: Manole, p. 645- 673, 2012.

CROZIER, Alan; JAGANATH, Indu B.; CLIFFORD, Michael N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

CUNHA, Daniel Ferreira da et al. Microminerais. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda, p. 142-143, 1998.

DAVIES, Paul; MOUALLA, Dima; BROWN, David R. Alpha-synuclein is a cellular ferrireductase. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15814, 2011.

DEL RÍO, Marlene Jiménez; VÉLEZ-PARDO, Carlos. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an *in vitro* model for neurodegeneration. **Archives of medical research**, v. 35, n. 3, p. 185-193, 2004.

DICK, Finlay D. et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 64, n. 10, p. 666-672, 2007.

DIMPFEL, Wilfried. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 375-379, 2006.

DOLINSK, Manuela. **Nutrição Funcional**. São Paulo: editora Roca, 2009.

FANG et al. L-DOPA neurotoxicity is mediated by up-regulation of DMT1– IRE expression. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4593, 2009.

FEANY, Mel B.; BENDER, Welcome W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 394-398, 2000.

FERNADEZ, Liana L.; FORNARI, Luis H. T.; BARBOSA, Malu V. Ferro e neurodegeneração. **Sci. med**, v. 17, n. 4, p. 218-224, 2007.

FLEMING, Robert E.; SLY, William S. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. 1, p. 663-680, 2002.

FUHRMAN, Bianca; AVIRAM, Michael. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current opinion in lipidology**, v. 12, n. 1, p. 41-48, 2001.

GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

GOEDERT, Michel et al. 100 years of Lewy pathology. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, p. 13-24, 2013.

GROOT, H. de; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 249-255, 1998.

GROPPER, Sareen S.; SMITH, Jack I.; GROFF, James L. **Nutrição avançada e metabolismo humano**. São Paulo: Cengage learning, p. 472-491, 2011.

GROTTO, Helena ZW et al. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2008.

GUINEY, Stephanie J. et al. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, 2017.

HARBORNE, Jeffrey B.; WILLIAMS, Christine A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HATTORI, Nobutaka et al. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 15, p. S35-S38, 2009.

HEATH, Anne-Louise M.; FAIRWEATHER-TAIT, Susan J. Health implications of iron overload: the role of diet and genotype. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 2, p. 45-62, 2003.

IRWIN, David J.; LEE, Virginia M.-Y.; TROJANOWSKI, John Q. Parkinson's disease dementia: convergence of [alpha]-synuclein, tau and amyloid-[beta] pathologies. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 626-636, 2013.

JIMENEZ-DEL-RIO, Marlene.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochemical research**, v. 35, n. 2, p. 227-238, 2010.

JONES, Douglas C.; MILLER, Gary W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: a possible role in drug addiction. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 569-581, 2008.

KAKADIYA, Jagdish; MULANI, Haresh; SHAH, Nehal. Protective effect of hesperidin on cardiovascular complication in experimentally induced myocardial infarction in diabetes in rats. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 85, 2010.

KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, Venugopal P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 323, n. 1-2, p. 21-29, 2009.

KAMISLI, Suat et al. Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin-induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 9, p. 841-851, 2015.

KATZENSCHLAGER, Regina; LEES, Andrew J. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 2, p. ii19-ii24, 2002.

KE, Ya; QIAN, Zhong Ming. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 4, p. 246-253, 2003.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LIMA, Susana Q.; MIESENBOCK, Gero. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. **Cell**, v. 121, n. 1, p. 141-152, 2005.

MANACH, Claudine et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANACH, Claudine; DONOVAN, Jennifer L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free radical research**, v. 38, n. 8, p. 771-785, 2004.

MANTHEY, John A.; GUTHRIE, Najla; GROHMANN, Karel. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

MCCARTHY, Ryan C.; KOSMAN, Daniel J. Iron transport across the blood–brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 4, p. 709-727, 2015.

MCGURK, Leeanne; BERSON, Amit; BONINI, Nancy M. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 377-402, 2015.

METODIEWA, Diana; KOCHMAN, Agata; KAROLCZAK, Stefan. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl ethers of flavone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action. **IUBMB Life**, v. 41, n. 5, p. 1067-1075, 1997.

MONASTIRIOTI, Maria. Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Microscopy research and technique**, v. 45, n. 2, p. 106-121, 1999.

MOOS, Torben; MORGAN, Evan H. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, n. 1, p. 14-26, 2004.

MORGAN, Thomas Hunt; BRIDGES, C. B.; STURTEVANT, A. H. The genetics of *Drosophila melanogaster*. **Bibliophia genet**, v. 2, p. 1-262, 1925.

NÚÑEZ-SELLÉS, Alberto J. Antioxidant therapy: myth or reality?. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

- OBESO, Jose A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 653-661, 2010.
- OSTREROVA-GOLTS, Natalie et al. The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 6048-6054, 2000.
- PARHIZ, Hamideh et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 323-331, 2015.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PONKA, Prem. Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, n. 1, p. 267-281, 2004.
- QIAN, Zhong Ming; WANG, Qin. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. **Brain Research Reviews**, v. 27, n. 3, p. 257-267, 1998.
- RESH, Vincent H.; CARDÉ, Ring T. **Encyclopedia of Insects**. Second edition, p. 301-303, 2009.
- ROSS, Julie A.; KASUM, Christine M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.
- ROOTE, John; PROKOP, Andreas. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 3, n. 2, p. 353-358, 2013.
- ROUAULT, Tracey A.; COOPERMAN, Sharon. Brain iron metabolism. In: **Seminars in pediatric neurology**. WB Saunders, 2006. p. 142-148.
- ROUGHEAD, Zamzam K. Fariba; ZITO, Carol A.; HUNT, Janet R. Initial uptake and absorption of nonheme iron and absorption of heme iron in humans are unaffected by the addition of calcium as cheese to a meal with high iron bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 2, p. 419-425, 2002.

SAID, Ussama Z. et al. Hesperidin attenuates brain biochemical changes of irradiated rats. **International journal of radiation biology**, v. 88, n. 8, p. 613-618, 2012.

SALAZAR, Julio et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18578-18583, 2008.

SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHMIDT, M. B. Störungen des Eisenstoffwechsels und ihre Folgen. **Ergebn. allg. Path. path. Anat**, v. 35, p. 105-208, 1940.

SENGSTOCK, Gregory John et al. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. **Experimental neurology**, v. 130, n. 1, p. 82-94, 1994.

SEUGNET, Laurent et al. Persistent short-term memory defects following sleep deprivation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. **Sleep**, v. 32, n. 8, p. 984, 2009.

SHAYEGHI, Majid et al. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 789-801, 2005.

SIAN-HÜLSMANN, Jeswinder et al. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 118, n. 6, p. 939-957, 2011.

SIQUEIRA, Egle M. A. S., ALMEIDA, Simone G., ARRUDA, Sandra. Papel adverso do sulfato ferroso. **Comun Ciênc Saúde**. v. 17(3):229-36, 2006.

SOUZA, Verônica T. et al. Characterization of the antioxidant activity of aglycone and glycosylated derivatives of hesperetin: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 2, p. 80-87, 2016.

SUAREZ, J.; HERRERA, M. D.; MARHUENDA, E. *In vitro* scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. **Phytomedicine**, v. 5, n. 6, p. 469-473, 1998.

SUN, Yujing et al. Phytochemical profile and antioxidant activity of physiological drop of citrus fruits. **Journal of food science**, v. 78, n. 1, p. C37-C42, 2013.

TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; CLIFFORD, Michael N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1073-1080, 2000.

TRINH, Kien et al. Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 465-472, 2008.

TRIPOLI, Elisa et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

WANG, Danling et al. Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 36, p. 13520-13525, 2006.

WHITE, Katherine E.; HUMPHREY, Dickon M.; HIRTH, Frank. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. **Frontiers in neuroscience**, v. 4, p. 205, 2010.

WHITNEY, Ellie; ROLFES, Sharon R. **Entendendo os nutrientes**. São Paulo: Cengage Learning, p. 269-278, 2008.

WILMSEN, Patrícia Kelly; SPADA, Dalla Santa; SALVADOR, Mirian. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4757-4761, 2005.

WU, Laura Jui-chen et al. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood–brain barrier. **Brain research**, v. 1001, n. 1, p. 108-117, 2004.

YELLMAN, Chris et al. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 94, n. 8, p. 4131-4136, 1997.

YOUDIM, Moussa BH. Rasagiline: an anti-Parkinson drug with neuroprotective activity. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 3, n. 6, p. 737-749, 2003.

ZHANG, Xuesheng et al. Cytokine toxicity to oligodendrocyte precursors is mediated by iron. **Glia**, v. 52, n. 3, p. 199-208, 2005.

ZHU, Zhou-Jing et al. Differential interaction between iron and mutant alpha-synuclein causes distinctive Parkinsonian phenotypes in *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 4, p. 518-525, 2016.