



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Stífani Machado Araujo

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

**EFEITO PROTETOR DO γ -ORIZANOL EM UM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster***

por

Stífani Machado Araujo

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 **Mestre em Bioquímica**.

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

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

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

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) .

A
AR663e Araujo, Stifani Machado
EFEITO PROTETOR DO γ -ORIZANOL EM UM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster* /
Stifani Machado Araujo.
58 p.
Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2016.
"Orientação: Marina Prigol".
1. γ -orizanol. 2. neuroprotetor. 3. rotenona. 4. *Drosophila*
melanogaster. 5. dopamina. I. Título.

STÍFANI MACHADO ARAUJO

**EFEITO PROTETOR DO γ -ORIZANOL EM UM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA 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 **Mestre em Bioquímica**.

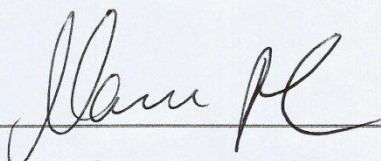
Orientadora: **Prof.^a. Dr.^a. Marina Prigol**

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

Área de concentração: Bioquímica Farmacêutica
e Toxicológica

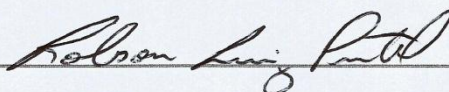
Dissertação defendida e aprovada: 19 de fevereiro de 2016

Banca examinadora



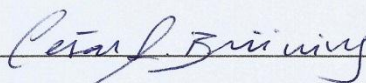
Prof.^a. Dr.^a. Marina Prigol

Orientador (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Robson Luiz Puntel

(UNIPAMPA)



Dr. César Augusto Brüning

(UFSM)

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, André e Maria Tereza.
Ao meu irmão, Smalei, e a toda a minha família, meus exemplos e maiores
incentivadores, fontes inesgotáveis de inspiração, amor e compreensão, que me
ensinaram, que é possível chegar sempre, aonde quer que seja, quando se deseja com
o coração.

DEDICATÓRIA

À meu amado noivo, Evandro.

Que desde o princípio desta caminhada tem estado ao meu lado em amor,
auxiliando-me em tudo e complementando-me emocional e espiritualmente.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida,

Por sempre me concederem sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À meus mestres

Minha mãe Maria Tereza, meu pai André pelo amor e ensinamentos que me mostraram a direção correta, a nunca desanimar, me ensinaram a ter fé. Amo vocês para sempre.

À minha orientadora

Professora Dr^a Marina Prigol a quem eu agradeço por todo conhecimento transmitido, obrigada pelos seus ensinamentos científicos e filosóficos, pelos conselhos, pela confiança em meu esforço, e por ser esse exemplo de profissional e de mulher, ao qual me inspiras.

À meu co-orientador

Professor Dr^o Cristiano Ricardo Jesse, que foi instrumento de transmissão de valiosos aprendizados, que me acompanha desde o início da graduação, obrigada pelos contínuos ensinamentos de cunho científico e pessoal.

À equipe LaftamBio Pampa

As queridas “Marinetes”, Mariane Trindade de Paula, Marcia Rósula Poetini, Luana Meitchry, Vandrezza Cardozo Bortolotto e Bianca Bertolazi, que mergulharam comigo nesse projeto, pelo imenso auxílio, pelos ensinamentos, e pelos indescritíveis momentos de alegria.

À minhas queridas amigas e colegas de profissão

Amigas incondicionais Micheli Zarzecki, Édna Gomes e Laura Virgili, obrigada pelo apoio, pelas palavras de conforto nas horas difíceis e por todos esses anos de amizade e cumplicidade, amo vocês.

Ào Professor Dr^o Mauro Oliveira

Que juntamente com o Professor Cristiano Jesse me inseriram no fascinante ramo da pesquisa, acreditando desde o princípio em meu potencial.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

EFEITO PROTETOR DO γ -ORIZANOL EM UM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM *Drosophila melanogaster*

Autora: Stéfani Machado Araujo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina PrigolCoorientador: Prof. Dr^o. Cristiano Ricardo Jesse

Local e Data da defesa: Uruguaiana, 19 de fevereiro de 2016

Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, afetando cerca de 1% dos adultos com mais de 60 anos. A DP está relacionada com a degeneração de neurônios dopaminérgicos principais componentes da substância negra cerebral, concomitantemente, com a disfunção do complexo I mitocondrial e o estresse oxidativo que desempenham um papel crucial na patogênese desta doença. A rotenona (ROT) é um pesticida natural e muito utilizado para induzir fenótipo de DP em modelos animais, por ser lipofílico pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica causando disfunção do complexo I mitocondrial e possível morte de neurônios dopaminérgicos. Dentre as várias aplicações terapêuticas dos antioxidantes, ressalta-se sua ação neuroprotetora, uma vez que o sistema nervoso central exibe uma maior vulnerabilidade e susceptibilidade aos insultos oxidativos, o γ -orizanol (ORY) é um produto natural composto por uma mistura de ésteres de ácido ferúlico extraídos a partir do óleo de farelo de arroz, e é bem descrito na literatura por possuir propriedades antioxidantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar um possível efeito neuroprotetor do γ -orizanol sobre alterações comportamentais e bioquímicas causadas pela exposição crônica de *Drosophila melanogaster* a rotenona. A mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, é uma espécie alternativa à utilização de modelos mamíferos que vem sendo usada com bastante confiabilidade na reprodução de modelos de disfunção dopaminérgica. As moscas (de ambos os sexos) com idades compreendidas entre 1 a 5 dias de idade foram divididos em quatro grupos de 50 moscas cada um: (1) de controle, (2) ORY 25 μ M, (3) ROT 500 μ M, (4) ORY 25 μ M + ROT 500 μ M. As moscas foram concomitantemente expostos a uma dieta contendo ROT e ORY durante 7 dias de acordo com os seus respectivos grupos. Após o tratamento foram feitas as análises comportamentais e bioquímicas. Como resultados, verificamos que o ORY ofereceu proteção contra as alterações locomotoras causadas por ROT, além de prevenir a mortalidade induzida por rotenona, protegeu contra geração de estresse oxidativo e disfunções mitocondriais além de otimizar as defesas antioxidantes celulares. Nossas descobertas apontam uma restauração dos déficits colinérgicos, e nos níveis de dopamina fornecida por pelo tratamento com ORY. Em conclusão, os presentes resultados mostram que ORY é eficaz na redução da toxicidade induzida ROT em *Drosophila melanogaster*, o que mostrou uma ação neuroprotetora, possivelmente devido à presença dos componentes de antioxidantes tais como o ácido ferúlico

Palavras-chave: γ -orizanol, neuroprotetor, rotenona, dopamina, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Dissertation of Master

Program of Post-Graduation in Biochemistry

Federal University of Pampa

**PROTECTIVE EFFECT OF γ -ORIZANOL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE
INDUCED BY ROTENONE IN *Drosophila melanogaster***

Author: Stéfani Machado Araujo

Advisor: Marina Prigol

Co-advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Site and Date of Defence: Uruguaiiana, february 19th, 2016.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the world, affecting about 1% of adults over 60 years. The DP is linked to the degeneration of dopaminergic neurons main components of the substantia nigra brain, concurrently with mitochondrial complex I dysfunction and oxidative stress play a crucial role in the pathogenesis of this disease. The rotenone (ROT) is a natural pesticide, and used to induce PD phenotype in animal models, being lipophilic can easily cross the blood-brain barrier dysfunction causing mitochondrial complex I and possible death of dopaminergic neurons. Among the various therapeutic applications of antioxidants, it emphasizes its neuroprotective action, as the central nervous system displays a greater vulnerability and susceptibility to oxidative insults, the γ -oryzanol (ORY) is a natural product composed of a mixture of esters ferulic acid derived from rice bran oil, and is well described in the literature to possess antioxidant properties. The objective of this study was to investigate a possible neuroprotective effect of ORY on behavioral and biochemical changes caused by chronic exposure of *Drosophila melanogaster* the rotenone. The fly fruit *Drosophila melanogaster*, is an alternative species to the use of mammalian models that have been used quite reliable reproduction of dopaminergic dysfunction models. The flies (male and female) between the ages of 1 to 5 days of age were divided into four groups of 50 flies each: (1) control, (2) ORY 25 μ M, (3) ROT 500 μ M (4) ORY 25 μ M + ROT 500 μ M. The flies were simultaneously exposed to a diet containing ROT and ORY for 7 days according to their respective groups. After treatment were made behavioral and biochemical analysis. As a result, we find that the ORY offered protection against locomotor changes caused by ROT, and to prevent the mortality induced by rotenone, protected against the generation of oxidative stress and mitochondrial dysfunction and optimize cellular antioxidant defenses. Our findings point to a restoration of cholinergic deficits, and dopamine levels provided by the treatment ORY. In conclusion, the present results show that ORY is effective in reducing the ROT induced toxicity in *Drosophila melanogaster*, which showed a neuroprotective effect, possibly due to the presence of antioxidants components such as ferulic acid

Keywords: γ -oryzanol, neuroprotective, rotenone, dopamine, *Drosophila melanogaster*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1- Representação esquemática da via nigroestriatal normal e com DP.....	22
Figura 2- Rota de metabolização da dopamina via monoamino oxidase e produção de radicais livres.....	25
Figura 3- Mecanismos pelos quais neurotoxinas afetam os neurônios dopaminérgicos envolvendo disfunção mitocondrial e dano oxidativo.....	27
Figura 4- Estrutura química da rotenona.....	28
Figura 5- Composição grão de arroz.....	30
Figura 6- Estruturas químicas dos quatro componentes principais de γ -orizanol.....	31
Figura 7- Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> mantidas a 25°C.....	38
Figura 8- Neurônios dopaminérgicos presentes no cérebro de <i>D. melanogaster</i> adulta.....	39
Figura 9- Mecanismo de ação de γ -orizanol contra toxicidade induzida por rotenona em <i>D. melanogaster</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**Revisão Bibliográfica**

6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina

ATP- Trifosfato de adenosina

COX-2- Ciclo-oxigenase-2

D.melanogaster- *Drosophila Melanogaster*

dDAT- Transportadores de dopamina

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DP- Doença de Parkinson

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FADH₂ - Flavina adenina

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations

FMN- Flavina mononucleótido

GABA_B - Ácido gama-aminobutírico

HMG-CoA redutase- 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase

HPLC- Cromatografia líquida de alto desempenho

JPND- EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research

MAO-A- Monoamine oxidase A

MAO-B- Monoamine oxidase B

MPP⁺ -1-metil-4-phenylpyridinium

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

N, N'-dimetil-4,4'-bipiridinium - Paraquat

NADH- Nicotinamida adenina

NF- κ B- Fator nuclear kappa B

OMS- Organização Mundial da Saúde

PC12- Células de feocromocitoma

ROS- Reactive oxygen species

VMAT- Vesículas de transporte de monoamina

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	vi
EPÍGRAFE.....	vii
RESUMO	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
4.1. Doença de Parkinson (DP).....	20
4.1.1. Estresse oxidativo <i>versus</i> Doença de Parkinson	22
4.2. Modelos baseados em agentes químicos: Neurotoxinas.....	26
4.2.1. Rotenona <i>versus</i> Doença de Parkinson	28
4.3. Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	29
4.3.1. γ -orizanol	31
4.3.2. Efeito neuroprotetor de γ -orizanol e seus componentes bioativos.....	34
4.4. Testes comportamentais em modelos animais <i>versus</i> Doença de Parkinson.....	36
4.4.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	37
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	51
7. PERSPECTIVAS	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** consta uma revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, os quais se encontram no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. Neste constam as seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas*.

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

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

1. INTRODUÇÃO

Em 1871, o médico inglês James Parkinson publicou em Londres um ensaio intitulado "*An Essay on the Shaking Palsy*", que vem a ser a primeira descrição mundial bem definida da doença de Parkinson (DP). A doença de Parkinson é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum no mundo e afeta 1% da população acima dos 60 anos de idade, resultando na morte de neurônios dopaminérgicos de forma progressiva na substância negra do cérebro (Muñoz-Soriano e Paricio, 2011; Chen et al., 2014). Evidências crescentes sugerem que DP pode estar associada com disfunção mitocondrial através de uma variedade de vias, incluindo geração de radicais livres, inflamação e disfunção do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Greenamyre et al., 2001; Winklhofer e Haass, 2010). Diversas linhas de pesquisa implicam um papel etiológico importante para agroquímicos no desencadeamento neurodegeneração (Betarbet et al., 2000; Di Monte, 2003). Os processos oxidativos são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento da neurodegeneração em doença de Parkinson ou após a exposição a pesticidas tais como rotenona. A rotenona é um agente potencialmente tóxico, pertence à classe dos rotenóides (compostos citotóxicos naturais extraídos de plantas tropicais, tais como a *Derris elliptica*) (Tanner et al., 2011). Por apresentar atividade lipofílica atinge rapidamente organelas celulares como as mitocôndrias, onde atua como um inibidor específico, de alta afinidade, da NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I) (Cicchetti et al., 2009). Segundo Perfeito e Rego (2012) a rotenona é considerada responsável pela morte celular dopaminérgica, e efeitos como o aumento da produção de radicais livres e um conseqüente aumento do estresse oxidativo mediado pela mitocôndria. Nas últimas décadas, a procura por compostos naturais e/ou sintéticos com ação antioxidante tem aumentado notavelmente. Dentre as várias aplicações terapêuticas dos antioxidantes, ressalta-se a ação neuroprotetora, uma vez que o SNC exibe uma maior vulnerabilidade e susceptibilidade aos insultos oxidativos. Sabe-se que γ -orizanol extraído do óleo do farelo de arroz é bem descrito na literatura por possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição de agregação das plaquetas, atividade antitumoral e atividades hipocolesterolêmicas (Yasukawa et al., 1998; Akihisa et al., 2000; Juliano et al., 2005; Wilson et al., 2007; Soto-Jover et al., 2016), no entanto, são escassos os trabalhos acerca dos mecanismos de ação, bem como dos efeitos da γ -orizanol em um modelo *in vivo* de DP induzido por rotenona. A utilização da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* como modelo para estudo de mecanismos moleculares envolvidos em doenças neurológicas têm sido bem

descrito na literatura é um excelente modelo animal com sistema único e poderoso para estudar a genética humana de doenças e no rastreamento de possíveis drogas terapêuticas (Marsh e Thompson, 2006; Kim et al., 2011). Recentemente, *Drosophila melanogaster* tem sido extensivamente utilizada como um modelo *in vivo* para caracterizar os efeitos de tóxicos ambientais (Sudati et al., 2009; Hosamani e Muralidhara, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Na busca de uma estratégia para a intervenção do dano causado pela rotenona e de um possível efeito preventivo do γ -orizanol relacionado com neurodegeneração, esse trabalho visa aumentar o entendimento sobre os efeitos do γ -orizanol e um possível mecanismo protetor para o desenvolvimento da doença de Parkinson induzida por rotenona em *Drosophila melanogaster*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar um possível efeito neuroprotetor do γ -orizanol sobre alterações comportamentais e bioquímicas causadas pela exposição crônica de *Drosophila melanogaster* a rotenona.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* após exposição a rotenona e tratamento com γ -orizanol.

Analisar possíveis alterações motoras das moscas com os testes geotaxia negativa, geotaxia negativa base e topo e teste de campo aberto de *D. melanogaster* após exposição crônica a rotenona e tratamento com γ -orizanol.

Quantificar os níveis de dopamina e verificar a atividade da enzima acetilcolinesterase de *D. melanogaster* após exposição crônica a rotenona e tratamento com γ -orizanol.

Avaliar a envolvimento do estresse oxidativo em homogenato do corpo de moscas através da determinação dos níveis de espécies reativas e peroxidação lipídica, os níveis de tióis proteicos e não proteicos e da atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST após exposição crônica a rotenona e tratamento com γ -orizanol.

Avaliar a viabilidade celular e mitocondrial de *D. melanogaster* após exposição crônica a rotenona e tratamento com γ -orizanol.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Doença de Parkinson (DP)

De acordo com o *EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research* (JPND, 2014), as doenças neurodegenerativas são definidas como condições hereditárias e esporádicas debilitantes e incuráveis, que resultam na degeneração progressiva e/ou na morte das células nervosas. Esta degradação causa problemas com o movimento, as chamadas ataxias, ou mal funcionamento cerebral, originando a demência. A demência está associada a um declínio da memória ou outras habilidades de pensamento graves o suficiente para reduzir à capacidade de uma pessoa de realizar atividades cotidianas afetando a memória, o pensamento, à orientação, a compreensão, o cálculo, sua capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. A consciência não é afetada, e não deve nunca ser associada a um processo normal de envelhecimento. Dentre as demências, podemos salientar a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Pick, a demência vascular, a doença de Creutzfeldt-Jakob ou a doença de Huntington (JPND, 2014; World Health Organization, 2015).

A DP descrita pela primeira vez há 198 anos atrás, pelo Dr. James Parkinson onde publicou um trabalho intitulado “*Essay on the Shaking Palsy*” originalmente definida como “paralisia trêmula” (do latim, *paralysis agitans*; do inglês, *shaking palsy*). Hoje em dia é o distúrbio do movimento mais comum relacionado com a idade e é a segunda desordem neurodegenerativa citada, após, a doença de Alzheimer, afetando 1 a 2% em todo o mundo e prevalência no Brasil de 3% acima de 70 anos de idade, espera-se a aumentar em prevalência nas próximas décadas e, portanto, representa uma das principais causas de o envelhecimento da população grande parte dos casos de DP é idiopática apenas cerca de 15% dos pacientes possuem histórico familiar da doença, diversos estudos epidemiológicos buscam a identificação de fatores ambientais e genéticos que influenciem o aparecimento e desenvolvimento da doença (Xun et al., 2007; Peternella e Marcon, 2009; Burbulla e Krüger, 2011).

A DP é uma doença neurodegenerativa, não contagiosa, progressiva e irreversível associada a um déficit da função motora. Em termos neurofisiológicos, a DP é descrita através de uma profunda e seletiva perda de neurônios dopaminérgicos localizados em uma zona do

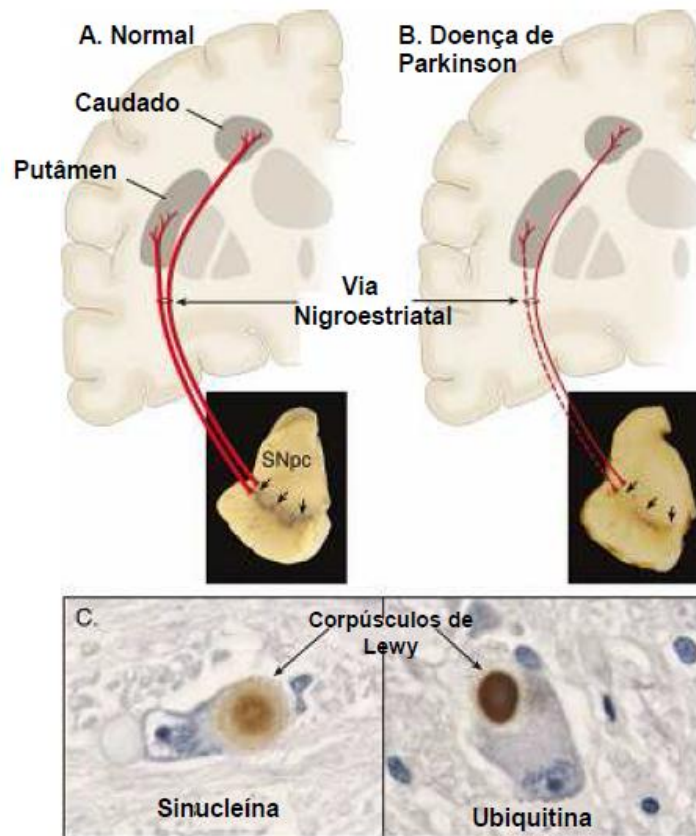
cérebro denominada substância negra compacta, e que se projeta para o estriado. Outra característica importante desta patologia é a presença dos corpos de Lewy, (Figura 1) agregados proteicos compostos majoritariamente por proteínas como a α -sinucleína, ubiquitina e sinfilina-1, entre outras (Abou-Sleiman et al., 2006; Xun et al., 2007; Jadiya et al., 2011; Perfeito e Rego, 2012). Algumas doenças neurodegenerativas, conhecidas como desordens parkinsonianas, apresentam manifestações clínicas similares a DP (parkinsonismo). No entanto, suas características patofisiológicas são distintas de PD e, assim, seguem diferentes padrões de neurodegeneração, DP é caracterizada pela formação de corpos de Lewy, e as outras doenças parkinsonianas, como degeneração corticobasal, há a formação de agregados neurofibrilares da proteína ligante de microtúbulos Tau, e não de α -sinucleína, entretanto, a correta diferenciação entre as patologias só é possível em exames *post mortem*, o que diminui a eficácia de seu tratamento (Zampol, 2013).

A dopamina está associada com a atividade motora, por conseguinte, a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, seu diagnóstico é estabelecido a partir dos sintomas clínicos, principalmente leva à rigidez muscular, tremores e bradicinesia, alterando também a cognição mental, capacidade de dormir, transtornos de personalidade e comportamento, incluindo depressão e ansiedade indicando um processo degenerativo mais generalizado (Bekris et al., 2010; Hauser e Hastings, 2013).

Em relação ao tratamento é importante lembrar e compreender que atualmente não existe cura para a doença, porém, ela pode e deve ser tratada, não apenas combatendo os sintomas, como também retardando o seu progresso. As cirurgias também podem ser bastante benéficas para determinados pacientes. As cirurgias consistem em lesões no núcleo pálido interno (Palidotomia) ou do tálamo ventro-lateral (Talamotomia), que estão envolvidos no mecanismo da rigidez e tremor. Porém, a lentidão de movimentos responde melhor aos medicamentos a terapia medicamentosa a de reposição de dopamina através do uso do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) é utilizada desde a década de 60 e permanece até os dias atuais como a droga mais utilizada e efetiva para tratar a bradicinesia e rigidez muscular, porém, não é muito efetiva no tratamento do tremor de repouso (Braga, 2008). Por outro lado, há um grande interesse em tratamentos não dopaminérgicos para a melhora das funções motoras sem o risco das complicações associadas com a L-DOPA, assim como plantas medicinais ou compostos bioativos de plantas empiricamente usados na medicina popular que são geralmente isentos de efeitos adversos e que sejam capazes de alterar o curso da morte neuronal, como a administração de γ -orizanol

um antioxidante natural para o tratamento da DP bem como de outras doenças neurodegenerativas (Braga, 2008; Li et al., 2013).

Figura 1- Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). Em C imuno-histoquímica marcando inclusões intracelulares os chamados corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNpc.



Fonte: Adaptado de Dauer e Przedorski (2003, p.891).

4.1.1. Estresse oxidativo *versus* Doença de Parkinson

A DP, assim como outras doenças neurodegenerativas não possui etiologia conhecida, porém, um dos fatores associados à neuropatogênese da DP é o estresse oxidativo decorrente da excessiva geração de espécies reativas do oxigênio e uma produção insuficiente de antioxidantes (Follmer e Netto, 2013). O estresse oxidativo é considerado responsável por comprometer a integridade dos neurônios vulneráveis e, assim, contribuir para degeneração neuronal de neurônios dopaminérgicos na DP. A fonte que desencadeia o estresse oxidativo

não é clara, mas podem incluir: disfunção do complexo I mitocondrial; metabolismo da dopamina; agregação α -sinucleína.

Disfunção do complexo I mitocondrial: as mitocôndrias produzem ATP (trifosfato de adenosina), através do processo de respiração e fosforilação oxidativa atuando assim como a fonte primária de energia na célula. O processo de fosforilação oxidativa envolve o acoplamento de ambas, reações redox e de fosforilação na membrana interna de mitocôndrias, resultando na síntese efetiva de ATP. Durante este processo, os elétrons do NADH (nicotinamida adenina) ou FADH₂ (flavina adenina) são transportados através da cadeia transportadora de elétrons, por complexos I-IV, para criar um gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial (Subramaniam e Chesselet, 2013). De acordo com Murphy (2009) evidências crescentes sugerem que as mitocôndrias são a fonte primária de espécies reativas de oxigênio que podem contribuir para o estresse oxidativo intracelular.

No processo de fosforilação oxidativa, o complexo I é a principal porta de entrada para os elétrons entrarem na cadeia respiratória, ele catalisa a transferência de elétrons a partir de NADH para a ubiquinona, envolvendo uma flavina mononucleótido (FMN) e sete agrupamentos de ferro-enzofre. Esta atividade é acoplada ao bombeamento de quatro prótons através da membrana interna mitocondrial e, assim, ocorre a formação de um potencial de membrana eletroquímica (Winklhofer e Haass, 2010). Quando ocorre uma desregulação nesta homeostase mitocondrial se estabelece um círculo vicioso de estresse oxidativo e insuficiência bioenergética da célula, com essa desregulação e/ou inibição interrompe-se o transporte de elétrons, com isso além de haver um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, há um decréscimo da produção de ATP; um aumento intracelular da concentração de cálcio; excitotoxicidade e danos celulares relacionados com o aumento de óxido nítrico pode haver também, a abertura do poro de transição permeável mitocondrial, havendo a possibilidade de libertação de citocromo c, que vai desencadear as vias de sinalização que conduzem à morte celular por apoptose o que contribui ser um mecanismos proposto para a morte de neurônios dopaminérgicos na DP (Abou-Sleiman et al., 2006; Perfeito e Rego, 2012; Subramaniam e Chesselet, 2013).

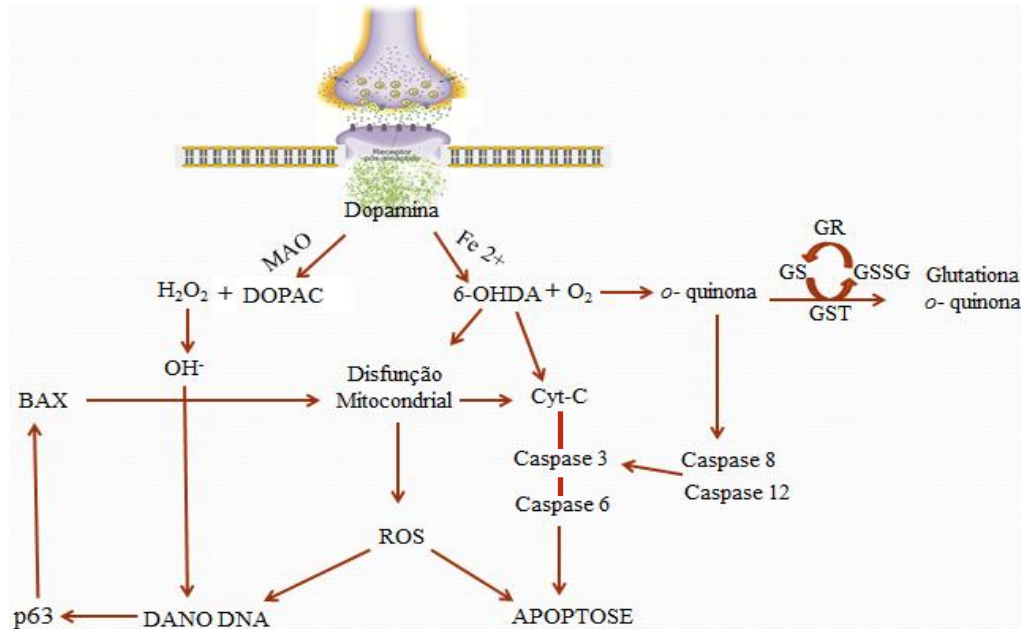
Metabolismo da dopamina: os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo são a principal fonte de dopamina no sistema nervoso central dos mamíferos. A dopamina é um composto químico pertencente à família das catecolaminas, sintetizada a partir do aminoácido L-tirosina, que é hidroxilado, pela tirosina hidroxilase, no precursor L-DOPA (3,4-

dihidroxifenilalanina), o qual será descarboxilado em dopamina, estes neurônios são encontrados na parte compacta do cérebro na chamada substância negra, que é rica em dopamina, um alto teor de ferro e neuromelanina razão pela qual aparece escurecida em cortes histológicos. Os neurônios dopaminérgicos desempenham um papel importante no controle de múltiplas funções cerebrais, incluindo movimento voluntário, afeto, recompensa, o sono, a atenção, memória de trabalho e de aprendizagem, desempenha também papéis fisiológicos na regulação do olfato, a regulação hormonal, regulação de funções cardiovasculares, sistema imunológico, e as funções renais, entre outros (Chinta e Andersen, 2005; Beaulieu e Gainetdinov, 2011).

Em concentrações fisiológicas, dopamina não induz processos degenerativos no cérebro, mas sua auto-oxidação aumenta com a idade e pode levar a toxicidade intracelular, portanto acredita-se que estes neurônios são particularmente propensos ao estresse oxidativo devido à sua elevada taxa de metabolismo do oxigênio, baixos níveis de antioxidantes, e alto teor de ferro associado ao metabolismo da dopamina, sendo então sugerido como um dos principais mecanismos envolvidos na produção de ROS e metabólitos tóxicos nos neurônios dopaminérgicos (Chinta e Andersen, 2005; Blum et al., 2001; Follmer e Netto, 2013).

A dopamina sofre dois tipos de oxidação (Figura 2): enzimática, através das enzimas monoamino oxidase (MAO) e catecol-o-metil transferase (COMT), ou não-enzimática, também chamada de auto-oxidação. A auto-oxidação da dopamina ocorre em presença de íons Fe^{2+} livres e H_2O_2 , promovendo a hidroxilação da dopamina na posição 6, formando a 6-hidroxdopamina que pode ser convertida, em torno de 20%, a *orto*-quinona. O sistema mais efetivo para detoxificação da *orto*-quinona no cérebro é através da enzima glutathione S-transferase (GST), a qual utiliza glutathione (GSH) para formar um complexo estável com a *orto*-quinona. No processo de oxidação enzimática a dopamina, quando oxidada pela enzima MAO, leva à formação do ácido 3,4 diidroxifenilacético e H_2O_2 , capaz de gerar OH^\bullet através da reação com íons de ferro. Essa via ocorre especialmente nos gânglios da base, onde existem altas concentrações de dopamina, oxigênio e ferro (Obata, 2002; Asanuma et al., 2004; Andrezza, 2008). Os transportadores de dopamina medeiam à captação de dopamina em neurônios e é um dos principais alvos para várias drogas farmacologicamente ativas e toxinas ambientais (Chen e Reith, 2000). A perda destes neurônios dopaminérgicos, que normalmente são ricos em neuromelanina, resulta em despigmentação da substância negra (Dauer e Przedborski, 2003).

Figura 2- Rota de metabolização da dopamina via monoamino oxidase (MAO) e produção de radicais livres.



Fonte: Adaptado de Andrezza (2008, p.128)

Agregação de α -sinucleína: o gene Park 1 codifica para a proteína pré-sináptica de 140 aminoácidos, a α -sinucleína, principal componente dos corpos de Lewy, em condições fisiológicas, ela parece estar relacionada com a entrega, acúmulo e controle da função mitocondrial nas sinapses, o que afetaria a liberação de neurotransmissores (Nakamura et al., 2011). As mutações no gene Park 1 resultam em substituições do aminoácido alanina na proteína α -sinucleína por treonina (A53T). As mutações da α -sinucleína impedem a degradação protéica, contribuindo para a produção de oligômeros (protofibrilas) em células nervosas. O ganho de função decorrente da mutação em Park 1 faz com que haja uma agregação protéica intracelular os chamados corpos de Lewy, que são neurotóxicos, onde ocorre o aprisionamento de mitocôndrias por α -sinucleína, levando à disfunção mitocondrial e falhas no controle de qualidade bioenergético com geração de espécies reativas, impedindo a função de células dopaminérgicas assim, possivelmente contribuindo para a propagação da DP (Ribeiro et al., 2004; Stefanis, 2012; Follmer e Netto, 2013).

4.2. Modelos baseados em agentes químicos: Neurotoxinas

A DP é uma doença exclusiva da espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais, portanto a experimentação animal é um exemplo clássico de como o uso de modelos animais para estudar doenças podem ter um impacto significativo na saúde humana. Essa patologia é induzida em animais e podem ser divididos em duas categorias: modelos genéticos e modelos neurotóxicos. Os modelos genéticos são aqueles criados com base principalmente em alvos identificados associados com mecanismos potencialmente conhecidos, por causar DP em humanos. No entanto, os modelos genéticos podem ser complementados pelos modelos em que diferentes moléculas neurotóxicas são usadas para danificar a via nigroestriatal, as chamadas neurotoxinas (Meredith et al., 2008; Tieu, 2011).

Alguns modelos de agentes neurotóxicos indutores de DP em modelos animais são (Figura 3):

6-hidroxidopamina (6- OHDA): modelo animal mais utilizado na pesquisa pré-clínica da DP baseia-se na utilização de 6-OHDA um hidroxilado análogo de dopamina. Devido à sua incapacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, esta neurotoxina deve ser estereotaxicamente injetada diretamente no cérebro na região de interesse, é então seletivamente retomado por neurônios catecolaminérgicos através de transportadores de monoaminas, esses tem elevada afinidade por esta molécula e uma vez nos neurônios, 6-OHDA acumula-se no citosol onde é facilmente oxidada levando à geração de espécies reativas de oxigênio causando lesão no sistema dopaminérgico nigroestriatal (Blum et al., 2001; Tieu, 2011; Solari et al., 2013).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP): modelo originou-se de descobertas no início de 1980 quando vários californianos usuários de drogas injetáveis contaminadas com MPTP foram internados em hospitais mostrando sintomas graves semelhantes a DP e estudos post-mortem confirmou a perda de estruturas nigrostriatais nestes pacientes. O MPTP é lipofílico, após ser injetado localmente em regiões específicas do cérebro pode rapidamente atravessar a barreira hematoencefálica, onde é convertido pela MAO-B para o seu metabolito ativo de 1-metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺), que, por sua vez, é então levado seletivamente pelo transportador de dopamina e causa neurotoxicidade principalmente através da inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons

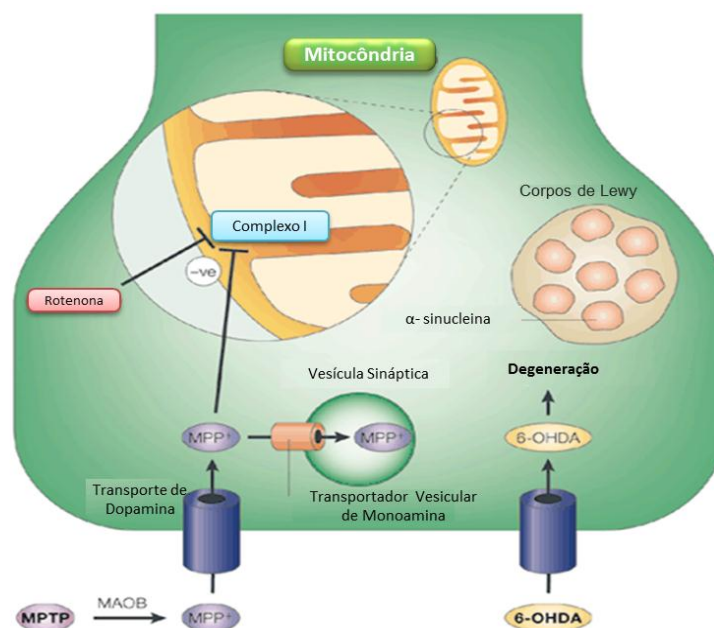
mitocondrial, resultando em depleção de ATP e aumento do estresse oxidativo (Tieu, 2011; Solari et al., 2013; Vermilyea e Emborg, 2015).

Paraquat (N, N'-dimetil-4,4'-bipiridinium): o metabolito ativo de MPTP caracterizado como MPP^+ foi identificado no pesticida. Ao ser injetado no cérebro, o paraquat penetra na barreira hematoencefálica e acumula-se onde induz a perda de neurônios da substância negra, pois, aumenta a desregulação e agregação da α -sinucleína contribuindo para formação de corpos de Lewy em DP. Dentro das mitocôndrias, paraquat não é inibidor do complexo I, por si só, embora este seja o local presumível onde é reduzido para formar superóxido, resultando em neurodegeneração (Rappold et al., 2011; Tieu, 2011).

Rotenona: outro pesticida capaz de atuar como neurotoxina para modelo animal de DP seu mecanismo de toxicidade é mediado principalmente pela sua potente inibição do complexo I mitocondrial.

Estes modelos contribuem para elucidar mecanismos patogênicos da neurodegeneração na DP, com os papéis de estresse oxidativo, a apoptose, disfunção mitocondrial, inflamação e comprometimento das vias de degradação de proteínas (Bové e Perier, 2012).

Figura 3- Mecanismos pelos quais neurotoxinas afetam os neurônios dopaminérgicos envolvendo disfunção mitocondrial e dano oxidativo.



Fonte: Adaptado Beal (2001).

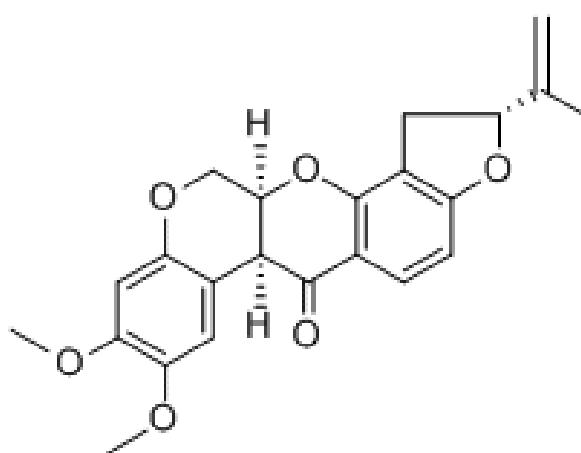
4.2.1. Rotenona *versus* Doença de Parkinson

Dentre os inseticidas orgânicos de origem natural os rotenóides, como a rotenona, foram usados como inseticidas agrícolas desde 1848, quando foram aplicados às plantas para controlar lagartas comedoras de folhas (Ware, 1989).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1992) rotenona (Figura 4) é um pesticida natural utilizado e preparado a partir das raízes de certas plantas subtropicais pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* ou *Derris elliptica*. Pode ser absorvida por ingestão e por inalação. Na base de estudos com coelhos, a absorção através da pele intacta, é baixa. O metabolismo e farmacocinética da rotenona não são completamente compreendidos, mas o composto é metabolizado pelo fígado dos mamíferos e a maior parte do composto é eliminada nas fezes.

O mecanismo de toxicidade de rotenona é mediado principalmente devido a sua lipofilicidade elevada que lhe permite atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica e membranas biológicas independentes de qualquer receptor ou transportador (Coulom e Birman, 2004; Tieu, 2011; Subramaniam e Chesselet, 2013).

Figura 4- Estrutura química da Rotenona.



Processos oxidativos são conhecidos por contribuir para a neurodegeneração em DP e rotenona tem sido utilizada como um instrumento para induzir modelo *in vitro* e *in vivo* de DP

e provou ser um modelo reprodutível tanto em *Drosophila* como em modelos de roedores (Canon e Greenamyere, 2010; Sudati et al., 2013; Manjunath e Muralidhara, 2015).

A neurotoxicidade pode estar relacionada com sua potente inibição específica de alta afinidade, da NADH desidrogenase mitocondrial no complexo I mitocondrial, com isso aumenta a capacidade de gerar ROS e interrompe a fosforilação oxidativa mitocondrial causando uma crise bioenergética, devido à redução nos níveis de ATP e morte celular por apoptose ou necrose, devido à despolarização causada pela grande abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, ocorre à liberação de fatores pró-apoptóticos tais como fator indutor de apoptose, que eventualmente causa a morte neuronal (Li, 2002; Cicchetti et al., 2009; Tieu, 2011; Subramaniam e Chesselet, 2013).

4.3. Arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz (*Oryza sativa* L.) surgiu no sudoeste asiático em 5.000 a.C, tendo posteriormente se expandido para a Índia e para a Europa, sendo o alimento básico para mais da metade da população do mundo é um recurso valioso, representando uma das três principais culturas de grãos do mundo (Pestana et al., 2010; Kim et al., 2013).

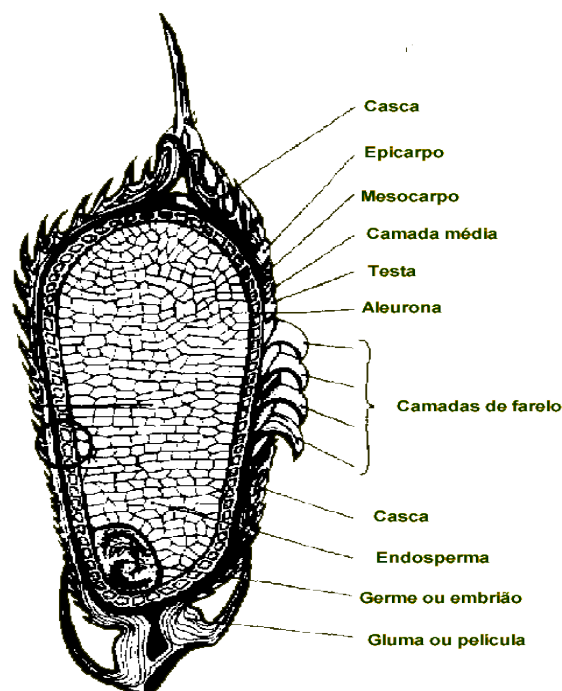
Os últimos dados fornecidos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2014) mostram que a produção brasileira de arroz em 2014 foi de quase 12 milhões de toneladas sendo considerado o nono maior produtor mundial. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2005) o consumo médio de arroz no Brasil varia de 74 a 76 Kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca atualmente, o consumo está estagnado, apenas acompanhando o crescimento populacional. A lavoura de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, produz anualmente cerca de 5 milhões de toneladas, sendo considerado estabilizador da safra nacional, responsável por cerca de 50% da produção brasileira, a maior entre os estados da federação.

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe (Figura 5), nas camadas do farelo e germe, estão concentradas a maior parte dos lipídeos do grão de arroz (Menacho et al., 2007). O grão é comumente consumido em forma moída ou polido, e o farelo de arroz é o principal subproduto do processamento de arroz, que representa de 5,0 a 5,5% do peso total do grão, sendo obtido a

partir do seu polimento, apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato. O pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o gérmen (embrião) são eliminados durante a operação de polimento na forma de farelo de arroz, restando o endosperma (grão de arroz polido), o farelo contém alto valor de proteína, gordura e fitoquímicos bioativos com propriedades antioxidantes e hipolipemiantes (Pestana et al., 2008; Islam et al., 2009; Choi et al., 2014; Wang et al., 2014). O farelo constitui cerca de 10% em peso de grãos de arroz cru e contém 18-22% de óleo tornando-o a fonte mais rica de óleo obtido a partir de um grão por produto (Yoon et al., 2014).

O óleo de farelo de arroz é apreciado especialmente no leste da Ásia. No Japão, aproximadamente 80 mil toneladas desse óleo são consumidas anualmente. Esse óleo é feito a partir do pericarpo e do germe das sementes de *Oryza sativa*, e recebeu atenção por apresentar grande quantidade de compostos nutracêuticos como o γ -orizanol, tocoferóis e tocotrienóis, sendo os dois últimos componentes da família da vitamina E é uma boa fonte de ácidos graxos, ácido fólico, lecitina, inositol, e ceras. Em uma xícara de arroz branco contém aproximadamente 4 mg de γ -orizanol é um importante constituinte natural do óleo de farelo de arroz, o que lhe confere alto valor comercial (Pestana et al., 2008; Ghatak e Panchal, 2012).

Figura 5- Composição grão de arroz.

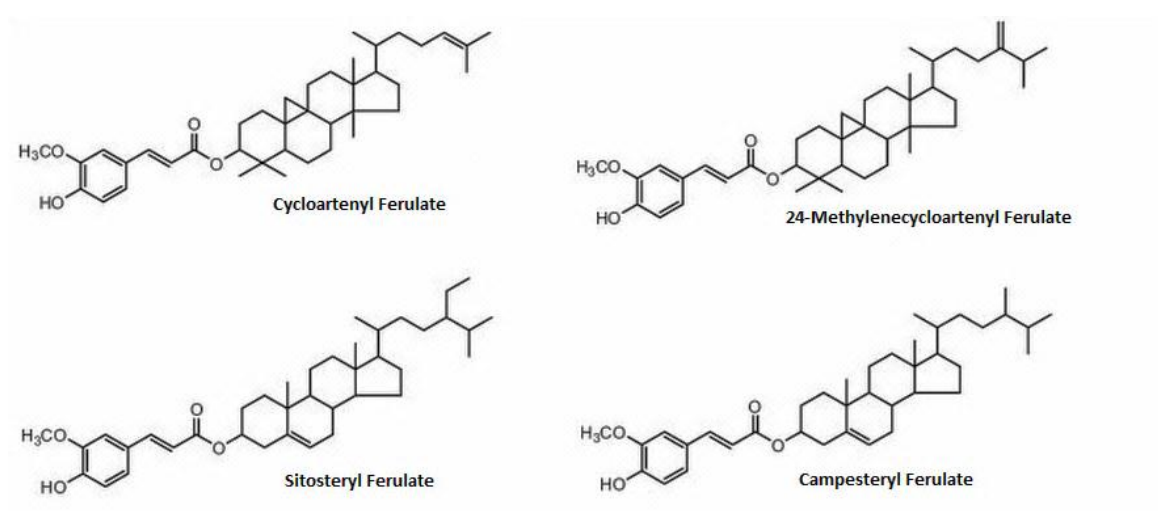


Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2004).

4.3.1. γ -orizanol

O γ -orizanol (Figura 6) foi encontrado na parte insaponificável do óleo de farelo de arroz bruto em 1954 por Kaneko e Tsuchiya e pensava-se que consistia de um único componente. Mais tarde, verificou-se ser uma mistura de diferentes componentes através da análise cromatográfica líquida de alto desempenho (HPLC). O γ -orizanol é composto por ésteres de ácido ferúlico de fitosteróis e álcoois triterpênicos que incluem 24-metileno cicloartenil ferulato, cicloartenilferulato ou cicloartenol, β -sistoterilferulato e campesterilferulato seus principais componentes são responsáveis por 80% da fração do γ -orizanol (Xu e Godber, 1999; Patel e Naik, 2004; Zolali et al., 2015).

Figura 6- Estruturas químicas dos quatro componentes principais de γ -orizanol.



Fonte: Adaptado de Zolali et al., (2015, p.2)

Em relação a sua distribuição o γ -orizanol é clivado no fígado por esterases inespecíficas, em ácido ferúlico e porção dos esteróis. Enquanto o esterol é excretado na bile e eventualmente nas fezes, o ácido ferúlico mostrou-se absorvido por todos os tecidos, com maiores concentrações reportadas no fígado, intestino, baço, adrenal e tecidos do cérebro (Machado, 2010).

O γ -orizanol é bem descrito na literatura por estar associado com diversos efeitos benéficos dentre estes, citamos alguns trabalhos:

Redução dos níveis de colesterol: em seu trabalho Wang et al., (2014) relatou que o extrato enzimático aquoso de farelo de arroz rico em γ -orizanol é capaz de reduzir os níveis

de colesterol no plasma e no soro de ratos Wistar machos com a dose de 750 mg/kg de peso corporal através de infusão gástrica, os mecanismos hipolipidêmicos do extrato enzimático aquoso de farelo de arroz são elucidados com base na inibição da absorção de colesterol e aumento de sua excreção nas fezes; e por inibir a atividade da HMG-CoA redutase hepática.

Efeito Anticancerígeno: inibindo o crescimento tumoral em células de carcinoma da mama humano MDA-MB-231, utilizando à dose de 100 µg /ml com o tratamento de 24 horas pode-se observar que γ -orizanol teve potencial efeito anti-metástases, devido à inibição da expressão de metaloproteínas de matriz, onde sua alta expressão está diretamente associada ao potencial invasivo e metastático de vários tumores malignos humanos (Pintha et al., 2014). As células tumorais de outros tecidos como trato digestório (Ferguson et al., 2001); pulmão (Lesca, 1983) e fígado (Tanaka et al., 1993) também podem ser suprimidas com a suplementação de ácido ferúlico, principal constituinte de γ -orizanol.

Ação fotoprotetora: é descrito por Lin et al., (2005) que ácido ferúlico ao ser incorporado em uma solução tópica de 15% de ácido L-ascórbico e 1% de alfa-tocoferol causa uma maior estabilidade química destas vitaminas (C + E) e dobram sua ação protetora contra os danos UV-induzidos por irradiação solar simulada na pele de 4 vezes para cerca de 8 vezes mensurada através da formação do eritema e da formação de queimaduras do sol. Esta união de antioxidantes puros de baixo peso molecular naturais fornece proteção sinérgica significativa por inibir a apoptose, que esta associada com a redução da indução da caspase-3, da caspase-7 (proteases envolvidas na apoptose dos queratinócitos) e da formação dos dímeros de timina (formação UV-induzida que ocorre no DNA), o ácido ferúlico também é capaz de absorver a radiação UV pela catalisação na formação da estabilidade de seus radicais fenoxi.

Inibição da agregação plaquetária: a agregação plaquetária foi medida utilizando plasma rico em plaquetas preparada a partir de ratos alimentados com γ -orizanol e dieta com 1% de colesterol. A dieta com γ -orizanol inibiu significativamente a agregação de plaquetas nestes animais (Seetharamaiah et al., 1990).

Intolerância à glicose: o γ -orizanol também é capaz de melhorar a intolerância à glicose em camundongos machos C57BL/6J, onde os animais foram expostos à dieta controle e dieta rica em gordura e avaliado seu comportamento alimentar. Os camundongos que receberam γ -orizanol nas doses de 20, 80, ou 320 mg/g de peso corporal durante 13 semanas, notavelmente, apresentaram uma melhora na intolerância à glicose e atenuou-se o estresse de

retículo endoplasmático do hipotálamo em camundongos alimentados com a dieta rica em gordura combinada com γ -orizanol (Kozuka et al., 2012).

Aumento da força muscular: em um ensaio clínico duplo-cego, 30 voluntários saudáveis (16 em suplemento e 14 no placebo) foram suplementados diariamente com 600 mg de γ -orizanol e o grupo placebo (a mesma quantidade de lactose) e foram avaliadas durante 9 semanas sua força muscular e suas medidas antropométricas destes homens jovens e saudáveis, os resultados indicaram que a suplementação diária de γ -orizanol durante o treinamento de resistência de 9 semanas não alterou as medidas antropométricas e do corpo, mas aumentou a força muscular em homens jovens saudáveis (Eslami et al., 2014).

Osteoporose: em um estudo realizado por Muhammad et al., (2013) demonstrou que γ -orizanol é eficaz no tratamento contra osteoporose. Os ratos Sprague Dawley foram tratados por 8 semanas com doses de 100 e 200 mg/kg de γ -orizanol e este foi capaz de estimular a osteoblastogênese por regulação positiva dos genes de formação de osso, possivelmente através da ativação de receptores GABA_B e por inibição da atividade de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio.

Efeito antiulcerogênico: de acordo com Cicero e Gaddi (2001) um dos mecanismos pelo qual γ -orizanol atua como antiulcerogênico é de que, o óleo de farelo de arroz provavelmente atua aumentando a saída de prostaglandinas, interferindo assim com a produção de HCl gástrico e possivelmente evitando o desenvolvimento de gastrite ou úlcera. O óleo de farelo de arroz contém uma alta percentagem de ácidos graxos insaturados que atuam como precursores na síntese do ácido araquidônico, que é por sua vez o precursor essencial de prostaglandinas, inibidores de secreção gástrica. O óleo de farelo de arroz também é rico em antioxidantes, tais como o α -tocoferol, o que da mesma forma pode estimular a síntese de prostaglandinas. Em outro estudo realizado por Itaya e Kiyonaga (1976) é descrito um segundo mecanismo que explica o efeito antiulcerogênico de γ -orizanol. Os ratos receberam 1 a 100 mg /kg de γ -orizanol diariamente durante cinco dias, e este reduziu dose-dependente o índice de úlcera, e ligeiramente impediu o aumento da taxa de 11-hidrocorticosteróides no soro. Estes efeitos foram observados nos animais adrenalectomizados, bem como nos ratos sujeitos a operação simulada. É provável que a ação antiulcerogênica de γ -orizanol seja devido à participação do sistema nervoso autônomo, mas não do eixo adrenal hipofisário.

Efeito anti-inflamatório: em um estudo realizado por Islam et al., (2008) foi investigado o efeito de γ -orizanol em um modelo de colite em camundongos C57BL/6J, os animais foram tratados com γ -orizanol (50 mg/kg/dia) por 18 dias após o tratamento pode-se observar um efeito anti-inflamatório de γ -orizanol em doença inflamatória do intestino, este efeito pode ser mediado pela inibição da atividade de NF- κ B, que foi, pelo menos, em parte devido ao efeito antioxidante da estrutura de ácido ferúlico que constitui o γ -orizanol. Outro estudo realizado por Ojha et al., (2015) relata que tratamento com γ -orizanol (50 mg/kg/dia) por 4 semanas em modelo de doença de Parkinson induzido por rotenona em ratos Wistar machos, reduziu os mediadores inflamatórios tais como as citocinas pró-inflamatórias e ciclooxigenase-2 induzível da óxido nítrico sintase comprovando ter efeito neuroprotetor promissor.

Propriedades antioxidantes: γ -orizanol é considerado antioxidante devido ser constituído por ésteres de ácido ferúlico, onde seu grupo hidroxila pode facilmente formar uma ressonância estabilizada com seu radical fenoxi e esta é a chave para sua propriedade antioxidante (Ogiwara et al., 2002; Juliano et al, 2005; Ojha et al., 2015; Wang et al, 2014).

O principal componente de γ -orizanol o ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinamico) foi isolado pela primeira vez a partir de uma resina comercial em 1866 e quimicamente sintetizado em 1925 (Graf, 1992). Contudo, seus efeitos biológicos começaram a ser notados em 1970, quando pesquisadores japoneses descobriram as suas propriedades antioxidantes devido ao seu núcleo e uma cadeia fenólica lateral estendida, onde forma uma ressonância estabilizada radical fenoxi que responde por seu efeito contra os radicais livres (Zhao e Moghadasian, 2008; Maruf et al., 2015). In situ ou *ex vivo* o ácido ferúlico pode ser absorvido pelo estômago, jejuno, e íleo. Depois de 25 minutos de incubação de ácido ferúlico no estômago de ratos, mais de 70% desaparece e é transferida para mucosa gástrica, para o sangue, urina e bile, o que sugere uma rápida absorção gástrica de ácido ferúlico (Zhao e Moghadasian, 2008).

4.3.2. Efeito neuroprotetor de γ -orizanol e seus componentes bioativos

O γ -orizanol exerce um possível efeito neuroprotetor, como visto no estudo realizado por Kim et al., (2004) onde camundongos machos ICR tiveram tratamento com solução de ácido ferúlico dissolvida em água em uma concentração de 0,006% (mg / kg), durante 4 semanas e subsequentemente, foi administrada uma injeção via intracerebroventricular de β -amilóide¹⁻⁴²

após, em vários pontos de tempo os cérebros foram analisados imuno-histoquimicamente. A administração de ácido ferúlico durante quatro semanas protegeu os cérebros de camundongos ICR machos, contra déficits de aprendizado e de memória induzidos por β -amilóide¹⁻⁴² administrada centralmente. É evidenciado neste estudo que o principal local de ação de ácido ferúlico poderia ser a microglia, assim pode ser sugerido que a administração em longo prazo de ácido ferúlico induz a microglia para suprimir o dano causado por β -amilóide¹⁻⁴². A ativação de células da glia incluindo o aumento da expressão de eNOS por pré-condicionamento estímulo foi postulado ser responsável pela indução de tolerância a danos neuronais.

Em sua revisão bibliográfica Cicero e Gaddi (2001) reportaram os efeitos do γ -orizanol sobre a síntese e liberação do hormônio de crescimento (GH) e prolactina (PRL) após uma única injeção subcutânea de γ -orizanol em ratos (20 mg / kg) este é capaz de suprimir a síntese de GH e de PRL após 1 hora da aplicação. O γ -orizanol aumentou a síntese e liberação de dopamina no hipotálamo basal medial, em contrapartida o grupo que recebeu o tratamento com alfa-metiltirosina, que é um inibidor da tirosina hidroxilase, teve seus níveis de dopamina diminuído. O γ -orizanol também foi capaz de aumentar a liberação de norepinefrina no hipotálamo basal medial. Estes resultados podem explicar os dados anteriores sobre as alterações nos níveis séricos de GH e de PRL por γ -orizanol e também sugerem que γ -orizanol pode afetar a síntese e/ou liberação de, pelo menos, dois neurotransmissores hipotalâmicos, dopamina e norepinefrina, resultando em alterações da síntese e/ou liberação de hormônio na hipófise anterior.

Outro estudo aponta que o ácido ferúlico tem a capacidade para inibir enzima COX-2, com um mecanismo que impede a oxidação da dopamina, e a acumulação de α -sinucleína dando ao componente de ácido ferúlico um efeito neuroprotetor (Gupta e Benzeroual, 2013). As células PC12 tem a capacidade de se diferenciar em células neuronais, Zhou et al., (2006) ao investigar o efeito neuroprotetor do ácido ferúlico em lesões às células PC12, Li et al., (2015) e Luo e Sun (2011) descreveram que ácido ferúlico promove a viabilidade das células, tendo efeito protetor notável em células PC12. Também é relatado na literatura que ácido ferúlico preserva células neuronais contra a isquemia cerebral induzida por óxido nítrico e contra a excitotoxicidade induzida por glutamato, em um estudo realizado por Koh (2012) onde ácido ferúlico (100 mg / kg, iv) é capaz de diminuir significativamente as lesões nas células do córtex cerebral de ratos, sugerindo um efeito neuroprotetor. Outro estudo realizado por Zhang et al., (2015) também foi capaz de comprovar o efeito neuroprotetor de ácido

ferúlico em lesão nervosa induzida por isquemia cerebral, onde sugere que a promoção da eritropoietina no sangue cerebral e no sangue periférico, podem contribuir para seu mecanismo neuroprotetor. Em seu estudo Ojha et al., (2015) avaliou a eficácia neuroprotetora do ácido ferúlico (50 mg/kg, ip) ao induzir doença de Parkinson em ratos machos Wistar utilizando rotenona (2,5 mg/kg, ip), onde o tratamento com ácido ferúlico inibiu a degradação de neurônios dopaminérgicos, restaurou atividade de enzimas antioxidantes, reduziu os mediadores inflamatórios tais como as citocinas pró-inflamatórias e ciclooxigenase-2 induzível da óxido nítrico sintase, sendo assim os resultados sugerem que os efeitos protetores são mediados através das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias de ácido ferúlico presente no γ -orizanol.

4.4. Testes comportamentais em modelos animais *versus* Doença de Parkinson

Vários modelos animais experimentais da DP foram desenvolvidos para alcançar as mesmas características clínicas da doença com alta reprodutibilidade e seletividade. Além da idade e exposição a toxinas ambientais, a perda de neurônios dopaminérgicos é exacerbado por mutações específicas nas regiões de codificação ou promotoras dos vários genes, estes danos causam lesão do sistema dopaminérgico nigro-estriatal. Testes comportamentais dos animais com lesão nigrostriatal representam um método não-invasivo valioso para avaliar a influência do sistema dopaminérgico danificado, na atividade locomotora (Mokry, 1995; Barone e Bohmann 2013).

Uma das formas mais básicas para avaliar a presença de um fenótipo motor de DP em um modelo de camundongo é a utilização de câmaras de atividade locomotora. Os camundongos são colocados em câmaras locomotoras transparentes e a atividade é medida por um determinado período de tempo. É considerado um fenótipo do déficit motor de DP a diminuição da atividade locomotora neste teste comportamental de campo aberto (Prut e Belzung, 2003; Taylor et al., 2010). Para avaliação dos déficits cognitivos induzidos por DP em modelo animal de roedor podem ser feitos os testes de labirinto de oito braços descrito por Olton (1987); e /ou labirinto aquático de Morris descrito por Morris et al., (1982) entre outros.

Assim como os roedores, os insetos como *Drosophila melanogaster* é um valioso modelo de organismo para estudar DP, pois, conserva algumas características da doença

humana, por exemplo, a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos e declínio da função locomotora. Ensaios comportamentais realizados neste modelo para avaliar déficits comportamentais induzidos por DP em *Drosophila* podem ser: ensaio de geotaxia negativo descrito por Jimenez del-rio et al., (2010) é utilizado para medir alterações locomotoras do inseto e o teste de campo aberto descrito por Hirth, (2010) avalia a capacidade exploratória da mosca. São formas rápidas e simples de avaliar quantitativamente déficits comportamentais na mosca da fruta (Ali et al., 2011).

4.4.1. *Drosophila melanogaster*

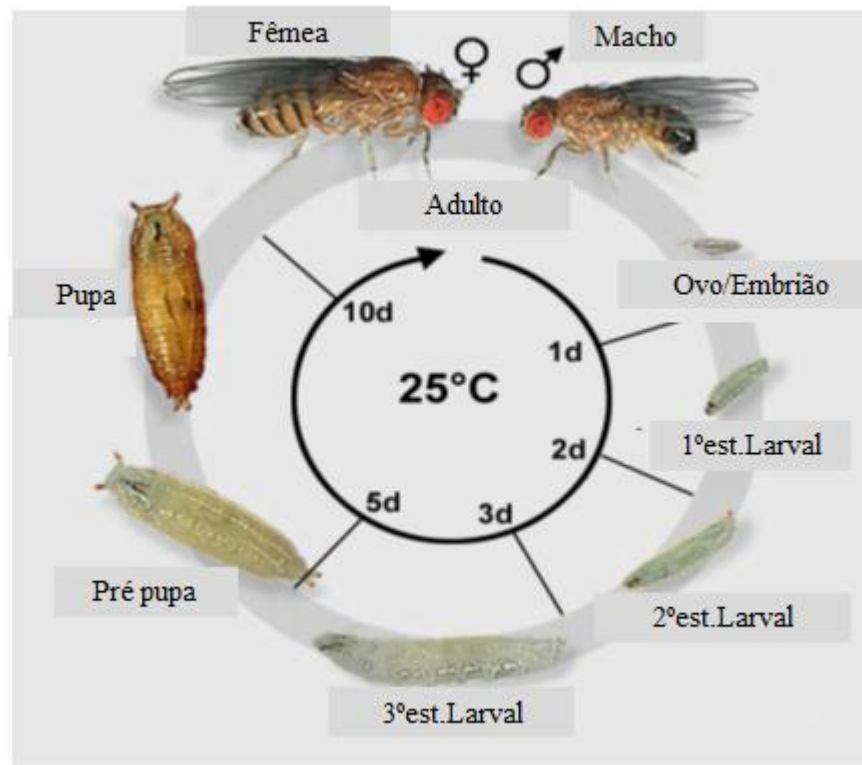
A mosca da fruta *D. melanogaster* (Figura 7) esta na vanguarda da biologia, onde os genes, técnicas genéticas, e outras descobertas são muitas vezes elucidados primeiro na mosca e depois traduzido para os sistemas mamíferos, seu crescimento e reprodução rápida, e o fato de ser barato e fácil de manter em laboratório são características que fazem a *D. melanogaster* um sistema modelo ideal para abordar questões biológicas inovadoras, incluindo as de saúde humana (Muñoz-Soriano e Paricio, 2011; Pandey e Nichols, 2011).

A mosca conserva estruturas que executam funções equivalentes dos mamíferos como coração, pulmão, rim, intestino, e sistema reprodutor. O cérebro da mosca adulta possui mais de 100.000 neurônios que formam circuitos discretos e fibras nervosas que medeiam comportamentos complexos, incluindo ritmo circadiano, o sono, a aprendizagem e a memória, alimentação, agressividade, adestramento, e navegação de vôo, aspectos fundamentais da biologia celular são bastante semelhantes no homem e nas moscas, incluindo a regulação da expressão gênica, o tráfego de membrana, o citoesqueleto, conectividade da sinalização celular neuronal, e morte celular. Significativamente, a resposta das moscas para muitas drogas que atuam no sistema nervoso é semelhante aos efeitos observados em sistemas de mamíferos (Sang e Jackson, 2005; Andretic et al., 2008; Pandey e Nichols, 2011).

Nos últimos anos, *D. melanogaster* tem sido utilizada como um modelo de diversas doenças neurodegenerativas (Bonini e Fortini, 2003), incluindo DP, pois possui similaridades entre o mecanismo de ação de drogas tornando-se um modelo para a compreensão da patogênese e progressão das doenças neurológicas, pois seu genoma contém homólogos de cerca de 77% do loci relacionada com as doenças neurológicas em seres humanos e mais de

85% de genes associados com a deficiências cognitivas, bem como processos celulares fundamentais, e vias de sinalização são conservados entre os dois organismos. Como prova disso, o sequenciamento de seu genoma revelou a homologia entre cinco dos seis genes relacionados à DP com humanos (Whitworth et al., 2006; Kim et al., 2011).

Figura 7- Ciclo de vida de *D. melanogaster* mantidas a 25°C.



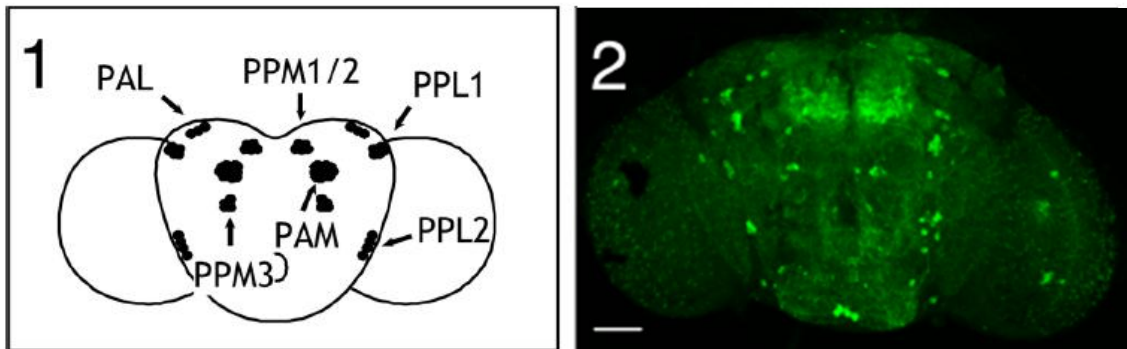
Fonte: Adaptado Roode e Prokop (2013).

A mosca apresenta em seu sistema nervoso central, seis conjuntos neuronais dopaminérgicos (Figura 8) (ppm3, PPL2, PPL1, PAM, e PAL, ppm 1/2) que estão normalmente presentes em cada hemisfério do cérebro adulto de *D. melanogaster* assim, o sistema dopaminérgico presente na *D. melanogaster* está associado ao controle locomotor como ocorre em humanos (Coulom e Birman, 2004).

A *D. melanogaster* também contém transportadores de dopamina (dDAT) (Ueno e Kume, 2014) e vesículas de transporte de monoamina (VMAT) (Greer et al., 2005), responsável pela homeostase da dopamina, sendo assim este invertebrado permite a rápida

triagem de potenciais fármacos para tratamento de doenças neurodegenerativas, dentre elas a DP.

Figura 8- Neurônios dopaminérgicos presentes no cérebro de *D. melanogaster* adulta. (1) Representação esquemática dos clusters* dopaminérgicos. (2) Neurônios dopaminérgicos determinados através de marcador para TH em microscopia confocal.



Fonte: Adaptado Coulom e Birman, (2004, p.2). *Abreviações: PPL1 e PPL2, junção posterior lateral 1 e 2; PPM1/2, junção posterior medial 1 e 2; PPM3, posterior medial 3; PAL, anterior lateral ; e PAM, anterior medial.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

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

Artigo: “Eficácia do γ -orizanol na redução do déficit neuromotor, da depleção da dopamina e do estresse oxidativo em um modelo de doença de Parkinson induzida por rotenona em *Drosophila melanogaster*”.

ARTIGO

NeuroToxicology (2015) 51: 96-105

doi:10.1016/j.neuro.2015.09.003

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

Stéfani Machado Araujo, Mariane Trindade de Paula, Marcia Rósula Poetini, Luana Meichtry, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Micheli Stefani Zarzecki, Cristiano Ricardo Jesse, Marina Prigol



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



Stéfani Machado Araujo^a, Mariane Trindade de Paula^a, Marcia Rósula Poetini^a, Luana Meichtry^b, Vandrezza Cardoso Bortolotto^b, Micheli Stefani Zarzecki^a, Cristiano Ricardo Jesse^{a,b}, Marina Prigol^{a,b,*}

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

^b Department of Nutrition, UNIPAMPA, Campus Itaqui, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2015

Received in revised form 4 September 2015

Accepted 9 September 2015

Available online 11 September 2015

Keywords:

γ -Oryzanol

Rotenone

Dopamine

Drosophila melanogaster

Oxidative stress

Neurotoxicity

ABSTRACT

The γ -oryzanol present in rice bran oil contains a mix of steryl triterpenyl esters of ferulic acid, which is believed to be linked to its antioxidant potential. In this study we investigated the neuroprotective actions of γ -oryzanol (ORY) against the toxicity induced by rotenone (ROT) in *Drosophila melanogaster*. The flies (both genders) aged between 1 and 5 days old were divided into four groups of 50 flies each: (1) control, (2) ORY 25 μ M, (3) ROT 500 μ M, (4) ORY 25 μ M + ROT 500 μ M. Flies were concomitantly exposed to a diet containing ROT and ORY for 7 days according to their respective groups. Survival and behavior analyses were carried out *in vivo*, and *ex vivo* analyses involved acetylcholinesterase activity (AChE), determination of dopaminergic levels, cellular viability 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-protein thiols (NPSH). Our results show for the first time that ORY not only acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defenses, but it also ameliorates rotenone induced mortality, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Our salient findings regarded the restoration of cholinergic deficits, dopamine levels and improved motor function provided by ORY. These results demonstrate the neuroprotective potential of ORY and that this effect can be potentially due to its antioxidant action. In conclusion, the present results show that ORY is effective in reducing the ROT induced toxicity in *D. melanogaster*, which showed a neuroprotective action, possibly due to the presence of the antioxidant constituents such as the ferulic acid.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The γ -oryzanol present in rice bran oil contains bioactive substances, a mix of steryl and other triterpenyl esters of ferulic acid. The microflora in the hind gut can hydrolyze these compounds, releasing ferulic acid for absorption or degradation (Zhao and Moghadasian, 2008). Some authors reported the beneficial effects of γ -oryzanol and their therapeutic applications, *in vitro* and *in vivo* models such as the inhibition of tumor growth

(Pintha et al., 2014), reduction in plasma cholesterol levels (Wang et al., 2014), improvement of glucose intolerance (Kozuka et al., 2012), stimulation of osteoblastogenesis (Muhammad et al., 2013) and antioxidant properties (Juliano et al., 2005; Spiazzi et al., 2013; Wang et al., 2014). In the literature, there is also evidence of the neuroprotective effect of γ -oryzanol, related to one of its constituents, the ferulic acid. This polyphenol has protective function against neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and stroke (Cheng et al., 2008).

Late onset neurodegenerative diseases represent a major public health concern, since the mean age of world population is steadily increasing. Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative syndrome characterized by degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra (Feany and Bender, 2000). Moreover evidence suggests that α -synuclein inclusions and

* Corresponding author at: Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas às Moléculas Bioativas, LaftamBio Pampa, Itaqui CEP 97650-000, Brazil. E-mail address: mail@prigol@gmail.com (M. Prigol).

COX-2 up regulation contribute to mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in PD. Increased expression of COX-2 has been reported to cause dopamine oxidation, which in turn, triggers oxidative stress and α -synuclein accumulation (Gupta and Benzeroual, 2013). Oxidative stress has been assigned as an important factor in the progression of PD (Muñoz-soriano and Paricio, 2011). Increasing evidence suggests that PD may be associated with mitochondrial dysfunction through a variety of routes, including the generation of free radicals, inflammation and dysfunction of complex I of the mitochondrial respiratory chain (Greenamyre et al., 2001; Winklhofer and Haass, 2010). However, most cases are sporadic and of unknown etiology, or they are thought to be a result of exposure to environmental toxins such as toxic agents i.e. rotenone, paraquat, among others. Knowing that the oxidative stress and dopaminergic loss plays a central role in PD disease, several studies have been conducted to investigate the potential neuroprotective effect of antioxidants in models of PD, mainly medicinal plants, or the use of bioactive plant components, since they are normally free of adverse effects.

Rotenone, a well-established mitochondrial toxin is often used as a chemical model, since it reproduces some important aspects of PD pathology both in *Drosophila* and rodent models (Cannon and Greenamyre, 2010; Tamilselvam et al., 2013; Manjunath and Muralidhara, 2015). The rotenone is a potentially toxic agent, which belongs to the class of rotenoids (natural cytotoxic compounds extracted from tropical plants such as *Derris elliptica*) and it is used as a pesticide (Tanner et al., 2011). By presenting lipophilic activity, it quickly reaches cell organelles like mitochondria, which acts as a specific inhibitor, of high affinity of the mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I) (Cicchetti et al., 2009). According to Perfeito and Rego (2012), rotenone is considered to be responsible for dopaminergic cell death, and for causing effects such as increased production of free radicals and consequent oxidative stress-mediated increase in the mitochondria.

Invertebrate animals such as *Drosophila melanogaster* have been an efficient study model and it has been widely explored as a powerful genetic tool for understanding complex biological problems. Many basic biological, physiological, and neurological properties are conserved between mammals and *D. melanogaster*, and nearly 75% of human disease-causing genes are believed to have a functional homolog in the fly (Pandey and Nichols, 2011). Recently, many researchers have used these flies as a model to understand various neurodegenerative diseases, since they have homology between five of the six genes related to PD in humans (Whitworth et al., 2006; Benton, 2008; Bagatini et al., 2011). This study aimed to investigate the possible neuroprotective effect of γ -oryzanol on behavioral and biochemical changes caused by chronic exposure of *D. melanogaster* to rotenone.

2. Materials and methods

2.1. Materials and fly culture condition

γ -Oryzanol (ORY) was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Rotenone was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade from the Campus of UNIPAMPA.

D. melanogaster wild-type (strain Harwich) was obtained from the National Center species, Bowling Green, Ohio, USA. The hatched flies were maintained for about 3 days in an incubator with controlled temperature of 25 °C and 30–50% humidity under a light/dark cycle of 12 h fed on standard medium (1% corn flour w/v; 1% yeast w/v beer, 1% w/v wheat germ 2% w/v sucrose, 1% w/v milk powder; 0.08% w/v nipagin).

2.2. Experimental protocol

2.2.1. Rotenone exposure and γ -oryzanol treatment

D. melanogaster (both genders) of 1–5 days old were divided into four groups of 50 flies each: (1) control, (2) ORY 25 μ M, (3) ROT 500 μ M, (4) ORY 25 μ M + ROT 500 μ M. Flies were concomitantly exposed to a diet containing ROT and ORY for 7 days according to their respective groups.

ROT (500 μ M) was diluted in ethanol and its concentration was similar to used by Hosamani and Muralidhara (2009) and Sudati et al. (2013). ORY (25 μ M) was diluted in sucrose. ORY concentration was chosen based in a pilot experiment where flies were exposed to ORY at various concentrations such as of 25 μ M, 50 μ M and 75 μ M to determine the effect of ORY alone on the survival of flies during the experimental period. However, only one of the concentrations was considered satisfactory when assessing mortality and the behavioral test for negative geotaxis of flies, thus, exposure to the concentration used was 25 μ M.

ROT and ORY were added into the food's flies at final concentration of 500 μ M and 25 μ M, respectively. The total food medium contained a volume of 1% of ethanol and 1% sucrose, ORY, ROT or ORY plus ROT. Two controls were used (with and without 1% of ethanol and 1% sucrose). Only the control with 1% of ethanol and 1% sucrose is showed in the results because there was no statistical difference between these groups in all parameters evaluated. The diet during the treatment consisted in 1% yeast w/v beer, 2% w/v sucrose, 1% w/v milk powder, 1% agar w/v; 0.08% w/v nipagin.

2.3. In vivo assays

2.3.1. Survival rate

The survival rate was evaluated by counting daily the number of living flies until the end of the experimental period (7 days). Around 150 flies per group were included in the survival data and the total number of flies represents the sum of three independent experiments (50 flies/each treatment repetition).

2.3.2. Negative geotaxis

Negative geotaxis of the flies was determined according to Jimenez del-río et al. (2010) by recording the time spent by each fly to achieve a height of 8 cm measured from the bottom of a glass test tube with a diameter of 1.5 cm. The test is repeated five times for each fly, and 15 flies are separated from each group to be evaluated, and the data were analyzed according to the averaging time. The total number of flies (60 per group) represents the sum four independent experiments.

2.3.3. Negative geotaxis test base top

Locomotor activity of flies was determined based on negative geotaxis behavior assay as previously described by Coulom and Birman (2004) with some modifications. The flies were exposed to ROT as described above. Following exposure, 10 flies (both genders) were classified and received brief anesthesia with ice and were then transferred to a Falcon tube (15 cm length and 1.5 cm in diameter). After 30 min of recovery from ice, flies were gently tapped to the bottom of the tube, and the number of flies that climbed up to the 6 cm mark of the column (i.e., the top) in 5 s as well as those that remained below the mark, were counted separately. The procedure was repeated five times per group at 1 min intervals. The total number of flies (40 per group) represents the sum four independent experiments.

2.3.4. Test open field

To evaluate the behavior and exploratory activity of the fly, 15 flies were used in each group and these were kept in a Petri dish divided by a square centimeter, which can be covered by a Petri dish,

described by (Hirth, 2010). Fly activity and movement were recorded and evaluated and the resulting trajectory for the time (60 s) was calculated according to the number of squares crossed/ explored by each fly analyzed in each group. The total number of flies (60 per group) represents the sum four independent experiments.

2.4. Ex vivo assays

2.4.1. Homogenized preparation

About 20 flies per group were immobilized by freezing in ice for approximately 1 min, then they were manually homogenized in ice-cold HEPES buffer (20 mM, pH 7.0), 10:1 (flies/volume (μ l)) with or without head according to each analysis to be performed after centrifugation according to each analysis to be performed, and the supernatant was removed and used for biochemical assays. All experiments were performed in triplicate.

2.4.2. Analysis of dopamine concentrations by HPLC

Twenty flies of each group had their heads separated from their bodies using a sharp blade. The head was homogenized in 100 μ l of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 1 mM EDTA, followed by centrifugation at 25,009 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was directly used to estimate the levels of dopamine by HPLC (Dalpiaz et al., 2007).

2.4.3. Evaluation of cell viability

Cellular viability was measured by two different methods. Firstly, cellular viability was measured using. Cellular viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 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.

The second method used was the resazurin reduction assay. The method is based in the ability of viable cells to reduce resazurin to resorufin, a fluorescent molecule (Franco et al., 2009). Groups of 20 flies were homogenized in 1 ml 20 mM Tris buffer (pH 7.0) and centrifuged at 3570 rpm for 10 min at 4 °C. After that, the supernatant was incubated in ELISA plates with 20 mM buffer Tris (pH 7.0) and resazurin for two hours. Fluorescence was recorded using EnsPireR multimode plate reader (Perkin Elmer, USA) at λ_{ex} 579 nm – λ_{em} 584 nm.

2.4.4. Evaluation of mitochondrial viability

Mitochondria were isolated from the whole body of flies by modified differential centrifugation method (Hosamani and Muralidhara, 2013). Briefly, flies were homogenized in ice-cold Tris-sucrose buffer (0.25 M, pH 7.4) (60 mg fly tissue homogenized in 1000 μ l buffer) and centrifuged at 1000 \times g for five minutes (4 °C). Mitochondria were obtained by centrifuging the postnuclear supernatant at 10,000 \times g for 10 min (4 °C). The pellet was washed in mannitol-sucrose-HEPES buffer and resuspended in 200 μ l of suspension buffer.

Mitochondrial fraction (200 microlitros) was with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT (\times % solution) for 30 min at 37 °C. After that, the samples were centrifuged at 10,000 \times g for five minutes. The pellet was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO), incubated for 30 min at 37 °C and the absorbance was measured at 540 nm. Results were expressed as percentage of the control.

2.4.5. Thiol determination

Thiol protein and non-protein were estimated based on spectrophotometry using Ellman (1959) reagent. Ten flies in each

group were manually homogenized after the homogenate was removed and added to 0.5 M PCA and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4 °C.

For non-protein thiol measures, the supernatant was used (the pellet should be reserved for later use) and added 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 5 mM awaited 15 min at room temperature protected from light and the reading was done by spectrophotometer at 412 nm. For non-protein thiol measures of previous samples the pellet was resuspended in Tris/HCl 0.5 M pH 8.0 buffer, the supernatant was removed and added to 5 mM DTNB, awaited 15 min at room temperature protected from light and the reading was done by the spectrophotometry at 412 nm.

2.4.6. Determination of reactive species levels (RS) and lipid peroxidation

For quantification of reactive species generation, a total of 20 flies were anesthetized on ice and homogenized in 1 ml 10 mM Tris buffer, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 1000 \times g for 5 min at 4 °C and the supernatant was removed for assay quantification of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation, as a general index of oxidative stress according to the protocol of Pérez-Severiano et al. (2004). The fluorescence emission of DCF resulting from DCF-DA oxidation was monitored after one hour at λ_{ex} 485 nm – λ_{em} 530 nm using EnsPireR multimode plate reader (Perkin Elmer, USA). Results represent the mean of three independent experiments. In each experiment, each treatment was done in duplicate. Lipid peroxidation was measured by TBARS. Ten flies in each group were homogenized and centrifuged at 1000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was removed and added to TBA (0.8% pH 3.2), acetic acid (20%, pH 3.5), sodium lauryl sulfate (SDS) (8%). The mixture was incubated for two hours at 95 °C. Immediately after the absorbance, it was measured at 532 nm (Ohakawa et al., 1979).

2.4.7. Activities of antioxidant enzymes

2.4.7.1. Determination of catalase activity. The catalase activity was measured following the method of Aebi (1984). Ten flies in each group were homogenized and centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. Containing solution was prepared (0.25 M KPi buffer/2.5 mM EDTA pH 7.0, 30% H₂O₂, and water triton X-100). This solution was added to the supernatant and the sample readings were taken at 240 nm for 1 min.

2.4.7.2. Determination of superoxide dismutase activity. SOD activity was measured by monitoring the inhibition of quercetin auto oxidation. Ten flies in each group were homogenized and centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. A solution containing was prepared containing (0.25 M KPi buffer/0.1 mM EDTA pH 10.0 and N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) at the time of the reading the supernatant of the sample with quercetin was added to the solution and this Reading was performed for 2 min at 406 nm. Expressed in terms of amount of protein required to inhibit 50% of quercetin auto oxidation (Kostyuk and Potapovich, 1989).

2.4.7.3. Determination of glutathione-S-transferase activity (GST). Assay of GST activity was performed according to the procedure of using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Ten flies in each group were homogenized and centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. Containing solution was prepared (0.25 M Kpi buffer/EDTA (2.5 mM, pH 7.0), distilled water and 100 mM GSH) in the sample and the supernatant was added 50 mM CDNB and its reading was taken at 340 nm for 2 min.

2.4.7.4. Activity of acetylcholinesterase (AChE). Acetylcholinesterase activity was determined according to the method of Ellmann et al. (1961). Ten flies in each group were homogenized and

centrifuged at 1000 rpm for 5 min at 4 °C. The reaction medium was prepared containing (0.25 M KPi buffer, pH 8.0 and 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB 5 mM)) is added to the supernatant solution sample and to acetylthiocholine 7.25 mM (2.1 mg/ml), and the reading was done for 2 min at 412 nm. The enzymatic activities were expressed as nmoles of hydrolyzed substrate/min/mg protein.

2.4.8. Protein determination

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

2.5. Statistical analysis

Lifespan measurement was determined by comparing the survival curves with a log-rank (Mantel–Cox) test. Other statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test where appropriate. Differences were considered significant between groups at $p < 0.05$ using the GraphPad Prism5 program.

3. Results

3.1. ORY improves the survival rate of *D. melanogaster*

Exposure of adult flies to ROT resulted in lethality over a 7 day experimental period (Fig. 1) when compared to the control group. The lifetime of flies receiving ORY was up to 7 days. However, in the ROT group this survival rate drops to 3 days. When compared with the ROT group, the mortality rate was lower for the flies treated simultaneously with ORY, indicating its ability to protect against ROT induced mortality ($p < 0.05$).

3.2. Locomotor performance and acetylcholinesterase activity

Exposure of adult flies to ROT caused impact deleterious on locomotor behavior as reductions in the climbing rate compared with the control. This effect was abolished by the treatment with ORY, once flies from this group had better performance climbing (Fig. 2A and B). Regarding the open field test, the group exposed to ROT showed less exploratory activity when compared to the control group (Fig. 2C, $p < 0.05$) indicating locomotor deficit. Acetylcholine is the primary excitatory neurotransmitter in the central nervous system, in parallel with the behavioral parameter; its activity was also assessed (Kim and Lee, 2013). As shown in Fig. 3, there was a significant inhibition of AChE activity ($p < 0.05$)

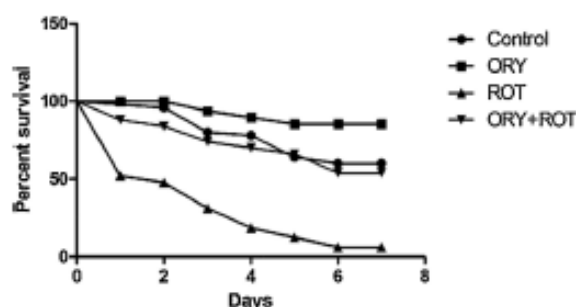


Fig. 1. Effect of γ -oryzanol (ORY) on survival rate of flies exposed to rotenone (ROT). Data were collected every 24 h for each group during 7 days. The total number of flies (150 per group) represents the sum of three independent experiments. Lifespan measurement was determined by comparing the survival curves Mantel–Cox log-rank test and multiple comparisons were corrected using the Bonferroni method.

in flies exposed to ROT, compared to the control group. This ROT effect was annulled by the treatment with ORY.

3.3. Effect of ORY on the depletion of the levels of dopamine (DA) induced ROT

The flies of the ROT group showed a depletion of 42% in the levels of dopamine in the head compared to the control group. Treatment with ORY protected against the reduction of dopamine levels in the head caused by ROT in flies (Fig. 4, $p < 0.05$).

3.4. Effect of ORY on Cell viability by MTT reduction in homogenate of flies exposed to rotenone

Exposure to ROT caused a significant decrease on MTT reduction in the fly homogenates, confirming the reduction in cell viability. This effect was abolished by the ORY treatment (Fig. 5A, $p < 0.05$).

3.5. Effect of ORY on mitochondrial viability by MTT reduction in flies exposed to rotenone

Exposure to ROT caused a significant decrease on MTT reduction on mitochondria. This effect was abolished by the ORY treatment (Fig. 5B $p < 0.05$).

3.6. Effect of ORY on resazurin reduction assay in homogenate of flies exposed to rotenone

Cell viability measured by the resazurin reduction test showed a significant drop in cell viability for the group exposed to ROT compared to the control group, confirming the toxicity of ROT cell level. This effect can be reversed by a treatment with ORY (Fig. 6, $p < 0.05$).

3.7. Oxidative stress and antioxidants defenses

Oxidative stress has been assigned as an important factor in the progression of PD. Here we quantify DCFDA oxidation as a general indicator of oxidative stress and TBARS as an indicator of lipid peroxidation (Fig. 8A and B). Flies treated with ROT had a significant increase in the production of reactive species measured by the oxidation of DCFDA compared to the control group. Also, there was an increase in lipid peroxidation (LPO) and its product malondialdehyde (MDA) that can be used as an indicator of the action of free radicals in the body, in the group receiving ROT compared to the control group. Co-exposure to ORY and ROT was able to reduce MDA levels and DCFDA oxidation induced by the rotenone.

The ROT group had an inhibition on SOD, CAT and GST activity when compared to the control group. Treatment with ORY was effective to reduce the inhibition of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) activities to control levels (Fig. 7A–C).

The content of protein thiols and nonprotein thiols was not altered in all groups tested (Fig. 9A and B).

4. Discussion

Our results demonstrate for the first time the protective effect of ORY in a model of Parkinson's disease induced by the exposure to rotenone in *D. melanogaster*. Importantly, the ORY acted on this model by restoring dopamine levels in heads of flies and the activity of the enzyme acetylcholinesterase and improving motor function of flies. Furthermore, the compound improved antioxidant defenses, preventing oxidative stress, mitochondrial dysfunction and preventing the lethality induced by rotenone. In this way,

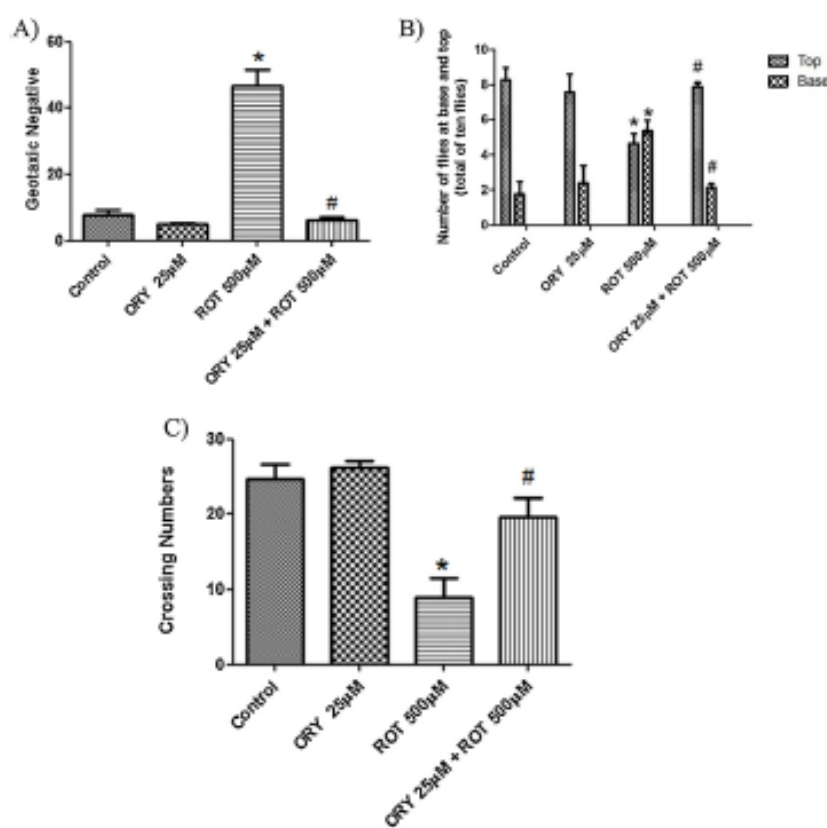


Fig. 2. Effect of γ -oryzanol (ORY) on geotactic response (climbing) and exploratory activities of flies exposed to rotenone (ROT) during 7 days. Graphic (A) negative geotaxis assay, graphic (B) negative geotaxis test base top and graphic (C) open-field. 15 flies per group were included for the negative geotaxis and open-field tests (total of 60 flies) and 10 flies per group were included for the negative geotaxis test base top (total of 40 flies). These values represent the sum of four independent experiments. Values are mean \pm SE. 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 ROT and ROT + ORY ($p < 0.05$).

in the literature we find studies that indicate a neuroprotective role of constituents of ORY which consists of a mixture of ferulic acid esters, which give the ORY its antioxidant potential (Pauca-Menacho et al., 2007; Sultana, 2012; Maruf et al., 2015). Ferulic acid acts as an antioxidant agent against radical oxidation in neuronal cell culture systems (Kanski et al., 2002), it also exerts a neuroprotective effect through the inhibition of apoptosis in focal cerebral ischemic injury (Koh, 2015). Long-term administration of ferulic acid for 4 weeks protects mice against learning and memory deficits induced by centrally administered β -amyloid^{1–42} (Kim et al., 2004), it also decreases the expression of active caspase-3 in the rat striatum (Cheng et al., 2008) and prevented increases in interleukin-1 α immunoreactivity and in the levels of endothelial nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in the activated astrocytes of the mouse hippocampus (Cho et al., 2005). Besides that, it exhibits neuroprotection against striatal neuronal cells subjected to oxidized low-density lipoproteins (Schroeter et al., 2000).

According to our results the ORY was effective in reducing neuromotor deficits, geotaxia negative tests (climbing), and open field test (rating exploratory capacity). Flies with locomotor deficits tend to stay in the bottom of the glass column and they have the ability to coordinate their legs in a normal manner. This phenotypic expression is explained by the requirement for high power of the muscles that are rich in mitochondria (Hosamani and Muralidhara, 2009). Although speculative, it is likely that mitochondrial machinery may have been disengaged due to severe inhibition

of complex I caused by rotenone toxicity (Cicchetti et al., 2009). In parallel with the behavioral parameter, the activity of acetylcholinesterase (AChE) is well described being used in the verification of the efficacy of treatment for PD and other neurodegenerative diseases (Hosamani et al., 2010) this is an enzyme that participates in cholinergic neurotransmission and it is able to break down. The neurotransmitter acetylcholine ends this process, when this activity is inhibited it leads to the accumulation of the neurotransmitter at the synapses (Calicet et al., 2006; Pohanka et al., 2011). AChE activity is inhibited by several compounds among them, flies exposed to the ROT had decreased AChE activity in our study, but the treatment with the ORY was able to prevent this inhibition. As reported by Swajger and Borowiec (2012) in a study with mice, ferulic acid prevented a decrease in acetylcholine levels in the cortex caused by intracerebroventricular injection of β -amyloid and protected mice against cognitive impairments, as demonstrated in the passive avoidance, Y-maze (spatial memory) and water maze tests.

In the central nervous system, it is possible to identify six dopaminergic neuronal sets (PPM3, PPL2, PPL1, PAM, and PAL, PPM1/2) that are normally present in each hemisphere of the brain of *Drosophila* adult (Coulom and Birman, 2004). *D. melanogaster* also contain dopamine transporter (dDAT) (Ueno and Kume, 2014) and vesicular monoamine transporter (VMAT) gene (Greer et al., 2005), responsible for dopamine homeostasis. The dopamine is involved in the control of locomotion, cognition, affect and neuroendocrine secretion (Giros et al., 1996). In Parkinson's disease, the accompanying dopaminergic depletion is traditionally considered

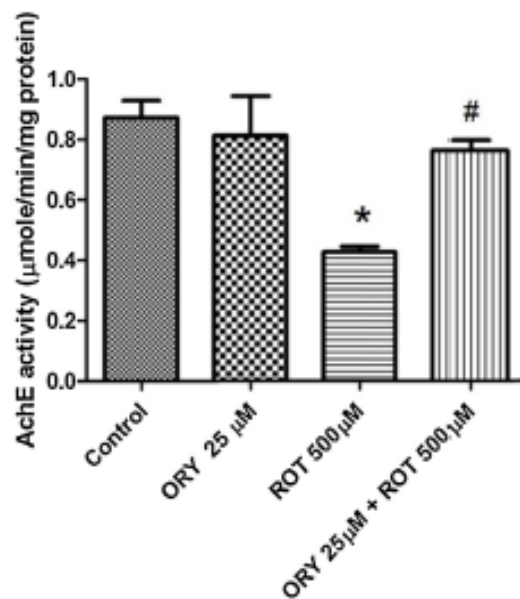


Fig. 3. Effect of γ -oryzanol (ORY) on rotenone (ROT) induced alterations in activity of acetylcholinesterase of adult *Drosophila melanogaster*. Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between ROT and ROT + ORY ($p < 0.05$).

one of the underlying mechanisms that contribute to the cardinal motor symptoms of bradykinesia, rigidity and tremor (Chong et al., 2015). Neurotoxins such as rotenone can lead to similar signs and symptoms of PD as this disorder is associated with mitochondrial dysfunction due to defects in complex I of the electron transport chain (Cicchetti et al., 2009). According to Hastings (1995) and Jahromi et al. (2015) complex I inhibition decreased antioxidant levels, and increased iron levels, dopaminergic neurons may be under a greater amount of oxidative stress than other neurons in the brain, because they contain dopamine. The monoamine oxidase metabolism produces H_2O_2 that can participate in Fenton type reaction with Fe(II) to generate ROS involved in neuronal death in the substantia nigra.

Dopamine metabolism is a complex biochemical system, which includes the synthesis, storage, release, reuptake and degradation

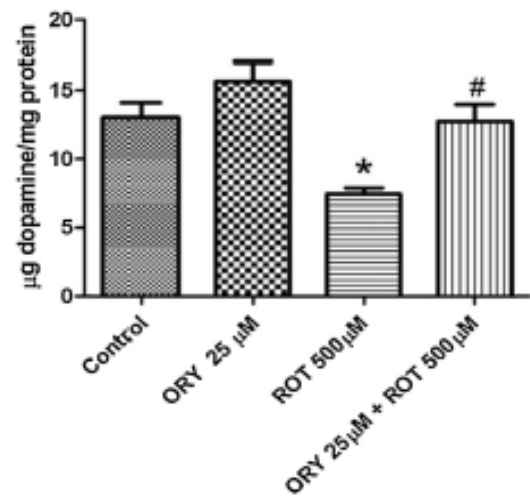


Fig. 4. Effect of γ -oryzanol (ORY) on rotenone (ROT) induced alterations in activity of dopamine levels in the head of adult *Drosophila melanogaster*. Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed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

of neurotransmitter (Qj et al., 2008). In our study, the group exposed to ROT had a significant depletion of dopamine levels in the head of flies. Previous studies have reported several mechanisms that justify a decrease in dopamine levels in the head flies treated with rotenone, among which are loss of dopaminergic neurons in brain (Coulom and Birman, 2004) and decrease in vesicular monoamine transporter (VMAT) (Lawal et al., 2010). Surprisingly, ORY was capable to prevent dopamine depletion, proving to be a potential neuroprotective agent, which we believe to have a significant correlation between locomotor dysfunction and deficiency of dopamine because the dopamine neurons of the brain comprise the black substance release DA and facilitate movement (Hauser and Hastings, 2013). According to Gupta and Benzeroual (2013), ferulic acid has the ability to inhibit COX-2 enzyme, a mechanism that prevents the oxidation of dopamine, and α -synuclein accumulation giving the ferulic acid component of ORY a neuroprotective effect.

Oxidative stress is considered an important factor for neurodegeneration in PD (Muñoz-soriano and Paricio, 2011). In the

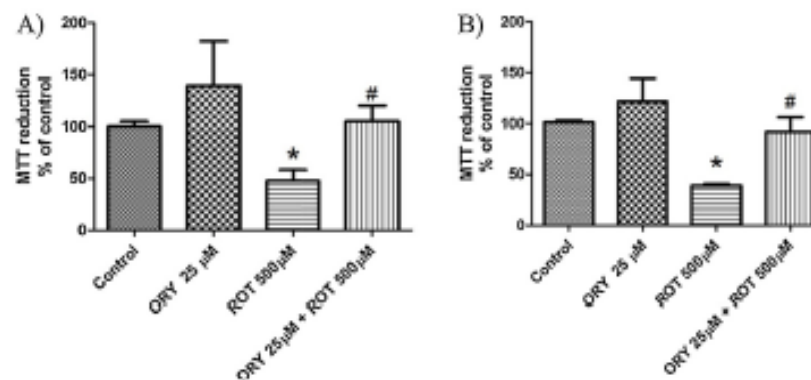


Fig. 5. Effect of γ -oryzanol (ORY) exposure on cell viability by MTT of flies exposed to rotenone (ROT) during 7 days. Graphic (A) cell viability in homogenate of flies and graphic (B) cell viability mitochondrial. Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to control group; #Significant difference between Rot and Rot + ORY groups. Results were expressed as the percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation $p < 0.05$).

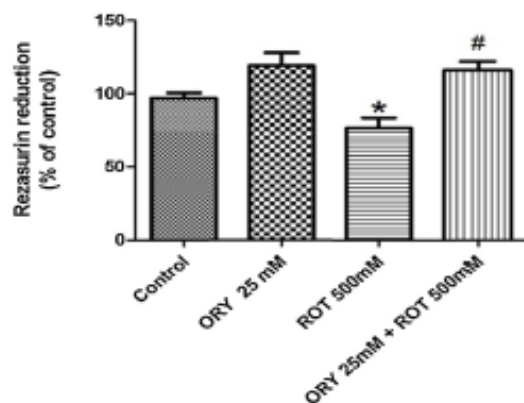


Fig. 6. Effect of γ -oryzanol (ORY) exposure on cell viability in homogenate of flies treated with rotenone (ROT) performed by resazurin reduction assay. Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. *Significant difference in relation to control group, #Significant difference between Rot and Rot + ORY groups. Results were expressed as the percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation $p < 0.05$).

present study, we found significant induction of oxidative stress in flies exposed to rotenone as evidenced by the sharp rise in the levels of MDA and ROS along with significant increases in antioxidant enzyme activities such as CAT, SOD and GST. Taken

together, the results suggest the involvement of oxidative stress-based model of rotenone with *D. melanogaster*. Depletion of these cellular levels of antioxidants was reduced with treatment with ORY, resulting in complete reduction of oxidative markers which clearly indicates the antioxidant capacity of ORY. As also described by Sultana (2012), ferulic acid has free radical scavenging activity toward hydroxyl radical, peroxynitrite, superoxide radical and oxidized low-density lipoprotein, the hydroxyl group in the ferulic acid can readily form a resonance stabilized phenoxyl radical and this is a key to its antioxidant property (Castelluccio et al., 1996; Ogiwara et al., 2002). Ferulic acid can also protect biological membranes from lipid peroxidation and neutralized peroxy and alkoxy radicals (Trombino et al., 2004). The contents of NPSH and PSH did not change and it is consistent with previous observations (Hosamani et al., 2010; Manjunath and Muralidhara, 2015).

In the current study, the flies exposed to ROT showed decreased cell viability using two different methodologies, indicating that the viability of the cells was compromised, resulting in high mortality of the flies during the exposure period of 7 days. The treatment with ORY resulted in higher cell viability, low incidence of mortality of flies treated with ORY, which clearly indicates the presence of protective bioactive compounds in ORY which may be responsible for the suppression of free radicals or an increase in the regulation of antioxidant defenses. The literature reported that the ferulic acid effect against apoptosis may be the overall effect of both scavenging of reactive oxygen species directly and chelation of iron to inhibit the Fenton reaction indirectly, ferulic acid can chelate the ferrous ion and decrease the formation of hydroxyl

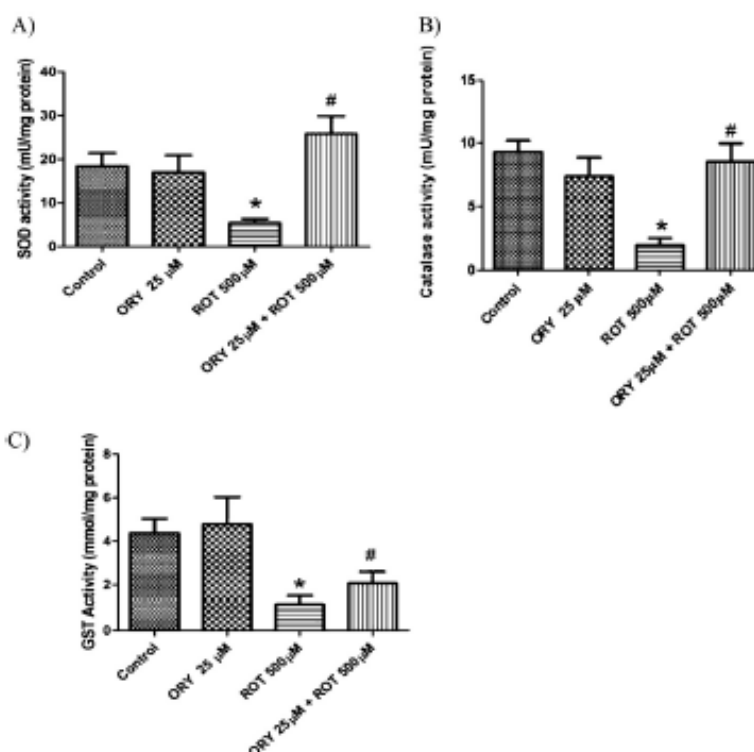


Fig. 7. Effect of γ -oryzanol (ORY) for 7 days on alterations induced by rotenone (ROT) the activities of antioxidant enzymes in the whole homogenate body of adult *Drosophila melanogaster*. Graphic (A) superoxide dismutase (SOD), graphic (B) catalase (CAT) and graphic (C) glutathione-S-transferase activity (GST). Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three 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 ROT and ROT + ORY ($p < 0.05$).

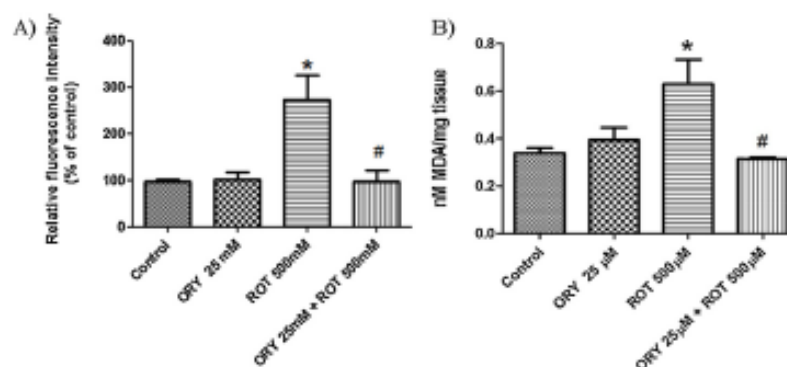


Fig. 8. Effect of γ -oryzanol (ORY) for 7 days on alterations induced by rotenone (ROT) in markers endogenous of oxidative stress. Graphic (A) reactive species levels (RS) and (B) levels of lipid peroxidation (LPO). Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between ROT and ROT + ORY ($p < 0.05$).

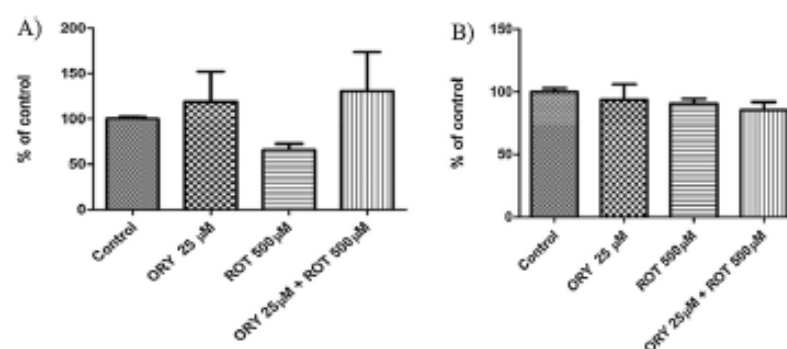


Fig. 9. Effect of γ -oryzanol (ORY) on protein thiol graphic (A) and non-protein thiol graphic (B) content in homogenate of flies exposed to rotenone (ROT). Results were expressed as the percentage (%) of the control group (mean \pm standard deviation $p < 0.05$). Values are mean \pm SE ($n = 20$ flies per replicate, three 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 ROT and ROT + ORY ($p < 0.05$).

radicals through the inhibition of the iron dependent Fenton reaction (Zhang et al., 2003).

In this study, we first assessed the effects of ORY in a model of neurodegenerative diseases such as the Parkinson's disease ROT induced toxicity in *D. melanogaster*. Our data demonstrate the effectiveness of ORY in reducing the deleterious effects of ROT toxicity in both behavior parameters, dopamine levels and oxidative stress after in vivo exposure of *D. melanogaster*, these properties provide a mechanism for preventing the toxicity caused by ROT. In conclusion, the present results show that ORY is effective in reducing the toxicity induced by rotenone in *D. melanogaster*, showing neuroprotective action, possibly due to the presence of the antioxidant constituents such as ferulic acid.

Conflict of interest

The authors declare that they have no any conflict of interest.

Acknowledgments

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Bagatini, P.B., Sauc, L., Rodrigues, M.F., 2011. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. *Invert. Neurosci.* 11 (1), 43–50. <http://dx.doi.org/10.1007/s10158-011-0116-3>.
- 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.jliff.2014.12.027>.
- Benton, R., 2008. Chemical sensing in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 357–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.012>.
- Čalić, M., Vrdoljak, A.L., Radić, B., 2006. In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology* 219 (1–3), 85–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2005.11.003>.
- Cannon, J.R., Greenamyre, J.T., 2010. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog. Brain Res.* 184, 17–33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84002-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84002-6).
- Castelluccio, C., Bolwell, G.P., Gerrish, C., Rice-Evans, C., 1996. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem. J.* 316, 691–694. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3160691>.
- Cheng, C.Y., Su, S.Y., Tang, N.Y., Ho, T.Y., Chiang, S.Y., Hsieh, C.L., 2008. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting of ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.* 13, 136–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.090>.
- Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, D.H., Yan, J.J., Suh, H.W., Song, D.K., 2005. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on astrocyte activation induced by intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1–42)

- in mice. *Prog. Neuro-Psychopharm* 29, 901–907, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2005.04.022>.
- Chong, T.T., Bonnelle, V., Manohar, S., Veitmann, K.R., Muhammed, K., Tojaris, 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>.
- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., Gross, R.E., 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 475–483, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2009.06.005>.
- Coulom, H., Birman, S., 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>.
- Dalpiat, A., Filosa, K., Capraris, P., Conte, G., Borolotti, F., Biondi, C., et al., 2007. Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycoyl conjugate. *Int. J. Pharm.* 336, 133–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.051>.
- 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).
- Ellman, 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).
- Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398, <http://dx.doi.org/10.1038/35006074>.
- Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., et al., 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 449–457, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013>.
- Girois, B., Jabot, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379, 606–612, <http://dx.doi.org/10.1038/379606a0>.
- Greenamyre, J.T., Sheret, T.B., Betarbet, R., Panov, A.V., 2001. Complex I and Parkinson's disease. *EBM Biol. Life* 52, 13.
- Greer, C.I., Grygork, A., Patton, D.E., Ley, B., Romero-Calderon, R., Chang, H.Y., Houshyar, R., Bainton, R.J., Diamantio, A., Krantz, D.E., 2005. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved traf-ficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J. Neurobiol.* 64, 239e258, <http://dx.doi.org/10.1002/neu.201465-141>.
- Gupta, S., Benzeroual, K., 2013. Neuroprotective effects of antioxidants, idebenone and ferulic acid, in MPTP/MPP+ intoxicated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 27, 1175-7.
- Hastings, T.G., 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J. Neurochem.* 64, 919–924.
- Hauset, D.N., Hastings, T.G., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* 51, 35–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.011>.
- Hirth, F., 2010. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 504–523, <http://dx.doi.org/10.2174/18752710791556104>.
- Hosamani, R., Muralidhara, 2009. Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 30, 977–985, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2009.08.012>.
- Hosamani, R., Ramesh, S.R., Muralidhara, 2010. Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine. *Neurochem. Res.* 35 (9), 1402–1412, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-010-0198-z>.
- 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>.
- Jahromi, S.R., Haddadi, M., Shivanandappa, T., Ramesh, S.R., 2015. Attenuation of neurotoxicity 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-río, M., Martínez, 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>.
- Juliano, C., Cosu, M., Alamanni, M.C., Piu, L., 2005. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *Int. J. Pharm.* 299 (1–2), 146–154, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.018>.
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D.A., 2002. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *J. Nutr. Biochem.* 13, 273–281, [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2833\(01\)00215-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2833(01)00215-7).
- Kim, H.S., Cho, J.Y., Kim, D.H., Yan, J.J., Lee, H.K., Suh, H.W., Song, D.K., 2004. Inhibitory effects of long term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intercerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1–42) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 120–121, <http://dx.doi.org/10.3164/jcbn.40.92>.
- Kim, Y.H., Lee, S.H., 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43 (1), 47–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.11.004>.
- Koh, P.O., 2015. Ferulic acid attenuates the down-regulation of MEK/ERK/p90RSK signaling pathway in focal cerebral ischemic injury. *Neurosci. Lett.* 588, 18–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.047>.
- Kozgruk, V.A., Potapovich, A.I., 1989. Superoxide driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int.* 19, 117–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.03.014>.
- Kozuka, C., Yabiku, K., Sunagawa, S., Ueda, R., Taira, S.I., et al., 2012. Brown rice and its component, γ -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. *Diabetes* 61, 3084–3093, <http://dx.doi.org/10.2337/db11-176722826028>.
- Lawal, H.O., Chang, H.Y., Terrell, A.N., et al., 2010. The *Drosophila* vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons. *Neurobiol. Dis.* 40, 102–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.008>.
- Manjunath, M.J., Muralidhara, 2015. Standardized extract of *Withania somnifera* (*Ashwagandha*) markedly offsets rotenone-induced locomotor deficits, oxidative impairments and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *J. Food Sci. Technol.* 52 (4), 1971–1981, <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1219-0>.
- Maruf, A.A., Iip, H., Wong, H., et al., 2015. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 234, 96–104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.11.007>.
- Muhammad, S., Maznah, I., Mahmud, R., Esmail, M., Zuki, A., 2013. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in osteoporotic rats treated with germinated brown rice bioactives. *Clin. Interv. Aging* 8, 1421–1431, <http://dx.doi.org/10.2147/CLIA.S44970>.
- Muñoz-soriano, V., Paricio, N., 2011. *Drosophila* models of Parkinson's disease: discovering relevant pathways and novel therapeutic strategies. *Parkinson's Dis.* 2011, 520640, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/520640>.
- Ogiwara, T., Satoh, K., Kadoma, Y., Murakami, Y., Unten, S., Asumi, T., Sakagami, H., Fujisawa, S., 2002. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Res.* 22, 2711–2717, <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2012.654561>.
- 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).
- Paucar-Menacho, L.M., Silva, L.H., Sant'ana, A.S., 2007. Gonçalves IAG refining of rice bran oil (*Oryza sativa* L.) to preserve γ -oryzanol. *SBCTA. Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27, 45–53, <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000500009>.
- Pandey, U.B., Nichols, C.D., 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 411–436, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.110.00329321415126>.
- Perfeito, R., Rego, A.C., 2012. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. *Rev. Neurosci.* 20 (2), 273–284.
- Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chavez, J., Medina-Campos, O.N., Ríos, C., Segovia, J., 2004. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem. Res.* 29 (4), 729–733, <http://dx.doi.org/10.1023/B:NERE.0000018843.83770.4b>.
- Pintha, K., Yodkeeree, S., Pitchakam, S., Limtrakul, P., 2014. Anti-invasive activity against cancer cells of phytochemicals in red jasmine rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (11), 4601–4607, <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4601>.
- Pohanka, M., Hrabínová, M., Kuca, K., Simonato, J.P., 2011. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2631–2640, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12042631>.
- Qi, Z., Miller, G.W., Voit, E.O., 2008. Computational systems analysis of dopamine metabolism. *PLoS ONE* 3 (6), e2444, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002444>.
- Schroeter, H., Williams, R.J., Martin, R., Iversen, L., Rice-Evans, C.A., 2000. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 1222–1233, [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00415-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00415-9).
- Spiazzi, C., Manfredini, V., Silva, F., Flores, E., Itaguiry, A., Vargas, L., Soares, M., Santos, F., 2013. Gamma-oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food Chem. Toxicol.* 55, 526–532, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foxt.2013.01.048>.
- Sudati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., Dias, G.R., Seeger, R.L., Golombeski, R., et al., 2013. Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 37, 118–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.04.006>.
- Sultana, R., 2012. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis Dis.* 1822 (5), 748–752, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.015>.
- Szwajgier, D., Borowiec, K., 2012. Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Inst. Brew.* 118, 40–48, <http://dx.doi.org/10.1002/jib.5>.
- Tamilselvam, K., Braidly, N., Manivasaagam, T., Essa, M.M., Pnsad, N.R., Karthikeyan, S., Thennozhi, A.J., Selvaraju, S., Guillemin, G.J., 2013. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's

- disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (11). <http://dx.doi.org/10.1155/2013/102741>.
- Tanner, C.M., Kameel, F., Ross, G.W., Hopkin, J.A., Goldman, S.M., Koroff, M., Mirra, C., Bhadrikanok, G.S., Kastan, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., Langston, J.W., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002839>.
- Trombino, S., Seifni, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Ando, S., Picci, N., Calviello, G., Palozza, P., 2004. Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2411–2420. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0303924>.
- Ueno, T., Kume, K., 2014. Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 303. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00303>.
- Wang, Y.X., et al., 2014. Hypolipidemic and antioxidative effects of aqueous enzymatic extract from rice bran in rats fed a high-fat and -cholesterol diet. *Nutrients* 6. <http://dx.doi.org/10.3390/n6090396>.
- Winklhofer, K.F., Haass, C., 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 29–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbab.2010.10.036>.
- Whitworth, A.J., Wes, D.P., Pallanck, L.J., 2006. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov. Today* 11 (3–4), 119–126. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03693-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03693-7).
- Zhang, Z., Wei, T., Hou, J., Li, G., Yu, S., Xin, W., 2003. Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 467, 41–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurj.2009.06.002>.
- Zhao, Z., Moghadasi, M.H., 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem.* 691–702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>.

6. CONCLUSÕES

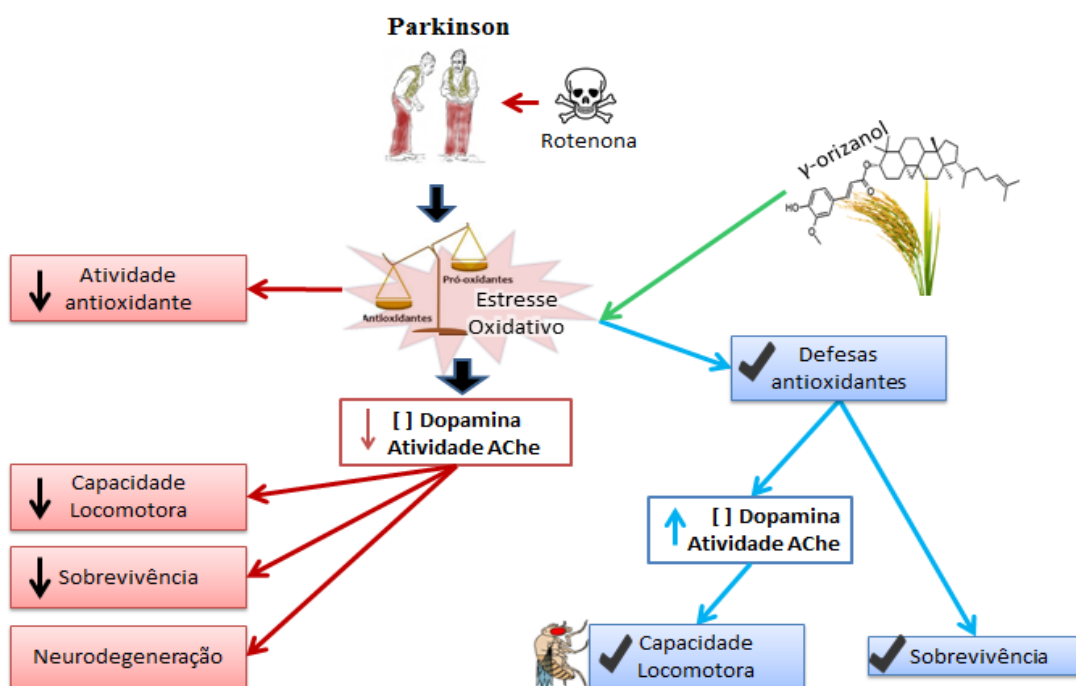
Baseando-se nos resultados apresentados nesta dissertação, pode-se concluir (Figura 9) que:

O tratamento com γ -orizanol foi eficaz em diminuir a mortalidade em *D. melanogaster* expostas à rotenona, bem como reduzir os efeitos tóxicos causados por rotenona associados aos distúrbios locomotores referentes ao teste de escalada e ao tempo de mobilidade avaliado pelos testes de geotaxia negativa e de campo aberto respectivamente.

O γ -orizanol também foi eficaz em proteger a redução dos níveis de dopamina nas cabeças de moscas e da atividade da enzima acetilcolinesterase onde otimizou a função motora das moscas. Por ter potencial antioxidante o γ -orizanol, melhorou as defesas oxidativas evitando o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial.

Assim, os nossos resultados sugerem pela primeira vez um efeito neuroprotetor de γ -orizanol em um modelo da DP induzida pela exposição de *D. melanogaster* a rotenona, uma vez que traz benefícios sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos e neuroquímicos.

Figura 9- Mecanismo de ação de γ -orizanol contra toxicidade induzida por rotenona em *Drosophila melanogaster*.



7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, poderíamos realizar estudos com os seguintes objetivos:

Determinar atividade do Complexo I-III (NADH-citocromo C redutase) e complexo II-III (Succinato-citocromo C redutase) em amostras de *D. melanogaster* expostas à rotenona e tratadas com γ -orizanol;

Determinar geração de o óxido nítrico em amostras de *D. melanogaster* expostas à rotenona e tratadas com γ -orizanol;

Determinar a produção de peróxido de hidrogênio em isolado de mitocôndria de *D.melanogaster* expostas à rotenona e tratadas com γ -orizanol;

Avaliar os efeitos de pré e pós-tratamento com γ -orizanol sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em *D. melanogaster* expostas à rotenona;

Avaliar os efeitos da substituição do γ -orizanol por ácido ferúlico em *D. melanogaster* expostas à rotenona sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos a fim de fazer um comparativo entre os resultados obtidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUGIT M. M.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 7 p. 207-19, 2006.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TAMAURA, T.; UKIYA, M.; KIMURA, Y.; SHIMIZU, N.; TAKIDO, M. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 2313-2319, 2000.
- ALI, Y. O.; ESCALA, W.; RUAN, K.; ZHAI, R. G. Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in *Drosophila* Models of Neurodegeneration. **J. Vis. Exp.**, (49), 2011.
- ANDREAZZA, A. C. **Envolvimento do dano ao dna e estresse oxidativo no transtorno bipolar e no uso de metilfenidato**. 2008.162 f. Tese (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
- ANDRETIC, R.; KIM, Y. C.; JONES, F. S.; HAN, K. A.; GREENSPAN, R.J. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 20392–20397, 2008.
- ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; HIGASHI, Y.; TSUJI, T.; OGAWA, N. Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity. **Ann N Y Acad Sci**, v.1025,p. 69-75, 2004.
- BARONE, M. C.; BOHMANN, D. Assessing Neurodegenerative Phenotypes in *Drosophila* Dopaminergic Neurons by Climbing Assays and Whole Brain Immunostaining. **J. Vis. Exp.** 74, 2013.
- BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 325-334, 2001.
- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 182–217, 2011.
- BEKRIS, L. M.; MATA, I. F.; ZABETIAN, C. P. The Genetics of Parkinson Disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 23, n. 4, p. 228-242, 2010.
- BETARBET, R.; SHERER T. B.; MACKENZIE G.; et al., Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, v. 3, p. 1301-1306 2000.
- BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135–172, 2001.
- BONINI, N. M.; FORTINI, M. E. Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 627– 656, 2003.

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

BRAGA, A. R. **Indução da morte de neurônios dopaminérgicos por MPTP como modelo animal da doença de Parkinson: uma abordagem molecular e farmacológica**. 2008. 132f. Tese (Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BURBULLA, L. F.; KRÜGER, R. Converging environmental and genetic pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurol Sci**. v. 306, p. 1-8, 2011.

CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. **Prog Brain Res**, v. 184, p.17–33, 2010.

CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, v.15, n. 3, p. 239-50, 2006.

CHEN, JINHU.; GUAN, ZHENLONG.; WANG, LIQIN.; SONG, GUANGYAO.; MA BOQING.; WANG, YANQIN. Meta-Analysis: Overweight, Obesity, and Parkinson's Disease. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p.7, 2014.

CHEN, N.; REITH, M. E. A. Structure and function of the dopamine transporter. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 329–339, 2000.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Dopaminergic neurons. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 942–946, 2005.

CHOI, J. S.; JEON, M. H.; MOON, W. S.; MOON, J. N.; CHEON, E. J. et al. In vivo hair growth promoting effect of rice bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, p. 44-53, 2014.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, p. 475–83, 2009.

CICERO, A. F.; GADDI, A. Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. **Phytother Res**, v.15, n. 4, p. 277-89, 2001.

COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **J Neurosci**, v. 24, p. 10993–8, 2004.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Review Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAWSON, T. M.; KO, H. S.; DAWSON, V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**, v. 10, n. 66, p. 646-61, 2010.

DI MONTE, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol**, v.2 p. 531-538, 2003.

EMBRAPA. **Consumo, Mercado e Comercialização do Arroz no Brasil**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap18.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

ESLAMI, S.; ESA, N. M.; MARANDI, S. M.; GHASEMI, G.; ESLAMI S. Effects of gamma oryzanol supplementation on anthropometric measurements & muscular strength in healthy males following chronic resistance training. **Indian J Med Res**, v.139, n. 6, p. 857-63, 2014.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

FERGUSON, L. R.; CHAVAN, R. R.; HARRIS, P. J. Changing concepts of dietary fiber: implications for carcinogenesis. **Nutr Cancer**, v. 39, n. 2, p. 155-69, 2001.

FOLLMER, C.; NETTO, H. J. C. B. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e a-sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 306-313, 2013.

GHATAK, S. B.; PANCHAL S. J. Anti-hyperlipidemic activity of oryzanol, isolated from crude rice bran oil, on Triton WR-1339-induced acute hyperlipidemia in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 642-648, 2012.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 435-448, 1992.

GREENAMYRE, J. T.; SHERER, T. B.; BETARBET, R.; PANOV, A.V. Complex I and Parkinson's disease. **IUBMB Life**, v. 52, p. 135-141, 2001.

GREER, C. L.; GRYGORUK, A.; PATTON, D. E.; LEY, B.; ROMERO-CALDERON, R.; et al. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. **J Neurobiol**, v. 64, n. 3, p. 239-58, 2005.

GUPTA, S.; BENZEROUAL, K. Neuroprotective effects of antioxidants, Idebenone and Ferulic Acid, in MPTP/MPP+ intoxicated PC12 cells as a model of Parkinson's Disease. **The FASEB Journal**, v. 27, p.1175-1177, 2013.

HAUSER, D. N, HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiol. Dis**, v. 51, p. 35-42, 2013.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 9, p. 504-23, 2010.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 83, p. 25-40, 2013.

ISLAM M. S.; YOSHIDA, H.; MATSUKI, N.; ONO, K.; NAGASAKA, R.; et al. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- κ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **J Pharmacol Sci**, v. 111, p. 328–337, 2009.

ISLAM, M. S.; MURATA, T.; FUJISAWA, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; BARI, A. M.; et al. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **Br J Pharmacol**, v. 154, p. 812–824, 2008.

ITAYA, K.; KIYONAGA, J. [Studies of gamma-oryzanol (1). Effects on stress-induced ulcer]. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v. 72, n. 4, p. 475–81, 1976.

JADIYA, P.; CHATTERJEE, M.; SAMMI, S. R.; KAUR, S.; PALIT, G.; NAZIR, A. Sir-2.1 modulates ‘calorie-restriction-mediated’ prevention of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*: implications for Parkinson's disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 413 p. 306–310, 2011.

JIMENEZ DEL-RIO, M.; MARTINEZ, C.; PARDO, C. V. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochem. Res**, v. 35, p. 227–238, 2010.

JPND. **EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research**. Disponível em: < <http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what/> >. Acesso em: 16 dez. 2015.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146–154, 2005.

KANEKO, R.; TSUCHIYA, T. New compound in rice bran and germ oils. **J Chem Soc Jpn**, v. 57, p. 526–529, 1954.

KIM, H. S.; CHO, J. Y.; KIM, D. H.; YAN, J. J.; LEE, H. K.; SUH, H. W.; SONG, D. K. Inhibitory effects of long term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intercerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1–42) in mice. **Biol. Pharm. Bull**, v. 27, p.120–121, 2004.

KIM, H. W.; KIM, J. B.; SHANMUGAVELAN, P.; KIM, S. N.; CHO, Y. S.; et al. Evaluation of γ -oryzanol content and composition from the grains of pigmented rice-germplasms by LC-DAD-ESI/MS. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 149, 2013.

KIM, S. I.; JUNG J. W.; AHN, Y. J.; RESTIFO, L. L.; KWON, H. W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **J. Asia–Pacific Entomol**, v. 14, p. 509–517, 2011.

KOH, P. O. Ferulic acid attenuates the down-regulation of MEK/ERK/p90RSK signaling pathway in focal cerebral ischemic injury. **Neuroscience Letters**, v. 588, p. 18–23, 2015.

KOZUKA, C.; YABIKU, K.; SUNAGAWA, S.; UEDA, R.; TAIRA, S. I.; et al. Brown rice and its component, γ -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. **Diabetes**, v. 61, p. 3084-3093, 2012.

LESCA, P. Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. **Carcinogenesis**, v. 4, n. 12, p. 1651-3, 1983.

LI, G.; XU, X.; XU, K.; CHU, F.; SONG, J.; ZHOU, S.; XU, B.; GONG, Y.; et al. Ligustrazinyll amides: a novel class of ligustrazine-phenolic acid derivatives with neuroprotective effects. **Chem Cent J**, v. 4, n. 9, p. 9, 2015.

LI, N.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; et al. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.10, p. 8516–8525, 2003.

LI, X. Z.; ZHANG, S. N.; LIU, S. M.; LU, F. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease. **Fitoterapia**, v. 84, p. 273-85, 2013.

LIN, F. H.; LIN, J.Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; et al. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. **J Invest Dermatol**, v. 125, n. 4, p. 826-32, 2005 .

LUO, L.; SUN, Y. Neuroprotective effect of ferulic acid in vitro. **Zhong Yao Cai**, v. 34, n. 11, p. 1750-3, 2011.

MACHADO, L. D. P. **Óleo de arroz rico gama orizanol e Treinamento de Velocidade: influência na composição corporal de ratos Wistar**. 2010. 48 f. Monografia (Graduação em Educação Física)-Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2010.

MANJUNATHN, M. J, MURALIDHARA. Standardized extract of *Withania somnifera* (Ashwagandha) markedly offsets rotenone-induced locomotor deficits, oxidative impairments and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 1971-1981, 2015.

MARSH, J. L.; THOMPSON, L. M. *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. **Neuron**, v. 52, p. 169-178, 2006.

MARUF, A. A.; LIP, H.; WONG, H.; et al. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 234, p. 96–104, 2015.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P. K.; CHESSELET, M.F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathol**, v.115, p. 385–398, 2008.

MOKRÝ, J. Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease. **Physiol Res**, v. 44, n. 3, p. 143-50, 1995.

MORRIS, R. G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.

MUHAMMAD, S.; MAZNAH, I.; MAHMUD, R.; ESMAILE, M.; ZUKI, A. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p.1421-1431, 2013.

MUÑOZ-SORIANO, V.; PARICIO, N. *Drosophila* Models of Parkinson's Disease: Discovering Relevant Pathways and Novel Therapeutic Strategies. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p.14, 2011.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical journal**, v. 417, p. 1-13, 2009.

NAKAMURA, K.; NEMANI, V. M.; AZARBAL, F.; SKIBINSKI, G. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. **J. Biol. Chem**, v. 286, p. 20710-20726, 2011.

OBATA T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. **J Neural Transm**, v. 109, n. 9, p. 1159-80, 2002.

OGIWARA, T.; SATOH, K.; KADOMA, Y.; MURAKAMI, Y.; UNTEN, S.; ATSUMI, T.; SAKAGAMI, H.; FUJISAWA, S. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. **Anticancer.Res**, v. 22, p. 2711-2717, 2002.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; ABUL, KHAIR S. B.; HAQUE, M. E. Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, n. 9, p. 5499-510, 2015.

OLTON, D. S. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. **Physiol Behav**, v. 40, p. 793-7, 1987.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 411-436, 2011.

PATEL, M.; NAIK, S. N. Gamma-oryzanol from rice bran oil-A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 569-578, 2004.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S, GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanol. **SBCTA, Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 45-53, 2007.

PERFEITO, R.; REGO A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Rev Neurocienc**, v. 20, n. 2, p. 273-284, 2012.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **B.CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 29-40, 2008.

PETERNELLA, F. M. N.; MARCON, S. S. Descobrendo a Doença de Parkinson: impacto para o parkinsoniano e seu familiar. **Rev Bras Enferm**, v. 62, n. 1, p. 25-31, 2009.

PINTHA K, YODKEEREE S, PITCHAKARN S, LIMTRAKUL P. Anti-invasive Activity against Cancer Cells of Phytochemicals in Red Jasmine Rice (*Oryza sativa* L.). **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 11, p. 4601-4607, 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RAPPOLDA, P. M.; CUIA, M.; CHESSERA, A. S.; et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 51, p. 20766-71, 2011.

RIBEIRO, E. M.; DANTAS, C. C. B.; MEDEIROS, A. C. C.; et al. Bases genéticas da doença de Parkinson. **Grupo Editorial Moreira Jr**, p. 388-398, 2004.

ROOTE, J.; PROKOP, A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. **G3 (Bethesda)**, v. 3, p. 353-358, 2013.

SANG, T. K.; JACKSON, G. R. *Drosophila* Models of Neurodegenerative Disease. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, p. 438-446, 2005.

SEETHARAMAIAH, G. S.; KRISHNAKANTHA, T.P.; CHANDRASEKHARA, N. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. **J Nutr Sci Vitaminol**. v. 36, n. 3, p. 291-297, 1990.

SOLARI, N.; BONITO-OLIVA, A.; FISONE, G.; BRAMBILLA, R. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. **Learn Mem**, v.18, n.10, p.592-600, 2013.

SOTO-JOVER, S.; BOLUDA-AGUILAR, M.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Influence of heating on stability of γ -oryzanol in gluten-free ready meals. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 25-31, 2016.

STEFANIS, L. α -Synuclein in Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 2, 2012.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, p. 17-32, 2013.

SUDATI, J. H.; VIEIRA, F. A.; PAVIN, S. S.; DIAS, G. R.; SEEGER, R. L.; GOLOMBIESKI, R.; et al. Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**, v. 37, p. 118-126, 2013.

TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T.; WANG, A.; SUZUI, M.; OKAMOTO, K.; MORI, H. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 7, p. 1321-5, 1993.

TANNER, C. M.; KAMEL, F.; ROSS, G. W.; HOPPIN, J. A.; GOLDMAN, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, p. 866-872, 2011.

TAYLOR, T. N.; GREENE, J. G.; MILLER, G.W. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's Disease. **Behav Brain Res**, v. 211, n. 1, p. 1-10, 2010.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, 2011.

UENO, T.; KUME, K. Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 303, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Terra de Arroz**. 2004. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/gr_divisao.htm. Acesso em: 19 de dez. 2015.

VERMILYEA, S. C.; EMBORG, M.E. α -Synuclein and nonhuman primate models of Parkinson's disease. **J Neurosci Methods**, v. 30, n. 255, p. 38-51, 2015.

WANG, Y. X.; LI, Y.; SUN, A. S.; et al. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of Aqueous Enzymatic Extract from Rice Bran in Rats Fed a High-Fat and -Cholesterol Diet. **Nutrients**, v. 6, p. 3696 -3710, 2014.

WARE, G. *The Pesticide Book*; Thomson Publications: Fresno, CA, 1989, 340 p.

WHITWORTH, A. J, WES D. P, PALLANCK, L. J. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3-4, p. 119-126, 2006.

WHO. **Rotenone: health and safety guide**, nº73. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg073.htm>> Acesso em: 16 dez. 2015.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dementia/en/>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, D.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **J Nutr Biochem**, v.18, p. 105-112, 2007.

WINKLHOFER, K. F.; HAASS, C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochim. Biophys.Acta**, v. 1802, p.29-44, 2010.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. **J Agric Food Chem**, v. 47, p. 2724-2728, 1999.

XUN, Z.; SOWELL, R.; KAUFMAN, T. C.; et al. Protein Expression in a *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 348-357, 2007.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; TAMAURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biol Pharm Bull**, v. 21, p. 1072-1076, 1998.

YOON, S. W.; PYO, Y. G.; LEE, J.; LEE, J. S.; KIM, B. H.; KIM, I. H. Concentrations of tocopherols and γ -oryzanol compounds in rice bran oil obtained by fractional extraction with supercritical carbon dioxide. **J Oleo Sci**, v. 63, n. 1, p. 47-53, 2014.

ZAMPOL, M. A. **Natural antioxidants action in a *Saccharomyces cerevisiae* parkinsonian model**. 2013. 93 f. Masters Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZHANG, L.; WANG, H.; WANG, T.; JIANG, N.; YU, P.; CHONG, Y.; FU, F. Ferulic acid ameliorates nerve injury induced by cerebral ischemia in rats. **Exp Ther Med**, v. 9, n. 3, p. 972-976, 2015.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, p. 691–702, 2008.

ZHOU, T.; XU, B.; QUE, H.; LIN, Q.; LI, V. S.; LIU, S. Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with primary neurons from rat cortex. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 66, n. 2, p. 105-12, 2006.

ZOLALI, E.; ASGHARIAN, P.; HAMISHEHKAR, H.; et al. Effects of gamma oryzanol on factors of oxidative stress and sepsis-induced lung injury in experimental animal model. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 12, p. 1257-63, 2015.