

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

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

**IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A UMA SOBRECARGA DE FERRO EM
ADULTOS E NA PROLE DE *Drosophila melanogaster* E OS EFEITOS DA
HESPERIDINA**

**Uruguiana
2021**

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

**IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A UMA SOBRECARGA DE FERRO EM
ADULTOS E NA PROLE DE *Drosophila melanogaster* E OS EFEITOS DA
HESPERIDINA**

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

Orientadora: Dr^a. Marina Prigol

Coorientador: Dr. Gustavo Petri Guerra

Uruguaiana

2021

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

**IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A UMA SOBRECARGA DE FERRO EM
ADULTOS E NA PROLE DE *Drosophila melanogaster* E OS EFEITOS
DA HESPERIDINA**

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

Área de concentração: Bioprospecção molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 23 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Elton Luis Denardin
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm
(UFPEL)

Prof^a. Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa
(UFSM)

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
(UNIPAMPA)



Assinado eletronicamente por **JEFERSON LUIS FRANCO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/08/2021, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **ELTON LUIS GASPAROTTO DENARDIN, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/08/2021, às 19:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Ethel Antunes Wilhelm, Usuário Externo**, em 23/08/2021, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **MARINA PRIGOL, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/08/2021, às 19:53, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0597632 e o código CRC 118EAC3A.

MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pela autora através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

319i POETINI SILVA, MÁRCIA RÓSULA
IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A UMA SOBRECARGA DE FERRO EM
ADULTOS E NA PROLE DE *Drosophila melanogaster* E OS EFEITOS DA
HESPERIDINA / MÁRCIA RÓSULA POETINI SILVA.
126 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2021.
"Orientação: MARINA PRIGOL".

1. COMPORTAMENTO. 2. ANSIEDADE. 3. MEMÓRIA. 4.
HIPERATIVIDADE. 5. PERÍODO EMBRIONÁRIO. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a CAPES pela concessão da bolsa de estudo nos períodos do mestrado e doutorado. Agradeço a aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, à UNIPAMPA pelas bolsas de estudo concedidas durante o período da graduação e pelo apoio até o presente momento e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade e pelos ensinamentos.

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

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra.

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

As minhas colegas de laboratório Elize, Dieniffer, Francieli, Nathalie, Luana, Magna, Eliana, Stifani, Vandrezza, Franciane e ao Mustafa.

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

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

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

Muito obrigada!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill

RESUMO

O ferro (Fe) é um nutriente fundamental para todas as células vivas, mas em excesso pode ser tóxico por catalisar a formação de radicais livres. A exposição a uma sobrecarga de Fe durante o período embrionário também é preocupante, podendo afetar a construção de circuitos cerebrais, comprometendo principalmente os sistemas de aminas biogênicas, sendo capaz de alterar a fisiologia, síntese e sinalização destes neurotransmissores. A hesperidina (Hsd) é um flavonoide cítrico, que possui propriedades farmacológicas como antioxidante e principalmente neuroprotetor, já o L-dopa foi utilizado neste estudo como controle positivo. O objetivo do estudo foi avaliar se a exposição à sobrecarga de Fe durante os períodos adulto e embrionário de *Drosophila melanogaster* está relacionada a alterações neurodegenerativas em adultos e neurodesenvolvimentais na geração filial (F1), bem como, os efeitos terapêuticos da Hsd frente as possíveis alterações neurodegenerativas. Para avaliar o efeito da sobrecarga de Fe, as moscas adultas foram expostas à dietas contendo tratamento por 10 dias. Para isso as moscas foram divididas em seis grupos: Controle, Hsd (10 µM), L-dopa (1 mM), Fe (1 mM), Fe + Hsd e Fe + L-dopa. As alterações motoras foram avaliadas pelos comportamentos motor (grooming, agressividade e equilíbrio) e teste de memória não motora por meio de fototaxia aversiva e testes que caracterizam comportamentos de ansiedade em moscas, como limpeza e agressão, além dos níveis das aminas biogênicas dopamina (DA) e octopamina (OA). Para avaliar o efeito da sobrecarga de Fe durante o período embrionário, as moscas foram expostas ao Fe (0,5, 1 e 5 mM) por 10 dias de tratamento, posteriormente foram retirados os progenitores e esperado a eclosão das moscas F1 para posteriores análises comportamentais e bioquímicas. Outra avaliação abordada neste estudo foi os níveis de Fe nas dietas, na cabeça e no corpo das moscas (progenitores e na prole), separadas por sexo. Como resultados, no manuscrito 1 observamos que a Hsd atenuou as alterações não motoras, como déficits de memória e ansiedade, melhorou os déficits monoaminérgicos e reduziu os níveis de Fe na cabeça das moscas adultas. Como resultados do artigo 1, observamos que os níveis de Fe das moscas F1 foi diretamente proporcional ao que é incorporado durante o período de desenvolvimento embrionário; também observamos um atraso na eclosão (5 mM),

fato que pode estar relacionado à redução da viabilidade celular do tecido ovariano de moscas progenitoras. As moscas F1 que foram expostas ao Fe (1 e 5 mM) mostraram aumento na atividade locomotora (hiperatividade) e um aumento significativo com maior número de movimentos repetitivos e agressivos. Também foi possível observar um aumento nos níveis de aminas biogênicas DA e 5-HT e um aumento na atividade da tirosina hidroxilase (TH) no Fe (1 e 5 mM). Esses resultados demonstraram que o dano comportamental induzido pela exposição ao Fe pode estar associado ao aumento nos níveis monoaminérgicos. Coletivamente os nossos dados sugerem que a Hsd atenuou as complicações causadas pela exposição ao Fe, diminuindo os déficits locomotores e neuroquímicos em moscas adultas.

Palavras-chave: comportamento; ansiedade; memória; hiperatividade; período embrionário; aminas biogênicas.

ABSTRACT

Iron (Fe) is a fundamental nutrient for all living cells, but in excess it can be toxic as it catalyzes the formation of free radicals. Exposure to Fe overload during the embryonic period is also a concern, as it can affect the construction of brain circuits, mainly compromising the biogenic amine systems, being able to alter the physiology, synthesis and signaling of these neurotransmitters. Hesperidin (Hsd) is a citrus flavonoid that has pharmacological properties as an antioxidant and mainly neuroprotective, whereas L-dopa was used in this study as a positive control. The aim of the study was to evaluate whether exposure to Fe overload during the adult and embryonic periods of *Drosophila melanogaster* is related to neurodegenerative changes in adults and neurodevelopmental changes in the filial generation (F1), as well as the therapeutic effects of Hsd against possible changes neurodegenerative to assess the effect of Fe overload, adult flies were exposed to diets containing treatment for 10 days. The flies were divided into six groups: Control, Hsd (10 μ M), L-dopa (1 mM), Fe (1 mM), Fe + Hsd and Fe + L-dopa. Motor changes were evaluated by motor behavior (grooming, aggressiveness and balance) and non-motor memory test through aversive phototaxy and tests that characterize anxiety behaviors in flies, such as cleaning and aggression, in addition to the levels of biogenic amines dopamine (DA) and octopamine (OA). To evaluate the effect of Fe overload during the embryonic period, the flies were exposed to Fe (0.5, 1 and 5 mM) for 10 days of treatment, then the parents were removed and the F1 flies were expected to hatch for further analysis. behavioral and biochemical. Another evaluation addressed in this study was the Fe levels in the diets, head and body of flies (parents and offspring), separated by sex. As a result, in manuscript 1 we observed that Hsd attenuated non-motor alterations, such as memory and anxiety deficits, improved monoaminergic deficits and reduced Fe levels in the head of adult flies. As a result of article 1, we observed that the Fe levels of F1 flies was directly proportional to what is incorporated during the period of embryonic development; we also observed a delay in hatching (5 mM), which may be related to the reduction in cell viability of the ovarian tissue of progenitor flies. F1 flies that were exposed to Fe (1 and 5 mM) showed an increase in locomotor activity (hyperactivity) and a significant increase with a greater number of repetitive and aggressive movements. It was also possible to observe an increase in the levels of

biogenic amines DA and 5-HT and an increase in the activity of Tyrosine Hydroxylase (TH) in Fe (1 and 5 mM). These results demonstrated that the behavioral damage induced by exposure to Fe may be associated with an increase in monoaminergic levels. Collectively, our data suggest that Hsd attenuated complications caused by exposure to Fe, decreasing locomotor and neurochemical deficits in adult flies.

Keywords: behavior; anxiety; memory; hyperactivity; embryonic period; biogenic amines.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Mecanismos de absorção intestinal de Fe	27
Figura 2. Principais vias de captação, armazenamento e exportação do Fe em <i>Drosophila melanogaster</i>	28
Figura 3. O estresse oxidativo do Fe na mitocôndria: reação de Fenton e formação do radical hidroxila.....	32
Figura 4. Relação entre o comprometimento do metabolismo do Fe e as doenças neurodegenerativas	34
Figura 5. Ciclo de desenvolvimento da <i>Drosophila melanogaster</i> (do embrião até o adulto)	41
Figura 6. Níveis de dopamina na DP	44
Figura 7. Estrutura química da hesperidina (a) e hesperitina (b)	48
Figura 8. Fluxograma esquemático	108

MANUSCRITO

Figure 1. Schematic diagram of the experimental treatment protocol	60
Figure 2. Evaluation of food consumption of <i>Drosophila melanogaster</i>	66
Figure 3. Effect of long-term exposure to Hesperidin (Hsd) on compared to L-dopa in a model organism of Parkinson like disease induced by Iron (Fe) in <i>Drosophila melanogaster</i>	67

Figure 4. Action of Hesperidin (Hsd) in the development of non-motor changes such learning and short-term memory in a model of Parkinson like disease induced by exposure to Iron (Fe) in *Drosophila melanogaster*68

Figure 5. Evaluation of Hesperidin (Hds) co-exposure in anxiety mimicking behaviors by assessing the number of grooming episodes (A), aggressiveness (B) and assessing the motor ability (balance test) (C) tests of *Drosophila melanogaster* with Parkinson like disease induced by iron (Fe) exposure 70

Figure 6. Evaluation of Hesperidin (Hsd) in the levels of Dopamine (DA) (A), Octopamine (OA) (B), and in the evaluation of the activity of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) (C) in *Drosophila melanogaster* flies with Parkinson like disease, induced by exposure to iron (Fe) 72

Figure 7. Quantification of iron (Fe) levels in the head (A) and body (B) of *Drosophila melanogaster* submitted to 10 days of treatment according experimental protocol 74

ARTIGO

Figure 1. Experimental design92

Figure 2. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, 5 mM) during the embryonic development period on the flies' hatch rate, where the number of hatched flies was monitored daily 94

Figure 3. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, and 5 mM) during the embryonic development on locomotor performance in *Drosophila melanogaster*. The behavioral tests to assess locomotion were A) negative geotaxis (female) and B) male, C) open field (female) and D) (male) 95

Figure 4. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, and 5 mM) during the embryonic

development on locomotor performance in *Drosophila melanogaster*. The behavioral tests to assess locomotion were A) grooming (female) and B) male, C) aggressiveness(female) and D) (male) 96

Figure 5. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, and 5 mM) during the embryonic development in A) dopamine, B) serotonin, C) Octopamine and D) tryptophan levels of *Drosophila melanogaster* 96

Figure 6. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, and 5 mM) during the embryonic development in the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in female A) and B) male, tyrosine hydroxylase C) in female and D) male, E) levels of reactive species in female and F) in male of *Drosophila melanogaster*96

Figure 7. Amount of food consumed (% of control) by *Drosophila melanogaster* in the control and Fe treatment groups at concentrations (0.5, 1 and 5 mM) 97

Figure 8. Effects of exposure to Fe (0.5, 1 and 5 mM) in progenitors. A) the MTT test on the ovary tissue of female flies. Both graphs express the results in percentage (%)in relation to the control group 97

Figure 9. Effects of Fe exposure (0.5, 1 and 5 mM) on parents (after the 10-day trial period) A) females and B) on males. In offspring after the period of embryonic development (newly hatched flies) C) females and D) males in iron levels in flies and E) iron levels in diet 98

Figura 10. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitors) on the negative geotaxis test in females (A) and males (B); open field test in females (C) and males (D); and the number of grooming episodes in females (E) and males (F) of F1 flies after their embryonic development in these different Fe concentrations. The data are represented as the mean SD. *Different from the control group (p <0.05)99

Figura 11. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitors) on acetylcholinesterase (AChE) activity in females (A) and males (B); and tyrosine hydro Xylase activity in females (C) and males (D) of F1 flies after their embryonic development in these different concentrations of Fe. The data are represented as the mean SD.*Different from the control group ($p < 0.05$)..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

BHE - Barreira hematoencefálica

CL - Corpos de Lewy

CTE - Cadeia de transporte de elétrons

DA - dopamina

DAT- Transportador de dopamina

DDC - DOPA descarboxilase

DDH - Dopamina desidroxilase

DMT-1 - Transportador de metal bivalente -1

DP- Doença de Parkinson

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

EM – Esclerose múltipla

ER - Espécies reativas

ERN_s – Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FtMt - Ferritina intramitocondrial

FPN - Ferroportina

HCP1 - Proteína heme transportadora 1

Hsd - Hesperidina

Hst - Hesperitina

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

L-dopa - L-3,4-di-hidroxifenilalanina

L-TYRO - L-tirosina

MAO - Monoamina oxidase

MPTP - 1-metil 4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

MVL - Malvolio

NE - Norepinefrina

OA - Octopamina

OE - Oligoelemento

RL - Radical livre

SN - Sistema nervoso

SNC - Sistema nervoso central

SNpc - Substância negra parte compacta

TDAH - Transtornos de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TDC - Tirosina descarboxilase

TEA - Transtorno do Espectro do Autismo

TF - Transferrina

TH - Tirosina hidroxilase

TND - Transtornos de neurodesenvolvimento

TPH - Triptofano hidroxilase

TYR - Tiramina

TβH - Tiramina β-hidroxilase

VMAT - Antiportador de prótons não-seletivo de monoaminas

α-sin - Alfa-sinucleína

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

Fe - Ferro

Mn – Manganês

Fe²⁺ - Ìon ferroso

Fe³⁺ - Ìon férrico

Fe-S - Fe-enxofre

FeSO₄ - Sulfato ferroso

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

O₂ – Oxigênio

O²⁻ - Radical superóxido

ROO⁻ - Radical peroxil

ROOH - Peróxidos orgânicos

OH^{*} - Radical hidroxil

APRESENTAÇÃO

Nas seções **INTRODUÇÃO** e **DESENVOLVIMENTO** a revisão da literatura sobre os temas abordados nesta tese.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo científico e manuscrito, que se encontram no item **MANUSCRITO** e **ARTIGO CIENTÍFICO**. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, encontradas no final desta tese, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos artigos presentes neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** dizem respeito às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DESENVOLVIMENTO**, **DISCUSSÃO** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS** desta tese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1. Fe: Essencialidade	26
2.2. Transporte, metabolismo e excreção do Fe	27
2.3. Toxicidade do Fe	29
2.4. Estresse oxidativo e Fe	31
2.5. Fe e alterações neurodegenerativas	34
2.6. Alterações fisiopatológicas na doença de Parkinson e Fe	35
2.7. Alterações neurodesenvolvimentais e Fe	36
2.8. <i>Drosophila melanogaster</i> como um modelo de estudo do Fe em adultos e na prole	40
2.9. Alterações monoaminérgicas em <i>Drosophila melanogaster</i>	43
2.10. Abordagens terapêuticas.....	47
2.11. Produtos naturais e a neuroproteção	47
2.12. Hesperidina	48
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4. RESULTADOS	67
4.1 Manuscrito: Improvement of non-motor and motor behavioral alterations associated with Parkinson-like disease in <i>Drosophila melanogaster</i> : comparative effects of treatments with hesperidin and L-dopa	67
4.2 Artigo: Iron overload during the embryonic period develops hyperactive like behavior and dysregulation of biogenic amines in <i>Drosophila melanogaster</i> ...	95

5. DISCUSSÃO	103
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
REFERÊNCIAS	111
ANEXO	126

1. Introdução

O Ferro (Fe) é necessário para o funcionamento basal de todas as células, sendo essencial na sobrevivência de quase todos os organismos, porque desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos como transporte de oxigênio, respiração celular, regulação gênica e biossíntese de DNA. O Fe participa de tais processos por meio dos grupos protéticos heme e Fe-enxofre, nos quais o Fe mostra sua capacidade de trocar elétrons com diferentes substratos (CALAP-QUINTANA et al., 2017). No entanto, o excesso de Fe promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a danos celulares (CALAP -QUINTANA et al., 2017). O Fe se acumula progressivamente no cérebro com a idade e esse acúmulo pode ser devido a uma alteração no metabolismo do Fe no sistema nervoso central (SNC), envolvendo fatores genéticos e ambientais (LU et al., 2017; IANG et al., 2017). Essa sobrecarga de Fe danifica os neurócitos, e induz ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a síndrome de Parkinson (LI et al., 2020). Uma desregulação no metabolismo do Fe, que inclui sua absorção, armazenamento e transporte, desempenha um papel fundamental nas doenças neurodegenerativas em humanos (JIANG et al., 2017).

O excesso de Fe em órgãos vitais, mesmo em casos leves de sobrecarga de Fe, aumenta o risco de doença hepática (cirrose, câncer), insuficiência cardíaca, diabetes mellitus, osteoartrite, osteoporose, síndrome metabólica, hipotireoidismo, hipogonadismo, vários sintomas e em alguns casos, a morte prematura (FRAGA e OTEIZA, 2002; FLEMING e PONKA, 2012). O excesso de Fe pode acelerar doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson de início precoce, Huntington, epilepsia e esclerose múltipla (JOHNSON et al., 1999; POWERS et al., 2003). A sobrecarga de Fe pode ser hereditária (genética) ou adquirida ao receber várias transfusões de sangue, receber injeções ou injeções de Fe ou consumir altos níveis de Fe suplementar (PIETRANGELO, 2010).

Este metal é um micronutriente indispensável para o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* (MANDILARAS et al., 2013). Além disso, o Fe mitocondrial também é essencial para o crescimento normal das larvas (LIU et al., 2020). No entanto, uma desregulação nutricional de oligoelemento como o Fe nos ovos

fertilizados pode ser uma das razões para o atraso no desenvolvimento da prole incluindo o ovo-pupa e na transição pupa-adulto (CHEN et al., 2014). Assim como, afeta a embriogênese normal de *Drosophila melanogaster* e interrompe o crescimento larval e a metamorfose (MANDILARAS et al., 2013).

Animais invertebrados como a *Drosophila melanogaster* têm sido um modelo de estudo eficiente e amplamente explorado como uma ferramenta genética para a compreensão de problemas biológicos complexos, como a toxicidade por metais. A exposição crônica ao Fe afeta a sobrevivência e causa um déficit locomotor em *Drosophila melanogaster* (ORTEGA-ARELLANO et al., 2017; BONILLA-RAMIREZ et al., 2011). Além disso, a concentração de Fe aumenta cronicamente na cabeça de *Drosophila melanogaster* expostas a este metal e o acúmulo de metal na cabeça da mosca está associado a uma neurodegeneração de vários aglomerados dopaminérgicos neuronais (ORTEGA-ARELLANO et al., 2017). A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* representa um modelo relevante para estudos toxicológicos de curto e longo prazo. Este modelo apresenta muitas vantagens, incluindo alta fecundidade, curto ciclo de vida, facilidade de manejo e criação, ferramentas genéticas e bancos de dados disponíveis, aliados a um bom conhecimento da biologia, fisiologia, desenvolvimento e comportamento desta espécie (PANDEY e NICHOLS, 2011). A *Drosophila melanogaster* é um modelo animal alternativo, que possui um amplo leque possibilidades experimentais e tem demonstrado eficiência em estudos relacionados a processos biológicos e patológicos humanos (MASAMITSU e HIDEKI, 2018).

Vários estudos buscam avaliar os efeitos terapêuticos de antioxidantes naturais frente a exposição a metais em altas concentrações (KHAN e PARVEZ, 2015; JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010; BONILLA-RAMIREZ; JIMENEZ-DEL-RIO e VELEZ-PARDO, 2013). Nestes antioxidantes naturais temos a Hesperidina (Hsd) (3,5,7-trihidroxitravanona-7-ramnoglicosídeo), uma flavonona encontrada em frutas cítricas. A Hsd apresentou efeitos na quimioprevenção e na eliminação de radicais livres, bem como propriedades anti peroxidação lipídica em membranas biológicas (GARG et al., 2001; HAJIALYANI et al., 2019). A Hsd é um composto fenólico natural com uma ampla gama de efeitos biológicos, entre os quais a sua ação neuroprotetora tem sido investigada (HAJIALYANI et al., 2019; POETINI et al., 2018) e a habilidade de compostos naturais de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) são importantes em sua ação neuroprotetora, demonstrando um efeito inibitório contra

o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (HAJIALYANI et al., 2019; PARI et al., 2015). Nesse contexto, nosso objetivo foi avaliar se a exposição à sobrecarga de Fe durante os períodos adulto e embrionário de *Drosophila melanogaster* está relacionada a alterações neurodegenerativas em adultos e neurodesenvolvimentais da geração filial (F1), bem como os efeitos terapêuticos da Hsd frente às possíveis alterações neurodegenerativas.

2. Revisão de literatura

2.1. Fe: Essencialidade

O Fe pertence ao grupo VIII da tabela periódica e é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre (WEBER et al., 2006), sendo o mais abundante dos metais de transição (WACHERSHAUSER, 2007). Em vista de sua ampla distribuição, estamos constantemente expostos ao Fe principalmente por meio da ingestão de alimentos. Este metal é um elemento essencial para os seres humanos (IWAI, 2019; TANJA GRUBIĆ KEZELE, 2018; CHEN et al., 2019), sua importância se deve ao fato do Fe ser um constituinte da hemoglobina, mioglobina e atua como co-fator para uma variedade de enzimas, sendo que até 30% do Fe no corpo é encontrado em formas de armazenamento, como ferritina e hemossiderina, no baço, fígado e medula óssea e uma pequena quantidade é associado à transferrina (GOLDHABER, 2003).

O Fe dietético encontra-se na forma heme ou não-heme, onde o Fe não heme é encontrado em alimentos de origem animal e o Fe não-heme é encontrado em vegetais. A maioria do Fe heme na dieta é de mioglobina e hemoglobina e é derivado de animais (CARPENTER e MAHONEY, 1992). No entanto, ácidos orgânicos como ácido cítrico e ácido ascórbico, também ajudam a manter o Fe não-heme em uma forma reduzida e solúvel, e podem potencializar a sua absorção. No entanto outros componentes dietéticos como fitatos, taninos e polifenóis, podem ligar-se ao Fe e impedir sua absorção. O Fe heme tende a ser absorvido de forma mais eficiente e sua absorção é menos dependente da composição da dieta (ANDERSON e FRAZER, 2017).

No sistema nervoso central (SNC), o Fe está envolvido em diversas atividades neurológicas, onde uma disfunção na homeostase deste metal pode interferir nas atividades enzimáticas, alterando o status neurofisiológico e resultando em doenças neurológicas (CHEN et al., 2019). Este metal é considerado “Oligoelemento” (OE) devido à sua essencialidade, precisa estar presente na dieta humana para manter as funções fisiológicas normais (GOLDHABER, 2003; FRAGA, 2005). A atividade biológica do Fe está fortemente associada à presença de elétrons não pareados que permitem sua participação em reações redox. Nos sistemas biológicos, este metal

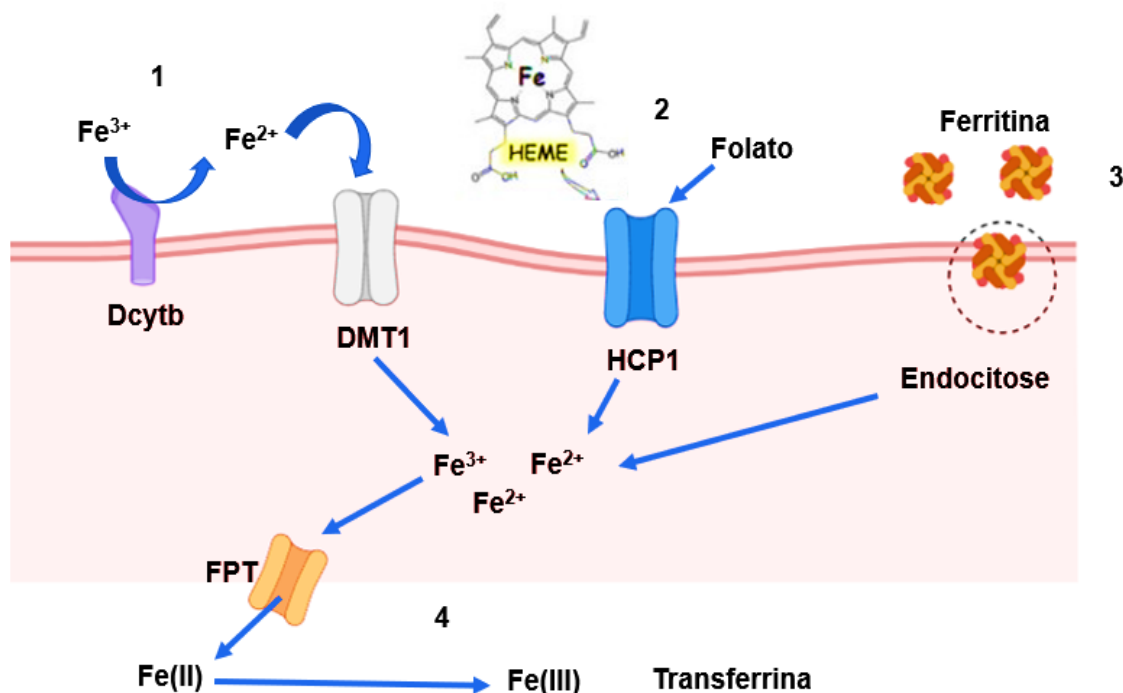
está principalmente ligado a proteínas, formando metaloproteínas. Muitos dos metais em metaloproteínas fazem parte de sistemas enzimáticos, têm funções estruturais e de armazenamento ou usam a proteína para serem transportados para o seu local alvo no organismo (FRAGA, 2005).

A maioria dos metais fazem parte de sistemas enzimáticos. Em enzimas, os metais participam de processos catalíticos como os constituintes de sítios ativos de enzimas, estabilizadores da estrutura terciária ou quaternária, auxiliares na formação de complexos de ligação fraca com o substrato que pode contribuir para orientar o substrato para reações ou estabilizar estados de transição (FRAGA, 2005).

2.2. Transporte, metabolismo e excreção do Fe

O Fe pode ser absorvido no enterócito através de mecanismos distintos: 1) sistema transportador de metal divalente 1 (DMT1) e Fe duodenal do citocromo b (Dcytb), que está envolvido na absorção de Fe divalente livre (Fe^{2+}), 2) proteína heme transportadora 1 (HCP1) que é um transportador de folato acoplado a prótons, que está envolvido na absorção de Fe-heme e folato e 3) um sistema dependente de receptor dependente de clatrina, que está envolvido na absorção do Fe ligado à ferritina vegetal via endocitose. Após a absorção, 4) todas as formas de Fe são transformadas em Fe catiônico que pode ser exportado dos enterócitos pela ferroportina (FPN), como podemos perceber na figura 1. No plasma, o Fe^{2+} é oxidado pela ceruloplasmina ou hefaestatina e liga-se à transferrina. A transferrina (TF) pode distribuir Fe para todos os tecidos do corpo, incluindo o cérebro onde a sobrecarga de Fe contribui para a neurodegeneração (FARINA et al., 2013).

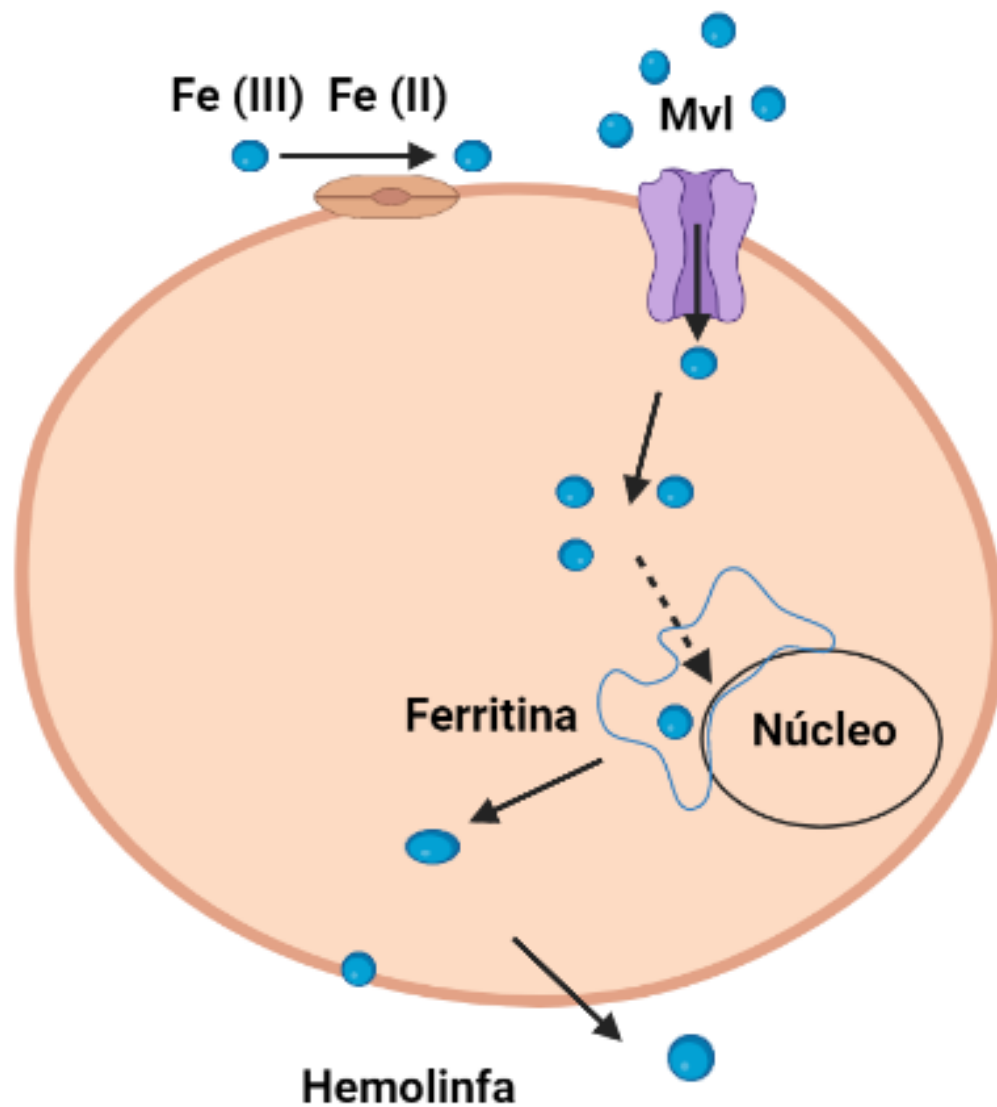
Figura 1. Mecanismos de absorção intestinal de Fe



Fonte: Adaptado de Farina et al., 2013.

A *Drosophila melanogaster* compartilha muitos genes-chave envolvidos no metabolismo do Fe com mamíferos, onde o Malvolio (Mvl) conforme demonstrado na figura 2, ortólogo de *Drosophila melanogaster* do transportador de metal divalente (DMT1) é expresso no intestino médio da mosca e foi proposto para funcionar como um importador de Fe dietético de forma semelhante ao seu homólogo mamífero. A TF também é uma proteína de ligação ao Fe abundante na hemolinfa, para a qual várias funções foram sugeridas em insetos (CALAP-QUINTANA et al., 2017).

Figura 2. Principais vias de captação, armazenamento e exportação do Fe em *Drosophila melanogaster*



Fonte: Adaptado de Calap-Quintana et al., 2017.

2.3. Toxicidade do Fe

Nos seres humanos a toxicidade induzida por Fe é caracterizada por sintomas como vômitos e diarreia, com efeitos subsequentes nos sistemas cardiovascular e nervoso central, rim, fígado e no sangue (ANDERSON, 1994). Uma doença genética conhecida como hemocromatose hereditária é caracterizada pelo acúmulo longo e lento de Fe nos tecidos (BACON et al., 1999). A sobrecarga de Fe também foi relatada em pessoas com certos tipos de anemia, especialmente quando há anormalidades na síntese de hemoglobina (GREEN et al., 1968). Vários dos efeitos biológicos, principalmente tóxicos, onde o Fe pode promover a produção exacerbada de espécies reativas (FRAGA e OTEIZA, 2002). Além disso, o Fe exerce

seu efeito tóxico na mitocôndria desviando os elétrons da cadeia de transporte de elétrons, desacoplando a fosforilação oxidativa, levando assim ao metabolismo anaeróbico (BARANWAL e SINGHI, 2003).

Uma das causas da toxicidade que o Fe, se deve a capacidade de se acumular em muitos órgãos, principalmente no fígado, coração e pâncreas. Além disso, as consequências clínicas desse acúmulo incluem fibrose hepática e cirrose, aumento do risco de carcinoma hepatocelular, cardiomiopatia, artrite e diabetes (FLEMING e PONKA, 2012).

Altas concentrações de Fe tecidual têm sido associadas ao desenvolvimento e progressão de várias condições patológicas, incluindo certos cânceres, doenças hepáticas e cardíacas, diabetes, anormalidades hormonais e disfunções do sistema imunológico (FRAGA e OTEIZA, 2002). Níveis mais elevados de Fe sérico aumentam o risco de desenvolver DP (JOHNSON et al., 1999; POWERS et al., 2003).

Estudos recentes mostraram que Fe^{2+} aumenta a oxidação de monoaminas como 5-HT, DA e toxinas relacionadas e que os produtos de oxidação formados podem sofrer uma ligação covalente em grupos sulfetrilas livres de proteínas como actina e "proteínas de ligação de 5-HT" que estão presentes em extratos cerebrais solúveis (PAUNOVIE et al. 2020). É provável que o Fe acelere a oxidação da DA sem a intervenção da enzima monoamina oxidase B, onde o Fe aumentando a taxa de oxidação da DA pode produzir quinonas, compostos que se ligam covalentemente a proteínas e induzem agregados de proteínas moleculares de alta molecularidade (VELEZ-PARDO et al., 2009). Estas considerações são importantes, pois sugere uma possível compreensão do mecanismo pelo qual os neurônios dopaminérgicos são destruídos em algumas doenças neurodegenerativas (VELEZ-PARDO et al., 2009).

Recentemente, foi identificada uma forma dependente de Fe de morte celular não apoptótica conhecida como ferroptose, caracterizado por acúmulo de ROS lipídico induzido por Fe, o que leva ao estresse oxidativo intracelular (WAN, REN e WANG, 2019). A ferroptose é uma forma regulamentada de morte celular impulsionada pela perda de atividade da enzima de reparação lipídica a glutathiona peroxidase 4 (GPX4) e posterior acúmulo de EROs (YANG e STOCKWELL, 2016; CAO e DIXON, 2016).

A ferroptose é depende de Fe intracelular, mas não de outros metais, onde é distinguível de outras formas de morte celular regulamentada porque não requer caspases (mediadores de apoptose), esgotamento ATP ou geração de EROs mitocondrial (mediadores da necroptose), Bax/Bak (mediadores essenciais da

permeabilização da membrana externa mitocondrial), ou elevações em Ca^{2+} intracelular (DIXON et al., 2012). Embora identificada pela primeira vez em células cancerosas, a ferroptose tem mostrado ter implicações significativas em várias doenças neurológicas, como derrame isquêmico e hemorrágico, doença de Alzheimer e DP (WEILAND et al., 2019). No entanto, esses efeitos causados pela ferroptose podem ser atenuados por quelação de Fe, não só previne a ferroptose, mas também a morte celular induzida por H_2O_2 (DIXON et al., 2012). A ferroptose pode desencadear um processo de inflamação crônica que pode estimular mais morte e inflamação, gerando um ciclo vicioso, que pode estar envolvido em algumas doenças (XIE et al., 2016). Além disso, a ferroptose pode não atuar em insetos, mas sim uma característica inesperada das células mamíferas (DIXON, 2017).

O envolvimento da ferroptose na DP ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, a inibição da ferroptose pode apresentar um efeito neuroprotetor (DIXON et al., 2012). A ferroptose é uma forma oxidativa de morte celular necrosada altamente relevante para muitas doenças degenerativas e câncer. Estratégias de tratamento de doenças em que o envolvimento da ferroptose está inserida, é importante a descoberta de novos inibidores e indutores de ferroptose pode ser um grande potencial no desenvolvimento de medicamentos inovadores para o tratamento de doenças ainda incuráveis (LORENZ e CONRAD, 2019; DO VAN et al., 2016).

A ferroptose pode desempenhar um papel crítico na supressão do tumor e tem sido proposta como um alvo potencial para a terapia do câncer. No entanto, a regulação da ferroptose *in vivo* permanece difícil devido à falta de compostos que possam efetivamente ativar ou reprimir a ferroptose (YUAN, PRATTE e GIARDINA, 2021).

2.4. Estresse oxidativo e Fe

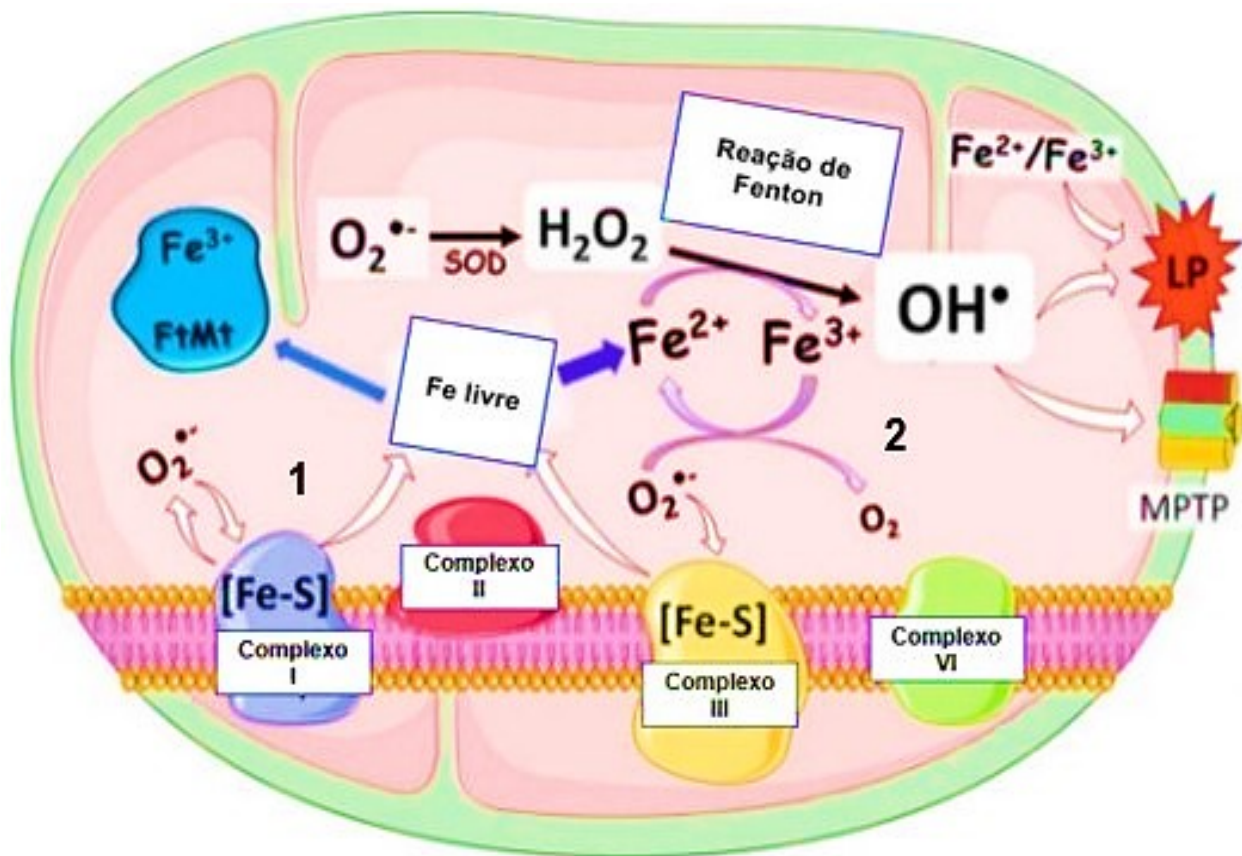
Estresse oxidativo é um distúrbio metabólico no quais moléculas instáveis, também denominadas espécies reativas (ERs), ocasionam injúrias celulares devido a reações de óxido-redução com moléculas orgânicas, tais como fosfolipídeos, proteínas e DNA. Essas injúrias podem acarretar perda da função celular e, conseqüentemente, disfunções importantes nos sistemas orgânicos. Tais espécies são formadas constantemente na fisiologia celular normal, seja através do metabolismo do oxigênio, gerando, respectivamente, as espécies reativas do

oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN). Devido ao potencial tóxico dessas moléculas, mecanismos de proteção endógenos, representados pelos agentes antioxidantes, entram em ação para neutralizar esses compostos e impedir a injúria celular. Quando a produção dessas espécies excede a capacidade antioxidante do organismo, o metabolismo celular entra em estresse oxidativo (CAMPOS e LEME, 2018).

O estresse oxidativo, particularmente nas mitocôndrias, é uma característica comum da toxicidade de metais como o Fe e manganês (Mn). Cátions de Fe e Mn têm elétrons desemparelhados que permitem a sua participação em reações redox envolvendo principalmente uma perda de elétrons (oxidação) ou ganho (redução). Os elétrons desemparelhados também permitem a classificação química da maioria dos metais como radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). O Fe livre (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) é um pró-oxidante potente e pode iniciar um conjunto de reações que formam produtos extremamente reativos, como o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$). Metais como o Fe e Mn podem oxidar a DA, gerando ER e também afeta a função mitocondrial, levando ao acúmulo de metabólitos, culminando com o estresse oxidativo (FARINA et al., 2013). Devido à sua capacidade de assumir dois estados de oxidação em sistemas biológicos [férico (3^+) e ferroso (2^+)], o Fe é um produtor intrínseco de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando ao estresse oxidativo neuronal e neurodegeneração (NÚÑEZ et al., 2012). Uma desregulação na homeostase do Fe, ou seja, uma sobrecarga de Fe tem sido relatada como um importante evento mediador da fisiopatogenia da doença de Parkinson (DP) e DA (BARTZOKIS et al., 2000; JAISER e WINSTON, 2010; BOWMAN et al., 2011; BREWER, 2012).

Os metais essenciais como o Fe e o Mn e os não essenciais como o mercúrio (Hg) têm recebido considerável atenção devido à sua capacidade de induzir dano oxidativo e neurodegeneração. Notavelmente, as etiologias de doenças neurodegenerativas, como a DP e a doença de Alzheimer, parecem ser muito dependentes de fatores ambientais ou de interações ambientais e genéticas (MARRAS e GOLDMAN, 2011).

Figura 3. O estresse oxidativo do Fe na mitocôndria: reação de Fenton e formação de radical hidroxila.



Fonte: Adaptado de Farina et al, 2013.

Alterações no estado oxidativo também tiveram associadas a redução do potencial transmembrana mitocondrial e ao aumento da produção de óxido nítrico (PAUNOVIE et al. 2020).

A desregulação do Fe na mitocôndria pode levar ao aumento do estresse oxidativo, gerando espécies altamente nocivas como a formação de radical hidroxila via reação de Fenton. O aumento de Fe pode iniciar o estresse oxidativo mitocondrial via interação com diferentes EROs, onde 1) o Fe livre pode ser liberado a partir de aglomerados de Fe-Enxofre (Fe-S) mitocondrial nos complexos I e III na interação com EROs, ocorrendo oxidação no aglomerado de Fe-S por oxigênio molecular podendo aumentar o Fe livre na matriz mitocondrial. 2) O par redox $Fe^{2+} - Fe^{3+}$ também pode estimular diretamente a peroxidação lipídica, que pode aumentar o estresse oxidativo e contribuir para a morte celular e mitocondrial através da formação de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). O Fe pode elemento crítico para a neurotoxicidade, podendo ser tamponado pela ferritina intramitocondrial (FtMt), que atua como uma proteína antioxidante na matriz mitocondrial, conforme demonstrado

na figura 3, o aumento do estresse oxidativo mitocondrial pode ser uma das possíveis causas de neurodegeneração (FARINA et al., 2013).

A disfunção mitocondrial induzida por diferentes agentes tóxicos ambientais ou endógenos pode iniciar ou propagar liberação de Fe de sítios não tóxicos (isto é, proteínas de ligação do Fe), que podem desencadear ou acelerar a progressão de doenças degenerativas (KUMAR et al., 2012; MESQUITA et al., 2012; SEBASTIANI e PANTOPOULOS, 2011; ZECCA et al., 2004). Na mitocôndria, os aglomerados de Fe-S encontrados nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (CTE), podem ser atacados por EROs, liberando Fe livre para participar da reação de Fenton onde essa reação gera um ânion hidroxil e um radical hidroxil livre, que é extremamente reativo e nocivo às células e outros processos oxidativos (figura 3). Assim, o Fe é um importante agente na toxicidade celular e pode iniciar por si só um conjunto de reações tóxicas extremamente oxidativas ou nutrir o estresse oxidativo provocado por xenobióticos ou metabólitos endógenos. De particular importância, o estresse oxidativo mediado pelo Fe tem sido classicamente ligado à morte celular apoptótica (OTT et al., 2007) e à ferroptose, que representa uma forma de morte celular não apoptótica dependente de Fe (DIXON et al., 2012).

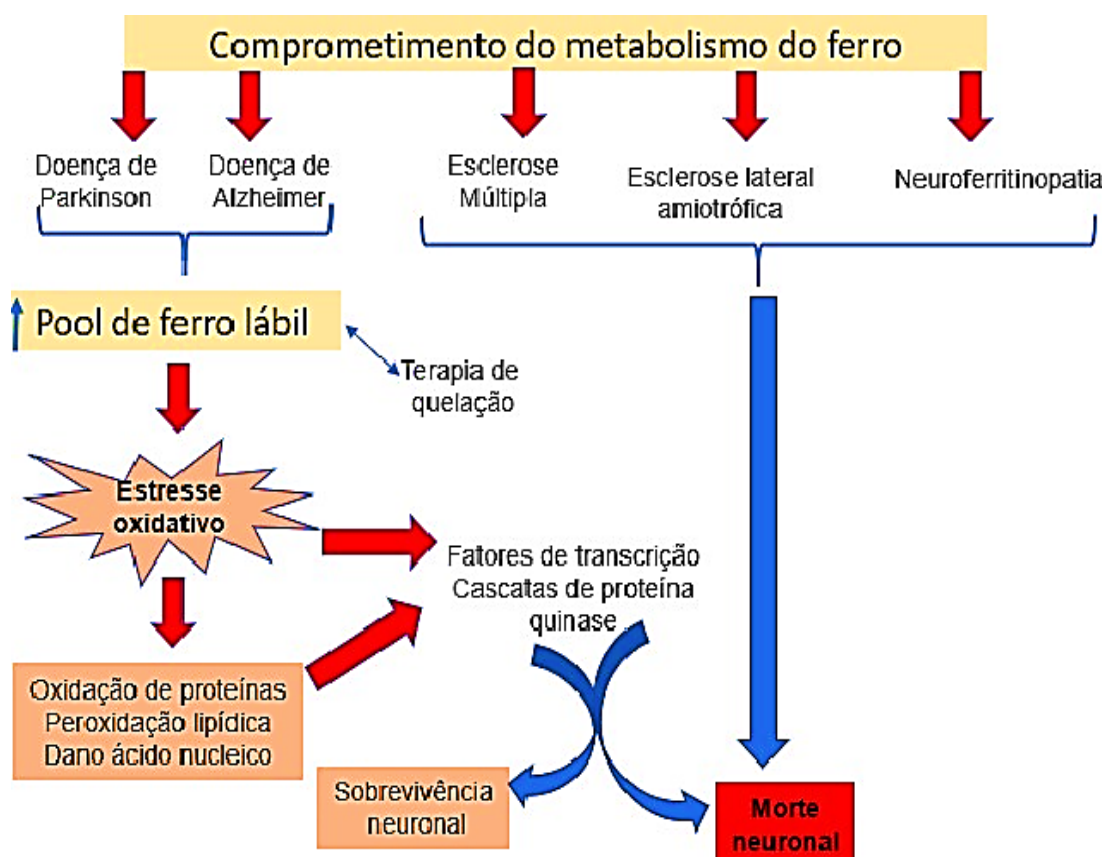
2.5. Fe e alterações neurodegenerativas

Conforme mencionado anteriormente, o Fe catiônico livre pode ser extremamente tóxico através do rompimento da função mitocondrial e, teoricamente, as alterações redox de $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$ podem ser acopladas à formação de espécies extremamente reativas, como o radical hidroxila ($OH\cdot$). Esta molécula é altamente reativa e sua existência livre é limitada ao seu coeficiente de difusão (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2018). A formação de $OH\cdot$ pode danificar diferentes biomoléculas e iniciar um ciclo vicioso de dano celular (figura 4). Além disso, o par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} serve como um produto *in vivo* iniciador de reações citotóxicas, particularmente, peroxidação lipídica (WELCH et al., 2002).

Embora os dados existentes mostrem claramente uma relação entre o metabolismo do Fe, o envelhecimento e a neurodegeneração, são necessários estudos mais aprofundados para entender completamente o papel desse metal de transição no início e na progressão de doenças neurodegenerativas e distúrbios

neurológicos relacionados à idade (HOGARTH, 2015; NDAYISABA, KAINDLSTORFER, WENNING, 2019; CAROCCI et al., 2018; LIU, LIANG, SOONG, 2019; THOMAS et al., 2021; IANKOVA et al., 2021; ZHANG et al., 2021). O papel desse metal de transição no início e na progressão dos distúrbios neurodegenerativos (figura 4), ainda se faz necessário mais pesquisas sobre o assunto, sendo que o avanço neste campo será fundamental para o estabelecimento de novas terapias destinadas à proteção neuronal durante condições de má administração do Fe.

Figura 4. Relação entre o comprometimento do metabolismo do Fe e as doenças neurodegenerativas



Fonte: Adaptado de Salvador et al. 2011.

O metabolismo desregulado do Fe é um marco em várias doenças neurodegenerativas, como a DP e Alzheimer, esclerose múltipla (EM), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e neuroferritopatias. No caso da DP e doença de Alzheimer,

o Fe tem mostrado um papel fundamental no destino neuronal: dependendo da extensão e intensidade do estresse oxidativo causado pelo aumento do pool de Fe lábil, afeta a atividade transcricional e as cascatas de sinalização que poderiam participar na sobrevivência ou morte neuronal (figura 4). Embora um papel para o Fe também tenha sido observado na EM, ELA e neuroferritopatias, os eventos moleculares que levam á morte neuronal não são totalmente compreendidos (SALVADOR et al., 2011).

As vias de sinalização central que regulam uma grande variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e resposta ao estresse são as cascatas MAPK, que são proteínas quinases ativadas por mitógenos. No entanto, uma desregulação ou um funcionamento inadequado destas cascatas, pode estar envolvida na indução e progressão de doenças como o diabetes, doenças autoimunes, anormalidades no desenvolvimento (PLOTNIKOV, 2011). Assim como, a doença de Alzheimer (DA), DP, ELA e vários tipos de cânceres (KIM e CHOI, 2010). Outra importante via é a MAPK/ERK que são reguladas por um sinal extracelular e está associada à proliferação celular, diferenciação, migração, senescência e apoptose (SUN et al., 2015).

2.6. Alterações fisiopatológicas na Doença de Parkinson e Fe

Entre as doenças neurodegenerativas temos a DP, que é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum que afeta 2-3% da população ≥ 65 anos de idade. A perda neuronal na substância nigra, que causa deficiência de DA no estriado e inclusões intracelulares contendo agregados de α -sinucleína são as marcas neuropatológicas da DP. Vários outros tipos de células em todo o SNC autônomo e periférico também estão envolvidos, provavelmente a partir da doença inicial (COOKSON, 2017).

A DP é um distúrbio neurodegenerativo que dá origem a sintomas motores como tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural e sintomas não motores, incluindo anosmia, constipação, apatia, insônia e depressão, entre outras (BADIN et al., 2018; COOKSON, 2017). Embora o diagnóstico clínico dependa da presença de bradicinesia e outras características motoras cardinais, a DP está associada a muitos sintomas não motores que aumentam a incapacidade geral. A patogênese molecular subjacente envolve múltiplas vias e mecanismos: proteostase da α -

sinucleína, função mitocondrial, estresse oxidativo, homeostase do cálcio, transporte axonal e neuroinflamação (COOKSON, 2017; POEWE, 2017).

A causa da maioria dos casos de DP é desconhecida e pode ser atribuída a uma combinação de fatores, como fatores genéticos e ambientais (LESAGE e BRICE, 2009). Não há cura para a DP, mas há vários tratamentos sintomáticos disponíveis. O tratamento dos sintomas motores da DP com o precursor DA a L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-dopa), introduzida há 50 anos, continua sendo o tratamento padrão-ouro para tratar a DP (MERCURI e BERNARDI, 2005, p. 341; POEWE e ANTONINI, 2015). No entanto, várias complicações motoras, incluindo discinesias induzidas por L-dopa, limitam a qualidade de vida em pacientes com DP e podem ser muito difíceis de manejar (FABBRINI et al., 2007).

Terapia de reposição dopaminérgica atenuam os sintomas da DP, no entanto, mais terapias são necessárias, visando outras vias farmacológicas, que não desenvolvam efeitos colaterais. A terapia com L-dopa em exposição crônica está associada ao desenvolvimento de complicações motoras em mais de 30% dos pacientes com DP após 2-3 anos de exposição e maior de 50% após os 5 anos (POEWE et al., 2017).

2.7. Alterações neurodesenvolvimentais e Fe

Os transtornos do neurodesenvolvimento (TND) mais comuns são: o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) e Epilepsia que ocorre na idade da infância e no adulto, esses transtornos são resultantes do desenvolvimento deficiente ou maturação do SNC. Os pacientes com transtornos do neurodesenvolvimento são afetados em muitas características das funções biológicas controladas pelo cérebro; em particular, alterações nas funções executivas sensoriais, motoras aprendizagem, memória, emoção, ansiedade e habilidade social (THAPAR; COPPER e RUTTER, 2017).

Os TNDs podem ser hereditários, no entanto, os determinantes genéticos críticos ainda não foram esclarecidos e a interação de fatores hereditários com estilo de vida não certificado e fatores ambientais parecem desempenhar um papel considerável em sua etiologia. Mais detalhadamente, o uso materno de tabaco, álcool ou drogas ilícitas durante a gravidez, parto prematuro, baixo peso ao nascer,

baixo nível socioeconômico, ambiente físico e a exposição pré-natal ou infantil a certos contaminantes ambientais representam uma ampla gama de fatores de risco ambientais que pode influenciar o neurodesenvolvimento (TRAN e MIYAKE, 2017), entre os fatores ambientais estão a exposição demasiada a metais como o Fe (POETINI et al., 2021).

O papel dos íons metálicos no cérebro está diretamente ligado ao desenvolvimento e manutenção de atividades enzimáticas, aprendizado e memória, funções mitocondriais, mielinização, sinaptogênese e plasticidade, neurotransmissão e inflamação. A interrupção de qualquer um desses mecanismos ou a absorção de metais tóxicos gera um desequilíbrio da homeostase do metal no cérebro. Essa desregulação da homeostase dos metais representa mais um fator de risco que determina uma cascata de eventos, levando ao desenvolvimento anormal do SNC e resultando em um estado de doença, particularmente sensível ao dano oxidativo (SUSSULINI e HAUSER-DAVIS, 2018). Essa condição resulta da redução incompleta do oxigênio, levando a formação de EROs e / ou à diminuição e degradação dos agentes antioxidantes endógenos oxidativos (SUSSULINI e HAUSER-DAVIS, 2018). Assim, muitos compostos antioxidantes e enzimas são de interesse no estudo dessas doenças.

Devido ao Fe desempenhar um papel essencial no crescimento normal do cérebro, síntese de neurotransmissores, catabolismo, processo metabólico celular, entre outros (KONOFAL et al., 2004), portanto níveis alterados deste metal pode levar a um desequilíbrio e disfunção de neurotransmissores, incluindo o sistema dopaminérgico. Ainda falando na essencialidade do Fe, este metal é um cofator da tirosina hidroxilase (TH), enzima responsável pela síntese de DA. A TH é enzima limitadora da taxa de conversão da hidroxilação da tirosina em L-DOPA e a enzima triptofano hidroxilase que é responsável pela síntese da 5-HT. Portanto, os níveis de Fe regulam a produção de síntese das monoaminas DA e noradrenalina (EARLY et al., 2014; KIM; WESSLING-RESNICK, 2014). Um desequilíbrio dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico é um possível mecanismo do TDAH (BIERDERMAN, 2005). No estudo de Yang e colaboradores investigaram a associação entre o metabolismo de oligoelementos como o Fe e o TDAH em crianças, onde os pesquisadores não acharam associação entre os níveis de Fe e o TDAH (YANG et al., 2019).

A hipótese da deficiência de Fe no TDAH é baseada em algumas evidências

aqui discutidas. Em primeiro lugar, o Fe é um cofator de enzimas necessárias para a síntese e catabolismo dos neurotransmissores monoaminérgicos (YOU DIM, 2000), que estão implicados na fisiopatologia do TDAH. Em segundo lugar, a deficiência de Fe está associada à diminuição da expressão do transportador de DA (BEARD, CONNOR e JONES, 1993). Terceiro, a deficiência de Fe pode levar à disfunção nos gânglios da base, que se acredita desempenhar um papel significativo na fisiopatologia do TDAH (BIEDERMAN, 2005).

Estudos recentes relatam que um dos metais mais investigados no TDAH é o Fe (YANG et al., 2019), no entanto é a ferritina sérica mais baixa, em vez de Fe sérico, está associada ao TDAH em crianças (WANG et al., 2017). Essa desregulação dos neurônios dopaminérgicos pode ainda resultar em múltiplas disfunções que mimetizam os sintomas do TDAH (GHORAYEB et al., 2019).

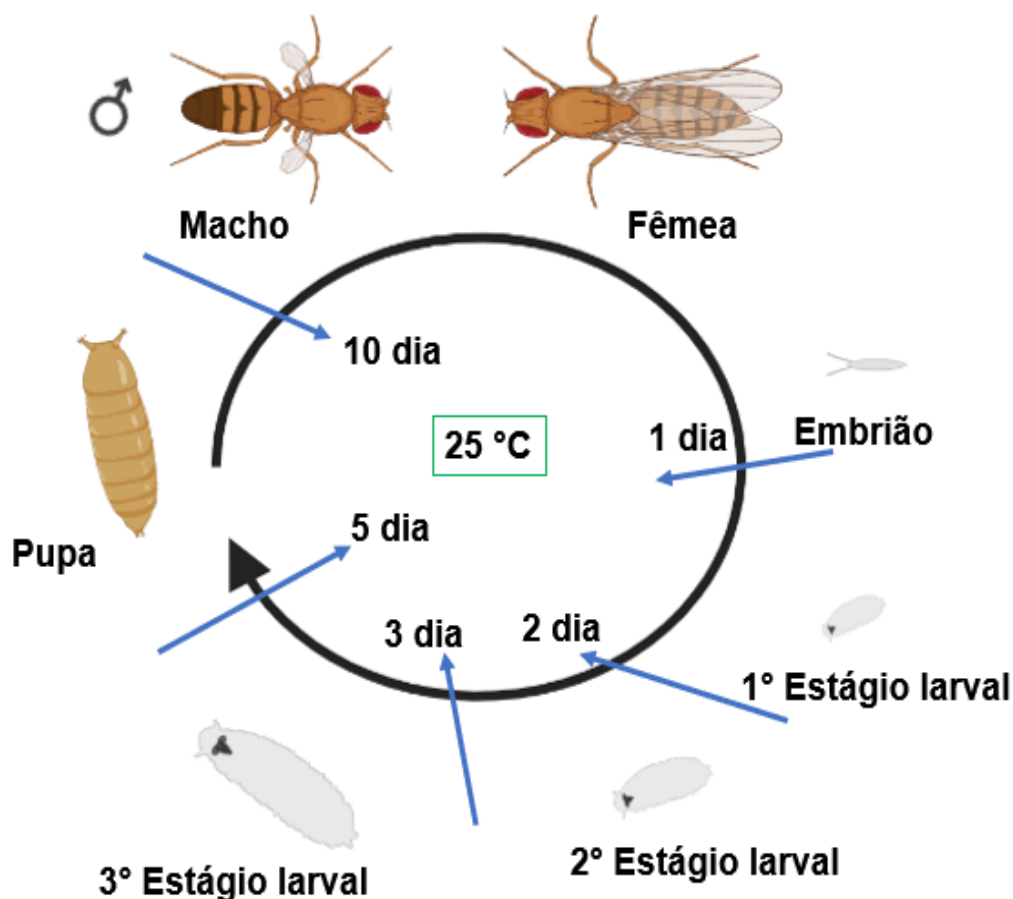
A prematuridade coloca o cérebro em desenvolvimento em risco de deficiência e sobrecarga de Fe. O feto acrescenta Fe principalmente durante o último trimestre da gravidez. Bebês nascidos prematuramente apresentam redução dos níveis de Fe corporal total, em relação a nascidos a termo (GEORGIEFF, 2005). No entanto, o cérebro do bebê prematuro pode estar sob alto risco de sobrecarga de Fe devido a capacidade de ligação do Fe sérico, sistemas antioxidantes imaturos, tecidos em rápido crescimento, exposição a Fe e transfusões múltiplas de glóbulos vermelhos (POLLAK et al., 2001).

2.8. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo do Fe em adultos e na prole

A *Drosophila melanogaster* é uma das espécies eucarióticas mais estudadas em diferentes áreas da biologia. A mosca também ganhou apreciação como um organismo modelo útil para estudos de doenças humanas. Estudos genômicos comparativos estimam que *Drosophila melanogaster* conserva genes homólogos a 75% dos genes humanos implicados em doenças (CALAP-QUINTANA et al., 2017; ADANS et al., 2000). Devido ao seu pequeno tamanho (2-3 mm) no qual o confere praticidade de manipulação, além do curto tempo para a geração da prole fez com que a mosca se tornasse um dos principais modelos de animais alternativos utilizados para educação e pesquisas biomédicas (ALLOCA, ZOLA e BELLOSTA, 2018).

O ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* dura aproximadamente 10 dias a 25 °C conforme demonstrado na figura 5. Uma única fêmea fértil pode depositar centenas de ovos, e a embriogênese ocorre em aproximadamente 24 horas. As larvas se alimentam e crescem, passando por três estágios até atingir o período de ecdise, virando pupa para sofrer metamorfose e desenvolver as estruturas características das moscas adultas (ALLOCA, ZOLA e BELLOSTA, 2018).

Figura 5. Ciclo de desenvolvimento da *Drosophila melanogaster* (do embrião até o adulto)



Fonte: Adaptado de Allocca, Zola e Bellosta, 2018.

A *Drosophila melanogaster* é de fácil manuseio, de baixo custo para de manutenção, alta reprodução e o crescimento dão uma grande quantidade de

progênies, e sua sequência genômica e informações genéticas estão bem documentadas. (BEGUM et al., 2018). Embora a *Drosophila melanogaster*, seja uma ótima opção como organismo modelo utilizado em pesquisas toxicológicas, ainda existe escassez de dados sobre a toxicidade do Fe em moscas (TANG e ZHOU, 2013; CALAP-QUINTANA et al., 2017; ORTEGA-ARELLANO et al., 2017; POETINI et al., 2018).

Nesse sentido, uso de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo mimético à DP é vantajoso em relação a outros por vários motivos. Primeiro, com exceção das células nas gônadas e de algumas células do intestino, não há mitose celular na mosca adulta. Assim, a *Drosophila melanogaster* pode ser considerada um organismo de células que envelhecem sincronicamente. Esta característica garante o tempo preciso em que a molécula antioxidante putativa impacta a taxa de sobrevivência e/ou atividade locomotora em moscas (NICHOLS, 2006). Em segundo lugar, a *Drosophila melanogaster* representa um organismo modelo utilizado não apenas para a compreensão dos processos neurofarmacológicos fundamentais, mas também para a pesquisa experimental comparativa. De fato, a similaridade entre a rede dopaminérgica, modo de ação da droga, comportamento e resposta gênica em *Drosophila melanogaster* e sistemas de mamíferos, tornou a mosca um modelo muito atraente para a descoberta de drogas anti-parkinsonismo (NICHOLS, 2006). A mosca possibilita a realização de análise rápida de triagem de drogas, o que ainda não é possível em modelos de mamíferos (MANEV; DIMITRIJEVIC; DZITOEVA, 2003). E, finalmente, dado o alto grau de conservação evolutiva dos genes humanos e de moscas envolvidos em distúrbios do movimento, a *Drosophila melanogaster* é um sistema eficiente para avaliar moléculas com potencial de melhorar a coordenação motora (JIMENEZ-DEL-RIO; DAZA- RESTREPO; VELEZ-PARDO, 2008).

Os organismos evoluíram para adquirir metais da nutrição e manter níveis adequados de cada metal para evitar efeitos danosos associados à sua deficiência, excesso ou extravio. Curiosamente, os principais componentes das vias homeostáticas do metal são conservados, com muitos ortólogos dos genes relacionados ao metal humano sendo identificados e caracterizados em *Drosophila melanogaster*. Nesse sentido, sabendo que as moscas possuem importantes ferramentas genéticas capazes de elucidar questões ainda não resolvidas a respeito

da patologia de várias doenças, o modelo pode contribuir para compreendermos melhor o metabolismo e homeostase deste metal (CALAP- QUINTANA et al., 2017).

Os organismos modelos não mamíferos, como a *Drosophila melanogaster*, são apropriados para a investigação de patologias relacionadas à idade, sendo que a ferritina (uma proteína de armazenamento de Fe) é expressa no cérebro de *Drosophila melanogaster* adulta e que o Fe e a holoferritina se acumulam com o envelhecimento (JACOMIN, 2019). O Fe é um microelemento essencial para o crescimento e desenvolvimento, mas em altas doses podem alterar significativamente os padrões de desenvolvimento, reprodução, envelhecimento e até mesmo promover a morte. Em busca de um modelo que possa ser geneticamente semelhante ao humano para estudar os efeitos do Fe, surge a *Drosophila melanogaster* (BEGUM et al., 2018).

A *Drosophila melanogaster* compartilha muitos genes-chave envolvidos no metabolismo do Fe com mamíferos, sendo que o Malvolio (Mvl), é um ortólogo transportador de metal divalente em *Drosophila melanogaster*, semelhante ao de mamíferos o DMT1. O Mvl (figura 2) é expresso no intestino médio da mosca e tem sido proposto para funcionar como importador de Fe dietético de forma semelhante ao seu homólogo dos mamíferos (FOLWELL, BARTON e SHEPHERD, 2006). Mamíferos e insetos armazenam o Fe absorvido em forma de Fe disponível no interior da ferritina, uma proteína formada por subunidades da cadeia pesada e leve (codificado pelos genes Fer1HCH e Fer2LCH respectivamente em *Drosophila melanogaster*).

Enquanto a ferritina é principalmente proteína citosólica em mamíferos, presente no sistema secretor (retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas secretoras) na maioria dos insetos, incluindo a *Drosophila melanogaster*, ela é secretada na hemolinfa em grandes quantidades (TANG e ZHOU, 2013). A transferrina 1 é também uma proteína de ligação de Fe abundante na hemolinfa para a qual múltiplas funções foram sugeridas em insetos. No entanto, ainda é não está resolvido se esta proteína serve como um transportador de Fe entre as células de uma forma semelhante ao transporte em mamíferos (TANG e ZHOU, 2013). Dois genes IRP (proteína reguladora de Fe) (Irp-1A e Irp-1B) foram descritos em *Drosophila melanogaster* e ambos mostraram atividade aconitase, mas apenas Irp-1A funciona como uma proteína reguladora de Fe (LIND et al., 2006).

Estudos com o Fe em *Drosophila melanogaster* demonstraram que a

exposição a este metal afeta a sobrevivência e a atividade locomotora (POETINI et al., 2018; BONILLA-RAMIREZ et al., 2011; JIMENEZ-DEL-RIO et al., 2010). A concentração desses biometálicos aumenta drasticamente no cérebro de *Drosophila melanogaster*, aguda ou cronicamente expostas ao Fe e o acúmulo de metal na cabeça da mosca está associado à neurodegeneração de vários aglomerados neuronais dopaminérgicos (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011). O Fe pode desencadear em lesão nos neurônios dopaminérgicos (BONILLA-RAMIREZ et al., 2011; JIMENEZ-DEL-RIO; GUZMAN- MARTINEZ e VELEZ-PARDO, 2010), onde o mecanismo neurodegenerativo do Fe pode envolver H_2O_2 e $OH\cdot$ (HOSAMANI e MURALIDHARA, 2013), geração de radicais livres via reação de Fenton e / ou Haber-Weiss e também a ativação de moléculas proapoptóticas p53, JNK e caspase-3 (ORTEGA-ARELLANO et al., 2013; ORTEGA- ARELLANO et al., 2017).

2.9 Alterações monoaminérgicas em *Drosophila melanogaster*

A DA é uma amina biogênica biossintetizada a partir da tirosina, é um neuromodulador essencial no SNC dos mamíferos que está envolvido na atenção, controle do movimento, motivação e cognição. Estudos em *Drosophila melanogaster* indicam que DA também desempenha papéis regulatórios centrais em insetos, especificamente nas redes neurais que controlam a atividade locomotora e comportamentos estereotipados (FRIGGI-GRELIN et al., 2003; YELLMAN et al., 1997; SESCOUSSE et al., 2018), sono e excitação (KUME et al., 2005; LEBESTKY et al., 2009), registro de estímulos salientes (KUME et al., 2005; YE et al., 2004; ZHANG et al., 2007) e aprendizagem olfativa associativa (CLARIDGE-CHUNG et al., 2009; SEUGNET et al., 2008).

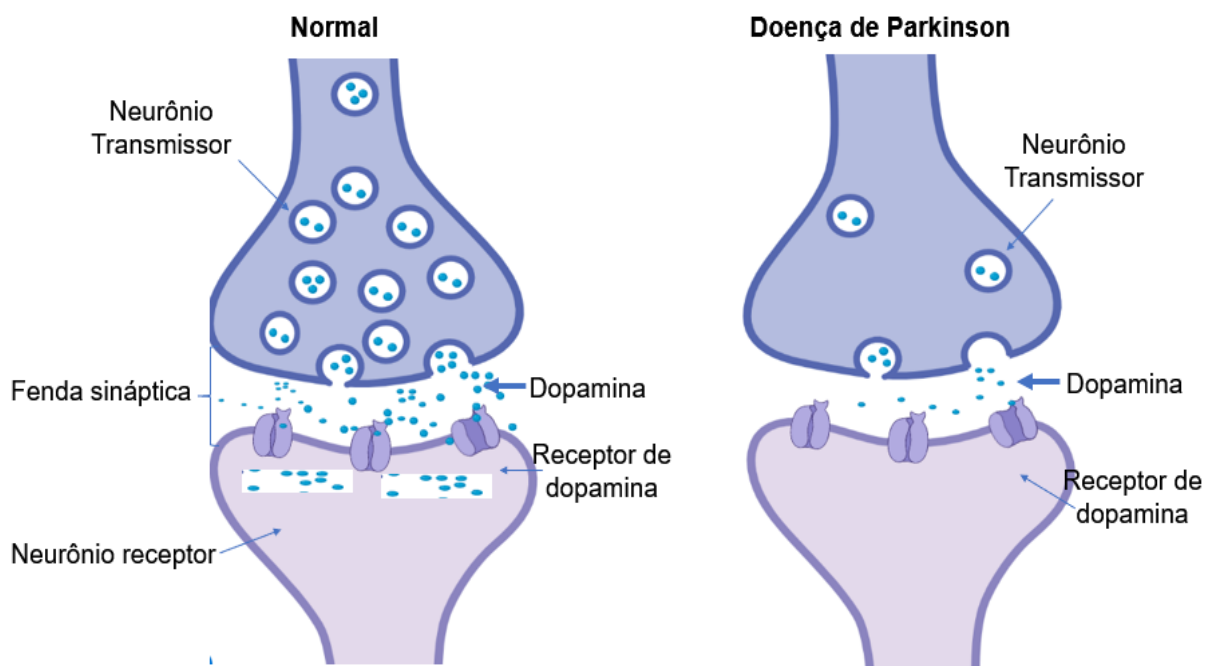
Em particular, o cérebro adulto da *Drosophila melanogaster* contém seis grupos pareados de neurônios dopaminérgicos, alguns dos quais se projetam especificamente para centros cerebrais superiores, como o complexo central e os corpos dos cogumelos (FRIGGI-GRELIN et al., 2003; CLARIDGE-CHANG et al., 2009; RIEMENSPERGER et al., 2005; TANAKA et al., 2008). A tirosina hidroxilase (TH) catalisa a primeira etapa da biossíntese de DA. A TH é a enzima limitante da taxa de biossíntese de catecolaminas, onde utiliza tetraidrobiopterina e O_2 para converter a tirosina em DA (DAUBNER, LE e WANG, 2011). As catecolaminas DA, epinefrina e

norepinefrina são os produtos da via, importantes como hormônios e neurotransmissores no SNC e periférico.

As pessoas com DP sofrem de níveis baixos de DA (figura 6) devido à deterioração da substância nigra, uma região do cérebro onde TH é mais abundante. A função de alfa-sinucleína (α -syn) é incerto, mas foi mostrado para ligar-se a TH e diminuir a fosforilação de TH e a produção de DA (DAUBNER, LE e WANG, 2011).

Um dos medicamentos padrão ouro no tratamento da DP é a levodopa ou de forma abreviada (L-dopa) (ácido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico), L-DOPA é um precursor da DA, sendo carboxilada a estes neurotransmissores quando entra nas células nervosas, estudos comprovam que a administração de L-DOPA produz um acentuado aumento na concentração de DA no cérebro, o que foi um grande avanço no tratamento do DP (MISHIHARA et al., 2004).

Figura 6. Níveis de dopamina na DP



Fonte: Google imagens com adaptações

Disponível em:

<https://www.saudebemestar.pt/pt/medicina/neurologia/doenca_de_parkinson/>.

A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina biogênica mais conhecida por seu papel como neurotransmissor. A

manipulação da 5-HT em modelos animais foi usada como uma ferramenta para estudar seu papel em humanos (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008).

A 5-HT é uma monoamina biogênica, semelhante à epinefrina, noradrenalina, DA e histamina. A sinalização da 5-HT desempenha um papel fundamental na regulação do desenvolvimento, humor e no comportamento. A *Drosophila melanogaster* é adequada para o estudo dos mecanismos básicos da sinalização serotoninérgica, mas o tamanho pequeno de seu sistema nervoso (SN) impedia anteriormente as medições diretas de neurotransmissores. BORUE et al. (2009) em seu estudo demonstrou que a dinâmica de liberação e recaptação de 5-HT em *Drosophila melanogaster* são análogos aos dos mamíferos, tornando este organismo simples mais útil para o estudo dos mecanismos fisiológicos básicos da sinalização serotoninérgica.

A octopamina (OA) pertence a um grupo de compostos conhecidos como aminas biogênicas, é um análogo mono-hidroxílico da norepinefrina, onde é encontrado nos sistemas nervosos de vertebrados e invertebrados. No entanto, está presente em concentrações relativamente altas nos tecidos neuronais e não neuronais da maioria das espécies de invertebrados estudadas, atuando como um neurotransmissor, neuromodulador e neuro-hormônio no sistema nervoso de insetos, onde influencia de forma proeminente vários eventos fisiológicos. No sistema nervoso periférico, a OA modula a atividade dos músculos de vôo, órgãos periféricos e a maioria dos órgãos dos sentidos. Em virtude disso, no SNC a OA é essencial para a regulação da motivação, dessensibilização das entradas sensoriais, excitação, iniciação e manutenção de vários comportamentos rítmicos, comportamentos de higiene e comportamentos sociais complexos, incluindo o estabelecimento do trabalho, bem como a aprendizagem e a memória (FAROOQUI, 2012).

A OA (em invertebrados) pode ser distinguida da norepinefrina (noradrenalina, um análogo estrutural de OA em vertebrados) pela ausência de um grupo hidroxila na posição 3 do anel fenol. Ambas as fenolaminas têm significado funcional nos SNC e periférico de invertebrados e vertebrados. Com base nas semelhanças em sua ação, foi sugerido que o sistema noradrenérgico em vertebrados é funcionalmente substituído pelo sistema octopaminérgico em invertebrados (ROEDER, 1999). A OA está presente em alta concentração no sistema nervoso periférico, SNC e vários

outros tecidos de insetos (AXELROD e SAAVEDRA, 1977). No SNC a OA modula a atividade dos músculos de vôo, órgãos periféricos (como corpo adiposo, oviduto e hemócitos) e quase todos os órgãos dos sentidos, sendo essencial para a regulação da motivação, dessensibilização das entradas sensoriais, iniciação e manutenção de vários comportamentos rítmicos e complexos, incluindo aprendizagem e memória (ROEDER, 1999; FAROOQUI, 2007).

A OA funciona como um neurotransmissor ligando-se a receptores acoplados à proteína G na superfície dos neurônios e outras células, afetando diversos comportamentos, como excitação, agressão e postura de ovos. Além da modulação direta das atividades no sistema nervoso, essas respostas podem ser orquestradas por meio de alterações no metabolismo, glicogenólise, metabolismo da gordura, frequência cardíaca, respiração e desempenho muscular (ROEDER, 2005). A OA é principalmente liberada das terminações neurosecretoras e absorvida pela circulação da hemolinfa (neuro-hormônio) (FAROOQUI, 2007).

2.10. Abordagens terapêuticas

As estratégias terapêuticas para tratar a neurodegeneração associada à sobrecarga de Fe são limitadas e envolvem o uso de agentes quelantes de metais (HELI et al., 2011; JOMOVA e VALKO, 2011; MOLINA-HOLGADO et al., 2007; SELIM et al., 2011). No entanto, o tratamento com esses agentes (incluindo a desferoxamina) pode causar toxicidade (HELI et al., 2011). Produtos naturais, como a catequina e outros polifenóis, têm sido indicados como potenciais agentes terapêuticos contra a toxicidade do Fe, devido às suas propriedades simultâneas antioxidante e quelante de Fe (MANDEL e YODIM, 2004; REZNICHENKO et al., 2006).

Diversas estratégias farmacológicas estão atualmente disponíveis para tratar a sobrecarga de Fe, embora algumas questões importantes precisem ser levantadas, tais como altos custos de terapia, toxicidade e qualidade de vida do paciente. A este respeito, o uso de antioxidantes comercialmente disponíveis que possuam propriedades de quelação de Fe podem representar uma alternativa viável. Além disso, tal abordagem tem a vantagem de afetar os dois principais momentos fisiopatológicos que levam à toxicidade do Fe (isto é, acúmulo de Fe e formação de EROs) (CAMIOLO et al., 2019).

2.11. Produtos naturais e a neuroproteção

A neuroproteção é a preservação da função e redes de tecidos neurais de danos causados por vários agentes, bem como doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, doenças de Huntington e esclerose múltipla (HAJIALYANI et al., 2019). Terapias comuns não são potentes no tratamento e prevenção da progressão sintomática da neurodegeneração, causando apenas melhora dos sintomas. Portanto, está se tornando necessário desenvolver medicamentos alternativos para a prevenção e proteção dessas doenças relacionadas à idade (GIRDHAR et al., 2015). Compostos naturais são escolhas alternativas, que ajudam a controlar a progressão dessas doenças, sendo que as plantas aromáticas apresentam um grande grupo de compostos, que são usados há muito tempo como agentes neuroprotetores. Os polifenóis naturais (incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas, entre outros, têm sido relatados por apresentar vários benefícios à saúde para os seres humanos (HAJIALYANI et al., 2019).

De acordo com as razões acima mencionadas, plantas medicinais e seus fitoquímicos são fortemente recomendados como alternativas terapêuticas e complementares para doenças neurodegenerativas. Especificamente, os flavonoides e suas subclasses, apresentam efeitos benéficos em doenças relacionadas à idade (HAJIALYANI et al., 2019).

Uma das alternativas da sobrecarga de Fe é através de flebotomia, uma terapia altamente eficaz e relativamente barata (FLEMING e PONKA, 2012), com a remoção de ~0,5 g sangue de Fe/L.

Terapias para tratar o excesso de Fe no organismo são o uso de quelantes como o deferroxamina é capaz de quelatar "ferro livre" mesmo dentro da célula, esses quelantes ligam ao Fe formando complexo, sendo o Fe excretado na urina ou fezes (ANDERSON e FRAZER, 2017).

A deferiprona é um medicamento atualmente comercializado para terapias de excesso de Fe no organismo, este quelante de Fe apresentou um potencial neuroprotetor em pacientes com DP em estágio inicial (DEVOS et al., 2014).

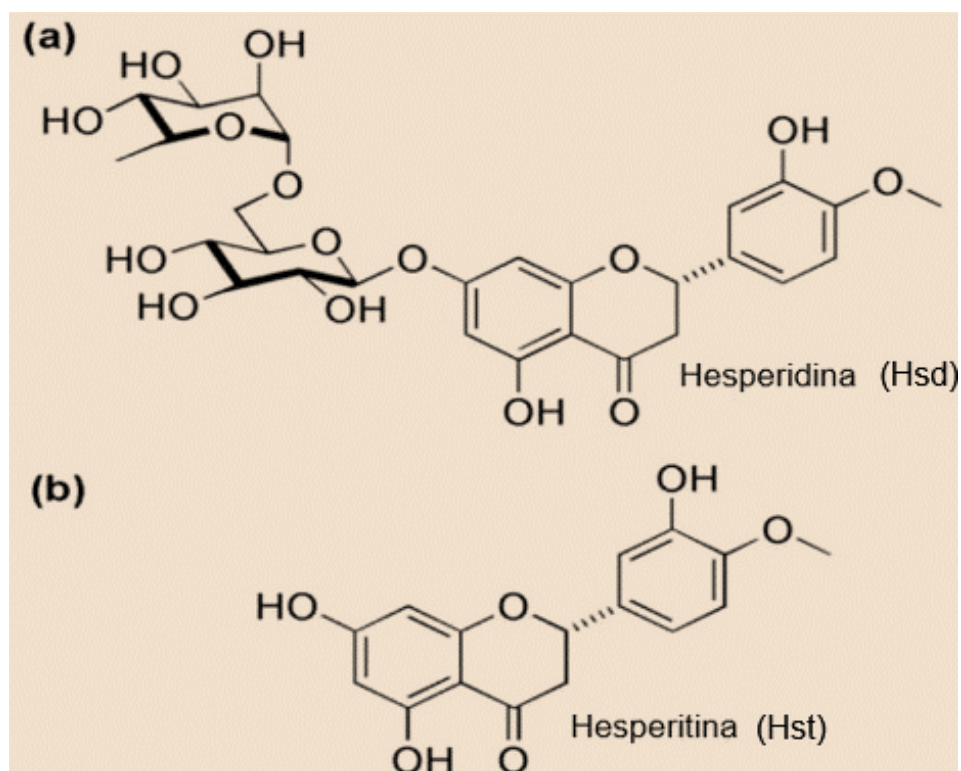
Uma das estratégias para controlar os danos radicais livres mediados por Fe podem ser: (a) prevenir condições que possam levar à sobrecarga de Fe; (b) fazer uso de

substâncias que sequestrem o excesso de Fe; (c) proteger moléculas funcionais (lipídios, proteínas, DNA) da oxidação com o uso de antioxidantes dietéticos como o uso de (vitaminas, flavonoides, zinco, entre outros) (FRAGA e OTEIZA, 2002).

2.12. Hesperidina

A hesperidina (4'-metoxi-7-O-rutinosil-3',5-di-hidroxi-flavanona) (Hsd) é um glicosídeo flavanona natural distribuído principalmente em frutas cítricas (LIU et al., 2017), como a laranja e o limão (GARG et al., 2001; ROOHBAKHSH et al. 2014; HAJIALYANI et al., 2019), a Hsd também está presente nos vegetais, chá verde e no vinho (CROZIER, JAGANATH, CLIFFORD, 2009), conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7. Estrutura química da hesperidina (a) e hesperitina (b)



Fonte: Adaptado de Hajjalyani et al., 2019.

O composto Hsd (figura 7) foi isolado pela primeira vez em 1828 pelo químico francês Lebreton. A concentração de Hsd parece ser alta no *Citrus sinensis* (15,25

$\pm 8,21$ mg / 100g de peso de frutas frescas) e *Citrus reticulata* ($19,26 \pm 11,56$ mg / 100g de peso de frutas frescas) (PETERSON et al., 2006). As frutas cítricas são importantes fontes de flavonoides, principalmente flavanonas, que estão presentes tanto no suco e nos tecidos das frutas (GARG et al., 2001). Aproximadamente, 90% dos flavonoides glicosídeos encontrados no suco de laranja são representados pela Hsd, sendo encontrada principalmente nas partes sólidas e nas membranas, separando os segmentos de polpa das frutas cítricas (TOMÁS-BARBERAN e CLIFFORD, 2000). A Hsd tem vários efeitos biológicos, tais como propriedades anticancerígenas, neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias (ROOHBAKHSH et al., 2014; ADEFEGHA et al., 2017; POETINI et al., 2018; HAJIALYANI et al., 2019).

Após a ingestão de Hsd, no intestino delgado esta flavanona é pouco absorvida pela via paracelular e é altamente dependente da conversão para hesperitina (WILLIAMSON, 2017). A Hsd atinge o intestino grosso, onde a microbiota intestinal cliva a porção de rutinose, formando hesperitina para posterior absorção colônica (GARG et al., 2001). A relação estrutura-atividade da Hsd com a sua propriedade antioxidante mostrou que os efeitos da atividade antioxidante da Hsd dependem do número e da ordem dos grupos OH e da presença da ligação dupla C4'-C8 conjugada ao grupo 4-ceto na estrutura dos flavonóides (SOMASUNDARAM, et al., 2018).

Em um estudo atual demonstrou-se que a toxicidade aguda letal oral de Hsd foi superior a 5000 mg / kg com uma dose letal mediano (DL_{50}) de 4837,5 mg / kg. Assim, Hsd isolada de frutas cítricas mostraram um bom perfil de segurança em estudos com animais e podem ser considerados como um agente importante para o tratamento clínico de doenças crônicas (LI et al., 2017).

Antunes et al. (2014) em seu estudo *in vivo*, demonstrou que o tratamento com Hsd (50 mg/Kg) melhorou o comprometimento da memória e comportamento semelhante à depressão em camundongos. A Hsd também atenuou o aumento dos níveis de EROs no estriado e na atividade da glutatona redutase e reduziu as atividades de glutatona peroxidase e catalase no estriado (ANTUNES et al., 2014). Estudos demonstram que a Hsd (ANTUNES et al., 2014) apresenta um efeito neuroprotetor nos modelos *in vivo* na DP, principalmente por meio de uma via neuroprotetora antioxidativa. Outro estudo relatou que a Hsd (10 mg/Kg) tem o potencial de modular as funções cerebrais, como a plasticidade sináptica, que estão

relacionadas a aprendizagem e memória (MATIAS et al., 2017). A Hsd apresentou uma variedade de efeitos farmacológicos, como promover a memória, aumentar a neurogênese e inibir a inflamação (YANG et al., 2011). A Hsd melhora a memória e aumenta a atividade antioxidante, o que é eficaz na melhora dos déficits causados por várias doenças neurodegenerativas (HONG e AN, 2018).

Investigações anteriores mostraram que a Hsd protegeu significativamente contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (KALTALIOGLU e COSKUNCEVHER, 2016; KUMAR et al. 2017), arsenito de sódio (TURK et al., 2018), acrilamida (HAMDY et al., 2017), tricloroetileno (SIDDIQI et al., 2015) e Fe (PARI et al., 2014) em ratos e na exposição aguda ao Fe em *Drosophila melanogaster* (POETINI et al., 2018), e também apresentou efeitos neuroprotetores (WANG et al., 2014; JUSTIN THENMOZHI et al., 2015; LI et al., 2015). A Hsd pode atravessar a BHE facilmente (RAZA et al., 2011; HWANG et al., 2012). Os potenciais efeitos de proteção vascular da Hsd (500 µg/dia) podem ser atribuídos à sua atividade de eliminação direta de ânions e reprimir enzimas geradoras de EROs ou estimular enzimas antioxidantes endógenas (HOMAYOUNI et al., 2018). No entanto, se a Hsd tem efeitos neuroprotetores contra o uso crônico de Fe e os mecanismos subjacentes não são totalmente compreendidos.

A Hsd é um sequestrador de radicais livres que demonstrou ter um efeito protetor contra insultos oxidativos. Um composto como a Hsd pode neutralizar o radical livre aceitando ou doando um elétron para eliminar a condição não pareada (SOMASUNDARAM et al., 2018). O mecanismo exato da Hsd ainda não é conhecido. No entanto, evidências sugerem que o efeito protetor da Hsd pode ser atribuído a uma combinação de diminuição dos radicais livres com alterações enzimáticas mitocondriais (WANG et al., 2014). O mecanismo antioxidante de Hsd inclui aumento dos níveis de antioxidantes endógenos, a eliminação de radicais livres e repressão de EROs (POETINI et al., 2018).

Hsd apresentou efeitos antidepressivos na dose de 0,1 mg/kg em camundongos (DONATO et al., 2014; 2015). Assim como, em doses maiores como 25-100 mg/kg em ratos diabéticos (EL-MARASY et al., 2014). Hsd pode exercer ação antidepressiva aumentando a expressão de BDNF de forma dependente da ERK (DONATO et al., 2014).

ANTUNES (2020) relatou em seu estudo que a Hsd pode aumentar os níveis

de 5-HT e noradrenalina, que por sua vez ativam receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos. Além disso, a Hsd ativou os receptores monoaminérgicos ativando e regulando a fosforilação ERK e, finalmente, promovendo a expressão de BDNF.

Parhiz (2015) em seu estudo demonstrou que a Hsd pode, além da atividade radical de limpeza, um aumento das defesas celulares antioxidantes através de uma via de sinalização ERK/Nrf2.

O uso de Hsd também pode ser eficaz em modelos de DP através da regulação do nível de citocinas pro inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 e IL-10, além de afetar os níveis de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), iNOS e COX-2 (TAMILSELVAM et al., 2013).

A Hsd (20 μ g) previne a perda do potencial de membrana, aumenta a permeabilidade mitocondrial, e impede a liberação de expressão proteica de citocromo c (cyt c) das mitocôndrias, inibindo assim as caspases 3 e 9, restaurando assim o desequilíbrio nos perfis de expressão de Bax e Bcl-2, e prevenindo a morte celular em apoptose induzido por rotenona em células de neuroblastoma SK-N-SH humanas (TAMILSELVAM et al., 2013).

Hsd (100 mg/kg) por 21 dias diminuiu o estresse oxidativo e aumentou os níveis de fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF) e Nrf2 e aumentou a atividade das enzimas de defesas antioxidantes em ratos (WELBAT et al., 2020).

A administração intragástrica de Hsd (40 mg/kg) por 90 dias atenuou significativamente o comprometimento cognitivo em camundongos. A Hsd suprimiu o estresse oxidativo e a inflamação através da ativação da sinalização Akt/Nrf2 e da inibição da sinalização RAGE/NF- κ B e apresentou neuroproteção em camundongos (HONG e AN, 2018).

Antunes (2021) em seu estudo demonstrou que a Hsd (50 mg/kg/dia, p.o.) por 28 dias atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos (células TH+) no SNpc e a depleção de DA e seus metabólitos como o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) no estriato de camundongos induzidos por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Hsd também protegeu contra a inibição da cadeia respiratória mitocondrial no complexo I, IV e V, a diminuição da atividade Na⁺-K⁺-ATPase e aumentou a atividade caspase 3 e 9 no estriado.

Compostos como o flavonoide Hsd podem diminuir o estresse oxidativo, aumentar as defesas antioxidantes e diminuir as EROs (ANTUNES et al., 2014). Porém, até o momento não estão completamente elucidados os mecanismos

relacionados a neurotoxicidade gerada pela exposição ao Fe em adultos e na prole de *Drosophila melanogaster* e os possíveis efeitos da Hsd frente a alterações comportamentais (como por exemplo, envolvendo déficits motores e não motores) e bioquímicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar se a exposição à sobrecarga de Fe durante os períodos adulto e embrionário de *Drosophila melanogaster* está relacionada a alterações neurodegenerativas em adultos e neurodesenvolvimentais da prole, bem como os efeitos terapêuticos da Hsd frente as possíveis alterações neurodegenerativas.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da Hsd e L-dopa na mortalidade e o consumo alimentar de *Drosophila melanogaster* expostas ao Fe na dieta.

Investigar o efeito da Hsd na longevidade nas moscas frente a exposição ao Fe.

Analisar possíveis alterações motoras e não motoras envolvidas como ansiedade, equilíbrio e memória em *Drosophila melanogaster* adultas após exposição ao Fe e tratamentos com Hsd e L-dopa.

Avaliar o envolvimento da enzima tirosina hidroxilase e os níveis das monoaminas DA e OA em resposta a exposição ao Fe e a Hsd em *Drosophila melanogaster* adultas.

Quantificar os efeitos dos níveis de Fe na cabeça e no corpo em *Drosophila melanogaster* adultas após exposição ao Fe e tratamentos com a Hsd e L-dopa.

Investigar o efeito do Fe após o período de desenvolvimento embrionário na locomotora, hiperatividade e agressividade na prole (F1) de *Drosophila melanogaster*.

Avaliar o efeito da exposição ao Fe durante o período de desenvolvimento embrionário e a viabilidade dos ovos de *Drosophila melanogaster* progenitoras expostas ao Fe, bem como a eclosão das larvas.

Analisar o efeito da exposição ao Fe na prole (F1) sobre os marcadores de estresse oxidativo.

Verificar os efeitos do Fe durante o período embrionário nos níveis de DA, 5-

HT, OA e triptofano na prole (F1) de *Drosophila melanogaster*.

Avaliar o efeito da enzima acetilcolinesterase (AChE), nas regiões do corpo e cabeça, na prole (F1) de *Drosophila melanogaster* expostas ao Fe durante o período embrionário.

Realizar as dosagens dos níveis de Fe na prole de *Drosophila melanogaster* (macho e fêmea, separadamente) expostas ao Fe durante o período embrionário, bem como nos progenitores e na dieta dos mesmos.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo científico e manuscrito, que se encontram neste item. Além disso, aqui constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Manuscrito: Improvement of non-motor and motor behavioral alterations associated with Parkinson-like disease in *Drosophila melanogaster*: comparative effects of treatments with hesperidin and L-dopa..... 56

Artigo: Iron overload during the embryonic period develops hyperactive like behavior and dysregulation of biogenic amines in *Drosophila melanogaster* 91

MANUSCRITO 1**Improvement of non-motor and motor behavioral alterations associated with Parkinson-like disease in *Drosophila melanogaster*: comparative effects of treatments with hesperidin and L-dopa**

Márcia Rósula Poetini, Elize Aparecida Santos Musachio, Stéfani Machado Araujo, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Luana Barreto Meichtry, Neicí Cáceres Silva, Dieniffer Espinosa Janner, Diogo La Rosa Novo, Marcia Foster Mesko, Rafael Roehrs, Bruna Piaia Ramborger, Marina Prigol

Manuscrito submetido a revista Neurotoxicology



2021

Improvement of non-motor and motor behavioral alterations associated with Parkinson-like disease in *Drosophila melanogaster*: comparative effects of treatments with hesperidin and L-dopa

Márcia Rósula Poetini^a, Elize Aparecida Santos Musachio^a, Stéfani Machado Araujo^a, Vandrezza Cardoso Bortolotto^a, Luana Barreto Meichtry^a, Neicí Cáceres Silva^a, Dieniffer Espinosa Janner^a, Diogo La Rosa Novo^c, Marcia Foster Mesko^c, Rafael Roehrs^d, Bruna Piaia Ramborger^d, Marina Prigol^{a,b*}

^aLaboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas- LaftamBio Pampa- Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Itaqui – Rua Joaquim de Sá Britto, s/n – Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97650-000.

^bDepartamento de Nutrição – Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Itaqui – Rua Joaquim de Sá Britto, s/n – Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97650-000.

^cCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas – Campus Universitário, S/N - Prédio/Bloco: 30 e 32, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 96160-000.

^dUniversidade Federal do Pampa– Campus Uruguaiana, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBioq), BR-472 Km 7, Uruguaiana, RS, Brazil, CEP 97500-970.

*Corresponding author:

Marina Prigol

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97650-000

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

ABSTRACT

In the Parkinson's disease (PD), non-motor alterations are expressed before motor alterations. Non-motor alterations such as anxiety and memory deficit can serve as a previous diagnosis of PD, thus helping to develop strategies that modify the disease path. In this sense, the search for strategies that act immediately on non-motor alterations is quite relevant. Hesperidin (Hsd) is a citrus flavonoid, having pharmacological properties as an antioxidant and mainly neuroprotective. Our objective was to evaluate Hsd in the development of motor and non-motor alterations such as memory deficit and anxiety, in a model of *Drosophila melanogaster* with Parkinson like disease induced by exposure to iron (Fe). The flies were divided into six groups: Control, Hsd (10 μ M), L-dopa (positive control, 1mM), Fe (1mM), Fe + Hsd and Fe + L-dopa. Motor alterations were evaluated by motor behavior, and non-motor memory test using aversive phototaxis and tests that characterize anxiety-like behaviors in flies, such as grooming and aggression. Hsd attenuated non-motor alterations, such as memory and anxiety deficits, attenuated monoaminergic deficits and lowered Fe levels in the head of flies. In addition, Hsd prolonged the life of the flies, standing out from the group treated with L-dopa. Thus, Hsd is capable of protecting the dopaminergic system from insults caused by Fe, preventing the development of non-motor alterations in PD. Hsd attenuated motor and non-motor changes such as memory and anxiety deficits in exposure to excess Fe.

Keywords: Behavior; anxiety; memory; *Drosophila melanogaster*; Parkinson's disease

1. INTRODUCTION

Hesperidin (Hsd) is a natural phenolic compound extracted from citrus peel, with an already proven antioxidant action (Garg et al., 2001; Roohbakhsh et al., 2014) and neuroprotector (Tamilselvam et al., 2013). There are not many data in the literature that describe Hsd as a compound with potential for non-motor alterations related in the PD. Recently, a study with murines found that Hsd can act on non-motor alterations such as depression and anxiety (Antunes et al., 2020). However, memory deficits are common in patients with PD in initial stage, but there are few studies investigating memory as a non-motor symptom.

Parkinson's disease (PD) is characterized clinical motor alterations such as bradykinesia, tremor, and muscle stiffness, caused by decreased dopamine levels (DA) and formation of intracytoplasmic Lewy body (LB) inclusion structures, after degeneration of 70 to 80% of dopaminergic neurons in the nigra substance (Aryal and Lee, 2019; Zheng et al., 2018; El-Agnaf et al., 2006). Non-motor alterations little investigated but no less important appear before motor alterations (Kalia and Lang, 2015). Non-motor alterations such as changes in sleep, mood, cognition, fatigue (Gao and Wu, 2016) and memory loss (Zokaei, 2012) is also induced by dopaminergic changes (Oh et al., 2018) when investigated can collaborate to develop therapeutic alternatives antiparkinsonian that attenuate disease progression (Emamzadeh and Surguchov, 2018) decreasing risk of mortality in PD patients (Reymond et al., 2009). It is believed that environmental factors may be involved in the causality of most cases of PD, including heavy metals such as iron and manganese (Bonilla-Ramirez et al., 2011; Poetini et al., 2018; Bianchini et al., 2016; Silva et al., 2021).

Currently available therapies act mimic DA in the central nervous system, minimize motor alterations for some years (Emamzadeh and Surguchov, 2018) but long-term, use causes side effects (Olanow et al., 2014). Between the available drugs, the L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) is used as 'gold standard' in treatment of PD, but it does not inhibit the progression of the disease (Goldenberg, 2008). Chronic therapy with L-dopa can develop disabling motor complications due to dopaminergic oxidative damage, which are related to a high mortality rate among PD patients (Morgan et al., 2014; Clark, 2000). There are no drugs that stop progressive degeneration dopaminergic neurons (Zhou et al., 2019). So, is

necessary search for biomolecules capable of acting on non-motor alterations, reducing dopaminergic neurodegeneration, without long-term side effects. In this sense, has increasing the interest in discovery natural compounds with neuroprotective action that can be used as a therapeutic strategy for PD (Antunes et al., 2020).

In this sense, the acting of human behavioral diseases has been investigated through of the use of alternative models such as *Drosophila melanogaster*. Currently, *Drosophila melanogaster* is an efficient model with great potential for carrying out studies that address non-motor alterations related to PD (Julienne et al., 2017).

In addition, even though it is simpler, central nervous system of the flies presents structure, organization and function similar to mammals (Nagoshi, 2018). DA and octopamine (OA) are two important neurotransmitters in behavioral modulation in invertebrates (Gorostiza et al., 2016). The fly model with Parkinson like disease has been effective in investigating non-motor alterations, such as changes in sleep and circadian dysfunction, visual deficits and learning and memory abnormalities (Afsari et al., 2014; Gajula Baliya et al., 2011; Julienne et al., 2017). Thus, the objective of the present study was to evaluate the action of Hsd in the development of motor and non-motor alterations like memory deficit and anxiety, in a model of Parkinson-like disease induced by exposure to Fe in *Drosophila melanogaster*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Hsd, Feus sulfate (FeSO₄) (> 99% purity) and FCF Brilliant Blue, were provided the Sigma Aldrich, St. Louis, MO, and L-dopa was provided Roche laboratory (Prolopa®). The other used for the development of this work from the laboratory of the Federal University of Pampa, Campus Itaqui.

2.2 *Drosophila melanogaster* Stocks

Drosophila melanogaster flies, Harwich strain, obtained from CIPBiotec (Unipampa/São Gabriel). The flies were kept in temperature-controlled BOD incubators (25 ± 2 °C), 12 hours light /12 hours dark cycle, and 60-70% relative humidity. The flies were fed with standard laboratory diet *ad libitum* (cornmeal, yeast, milk powder, wheat germ, water and methylparaben (Nipagin®)).

2.3 Exposure protocol to Fe and treatment with Hsd

Flies of both sexes were used with 2 days of age, divided into six groups (50 flies per group): [1] Control group (agar diet), [2] Hsd (10 μ M), [3] L-dopa (1mM), [4] Fe (Ferrous sulfate 1mM), [5] Fe (1mM) + Hsd (10 μ M) and [6] Fe (1mM) + L-dopa (1mM). Ferrous sulfate, Hsd, and L-dopa were separately dissolved in distilled water (vehicle) and later added in 5mL of diet composed of agar, powdered milk, sugar, and methylparaben (to antifungal control), where sugar and powdered milk were used as a source of carbohydrate and protein in the diet. The concentrations of Fe (1mM) and Hsd (10 μ M) were used according to a study of Poetini et al. (2018), and concentration of L-dopa (1mM) used as a positive control, was according to Coulom and Birman, (2004). The flies were exposed to treatments for 10 days, with the treatment glass being changed every 48 hours. On the 11th day behavioral tests and biochemical analyses were performed.

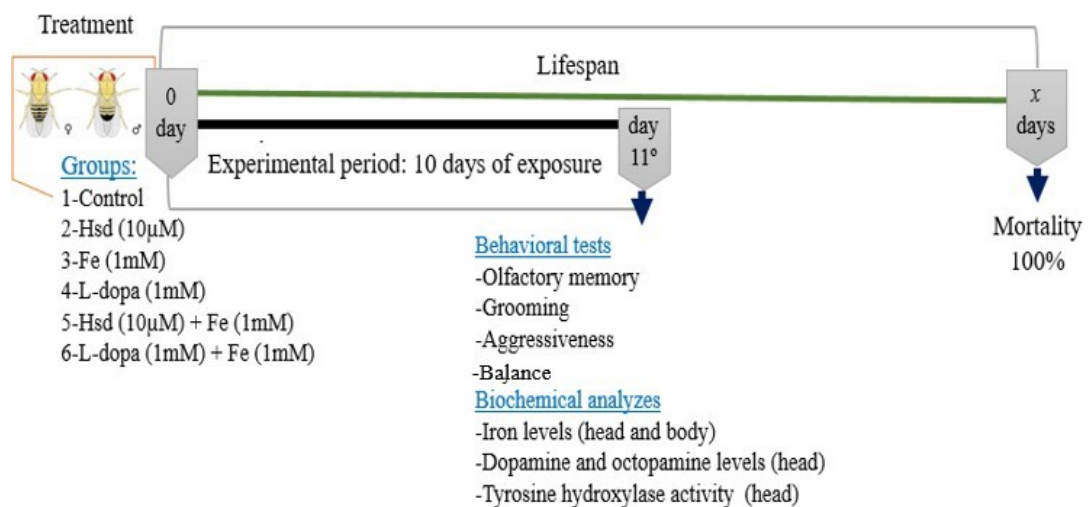


Figure 1. Schematic diagram of the experimental treatment protocol.

2.4 In vivo tests

2.4.1 Food Intake Analysis

This analysis was performed to estimate the intake of food offered, thus ensuring that there were Fe, Hsd, and L-dopa intake. Food consumption was

assessed, according to Lushchak et al. (2011), with some adaptations. Fifteen flies (one experimental n) were used from each of the treatment groups. The flies were transferred from treatment media to recipients of the respective treatments, but with the addition of 0.5% FD&C Blue N°1 dye (FCF Brilliant Blue). After 2 hours, the flies were placed on ice and the body was subsequently separated for sample production. Fifteen fly bodies were homogenized in 200 μ L of 50 mM potassium phosphate buffer (KPI) (pH 7.5), and centrifuged at 14.288g for 15 minutes. The supernatant was analyzed in a 629nm microplate reader. The optical density of homogenated flies consumed with the corresponding diets without dye was used as a blank. Total of 60 flies for each treatment group were used (n=4).

2.4.2 Longevity

Longevity was performed to assess the impact of treatments on the useful lifetime of flies, which assesses the life span of the fly. After 10 days exposed to the respective treatment group, the flies were transferred to flasks containing standard food (without Fe, Hsd or L-dopa). From day 1 of treatment, the number of dead flies in each group was individually counted at the end of each day, until the moment that no more live flies were left. Three independent experiments were performed, using 50 flies per group (n=3).

2.4.3 Behavioral tests

2.4.3.1 Memory assessment through aversive phototaxis test

The flies' memory was evaluated using an aversive phototaxis test for sensitivity to quinine, described by Le Bourg and Buecher (2002), with some adaptations. Before the tests, it was checked whether the flies were phototaxis (attracted to light), which is an important factor for the test. Firstly, a test was performed to assess the locomotor mobility of the flies and the negative geotaxis test, after the flies did not show locomotor deficit and phototaxis sensitivity, the flies were considered able to perform the test. Then, individually, the flies were placed in a dark cylindrical tube. After one minute, the dark tube with the fly still inside was fixed horizontally to the device, where another tube was fully lit (16 W lamp). The device has free passage between one tube and another. If the fly left the dark tube and went towards the light (in 10 seconds), it was considered valid to carry out the next steps

of the test.

In the second moment, the flies were trained. Then, a filter paper moistened with 120 μL of 10^{-1} M quinine solution was added to the end of the illuminated tube. The fly was added again to the dark tube and coupled to the illuminated tube, containing quinine. When going to the illuminated tube (for the light), the fly was repelled by the quinine. This procedure was repeated five times, the training was performed at zero time (PC0), this test was called zero time, corresponding to short-term memory.

Later, after 6 hours after training (PC6), the flies performed the same procedure, however, they removed the quinine from the illuminated tube. Therefore, the permanence of flies on the dark side means memorizing that light repels them. Six hours after training, each trained fly was evaluated again, following the same protocol as time zero. The number of times the fly avoided entering the lighted tube was recorded. This last stage of the test is called PC6 (6 hours after conditioning), related to long-term memory. In total, 15 flies were used per group, corresponding to three independent experiments ($n = 3$).

2.4.3.2 Repetitive behavior test

Through the repetitive behavior test, grooming behavior was observed in flies are related to the dopaminergic and octopaminergic system (Pitmon et al., 2016). Here we evaluate the number of grooming events as a parameter related to stress. The performance evaluation of repetitive hygiene behaviors was performed as previously described by Kaur et al. (2015), with some adaptations. The number of times the fly performed the cleaning movements was observed and recorded during two minutes of observation. Six independent experiments were realized ($n=6$), and five flies per group performed tests. The mean time of the 5 flies in each group was used for statistical analysis.

2.4.3.3 Aggressiveness test

The aggressiveness test was evaluated according to the method of Edwards et al. (2006), with some adaptations by Araujo et al. (2018). After the experimental period, the flies were placed in test tubes for 90 minutes without food before the test started. The pairs of male flies were placed in a circular arena with a radius of 45 mm and a height of 12 mm, in the center of the arena contained a 5% drop in sucrose. Behavioral tests

were performed at 22°C. After the acclimatization period, the males were placed in the arena for the observation of aggressive events, for 5 minutes. They were counted as aggressive events: leg extended from one fly to another resulting in physical contact, chase, quick approach that leads to disorientation, high wing in response to proximity / approach from one fly to another and the impact involving the front legs of both the flies. The score corresponded to the number of aggressive and events among the flies. Ten pairs of male flies per group were used for the evaluation. Total of 30 pairs per treatment group was assessed (n=3).

2.4.3.4 Test of motor coordination

The balance test was performed according to the protocol described by Iliadi et al. (2016) with adaptations. The test is sensitive for the detection of motor disorders in the early stages, directly assessing motor behavior in neurodegenerative diseases. Flies of both sexes were anesthetized on ice so that the wings were cut three days before the test. To test psychomotor activity and learning, a rectangular acrylic device filled with two platforms submerged in water at 35 °C was used, with the upper part (5mm) present on the water surface. A line of transparent nylon (0.6 mm) was then tied between the two platforms. A single fly (without the wings) was added to the platform with the help of a brush. The time began to be timed when the fly entered the red zone (1 cm from the platform). The learning protocol consisted of three successive sessions, with no time interval. The results were expressed as walking speed in mm/s. Five independent experiments were carried out, and 25 flies per treatment group performed the test. The mean time of the 25 flies in each group was used for statistical analysis (n = 5).

2.5 Ex vivo assays

2.5.1 DA and octopamine (OA) levels

DA and OA levels were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the procedure proposed by Soares et al. (2017). In the sample preparation, the heads of thirty flies per treatment group were homogenized in 400µL NaCl (0.9%) and 0.5 M HCl (96:4% v/v) for 60 seconds. Subsequently, the samples were centrifuged for 10 minutes at 7.840g at 4 °C. Four independent experiments were performed (n = 4). Detection was performed at 198nm and protein corrected

results expressed in $\mu\text{g DA/mg}$ or $\mu\text{g OA/mg}$ tissue. Four independent experiments were carried out. For each analysis, thirty fly heads per group were used.

2.5.2 Determination of tyrosine hydroxylase (TH) activity

The activity of TH was determined as described previously Vermeer et al. (2013) with some adaptations by Figueira et al. (2017). For the analysis of TH activity, 30 fly heads per experimental group were collected. For the preparation of the samples, we used the heads of flies, where the tissues were homogenized in 250 μL of Tris HCL buffer 0.05 M (pH 7.2), subsequently centrifuged at 13.201g, 5 min at 4 °C. The reaction of the mixture was 100 μL of the sample, 50mM Hepes, 50 mM tyrosine and 100 mM sodium periodate. TH activity was determined at 475 nm for 60 minutes (interval of 5 minutes) at an ambient temperature of 25 °C. The results were normalized by protein, and the values were expressed as % in relation to control. Four independent experiments were carried out.

2.5.3 Protein determination

The protein present in the samples was determined based on the method described by Bradford, (1976). First, 10 μL of the sample was diluted in water (1:10). An aliquot of 10 μL was removed from dilution to be added to 190 μL of Bradford reagent (Comassie Blue). After 10 minutes of incubation at room temperature, absorbance was measured at a wavelength of 595nm on a spectrophotometer. The protein values were calculated with a standard curve by using bovine serum albumin as standard.

2.5.4 Determination of Fe concentration

After the 10-day experimental period, the flies were euthanized and weighed. In the digestion process, the flies' heads (about 2 mg) or bodies (about 14 mg) were transferred to microtubes (2 mL), adding 500 μL of HNO_3 concentrate and subsequently heated in a water bath (95 ° C) for two hours. The final solution after the digestion process was diluted to 2.0 mL with ultrapure water. The experiments were based on previous studies in the literature (Couto et al. 2019; Silva et al. 2021). The concentrations of Fe in the flies (head and body) were determined by optical emissionspectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES). The wavelength selected in the determination step was 259.941 nm. Instrumental performance was

optimized following the manufacturer's instructions and as previously described in the literature (Barin et al. 2012). The limit of quantification (LOQ) was calculated from the average of the blank values plus ten times the standard deviation obtained for ten repetitions of the blank, considering the sample mass and the final digestion volume. The results were expressed considering the weight of the flies (μg of Fe per gram of body weight).

2.6 Statistical analysis

The static analysis was performed using the GraphPad prism 6 program. The homogeneity of the data was assessed by the Shapiro-Wilk test. The behavioral data showed no homogeneity, so Kruskal-Wallis analysis was applied, followed by Dunn's multiple comparison test. The biochemical analysis data showed normal distribution, so the unidirectional ANOVA test was applied, followed by the Tukey multiple range tests. Survival data were assessed using the Mantel-Cox log-rank test. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. The data from the non-parametric analysis are represented as box and mustache graphs (min to max), and the data from the parametric analysis as mean and SEM.

3. RESULTS

3.1 Food Intake

Food consumption was carried out with the aim of proving that the flies ingested the food and, consequently, the incorporated compounds. All flies consumed their respective diets homogeneously, with no difference in the amount of food eaten between the groups. Thus, we maintain that all the results obtained in this work were through exposure to the compounds (Hsd, L-dopa, and Fe). Regarding the food consumption test, there was no statistical difference between the groups (Figure. 2).

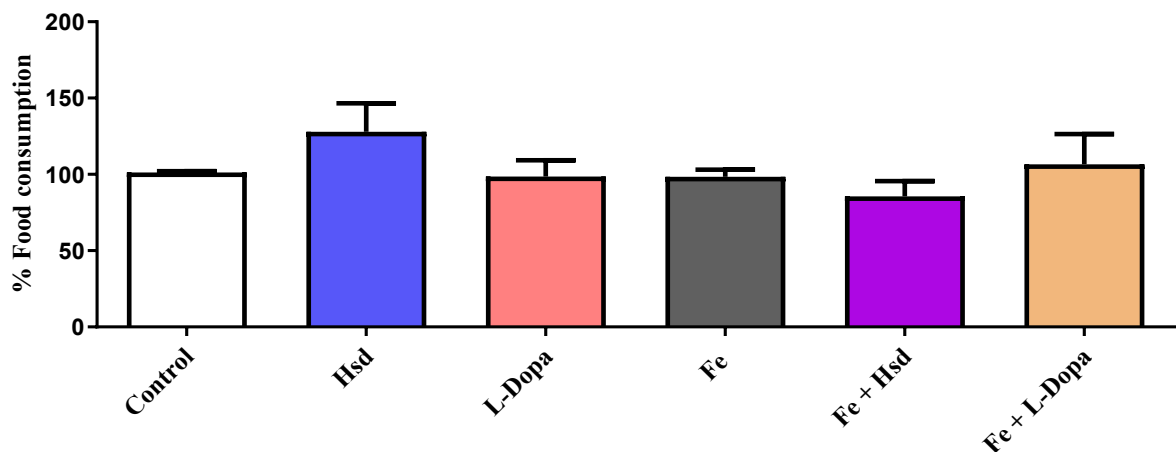


Figure 2. Evaluation of food consumption of *Drosophila melanogaster*. The results were expressed as percentage (%) in relation to the control group (mean \pm SEM and $p < 0.05$). (15 flies per treatment, four independent experiments). Significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test.

3.2 Longevity

The flies exposed for 10 days to Fe had a decrease in the longevity. Hsd was able to prolong the useful lifetime of the flies exposed to Fe, being statistically different from the Fe group and similar to the control group ($p < 0.05$). The flies exposed to L-dopa concomitantly with Fe (Fe + L-dopa) had their lifespan partially protected, the result being statistically different of the control group and the Fe group (Figure 3).

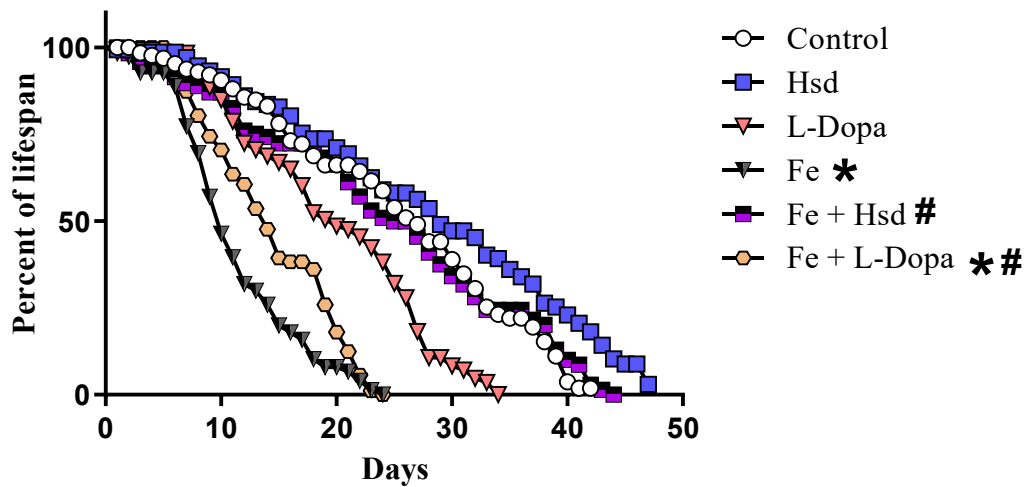


Figure 3. Effect of long-term exposure to Hesperidin (Hsd) on compared to L-dopa in Parkinson like disease induced by Iron (Fe) in *Drosophila melanogaster*. The total number of flies represents the sum of three independent experiments. The test was performed by comparing the curves of the Mantel-Cox log-rank tests. *Statistically different of the control group. #Statistically different of the Fe group ($p < 0.05$).

3.3. Behavioral assessments regarding non-motor behavioral alterations

3.3.1. Effect of Hsd on learning ability and memory assessed using the aversivephototaxis test

Exposure for 10 days to Fe decreased the learning capacity (short-term memory), as demonstrated by the PC0 test (Fig. 4 A) and compromised the long-term memory, as shown by the PC6 test (Fig. 4 B) of *Drosophila melanogaster* ($p < 0.05$). The flies belonging to the co-exposure groups Fe + Hsd and Fe + L-dopa preserved short- and long-term learning and memory ($p < 0.05$).

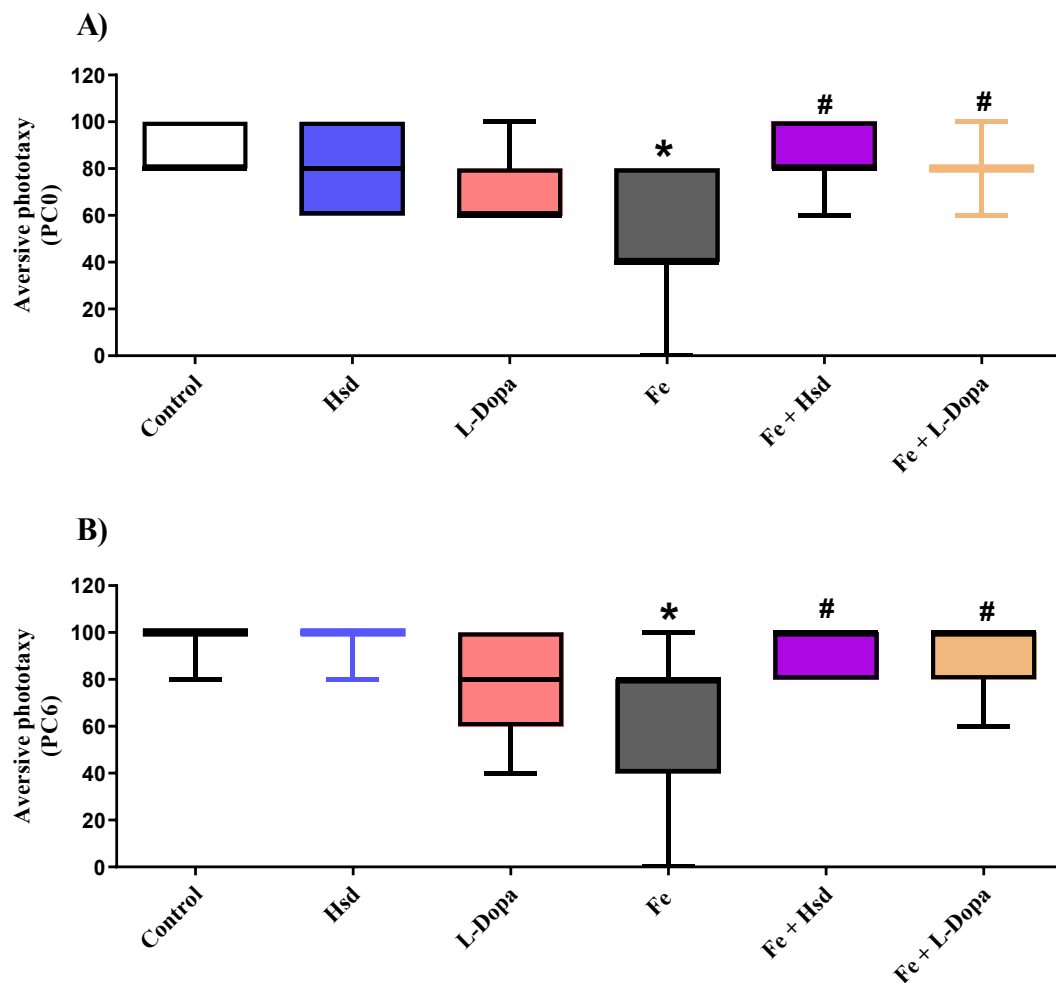


Figure 4. Action of Hesperidin (Hsd) in the development of non-motor changes such learning and short-term memory in Parkinson like disease induced by exposure to Iron(Fe) in *Drosophila melanogaster*. For both assessments, the aversive phototaxis test was used, where learning was estimated by performing the 0h post-conditioning test (PC0) (A) and the short-term memory was assessed by applying the 6h post-conditioning test (PC6) (B). Significance was determined by Shapiro-Wilk and non-parametric analysis by Kruskal-Wallis. Values are expressed as median and interval (interquartile range). *Statistically different of the control group. #Statistically different of the Fe group ($p < 0.05$).

3.3.2. Hsd action in the development of grooming movements

In grooming test, it was observed a sequence of cleaning movements performed by the fly (Fig. 5 A). Flies exposed to Fe performed an increased number

of grooming episodes when compared to the control group ($p < 0.05$). Flies co-exposed to iron increased the scavenging episodes in relation to the control group, statistically different from the control group ($p < 0.001$). However, the groups co-exposed to Fe + Hsd and Fe + L-dopa reduced the episodes of scavenging in relation to the iron group, indicating they had a neuroprotective effect.

3.3.3. *Hsd action against the development of aggressive behavior*

The aggressiveness of the flies was expressed according to the number of aggressive encounters observed (Fig.5 B). Flies exposed to Fe exhibited more aggressive behavior than the control group. However, Hsd and L-dopa maintained the behavior of the flies statistically different from the Fe group ($p < 0.0001$), that is, there was a reduction in the number of aggressive events, remaining similar to the control group.

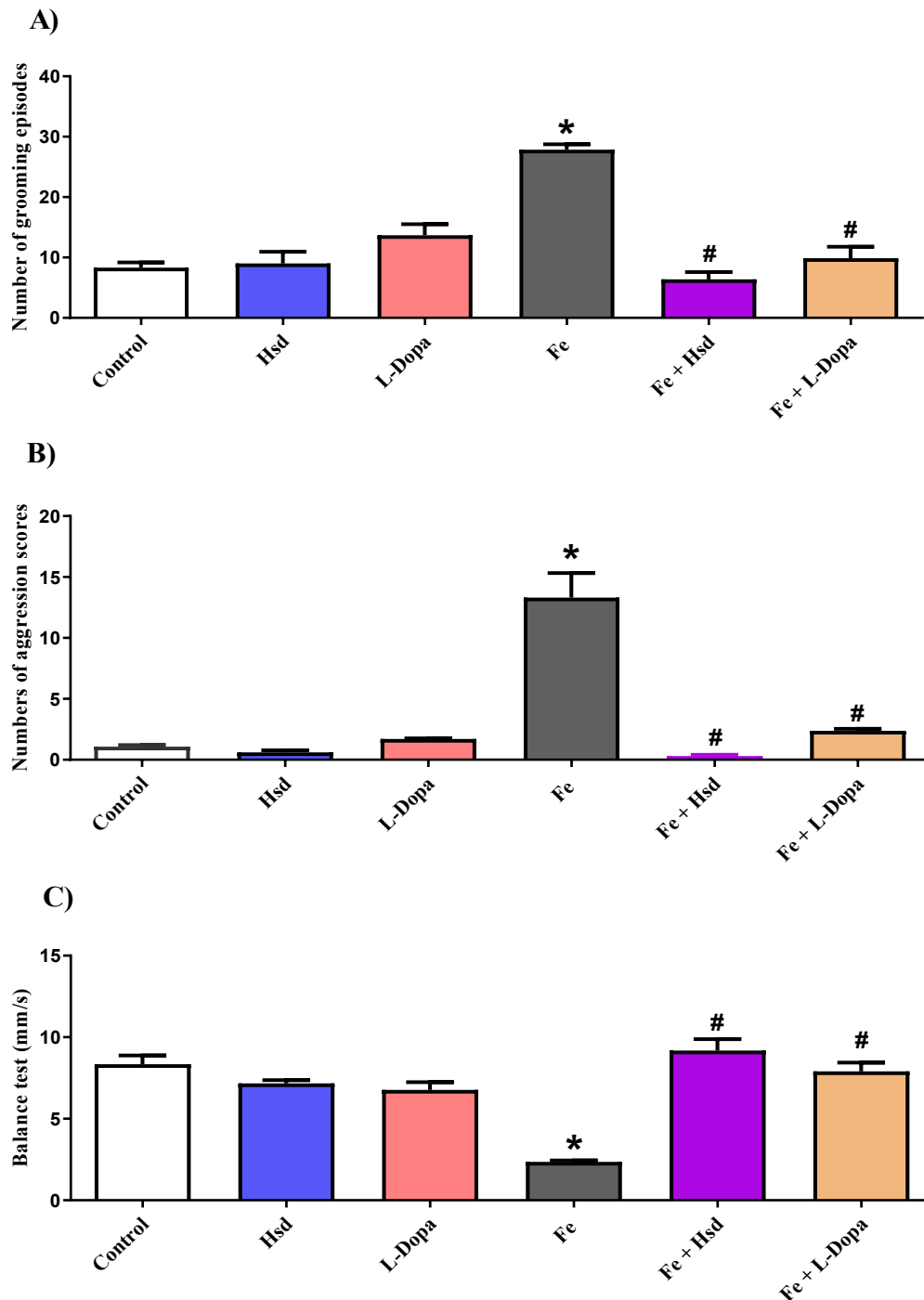


Figure 5. Evaluation of Hesperidin (Hds) co-exposure in anxiety mimicking behaviors by assessing the number of grooming episodes (A), aggressiveness (B) and assessing the motor ability (balance test) (C) tests of *Drosophila melanogaster* with Parkinson like disease induced by iron (Fe) exposure. Significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values are expressed as means \pm SEM. *Statistically different of the control group. #Statistically different of the Fe group ($p < 0.05$).

3.3.4. Motor behavior

In the motor behavior assessment test (Fig. 5 C) it is possible to observe that the Fe exposure decreased the flies' ability to balance, that is, the gait performance and perception of the path to be taken were reduced. Hsd preserved the flies' performance in the test, since the flies' co-exposure group (Fe + Hsd) performed the route in less time, similar to the control group ($p < 0.05$). Thus, co-exposure with L-dopa did preserve the flies' ability to balance.

3.5 Effect of Hsd in DA and OA levels

The levels of DA and OA are shown in the Figure 6. Exposure to Fe decreased DA and OA levels in the fly's head ($p < 0.05$). Co-exposure Hsd and L-dopa preserved DA levels similar to the control ($p < 0.005$) (Fig. 6 A). Regarding OA levels, co-exposure with Hsd also conserved OA levels similar to the control group ($p < 0.005$). However, it was not observed conservation of OA levels in flies co-exposed to L-dopa ($p < 0.05$) (Fig. 6 B).

3.6 Effect of Hsd in the TH enzyme activity

Flies belonging to the Fe and L-dopa groups showed increased TH activity ($p < 0.05$). Hsd co-exposure (Fe + Hsd) maintained TH enzyme activity similar to control levels ($p < 0.0027$). The group co-exposed to L-dopa (Fe + L-dopa) did not act effectively to preserve TH activity, being statistically different from the control and Fe group (Fig. 6 C).

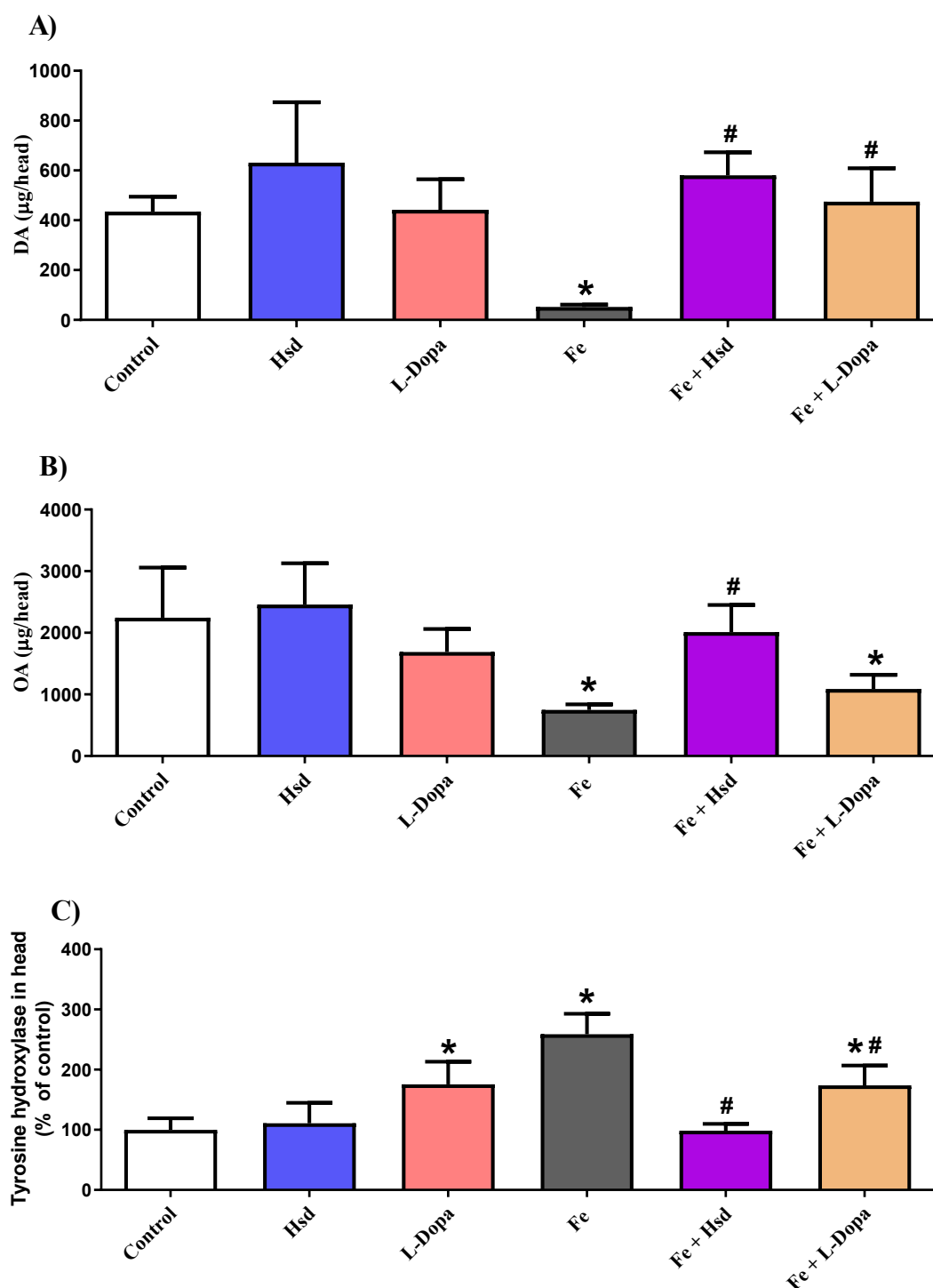


Figure 6. Evaluation of Hesperidin (Hsd) in the levels of Dopamine (DA) (A), Octopamine (OA) (B), and in the evaluation of the activity of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) (C) in *Drosophila melanogaster* flies by exposure to iron (Fe). Significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values are expressed as means \pm SEM.

*Statistically different of the control group. #Statistically different of the Fe group ($p < 0.05$).

3.6 Fe levels

Considering that the model organism of *Drosophila melanogaster* with Parkinson like disease was induced by exposure to Fe, the levels of Fe in the head and body were measured separately (Fig. 7 A and B). Flies exposed to Fe showed an increase in Fe concentrations in the head and body samples compared to the control group. It was observed that the flies co-exposed to Hsd (Hsd + Fe group) and L-dopa (L-dopa + Fe group) presented a reduction on Fe levels in the head ($p < 0.05$). However, this result did not occur in body, where the groups co-exposed to Hsd and L-dopa showed increased Fe concentrations, being also different in relation to the control group ($p < 0.0001$). The increase in Fe levels in the body of flies exposed to the iron groups alone or in association with Hsd and L-dopa are justified by the intake of metal in the diet, demonstrating that Hsd and L-dopa did not interact with Fe in the diet and did not inhibit the absorption of the metal, a limiting factor for this study.

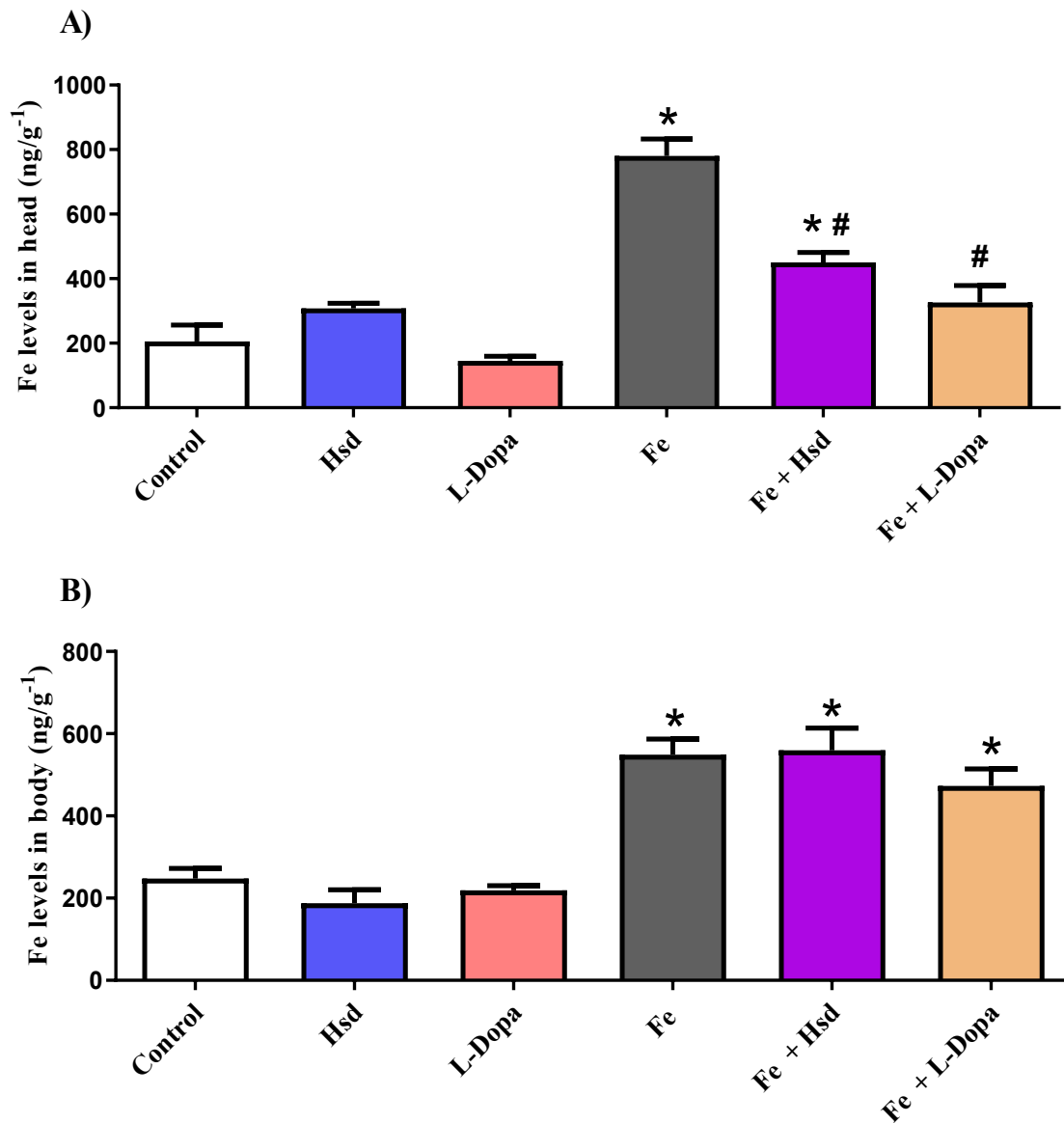


Figure 7. Quantification of iron (Fe) levels in the head (A) and body (B) of *Drosophila melanogaster* submitted to 10 days of treatment according experimental protocol. Significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values are expressed as means \pm SEM. *Statistically different of the control group. #Statistically different of the Fe group.

4. DISCUSSION

The non-motor alterations demonstrated in the early stages of PD are poorly understood and investigated when compared to the motor alterations, already defined and characterized in the literature (Gao and Wu, 2016; Zokaei, 2012; Oh et al., 2018). Considering that the increase in Fe levels in the brain are related to the development of PD (Hare and Double, 2016) and fly model with Parkinson like disease is efficient to investigate non-motor alterations (Julienne et al., 2017), we used a model of *Drosophila melanogaster* with Parkinson like disease induced by chronic exposure to Fe. In this sense, non-motor alterations can serve as a basis for research related to the search for new pharmacological alternatives that improve the quality of life and longevity of patients with PD. As a result, flavonoid Hsd improved dopaminergic functionality, reducing Fe levels in the head and inhibiting the development of non-motor alterations, such as memory deficits and anxiety-like behaviors. Hsd also prolonged the lifespan of the flies, performing better than the group treated with L-dopa.

Considering that anxiety and memory deficit are non-motor alterations that precede motor alterations in PD, we investigated them in order to highlight Hsd as a possible therapeutic alternative capable of early attenuate these alterations, slowing down the disease development. To assess the action of Hsd on the memory capacity of the flies, we used the aversive phototaxis test. flies exposed to Fe had a decrease in learning capacity, however, Hsd was effective in preserving this ability. Related to this, according to Ali et al. (2011) the PC6 (test performed 6 hours after training) is an indicator that assesses short-term memory based on the memory of the task learned (Ali et al., 2011).

In the result of PC6 we observed that the memory was also preserved by Hsd in the flies. The use of animal models in studies on learning and memory contributed to new drug development strategies, therefore, they are important in therapeutic evaluation (More et al., 2016). Cognitive changes are related to increased concentrations of Fe with neurodegenerative diseases (Ding et al. 2009). These memory deficits are accompanied by increased oxidative stress (de Lima et al. 2005) and apoptotic markers (Wang et al., 2014; Miwa et al. 2004). Thus, our results, supported by an invertebrate model, are similar to a study by Muhammad et al. (2019) that evaluated the action of Hsd in rodent memory. In addition, the study suggests

that Hsd has acted in modulating inflammatory and apoptotic pathways, protecting synaptic integrity, related to cognition and memory. Hsd mediated neuroprotection occurs improving the functions of endogenous antioxidant defense, decreasing neuroinflammatory and apoptotic pathways (Hajjalayani et al., 2019).

The action of Hsd was verified in behaviors that mimic anxiety in flies. Anxiety is considered a common non-motor symptom in PD (Akhmadeeva et al., 2018). Cleaning behavior in flies was used to assess anxiety, as in a study by Reimer et al. (2015) to assess anxiety in rodents. The number of cleaning episodes performed by flies in the group co-exposed to Hsd (Fe + Hsd) was similar to the control group. However, exposure to Fe increased the number of grooming episodes, showing the lack of behavioral control in the flies. To add up, the flies were subjected to the aggressiveness test, considering that increased aggression is a preclinical non-motor symptom of PD (Durand et al., 2015). Hsd protected against the deregulation of social relations, preserving the number of aggressive encounters similar to the control group. Therefore, we found that Hsd performs anxiolytic action, thus mitigating non-motor alterations. Our results suggest that the flavonoid Hsd has the potential to exert a series of biological activities that can also include sedation, myorelaxation and analgesia.

Anxiety may be associated with the development of gait problems (Dissanayaka et al., 2010) and, to investigate this relationship, we performed the psychomotor test on the flies. Psychomotor activity is defined through the perception of the senses, cognition and movement (Buyukdura et al., 2011). According to Iliad et al. (2016; 2018), the changes in the psychomotor appear before the locomotor alterations actually manifest. In our study, there were no psychomotor changes in the flies that were co-exposed to Hsd. The decrease in the psychomotor ability of flies exposed to Fe also made up the model's effectiveness. It is also worth mentioning that the performance of flies belonging to positive control group L-dopa is also preserved. Anxiety behaviors are also regulated by the dopaminergic pathway, a brain structure responsible for producing and regulating anxiety behaviors (Tessitore et al., 2002).

Thus, in general, the possible anxiolytic action of Hsd in invertebrates was addressed in this article through behavioral tests. Similar to this, Hsd also demonstrated an anxiolytic effect in rodents, being justified by the action of the compound in improving brain plasticity and dopaminergic dynamics (Antunes et al., 2020). Non-motor alterations are caused by changes in the dopaminergic system (Oh

t al., 2018). Fe decreased the levels of DA in the head of the flies, but Hsd kept the DA levels similar to the control and positive control L-dopa, a drug already used in the treatment of PD as a precursor of DA (Goldenberg, 2008). Excess Fe oxidizes DA, forming neurotoxic products, and L-dopa in the long time can exacerbate neurodegeneration with toxic conjugates, generated in the auto-oxidation of DA (Hare and Double, 2016; Zucca et al., 2016). Thus, we emphasize that the antioxidant action of Hsd already proven in several studies (Poetini et al., 2018; Hajialyani et al., 2019) can modulate the course of PD, as a lesser expression of long-term side effects. Hesperidin did present a chelating effect of iron, a possible mechanism would be through the reduction of oxidative stress and antioxidant activity of the compound, and, therefore, it may have a beneficial effect in neurodegenerative diseases.

Just as DA exerts effects on cognition and aversive olfactory learning in insects, OA is responsible for modulate learning and memory (Burke et al. 2012), locomotion and appetite (Schwäerzel et al. 2003) and aggressive behavior (Dierick, 2008). However, more studies are needed to further investigate the octopaminergic circuits and receptors related to the development of Parkinson like disease in *Drosophila melanogaster*. In our study, we observed that OA levels were also preserved by Hsd, in contrast to groups co-exposed to L-dopa, where there was a decrease in OA concentration, as well as in the damage group (Fe). Similarities in chemical structure and action make the octopaminergic system in invertebrates homologous to the adrenergic system in vertebrates, OA is an extremely pleiotropic substance that regulates a wide variety of processes, including metabolic pathways and physical activity (Roeder et al., 2020). Therefore, based on our results, we suggest that dysregulation of the homeostasis of this neurotransmitter can also be attributed as an important factor to be evaluated in the development of PD by increasing the concentration of Fe in the brain of the flies and that low concentrations of OA were found in flies exposed to Fe, may be due to less walking activity and balance. Circulating OA levels can be promising as biomarkers of the onset of PD (D'Andrea et al., 2010).

DA and OA, catecholamines in general, have a rate of synthesis limited by TH (Dunkley and Dickson, 2019) in which, the Fe acts as a cofactor (Tekin et al., 2014). Activity of the TH enzyme was increased in flies exposed to Fe. We suggest that the hyperactivity of the TH enzyme in this case, characterizes a feed back effect, as a

compensatory attempt related to the low levels of DA and OA, thus supporting the hypothesis that Fe can incorporate into apoenzyme, increasing its catalytic activity (Ribeiro et al., 1992). The ability of Hsd to preserve the activity of TH similar to the control, was an important finding of this research. TH is an enzyme that is very sensitive to oxidative stress, so we believe that the effectiveness of the compound in protecting TH is attributed to the antioxidant action of Hsd, capable of donating an electron or proton to free radicals, acting as a key element of the balance redox in biological systems (Abolaji et al., 2017).

In flies, after the consumption of Fe, the metal is metabolized rapidly to storage in ferritin (Metha et al., 2009). Thus, the increase in the levels of Fe in the heads of the flies corresponds to the metal already metabolized and circulating, being similar to a study by Bonilla-Ramirez et al. (2011). When in excess, part of the Fe ions does not bind to ferritin, causing harmful effects to cells, even inducing cell death (Tang et al., 2002). Flies co-exposed to Hsd (Hsd + Fe) had preserved Fe levels in the head similar to the control group. Thus, effective chelation of Fe by natural or synthetic ligands is of great physiological and therapeutic importance. Considering that in addition to the antioxidant action Hsd is also a natural Fe chelator (Mohammad et al., 2017; Kell, 2009), we highlight that Hsd may have exerted a chelating effect in our study, modulating the course of Fe-induced Parkinson's disease in flies. The neuroprotective action of Hsd against the increase of Fe levels in the head was similar to the action Deferoxamine (Fe chelate) in flies exposed concomitantly to Fe (Bonilla-Ramirez et al., 2011). L-dopa also preserved Fe levels in the fly's head. This result corroborates with evidence that L-dopa has Fe chelating properties (Billings et al., 2019).

An important result found in our work was related to the evaluation of the useful lifespan, where Hsd extended the lifespan of the flies. We observed that, after 10 days of exposure to treatments, even though they were transferred to bottles with compound-free food, the flies belonging to the Fe groups had their useful life reduced. In addition, the partial protection of L-dopa to the lifespan can be attributed to evidence that even improving motor alterations in PD, it is not able to slow the progression of the disease (Olanow et al., 2014). The chronic administration of L-dopa can promote oxidation of DA, potentiating neuronal loss (Asanuma et al., 2003), and thus, increase mortality in PD patients (Morgan et al., 2014). We suggest that the antioxidant action, already proven by Hsd (Poetini et al., 2018; Muhammad et al.,

2017), can attenuate neuronal damage, which resulted in an increase in the lifespan of the flies, even if it is used for a period considered chronic, in relation to *Drosophila melanogaster*. In general, we believe great advantage of the use of Hsd in relation to L-dopa is due to its antioxidant effect, since the flavonoid Has increased the longevity of the flies in our study. The flies have been widely used as a model organism in research related to the extension of life span through natural compounds (Kumar et al., 2017). The assessment of the mortality rate is important in studies on PD, because it can assist in the anticipation of results and influence in therapeutic decision-making (Morgan et al., 2014). Thus, we indicate that Hsd can inhibit the progression of PD, and can be an efficient therapy in initial cases of this pathology.

5. Conclusion

Hsd was able to interfere in the development of Parkinson like disease in *Drosophila melanogaster*, inhibiting the development of non-motor alterations, until now little evidenced in the literature, such as memory deficit and anxiety. We showed that Hsd prolonged the life of the flies after treatment, standing out from the group treated with L-dopa. As major action mechanisms, we observe the adjustment of iron levels in the flies` head and TH activity, which regulates DA and OA levels.

Credit authorship contribution statement

M. R. Poetini: Research, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing - original draft. E. A. S. Musachio: Research, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing. S. M. Araujo: Investigation. L. B. Meichtry: Investigation. V. C. Bortolotto: Investigation. N. C. Silva: Investigation. D. E. Janner: Investigation. D. La R. Novo: Investigation. M. F. Mesko: Investigation. R. Roehrs: Investigation. B. P. Ramborger: Investigation. M. Prigol: Conceptualization, Financing acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review and editing.

Declaration of Competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (307099/2017-2), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (PQG 19/2551-0001913-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financial Code 001, for the support and research grants provided.

References

- Abolaji, A. O., Babalola, O. V., Adegoke, A. K., Farombi, E. O., 2017. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, alleviates trichloroethylene-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 202-207. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.038>
- Afsari, F., Christensen, K. V., Smith, G.P., Hentzer, M., Nippe, O.M., Elliott, C.J.H., Wade, A.R., 2014. Abnormal visual gain control in a Parkinson's disease model. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4465–4478. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu159>
- Akhmadeeva, G.N., Magzhanov, R. V., Tayupova, G.N., Baitimerov, A.R., Khidiyatova, I.M., 2018. Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. *Neurosci. Behav. Physiol.* 48, 636–640. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0609-1>
- Ali, Y.O., Escala, W., Ruan, K., Zhai, R.G., 2011. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila melanogaster* models of neurodegeneration. *J. Vis. Exp.* 1–6. <https://doi.org/10.3791/2504>
- Antunes, M.S., Cattelan Souza, L., Ladd, F.V.L., Ladd, A.A.B.L., Moreira, A.L., Bortolotto, V.C., Silva, M.R.P., Araújo, S.M., Prigol, M., Nogueira, C.W., Boeira, S.P., 2020. Hesperidin Ameliorates Anxiety-Depressive-Like Behavior in 6-OHDA Model of Parkinson's Disease by Regulating Striatal Cytokine and Neurotrophic Factors Levels and Dopaminergic Innervation Loss in the Striatum of Mice. *Mol. Neurobiol.* 57, 3027–3041. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01940-3>
- Araujo, S.M., Poetini, M.R., Bortolotto, V.C., de Freitas Couto, S., Pinheiro, F. C., Meichtry, L.B., et al. 2018. Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research* 351, 104-113. doi: 10.1016/j.bbr.2018.05.016.

- Aryal, B., Lee, Y., 2019. Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Rep.* 52, 250–258.
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2019.52.4.204>
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N., 2003. Dopamine-or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 5(3), 165-176.
<https://doi.org/10.1007/BF03033137>
- Barin, J.S., Pereira, J.S., Mello, P.A., Knorr, C.L., Moraes, D.P., Mesko, M.F., Nobre, J.A., Korn, M.G., Flores, E.M., 2012. Focsed microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. *Talanta* 94:308–314. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.048>
- Bianchini, M.C, Gularte, C.O, Escoto, D.F, Pereira, G, Gayer, M.C, Roehrs, R, Soares, F.A., Puntel, R.L., 2016. Peumus boldus (Boldo) Aqueous Extract Present Better Protective Effect than Boldine Against Manganese-Induced Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurochemical Research* 41:2699-2707. doi: 10.1007/s11064-016-1984-z
- Billings, J. L., Gordon, S. L., Rawling, T., Doble, P. A., Bush, A. I., Adlard, P. A., Hare, D. J., 2019. l-3, 4-dihydroxyphenylalanine (l-DOPA) modulates brain iron, dopaminergic neurodegeneration and motor dysfunction in iron overload and mutant alpha-synuclein mouse models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 150(1), 88-106.<https://doi.org/10.1111/jnc.14676>
- Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio, M., Velez-Pardo, C., 2011. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: A model to study Parkinsonism. *BioMetals* 24, 1045–1057. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9463-0>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., Waddell, S., 2012. Layered reward signalling through Octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature*, 492(7429), 433-437. <https://doi.org/10.1038/nature11614>

- Buyukdura, J.S., McClintock, S.M., Croarkin, P.E., 2011. Psychomotor retardation in depression: Biological underpinnings, measurement, and treatment. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.019>
- Clarke C.E., 2000. Mortality from Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 68(2):254-255. doi:10.1136/jnnp.68.2.254
- Coulom, H., Birman, S., 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>
- Couto, S.F., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., Poetini, M.R.P., Pinheiro, F.C., Musachio, E.A.S., Meichtry, L.B., Sacramento, M., Alves, D., Novo, D.L.R., Mesko, M.F., Prigol, M., 2019. 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline prevents dopamine depletion in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's-like disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.10.015>.
- D'Andrea, G., Nordera, G., Pizzolato, G., Bolner, A., Colavito, D., Flaibani, R., & Leon, A., 2010. Trace amine metabolism in Parkinson's disease: Low circulating levels of OAopamine in early disease stages. *Neuroscience letters*, 469(3), 348-351. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.025>
- de Lima, M. N. M., Laranja, D. C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., & Schröder, N., 2005. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Experimental gerontology*, 40(6), 506-511. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.03.004>
- Dierick, H. A., 2008. Fly fighting: Octopamine modulates aggression. *Current Biology*, 18(4), R161-R163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.026>
- Dissanayaka, N.N.N.W., White, E., O'Sullivan, J.D., Marsh, R., Pachana, N.A., Byrne, G.J., 2014. The clinical spectrum of anxiety in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 29, 967–975. <https://doi.org/10.1002/mds.25937>
- Dunkley, P. R., Dickson, P. W., 2019. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *Journal of neurochemistry*, 149(6), 706-728. <https://doi.org/10.1111/jnc.14675>
- Edwards, A.C., Rollmann, S.M., Morgan, T.J., Mackay, T.F.C., 2006. Quantitative

- Genomics of Aggressive Behavior in *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet. 2, 1386–1395. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020154>
- El-Agnaf, O.M.A., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Curran, M.D., Gibson, M.J., Court, J.A., Schlossmacher, M.G., Allsop, D., 2006. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. FASEB J. 20, 419–425. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1449com>
- Emamzadeh, F.N., Surguchov, A., 2018. Parkinson's disease: Biomarkers, treatment, and risk factors. Front. Neurosci. 12, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00612>
- Figueira, F.H., de Quadros Oliveira, N., de Aguiar, L.M., Escarrone, A.L., Primel, E.G., Barros, D.M., da Rosa, C.E., 2017. Exposure to atrazine alters behaviour and disrupts the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*. Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 202, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.08.005>
- Gajula Balija, M.B., Griesinger, C., Herzig, A., Zweckstetter, M., Jäckle, H., 2011. Pre-fibrillar α -Synuclein mutants cause Parkinson's disease-like non-motor symptoms in *Drosophila melanogaster*. PLoS One 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024701>
- Gao, L. lin, Wu, T., 2016. The study of brain functional connectivity in Parkinson's disease. Transl. Neurodegener. 5, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0066-0>
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., 2001. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. Phyther. Res. 15, 655–669. <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>
- Goldenberg, M.M., 2008. Medical management of Parkinson's disease. P T 33.
- Gorostiza, E.A., Colomb, J., Brembs, B., 2016. A decision underlies phototaxis in an insect. Open Biol. 6. <https://doi.org/10.1098/rsob.160229>
- Hajjalyani, M., Farzaei, M.H., Echeverría, J., Nabavi, S.M., Uriarte, E., Eduardo, S.S., 2019. Hesperidin as a neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. Molecules 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24030648>

- Hare, D.J., Double, K.L., 2016. Iron and dopamine: A toxic couple. *Brain* 139, 1026–1035. <https://doi.org/10.1093/brain/aww022>
- Iliadi, K. G., Gluscencova, O. B., Boulianne, G. L. 2016. Psychomotor behavior: a practical approach in *Drosophila*. *Frontiers in psychiatry*, 7, 153. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00153>
- Iliadi, K. G., Gluscencova, O. B., Iliadi, N., Boulianne, G. L., 2018. Mutations in the *Drosophila* homolog of human PLA2G6 give rise to age-dependent loss of psychomotor activity and neurodegeneration. *Scientific reports*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21343-8>
- Julienne, H., Buhl, E., Leslie, D.S., Hodge, J.J.L., 2017. *Drosophila* PINK1 and parkin loss-of-function mutants display a range of non-motor Parkinson's disease phenotypes. *Neurobiol. Dis.* 104, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.014>
- Kalia, L. V, Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav. Brain Res.* 284, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.001>
- Kell, D.B., 2009. Iron behaving badly: Inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med. Genomics* 2, 1–79. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-2>
- Kumar, A., Christian, P.K., Panchal, K., Guruprasad, B.R., Tiwari, A.K., 2017. Supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) Improves Lifespan and Locomotor Activity in Paraquat-Sensitive DJ-1 β Δ 93 Flies, a Parkinson's Disease Model in *Drosophila melanogaster*. *J. Diet. Suppl.* 14, 573–588. <https://doi.org/10.1080/19390211.2016.1275917>
- Le Bourg, É., Buecher, C., 2002. Learned suppression of photopositive tendencies in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Learn. Behav.* 30, 330–341. <https://doi.org/10.3758/BF03195958>

- Lushchak, O. V., Rovenko, B.M., Gospodaryov, D. V., Lushchak, V.I., 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 160, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.04.019>
- Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L., Brand, M.D., 2004. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila melanogaster*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 388–391. <https://doi.org/10.1196/annals.1297.069>
- More, S.V., Kumar, H., Cho, D.Y., Yun, Y.S., Choi, D.K., 2016. Toxin-induced experimental models of learning and memory impairment. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091447>
- Morgan, J.C., Currie, L.J., Harrison, M.B., Jr, J.P.B., Trugman, J.M., Wooten, G.F., 2014. Mortality in Levodopa-Treated Parkinson's Disease 2014.
- Muhammad, M.H., 2017. Could Hesperidin and Iron chelator be a new Therapeutic approach in Gentamicin induced Acute Kidney Injury in Rats? *Am. J. Biomed. Sci.* 9, 62–74. <https://doi.org/10.5099/aj170200062>
- Muhammad, T., Ikram, M., Ullah, R., Rehman, S. U., Kim, M. O., 2019. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling. *Nutrients*, 11(3), 648. <https://doi.org/10.3390/nu11030648>
- Nagoshi, E., 2018. *Drosophila* Models of Sporadic Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3343. <https://doi.org/10.3390/ijms19113343>
- Oh, Y.S., Kim, J.S., Hwang, E.J., Lyoo, C.H., 2018. Striatal dopamine uptake and olfactory dysfunction in patients with early Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 56, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.06.022>
- Olanow, C.W., Kieburtz, K., Odin, P., Espay, A.J., Standaert, D.G., Fernandez, H.H., Vanaganas, A., Othman, A.A., Widnell, K.L., Robieson, W.Z., Pritchett, Y., Chatamra, K., Benesh, J., Lenz, R.A., Antonini, A., 2014. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: A randomised, controlled, double-blind, double-dummy

- study. *Lancet Neurol.* 13, 141–149. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70293-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70293-X)
- Pitmon, E., Stephens, G., Parkhurst, S.J., Wolf, F.W., Kehne, G., Taylor, M., Lebestky, T., 2016. The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain Behav.* 15, 327–334. <https://doi.org/10.1111/gbb.12264>
- Poetini, M.R., Araujo, S.M., Trindade de Paula, M., Bortolotto, V.C., Meichtry, L.B., Polet de Almeida, F., Jesse, C.R., Kunz, S.N., Prigol, M., 2018. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. *Chem. Biol. Interact.* 279, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.018>
- Reimer, A.E., de Oliveira, A.R., Diniz, J.B., Hoexter, M.Q., Chiavegatto, S., Brandão, M.L., 2015. Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. *Behav. Brain Res.* 292, 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.036>
- Roeder, T. 2020. The control of metabolic traits by Octopamine and tyramine in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 223(7).
- Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M., 2014. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin - A mini-review. *Life Sci.* 113, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.029>
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M., 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 23(33), 10495-10502. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-33-10495.2003>
- Silva, N. C., Poetini, M. R., Bianchini, M. C., Almeida, F. P., Dahle, M. M. M., Araujo, S. M., Bortolotto, V.C., Musachio, E. A.S., Ramborger, B. P., Novo, D. La R., Roehrs, R., Mesko, M. F., Prigol, M., Puntel, R. L. 2021. Protective effect of gamma-oryzanol against manganese-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11848-z>

- Soares, J.J., Rodrigues, D.T., Gonçalves, M.B., Lemos, M.C., Gallarreta, M.S., Bianchini, M.C., Gayer, M.C., Puntel, R.L., Roehrs, R., Denardin, E.L.G., 2017. Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of Bougainvillea glabra Choisy. *Biomed. Pharmacother.* 95, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.073>
- Tamilselvam, K., Braidy, N., Manivasagam, T., Essa, M.M., Prasad, N.R., Karthikeyan, S., Thenmozhi, 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. <https://doi.org/10.1155/2013/102741>
- Tang, S.Z., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J., 2002. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chem.* 76, 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00248-5)
- Tekin, I., Roskoski, R., Carkaci-Salli, N., Vrana, K.E., 2014. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase, *Journal of Neural Transmission.* <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1238-7>
- Tessitore, A., Hariri, A. R., Fera, F., Smith, W. G., Chase, T. N., Hyde, T. M., Mattay, V. S. (2002). Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 22(20), 9099-9103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-09099.2002>
- Vermeer, L.M., Higgins, C.A., Roman, D.L., Doorn, J.A., 2013. Real-time monitoring of tyrosine hydroxylase activity using a plate reader assay. *Anal. Biochem.* 432, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.09.005>
- Wang, L.L.J.L.-S., Blaha, L., Dott, W., 2014. DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during drinking water treatment in a waterworks in China. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 51, 229–235. <https://doi.org/10.1002/em.20537>
- Zheng, C., Chen, G., Tan, Y., Zeng, W., Peng, Q., Wang, J., Cheng, C., Yang, X., Nie, S., Xu, Y., Zhang, Z., Papa, S.M., Ye, K., Cao, X., 2018. TRH analog, taltirelin protects dopaminergic neurons from neurotoxicity of MPTP and rotenone. *Front.*

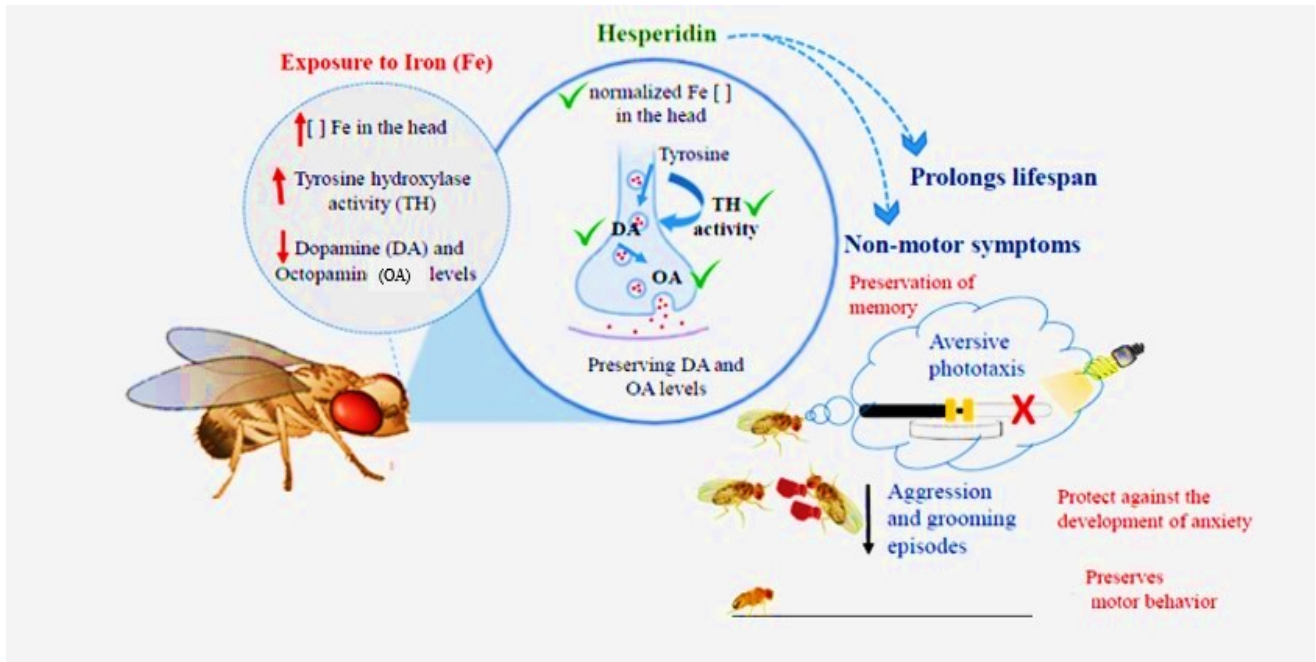
Cell. Neurosci. 12, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00485>

Zhou, Z. D., Selvaratnam, T., Lee, J. C. T., Chao, Y. X., Tan, E. K., 2019. Molecular targets for modulating the protein translation vital to proteostasis and neuron degeneration in Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0145-0>

Zokaei, N. and M.H., 2012. Neurotrophins and. Brain Imaging Behav. Neurosci. 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>

Zucca, F.A., Aguilar Segura, J., Emanuele, F., Muñoz, P., Paris, I., Sulzer, D., Sarnae, T., Casella, L., Zecca, L., 2016. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Physiol. Behav.* 176, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.011>

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTIGO 1**Iron overload during the embryonic period develops hyperactive like behavior and dysregulation of biogenic amines in *Drosophila melanogaster***

Márcia Rósula Poetini, Elize Aparecida Santos Musachio, Stifani Machado Araujo, Francielli Polet Almeida, Mustafa Munir Mustafa Dahleh, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Dieniffer Espinosa Janner, Franciane Cabral Pinheiro, Bruna Piaia Ramborger, Rafael Roehrs, Diogo La Rosa Novo, Márcia Foster Mesko, Gustavo Petri Guerra, Marina Prigol

Publicado na Revista Developmental Biology



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

Iron overload during the embryonic period develops hyperactive like behavior and dysregulation of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*



Márcia Rósula Poetini ^a, Elize Aparecida Santos Musachio ^a, Stéfani Machado Araujo ^a, Francielli Polet Almeida ^a, Mustafa Munir Mustafa Dahleh ^a, Vandrezza Cardoso Bortolotto ^a, Dieniffer Espinosa Janner ^a, Franciane Cabral Pinheiro ^a, Bruna Piaia Ramborger ^b, Rafael Roehrs ^b, Diogo La Rosa Novo ^c, Márcia Foster Mesko ^c, Gustavo Petri Guerra ^a, Marina Prigol ^{a,*}

^a Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas- LaftamBio Pampa, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Itaqui, Rua Joaquim de Sá Britto, s/n, Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, CEP 97650-000, Brazil

^b Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguiana, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBioq), BR-472 Km 7, Uruguiana, RS, CEP 97500-970, Brazil

^c Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N - Prédio/Bloco: 30 e 32, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, CEP 96160-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hyperactivity
Embryonic period
Behavior
Iron
Biogenic amines

ABSTRACT

Iron (Fe) is used in various cellular functions, and a constant balance between its uptake, transport, storage, and use is necessary to maintain its homeostasis in the body. Changes in Fe metabolism with a consequent overload of this metal are related to neurological changes and cover a broad spectrum of diseases, mainly when these changes occur during the embryonic period. This work aimed to evaluate the effect of exposure to Fe overload during the embryonic period of *Drosophila melanogaster*. Progenitor flies (male and female) were exposed to Ferrous sulfate (FeSO₄) for ten days in concentrations of 0.5, 1, and 5 mM. After mating and oviposition, the progenitors were removed and the treatment bottles preserved, and the number of daily hatches and cumulative hatching of the first filial generation (F1) were counted. Subsequently, F1 flies (separated by sex) were subjected to behavioral tests such as negative geotaxis test, open field test, grooming, and aggression test. They have evaluated the levels of dopamine (DA), serotonin (5-HT), Octopamine (OA), tryptophan and tyrosine hydroxylase (TH), acetylcholinesterase, reactive species, and the levels of Fe in the progenitor flies and F1. The Fe levels of F1 flies are directly proportional to what is incorporated during the period of embryonic development; we also observed a delay in hatching and a reduction in the number of the hatch of F1 flies exposed during the embryonic period to the 5mM Fe diet, a fact that may be related to the reduction of the cell viability of the ovarian tissue of progenitor flies. The flies exposed to Fe (1 and 5 mM) showed an increase in locomotor activity (hyperactivity) and a significantly higher number of repetitive movements. In addition to a high number of aggressive encounters when compared to control flies. We can also observe an increase in the levels of biogenic amines DA and 5-HT and an increase in TH activity in flies exposed to Fe (1 and 5 mM) compared to the control group. We conclude that the hyperactive-like behavior demonstrated in both sexes by F1 flies exposed to Fe may be associated with a dysregulation in the levels of DA and 5-HT since Fe is a cofactor of TH, which had its activity increased in this study. Therefore, more attention is needed during the embryonic development period for exposure to Fe overload.

1. Introduction

Iron (Fe) is a micronutrient that performs vital functions in all cells of organic systems; although it is intensively studied in mammals and yeasts, little is known about the mechanism of Fe homeostasis for the

largest and most diverse group of organisms on earth - insects (Rao and Georgieff, 2007; Tang and Zhou, 2013). The basic premise of insect development involves the morphogenesis of quite different types of structures. The first is related to the larval pattern's construction (embryonic period), the second is related to metamorphosis in the adult body

* Corresponding author. Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, CEP 97650-000, Brazil.

E-mail address: marinaprigol@unipampa.edu.br (M. Prigol).

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.03.006>

Received 16 November 2020; Received in revised form 9 March 2021; Accepted 10 March 2021

Available online 16 March 2021

0012-1606/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

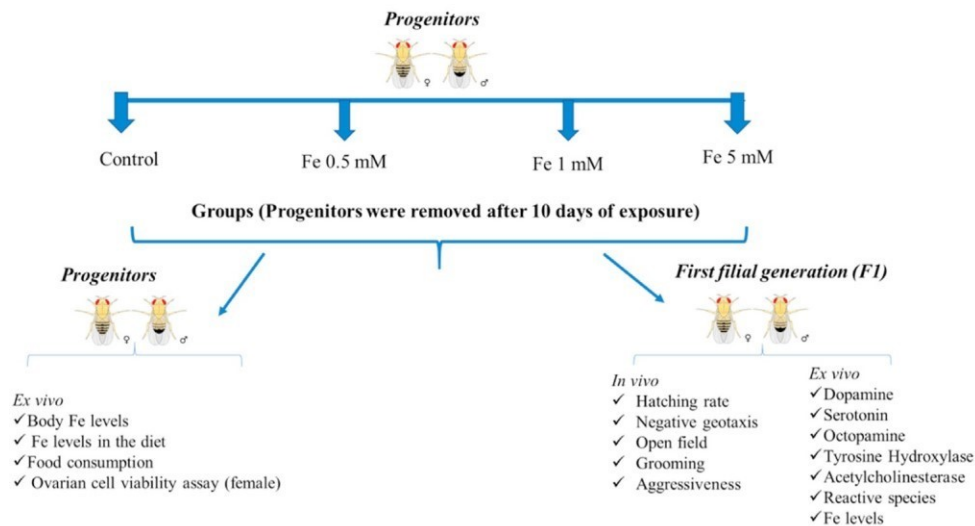


Fig. 1. Experimental design.

(Nascimento et al., 2002). During the embryonic period of *Drosophila melanogaster*, Fe is indispensable, as it participates in neuronal growth and differentiation, making it essential for brain development, and enzymes use it as a cofactor and perform numerous physiological functions, including breathing, DNA synthesis, and ecdysone, in addition to participating in the synthesis of biogenic amines (Warren et al., 2002; Mandilaras et al., 2013).

The regulation of Fe at the brain level is tightly controlled by sophisticated mechanisms that manage its quantity and prevent its harmful capacity (Kim and Wessling-Resnick, 2014); however it has been proposed that this mechanism protects the brain against Fe overload to some extent and that it cannot compensate when the load exceeds this limit (Maaroufi et al., 2009). Exposure to an excess of Fe during the embryonic period is worrying, as it can affect the construction of brain circuits, mainly affecting biogenic amine systems, highly conserved between *Drosophila melanogaster* and mammals (Shin et al., 2018).

Previous work describes that excess Fe is capable of altering the physiology, synthesis, and signaling of neurotransmitters, and as a consequence, there may be an over or underproduction of dopamine (DA), noradrenaline (homologous *Drosophila* octopamine), adrenaline, and serotonin (5-HT), which are involved in the regulation of emotion, attention, reward, movement and various other functions (Youdim et al., 2009). These neurotransmitters are synthesized by a series of Fe-dependent enzymes, including phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase (TH), and tryptophan hydroxylase (Kim and Wessling-Resnick, 2014; Youdim et al., 2009). Abnormalities in the metabolism and function of these neurotransmitters are commonly described in studies with experimental models of vertebrates, invertebrates, and in humans, where harmful implications are observed in their motor functions similar to Parkinson's disease (Poetini et al., 2018; Meder et al., 2019), in learning and memory deficits (de Lima et al., 2007; Puig et al., 2014), schizophrenia, bipolar disorder, attention deficit disorder, hyperactivity disorder (ADHD) (Kaushik et al., 2007). These diseases can be characterized in various animal models. The use of invertebrate animals such as *Drosophila melanogaster* may be a strategic decision relevant to the understanding of the human nervous system since it presents a reduced nervous system facilitating the understanding of the basic mechanisms of neurotransmission and neuromodulation homologous to humans, allowing substantial advances and benefits for our understanding (Giurfa and Pflüger, 2019).

Therefore, we hypothesize that the early overexposure to Fe during embryonic development of *Drosophila melanogaster* alters the brain

biochemistry and function of the biogenic amine systems, reflecting in the behavioral changes of these insects when they reach the adult body. In this context, our objective was to assess whether exposure to Fe overload during the embryonic period of *Drosophila melanogaster* is related to changes in the neurodevelopment of F1 flies.

2. Materials and methods

2.1. *Drosophila melanogaster* stock and culture

Drosophila melanogaster (Harwich strain) of the wild type was obtained from the Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Interdisciplinary Research Center on Biotechnology-CIPBIOTEC, in Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, RS, Brazil. The flies were raised on a standard laboratory diet containing cornmeal, yeast, powdered milk, salt, sugar, wheat germ, wheat fiber, and methylparaben as an antifungal control and kept at constant temperature and humidity (24 °C; 60% relative humidity) and under a 12 h dark /12 h light cycle.

2.2. Experimental design

Progenitor flies of both sexes (50% female and 50% male), two days old, were exposed to Fe in the form of Ferrous sulfate (FeSO_4) dissolved in distilled water and mixed with 5ml of the standard diet to obtain the final concentrations 0.5; 1 and 5mM. In the control group, the standard medium had no addition of Fe. FeSO_4 concentrations were chosen from response concentration curves previously performed in our laboratory. After ten days of exposure to the diet and the oviposition process, the progenitors were removed and the treatment bottles preserved until the progeny hatched (first filial generation (F1)). F1 flies were daily and immediately transferred to tubes without Fe and separated by sex to be later used in behavioral and biochemical analyses (Fig. 1).

An additional protocol was implemented to avoid an experimental configuration bias. To evaluate female flies: Virgin female and male progenitor flies mated in a standard medium free of excess Fe for 4 h. Afterward, only the progenitor females were removed and transferred to a standard diet containing Fe in the final concentrations of 0.5; 1 and 5mM. After ten days of oviposition, the female parents were removed, and the treatment bottles were preserved until the of the flies F1 hatches. F1 flies were daily and immediately transferred to tubes without Fe and separated by sex later used in behavioral procedures and biochemical analyses. The results are demonstrated in the Figs. 9–11. Our results show

that the absence of progenitors exposure to iron did not cause any change in the results obtained, proving that progenitors exposure did not modulate offspring's phenotype.

2.3. *In vivo analyses*

2.3.1. *Number of daily hatch and cumulative hatching*

The number of daily hatch was obtained by counting of the total number of F1 flies hatched (first day 0 flies) for fifteen days after removing the progenitors from the medium. Cumulative hatching is the number of hatches of F1 flies in relation to the total hatches at the beginning of the test. The results represent the average of four independent experiments.

2.3.2. *Negative geotaxis test (climbing)*

In some types of neurological disorders, hyperactivity is a characteristic behavior. A negative geotaxis test was performed to assess possible behavioral changes related to hyperactivity in flies, which can determine the locomotor function of the flies. The test was carried out with 20 female F1 flies and 20 male F1 flies from each experimental group, and the time required to reach the 8 cm of the tube was counted, according to (Ternes et al., 2014). The test was repeated five times for each fly, and the data were expressed as the average of five attempts in the treatment group. Therefore, the total number of flies represents the sum of five independent experiments.

2.3.3. *Open field test (number of crossings)*

The open-field test was used to assess the flies' locomotor activity, as in a study by Kaur et al. (2015). Newly hatched flies of both sexes were kept in a 9 cm diameter arena that was divided into squares (1×1 cm), and the area was covered with a Petri dish. The flies' activities and movements were timed, and the trajectory was recorded in a certain time (60 s). The crossing number test consists of counting the number of squares crossed by each fly in the 60 s period, as previously described by Connolly (1966), with adaptations performed by Musachio et al. (2020). The results are expressed as the average number of squares crossed by the group of flies. About 20 flies per group (20 female F1 and 20 male F1) were included for the crossing number data, and the total number of flies represents the sum of five independent experiments.

2.3.4. *Grooming (repetitive behavior)*

Repetitive behavior was assessed by the grooming test, as previously described by Tauber et al. (2011). Recorded for 5 min and manually counting the number of grooming episodes carried out in both sexes. Five independent experiments were carried out.

2.3.5. *Aggressiveness test*

According to the method of Edwards et al. (2006), the aggressiveness test was evaluated, adapted by Araujo et al. (2018). The flies were placed in test tubes for 90 min without food before the test started. The pairs of male or female flies were placed in a circular arena with a radius of 45 mm, and a height of 12 mm, in the center of the arena contained a drop of 5% sucrose. Behavioral tests were carried out at 22 °C. After the acclimatization period, the males were placed in the arena. After a time of adaptation, a number of aggressive events were observed at the time of 5 min. The following factors were counted as aggressive events: leg extended one fly to another resulting in physical contact, chase, a fast approach that leads to disorientation, high wing in response to proximity/approach from one fly to another, and the impact the front legs of both flies. Ten pairs of male flies and ten pairs of female flies were evaluated per group. Three independent experiments were performed, obtaining the result of the aggressiveness test of 60 pairs of flies per group (30 pairs of males F1 and 30 pairs of female F1). Thus, the score corresponded to the number of aggressive events among the flies.

2.4. *Ex vivo analyses*

2.4.1. *Estimation of the levels of DA, 5-HT, OA, and tryptophan (Trp) by HPLC*

DA, 5-HT, and OA levels were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of DA concentrations according to the procedure previously described by Bianchini et al. (2019). Therefore, 30 heads of F1 flies were used, 15 heads of female flies together with 15 heads of male flies, were homogenized in 385 µL of cold 0.9% NaCl and 15 µL of 500 mM HCl, after centrifugation at 3000g per 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was filtered through 0.22 µm syringe filters and then stored at -80 °C until use.

Samples (20 µL) were injected into the HPLC system by an auto-sampler device. The YL9100 HPLC system consisted of a vacuum degasser and a quaternary pump connected to a reverse-phase column (Synergi 4 µ Fusion-RP 80 Å 250×4.60 mm; Phenomenex) coupled to a diode array detector (DAD). The mobile phase consisted of methanol and water (12:88 v/v) adjusted to pH 3 with phosphoric acid, and the flow rate was maintained at 0.8 mL/min. Five independent experiments (30 flies per group) were performed. The detection was performed at 198 nm, and the results were expressed as µg/mg after correction by the total protein.

2.4.2. *Enzymatic assays*

The enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) was performed in both sexes of F1 flies. Therefore, 20 female F1 fly heads and 20 male F1 fly heads per group were used, and these were homogenized in 20 mM HEPES buffer pH 7.4 and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. To produce the sample, the flies were decapitated with the aid of a No. 21 scalpel blade and a stereoscopic microscope with a magnifying glass. Subsequently, 15 µL of head sample and 50 µL of acetylthiocholine iodide (7.25 mM) was added to a reaction mixture containing phosphate buffer (0.25 M, pH 8.0) and 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (5 mM). The reaction was monitored for 2 min at 412 nm. The results represent the average of five experiments. They are expressed as mean standard deviation in µmol AcSch/h/mg protein, based on the protocols previously described by Ellman et al. (1961).

Tyrosine hydroxylase (TH) was determined as described previously by Vermeer et al. (2013) with some adaptations. For the analysis of TH activity, 30 female F1 fly heads and 30 male F1 fly heads per group were used, per experimental group was collected. The tissues were homogenized in 250 µL of Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7.2, and subsequently centrifuged at 13,200g, 5 min at 4 °C. The mixture's reaction was 100 µL of the sample, 50 mM HEPES, 50 mM tyrosine, and 100 mM sodium periodate. TH activity was determined at 475 nm for 60 min (interval of 5 min) at an ambient temperature of 25 °C. The results were normalized by protein, and the values were expressed as % in relation to the control, five independent experiments were carried out.

2.4.3. *Determination of levels of reactive species*

Fifteen heads (male and female F1, separately) per group were homogenized in 10 mM Tris buffer, pH 7 and centrifuged at 1,000g for 5 min at 4 °C. The quantification of the 2¹-7¹-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) oxidation test was monitored, as a general index of oxidative stress according to the protocol proposed by Perez-Severiano et al. (2004). After 1 h, the fluorescence emission resulting from the oxidation of DCF-DA was monitored, the reading occurred in excitation at 488 nm and the emission at 520 nm (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer). The rate of formation of DCF was calculated as a percentage of the fluorescence of the treatments in relation to the control group. Five independent experiments were carried out.

2.4.4. *Determination of Fe levels in the flies (progenitors and F1) and the diet*

In the digestion process, around 50 mg of female flies and 50 mg of male flies from each experimental group of progenitors or F1 were

transferred to microtubes (2 mL), adding 500 μL of concentrated HNO_3 and subsequently heated in a water bath (95 $^\circ\text{C}$) for 2 h. Also, Fe dosage in the fly diets was performed in control, and Fe (0.5, 1 and 5 mM) and around 50 mg of diets previously dried were digested using the same digestion process used for flies. The final solution after the digestion process was diluted up to 2.0 mL using ultrapure water. The experiments were based on previous studies present in the literature (Couto et al., 2019; Silva et al., 2021).

The concentration of Fe in the flies and the diet was determined by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-

OES). The wavelength selected in the determination step was 259.941 nm. The instrumental performance was optimized following the manufacturer's instructions and as previously described in the literature (Barin et al., 2012). The limit of quantification (LOQ) was calculated from the average of the blank values plus ten times the standard deviation obtained for ten repetitions of the blank, considering the sample mass and the final digest volume. Three to five independent experiments were carried out. The results were expressed considering the flies' weight (μg of Fe per gram of body weight) and considering the weight of the diets (μg of Fe per gram of dry mass).

2.4.5. Determination food consumption

To determine if the progenitors (female and male) ingested the same amount of the diet as the control, we measured their food consumption. Food consumption on progenitors was assessed according to Lushacket al. (2011), with adaptations (Silva et al., 2021).

2.4.6. Ovarian cell viability using the assay of (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)

After the experimental period (10 days), the female progenitor flies (15 flies per group) were removed from the flasks and anesthetized on ice. After their ovaries were removed with the aid of an optical microscope, added to a 96-well plate and incubated with 200 μL of MTT for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. Subsequently, MTT was removed and 200 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to incubation for another 30 min at 37 $^\circ\text{C}$. After the absorbance reading was measured at 540 nm. The results represent the average of four independent experiments and are expressed as a percentage in relation to the control group. The analysis method was described by Babot et al. (2005) with adaptations.

2.4.7. Protein determination

As previously described by Bradford (1976), protein content was determined using bovine serum albumin as a standard.

2.5. Statistical analysis

All data were analyzed using the Shapiro-Wilk normality test, and the homogeneity of the data was verified using the Bartlett test. Cumulative hatching, behavioral and biochemical data were analyzed using one-way ANOVA with the Fe exposure factor between subjects (Control vs. Fe). Significant ANOVA results were followed by Tukey's post hoc comparisons. Number of the daily hatch was analyzed using two-way ANOVA with time (Days) and treatment (Control vs. Fe) factors. Significant ANOVA results were followed by BonFeni's post hoc comparisons. All alpha levels were set at 0.05. The data were expressed as mean standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software.

3. Results

3.1. Effect of Fe exposure on ovarian cell viability of female progenitors and the number of daily and cumulative hatches of F1 flies after their embryonic development at different concentrations of Fe

Exposure to Fe in the progenitors caused a reduction in the fraction of viable cells in the ovarian tissue of flies exposed to a concentration of Fe5 mM (One-way ANOVA, $F_{(3,12)} 9.444$, $p 0.0018$) (Fig. 2A), concerning the control group.

Our results showed that F1 flies exposed to Fe 5 mM during the embryonic period had a delay in hatching, reflecting a significant reduction in the number of the daily hatch (Two-way ANOVA showed a significant interaction between factors ($F_{(42,120)} \frac{1}{4} 1,942$, $p \frac{1}{4} 0,0028$) and cumulative hatching (One-way ANOVA, $F_{(3,12)} 252,3$, $p \frac{1}{4} < 0,0001$), compared to the control group (Fig. 2B and C).

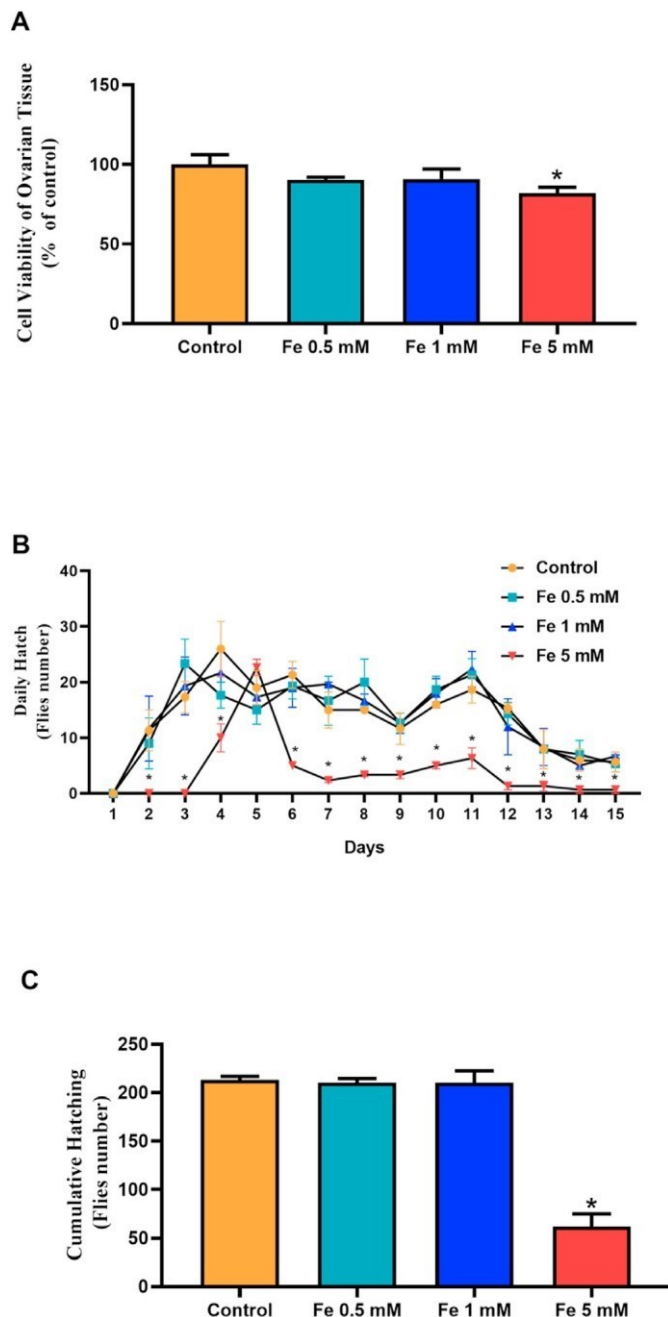


Fig. 2. Effect of Fe exposure from progenitors on ovarian cell viability of female progenitors (A) and the number of daily hatches (B) and cumulative hatches (C) of F1 flies after their embryonic development at different concentrations of Fe. The data are represented as the mean standard deviation (SD). *Different from the control group ($p < 0.05$).

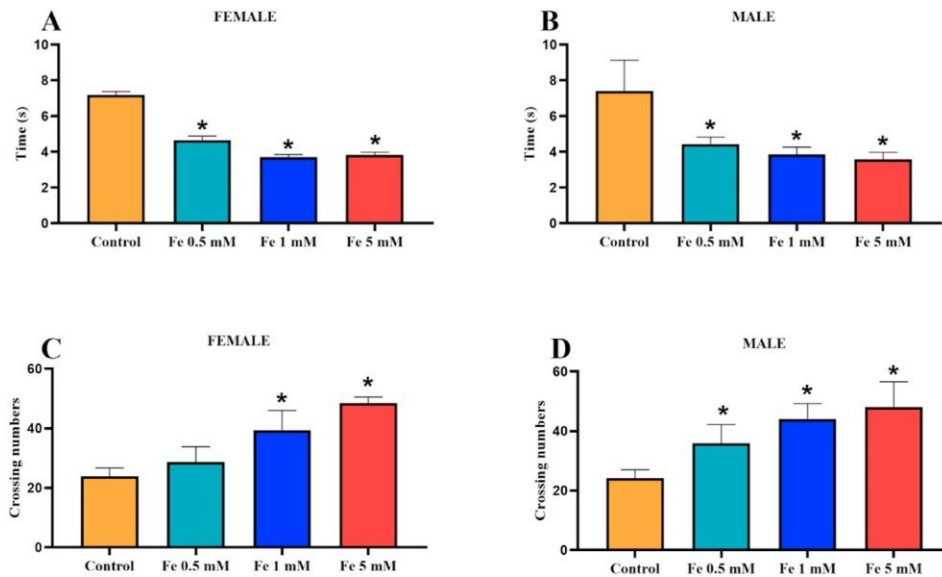


Fig. 3. Effects of exposure to Fe (0.5, 1 and 5 mM) during embryonic development of F1 flies on locomotor performance. The behavioral tests to assess locomotion were negative geotaxis in the female (A) and male (B), open field in the female (C), and male (D). The data are represented as the mean \pm SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

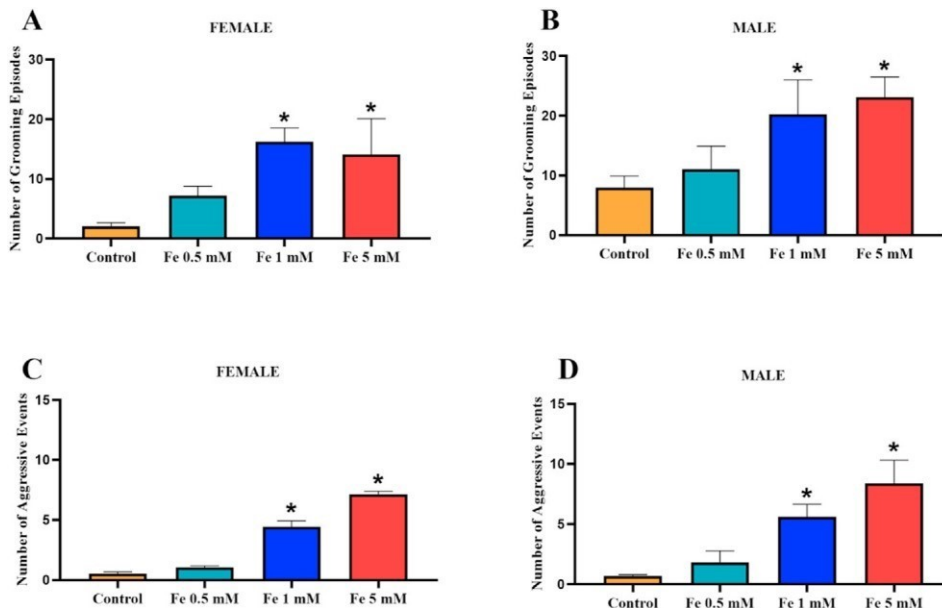


Fig. 4. Effects of exposure to Fe (0.5, 1, and 5 mM) during the embryonic development of F1 flies on the number of grooming episodes in females (A) and males (B) and the number of aggressive events in females (C) and males (D). The data are represented as the mean \pm SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

3.2. Effect of Fe exposure during embryonic development on the behavioral activity of F1 *Drosophila melanogaster*

In the negative geotaxis test, F1 flies exposed during the embryonic period to Fe (0.5, 1 and 5 mM) increased locomotion in females (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 396.7$, $p < 0.0001$) (Fig. 3A) and males (One-way

ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 17.62$, $p < 0.0001$) (Fig. 3B) concerning the control

group. In the open field test, groups exposed to Fe (1 and 5 mM) increased the number of crossing of female flies (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 29.51$, $p < 0.0001$) (Fig. 3C) and males (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 15.29$, $p < 0.0001$) (Fig. 3D) concerning the control group. Demonstrating that exposure to Fe during the development period causes hyperactive behavior in the offspring.

The post hoc analysis showed an increase in the number of grooming

episodes in female flies exposed to the concentration of Fe (1 and 5 mM) during the embryonic period (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 19.08$, $p < 0.0001$) (Fig. 4A) and males (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \approx 16.43$, $p < 0.0001$) (Fig. 4B) compared to their control group. The number of aggressive events was higher in female flies exposed to concentrations of Fe (1 and 5 mM) (One-way ANOVA, $F_{(3,8)} \approx 317.8$, $p < 0.0001$) (Fig. 4C)

and males (One-way ANOVA, $F_{(3,8)} \approx 25.65$, $p \approx 0.0002$) (Fig. 4D) compared to the control group.

3.3. Effect of Fe exposure of flies during embryonic development on DA, 5-HT, OA, and Trp levels

Exposure to Fe at concentrations of 1 and 5 mM during the period of embryonic development caused an increase in DA levels (One-way

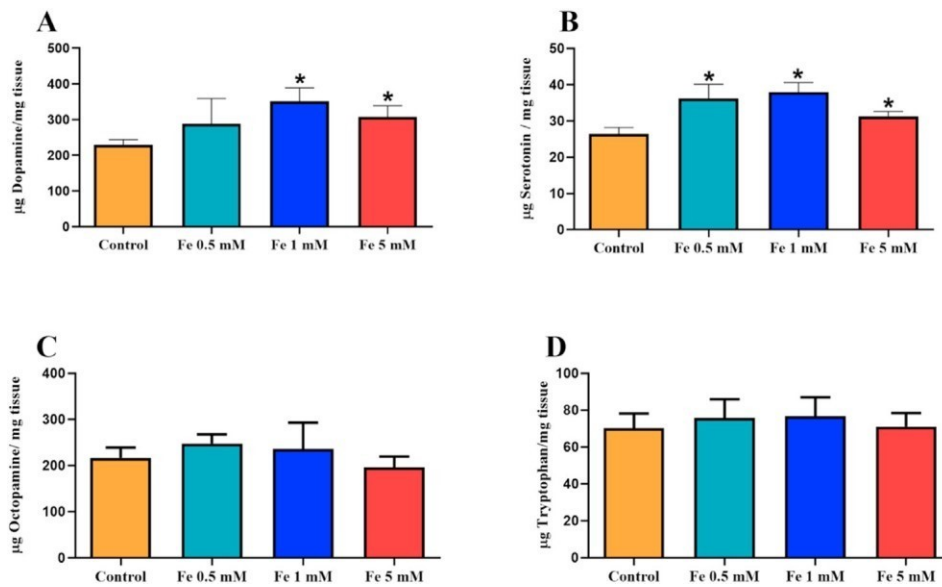


Fig. 5. Effects of exposure to Fe (0.5, 1 and 5 mM) during the embryonic development of F1 flies on the levels of dopamine (A), serotonin (B), octopamine (C), and tryptophan (D). The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

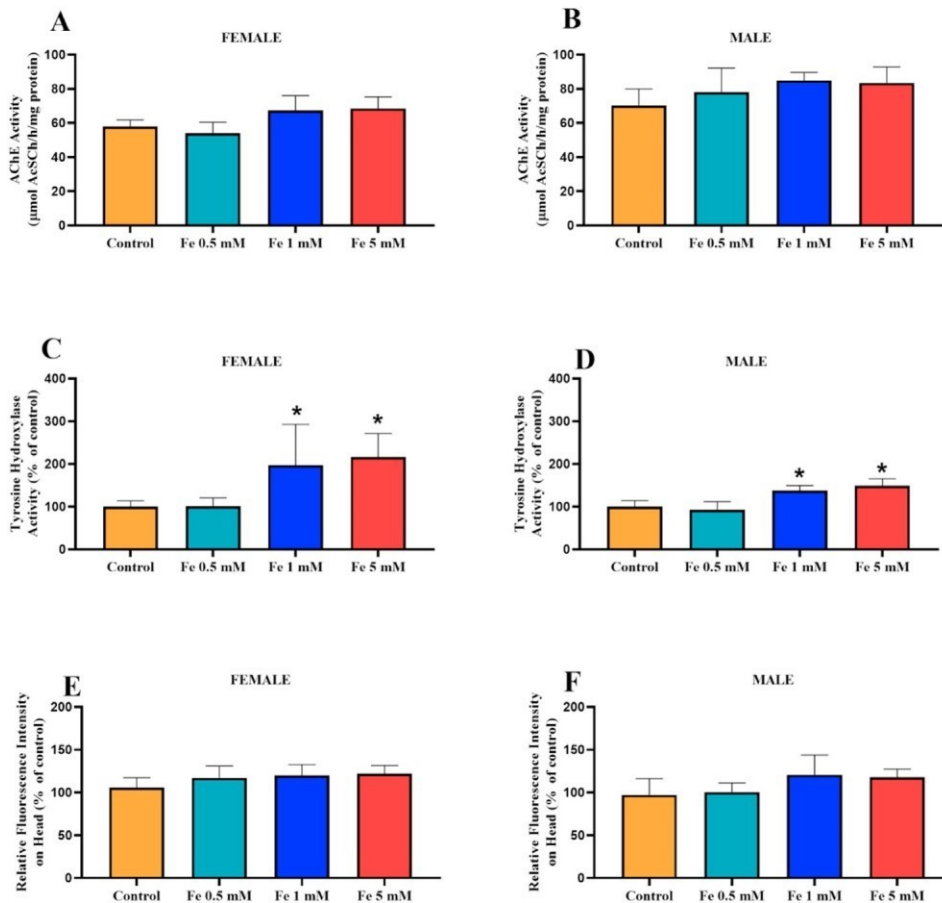


Fig. 6. Effects of Fe exposure (0.5, 1 and 5 mM) during embryonic development of F1 flies on acetylcholinesterase (AChE) activity in female (A) and male (B), tyrosine hydroxylase activity in female flies (C) and males (D), and levels of reactive species in female (E) and male (F) flies. The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

ANOVA, $F_{(3,16)} \frac{1}{4} 6.939$, $p < 0.0033$) and 5-HT levels (at concentrations 0.5, 1 and 5 mM) (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \frac{1}{4} 20.21$, $p < 0.0001$) in the head of the flies, compared to the control group ($p < 0.05$) (Fig. 5A and

Fig. 5B). However, at the levels of OA (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \frac{1}{4} 2.199$, $p \frac{1}{4} 0.1278$), and Trp (One-way ANOVA, $F_{(3,16)} \frac{1}{4} 0.6526$, $p \frac{1}{4} 0.5929$), (Fig. 5C and D), showed no statistical differences between the groups

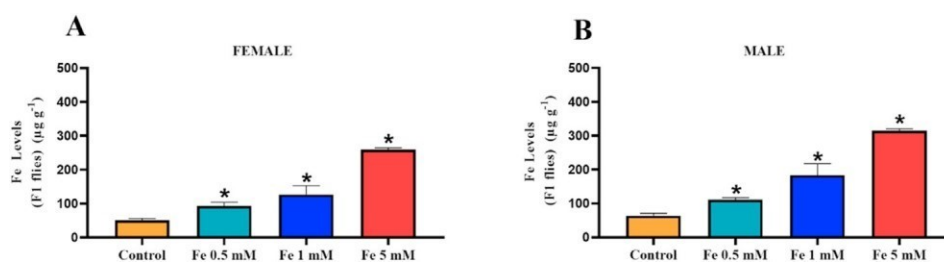


Fig. 7. Fe levels on F1 flies exposed to Fe (0.5, 1 e 5 mM) during the embryonic period. A) Fe levels in females (A) and males (B). The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

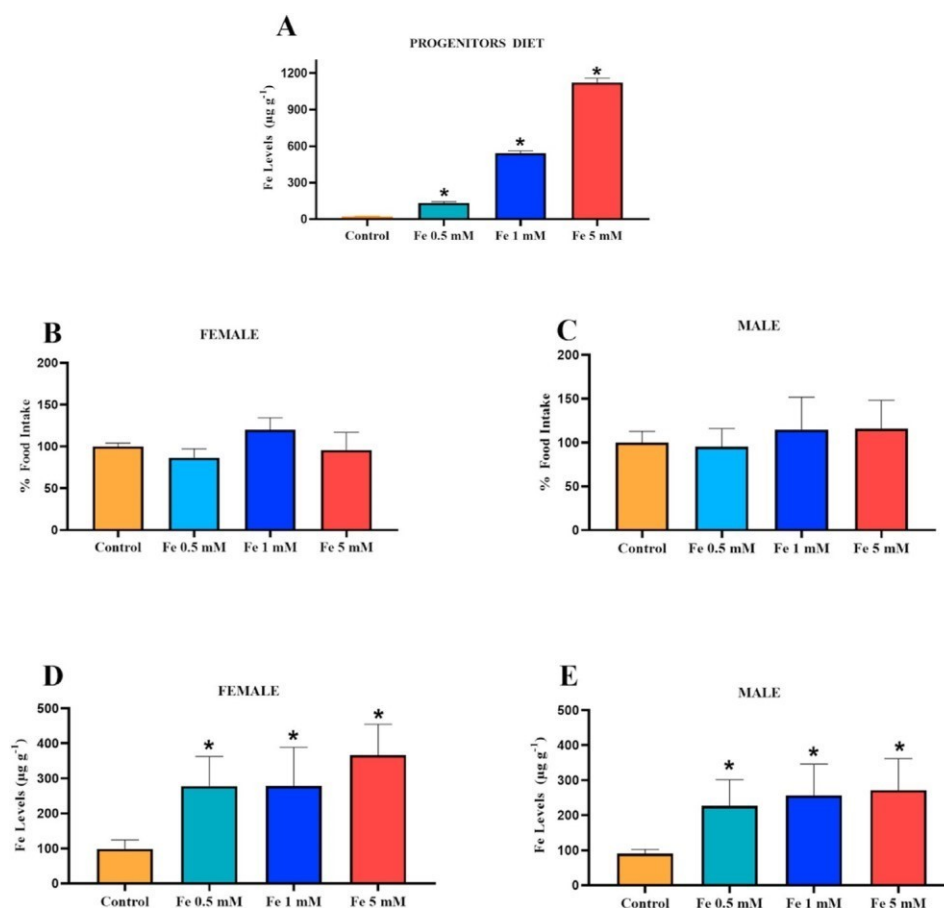


Fig. 8. Fe levels in the diets of the progenitor flies (A); Percentage of food intake in female (B) and male (C) progenitors; Fe levels in female (D) and male (E) progenitors. The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

exposed to Fe and the control group.

3.4. Effect of exposure to Fe in flies during embryonic development on the levels of reactive species, AChE, and TH activity

Female F1 flies exposed to different concentrations of Fe during the embryonic period showed no significant difference between the groups concerning the control group in AChE activity (One-way ANOVA, $F_{(3,18)}$ \approx 6.406, $p \approx$ 0.0038) (Fig. 6A) and males (One-way ANOVA, $F_{(3,16)}$ \approx 2.183, $p \approx$ 0.1298) (Fig. 6B). There was an increase in TH activity after exposure to Fe during embryonic development (at concentrations of 1 and 5 mM) in females (One-way ANOVA, $F_{(3,20)}$ \approx 7.153, $p < 0.0001$, Fig. 6C) and males (One-way ANOVA, $F_{(3,20)}$ \approx 18.69, $p < 0.0001$) (Fig. 6D) compared to the control group.

Flies exposed to different concentrations of Fe during the embryonic period showed no significant difference between groups in relation to the control group in the levels of reactive species of female and male F1 flies (One-way ANOVA, $F_{(3,20)}$ \approx 2.184, $p \approx$ 0.1216) (Fig. 6E), (One-way ANOVA, $F_{(3,12)}$ \approx 2.077, $p \approx$ 0.1563) (Fig. 6F) respectively.

Flies exposed to different concentrations of Fe during the embryonic period showed no significant difference between groups in relation to the

control group in the levels of reactive species of female and male F1 flies (One-way ANOVA, $F_{(3,20)}$ \approx 2.184, $p \approx$ 0.1216) (Fig. 6E), (One-way ANOVA, $F_{(3,12)}$ \approx 2.077, $p \approx$ 0.1563) (Fig. 6F) respectively.

3.5. Fe levels on F1 flies of exposed to Fe during embryonic period

There was an increase in Fe levels in females ($F_{(3,12)}$ \approx 148.8, $p < 0.0001$; Fig. 7A) and males ($F_{(3,12)}$ \approx 150.8, $p < 0.0001$; Fig. 7B) of F1 exposed to Fe during the embryonic period concerning the control group.

3.6. Fe levels on diet, progenitors and its relationship with food intake

Fe levels in the diets (0.5, 1 and 5 mM) were significantly increased compared to the standard (control) diet ($F_{(3,16)}$ \approx 45.2, $p < 0.0001$; Fig. 8A).

Female and male progenitor flies exposed to different concentrations

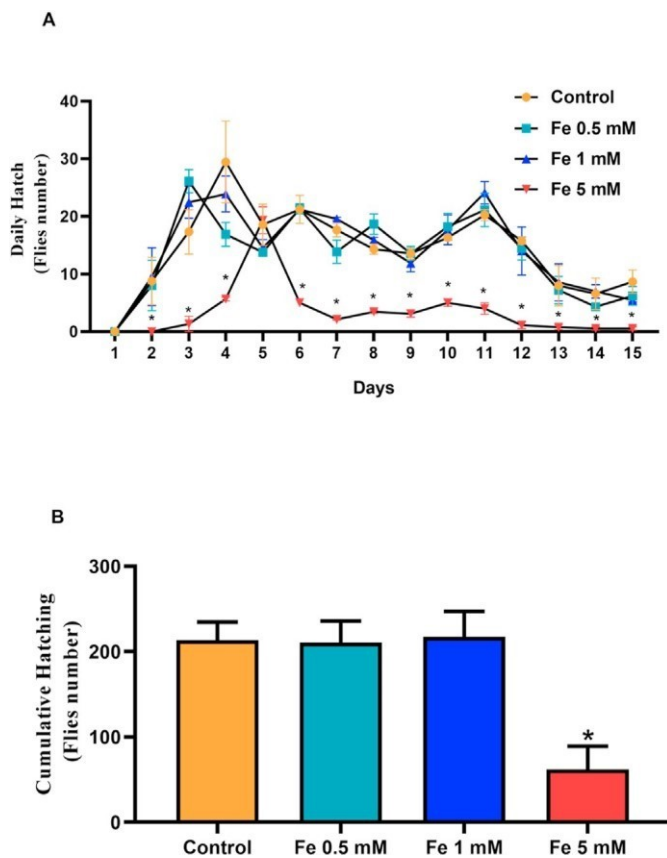


Fig. 9. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure female progenitors on the number of daily hatches (A) and cumulative hatching (B) of F1 flies after their embryonic development at different concentrations of Fe. The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

of Fe (0.5, 1 and 5 mM) did not have their food intake altered compared to the control group; female (One-way ANOVA, $F_{(3,12)} = 4.015$, $p = 0.0345$) (Fig. 8B), and males (One-way ANOVA, $F_{(3,12)} = 0.579$, $p = 0.6398$) (Fig. 8C).

Progenitor flies (male and female) exposed to Fe in different concentrations (0.5, 1 and 5 mM) after the experimental period (10 days) had an increase in Fe levels when compared to flies in the control group, female ($F_{(3,12)} = 7.307$, $p = 0.0048$; Fig. 8D) male ($F_{(3,16)} = 6.276$, $p = 0.0051$; Fig. 8E).

3.7. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitor flies) on the number of daily and cumulative hatches of F1 flies

Our results showed that F1 flies from female progenitor flies exposed to the Fe 5 mM diet had a delay in hatching, reflecting a significant reduction in the number of daily hatches showed a significant interaction between factors (Two-way ANOVA $F_{(42,120)} = 3.276$, $p < 0.0001$) and cumulative hatching (One-Way ANOVA, $F_{(3,8)} = 25.17$, $p = 0.0002$, compared to the control group (Fig. 9A and B).

3.8. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitor flies) on the behavioral activity of their F1

In the negative geotaxis test, flies exposed during the embryonic period to Fe (0.5, 1 and 5 mM) increased locomotion in relation to the control group in females (One-way ANOVA, $F_{(3,8)} = 80.34$, $p < 0.0001$) (Fig. 10A) and in males (One-way, $F_{(3,8)} = 58.89$, $p < 0.0001$) (Fig. 10B). In the open field test, the groups exposed to Fe (1 and 5 mM) increased the number of crossings in relation to the control group in female flies

(One-way ANOVA, $F_{(3,8)} = 29.79$, $p = 0.0001$) (Fig. 10C) and males (1 and 5 mM) (One-way, $F_{(3,8)} = 33.78$, $p < 0.0001$) (Fig. 10D).

The post hoc analysis showed an increase in the number of grooming episodes in female F1 flies compared to the control group (One-way ANOVA, $F_{(3,8)} = 22.00$, $p = 0.0003$) (Fig. 10E) and in males (One-way, $F_{(3,8)} = 14.69$, $p = 0.0013$) (Fig. 10F).

3.9. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitor flies) on acetylcholinesterase (AChE) activity and tyrosine hydroxylase (TH) activity of their F1

Female (One-way ANOVA, $F_{(3,8)} = 3.297$, $p = 0.0787$) and male (One-Way ANOVA, $F_{(3,8)} = 3.302$, $p = 0.0785$) F1 flies exposed to different concentrations of Fe during the embryonic period did not show any significant difference between groups in relation to the control group in AChE activity (Fig. 11A) and (Fig. 11B). There was an increase in TH activity after exposure to Fe during embryonic development (at concentrations of 1 and 5 mM) in females (One-Way ANOVA, $F_{(3,12)} = 20.27$, $p < 0.0001$, Fig. 11C) and males (One-Way ANOVA, $F_{(3,12)} = 11.40$, $p = 0.0008$) (Fig. 11D) compared to the control group.

4. Discussion

In the present study, we evaluated whether exposure to Fe overload during the embryonic period of *Drosophila melanogaster* would be related to changes in the neurodevelopment of its F1. It is known that during development, a greater supply of Fe is necessary, but when supplementation occurs in an exacerbated way or there is overexposure to environmental sources, the possible consequences caused by Fe overload are not well understood.

Initially, we evaluated Fe levels in female and male progenitors. We found that the increase in Fe levels in the progenitors is proportional to the concentration they were exposed to in the diet, since flies of all groups maintained the same food consumption pattern during the ten days of exposure. The Fe levels of the F1 flies were also directly proportional to what is incorporated by the offspring during their embryonic development period since the F1 flies, immediately after hatching, are removed to a food medium without Fe. The experimental tests were performed on F1 female and adult male flies separately to avoid the possible bias of experimental configuration concerning sex. However, F1 flies responded in the same way to experimental tests regardless of sex.

4. Discussion

Fe levels in the body are strictly controlled through well-adjusted complex mechanisms to prevent cytotoxicity induced by the accumulation of this metal and to allow physiologically tolerable Fe levels to serve as a critical catalytic component of many proteins enzymes (Cronin et al., 2019). As we can see in our results, overexposure to Fe (0.5, 1 and 5 mM) during the embryonic period did not cause an exacerbated formation of reactive species on the fly's head, regardless of sex. In fact, the results found in this work are different from previous studies that exposed adult flies to an overload of Fe in the diet and observed an associated increase in the production of free radicals with a subsequent reduction in TH activity and neuronal death mainly from dopaminergic neurons, leading to a manifestation of the symptoms of Parkinson's disease and low survival (Poetini et al., 2018; Kaushik et al., 2007).

Our results suggest that an overload of Fe during the embryonic developmental period of *Drosophila melanogaster* was able to modulate cerebral Fe metabolism and alter aminergic systems by raising brain levels of DA and 5-HT that play an essential role in controlling cognition, attention, are neuromodulators of motor behaviors and control the formation of memory and behavioral plasticity in the central nervous system (Raza and Su, 2019; Bacqué-Cazenave et al., 2020). OA is considered one of the main neurotransmitters and neurohormone of invertebrate species (Verlinden et al., 2010). However, OA showed no significant difference in its levels in relation to the control group and the groups exposed to Fe. This deregulation of DA and 5-HT can affect the memory of F1 flies since it is well described that 5-HT is necessary to form place memory and

performed on F1 female and adult male flies separately to avoid the possible bias of experimental configuration concerning sex. However, F1

flies responded in the same way to experimental tests regardless of sex.

Fe levels in the body are strictly controlled through well-adjusted complex mechanisms to prevent cytotoxicity induced by the accumulation of this metal and to allow physiologically tolerable Fe levels to serve as a critical catalytic component of many proteins enzymes (Cronin et al., 2019). As we can see in our results, overexposure to Fe (0.5, 1 and 5 mM) during the embryonic period did not cause an exacerbated formation of reactive species on the fly's head, regardless of sex. In fact, the results found in this work are different from previous studies that exposed adult flies to an overload of Fe in the diet and observed an associated increase in the production of free radicals with a subsequent reduction in TH activity and neuronal death mainly from dopaminergic neurons, leading to a manifestation of the symptoms of Parkinson's disease and low survival (Poetini et al., 2018; Kaushik et al., 2007).

Our results suggest that an overload of Fe during the embryonic developmental period of *Drosophila melanogaster* was able to modulate cerebral Fe metabolism and alter aminergic systems by raising brain levels of DA and 5-HT that play an essential role in controlling cognition, attention, are neuromodulators of motor behaviors and control the formation of memory and behavioral plasticity in the central nervous system (Raza and Su, 2019; Bacqué-Cazenave et al., 2020). OA is considered one of the main neurotransmitters and neurohormone of invertebrate species (Verlinden et al., 2010). However, OA showed no significant difference in its levels in relation to the control group and the groups exposed to Fe. This deregulation of DA and 5-HT can affect the memory of F1 flies since it is well described that 5-HT is necessary to form place memory and

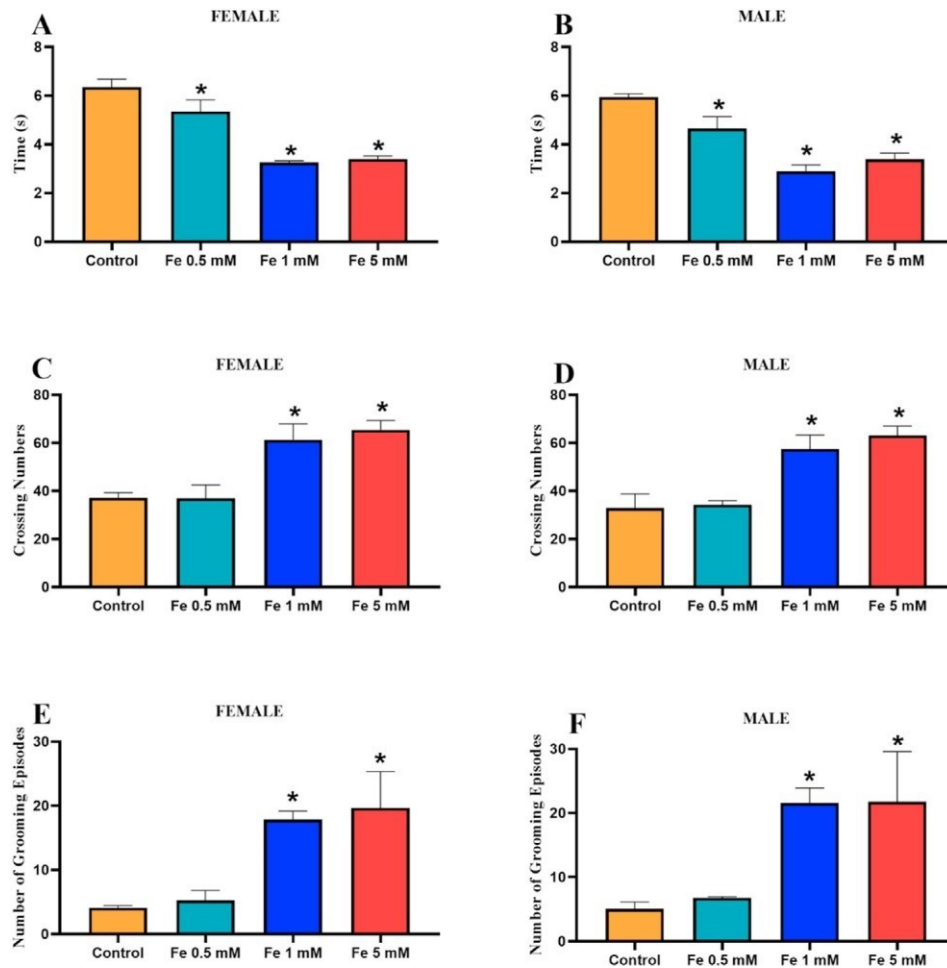


Fig. 10. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitors) on the negative geotaxis test in females (A) and males (B); open field test in females (C) and males (D); and the number of grooming episodes in females (E) and males (F) of F1 flies after their embryonic development in these different Fe concentrations. The data are represented as the mean SD. *Different from the control group ($p < 0.05$).

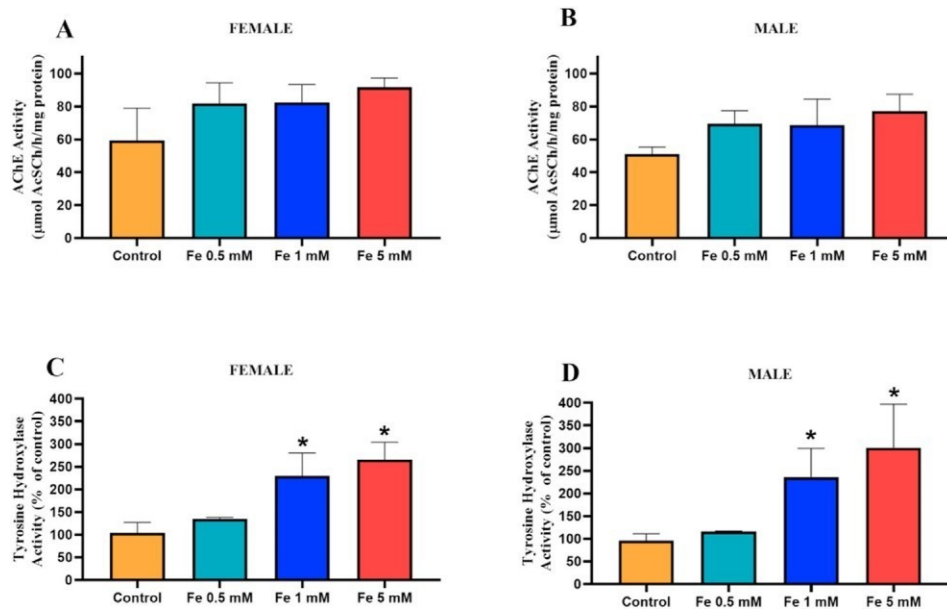


Fig. 11. Effect of Fe (0.5, 1 and 5 mM) exposure (female progenitors) on acetylcholinesterase (AChE) activity in females (A) and males (B); and tyrosine hydroxylase activity in females (C) and males (D) of F1 flies after their embryonic development in these different concentrations of Fe. The data are represented as the mean SD.

*Different from the control group ($p < 0.05$).

associative olfactory learning memory, and DA is necessary to mediate unconditional stimulation after a training phase of a fly (Monier et al., 2019).

We believe that high brain levels of DA and 5-HT found in our study are related to a positive modulation of Fe, producing an increase in the TH activity (a rate-limiting enzyme of catecholamine biosynthesis) since both F1 female and male flies demonstrated an increase in TH activity after exposure to Fe during embryonic development. It is known that Fe acts as a cofactor of TH and helps in the catalysis of TH, a limiting step in the rate of synthesis of these neurotransmitters (Kim and Wessling-Resnick, 2014). In contrast, the amino acid Trp, a 5-HT precursor, showed no difference in its levels when compared between groups.

We also observed that both female and male flies exposed to high concentrations of Fe during embryonic development showed significantly greater locomotor activity than female and male control, assessed by negative geotaxis and open field tests. This altered behavior was pointed out by Ternes et al. (2014) as a hyperactive behavior of flies exposed to manganese, probably due to the accumulation of this metal in dopaminergic neurons, a fact well described for contributing to the etiology of ADHD. Our groups exposed to Fe 1 and 5 mM concentrations, both sexes showed changes in grooming behaviors and had an increase in aggressive behavior. It is described that this repetitive behavior observed in the grooming test can be seen as a stereotyped behavior similar to that observed in individuals with autism-like, as measured by Kaur et al. (2015) when exposing flies during the embryonic period to Bisphenol-A. It is important to note that these behavioral changes reported above are not related to cholinergic neurotransmission changes since AChE has not been shown to have its activity compromised during exposure to high concentrations of Fe.

Therefore, these behavioral changes presented in our work as an increase in hyperactive, aggressive, anxiogenic like behaviors may reflect a regulation in Fe metabolism due to this overload, reinforcing the hypothesis that it modulates the cascades of enzyme signaling, causing an increase in the synthesis of biogenic amines mainly DA and 5-HT during the embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. Kaushik et al. (2007) reported that neurobehavioral disorders, including schizophrenia, bipolar disorder, attention deficit disorder, and ADHD are due to imbalances or excessive DA levels.

The *Drosophila* ovary offers unique opportunities to study cell death (Pritchett et al., 2009). We observed a promotion of damage in female progenitor flies' reproductive system submitted to feeding with Fe 5mM, causing a reduction in cell viability and possible cell damage in the ovarian tissue. In their work, Pritchett et al. (2009) point out that the death of *Drosophila* ovarian cells can occur at different stages and in response to various stimuli, including chemical exposure or development insults, such as the availability of nutrients, which can cause damagespecifically in the middle of oogenesis. This reprotoxicity caused may be related to the delay in hatching and a reduction in the number of F1 flies hatched in the group exposed to the highest Fe 5mM. Although the concentration of Fe 5mM caused damage to the progenitors' ovarian tissue and reduced the number of hatches of F1 flies, the remaining flies hatched from this concentration did not show different results concerning behavioral and biochemical tests of F1 flies exposed to 1mM, for example.

As we can see, exposure to high levels of Fe during the embryonic development of *Drosophila melanogaster* can modulate the phenotype of F1 flies regardless of sex. Considering the homology present between humans and *Drosophila* related to dietary exposure of progenitors female during embryogenesis and the differences related to the development of the embryo being external to the progenitor body in flies, we can make two important observations based on our results: 1) the progenitor's exposure to Fe overload (Fe 5mM) seems to influence the number of offspring generated, while; 2) the development of F1 flies (egg, larva and pupa) in the medium with Fe overload seems to influence the behavioral and biochemical changes observed in F1 flies when they reach adult

stage. However, more research is needed to better understand how excess Fe in the diet can harm neurodevelopment.

In conclusion, exposure to high Fe levels during embryonic development produced aggressive, anxiety-like and hyperactive-like behaviors in both sexes by F1 flies. These behaviors are associated with a dysregulation in DA and 5-HT levels since Fe is a cofactor of TH, which had its activity increased in this study. Our results make us reflect on the exacerbated Fe supplementation during the embryonic period and the possible alterations on F1 flies.

Sample credit author statement

Márcia Rósula Poetini: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing, Writing - original draft, Visualization. Stifani Machado Araujo: Methodology, Conceptualization, Resources, Writing - original draft, - Review & Editing, Visualization, Supervision. Elize Aparecida Santos Musachio: Methodology, Conceptualization, Resources. Francielli Polet Almeida: Methodology, Conducting behavioral analyses. Vandrezza Cardoso Bor-tolotto: Methodology, Statistical analysis. Dieniffer Espinosa Janner: Conducting behavioral analyses. Franciane Cabral Pinheiro: Methodology. Bruna Piaia Ramborger and Rafael Roehrs: Dosage biogenic amine levels and aid in statistical analysis. Diogo La Rosa Novo and Márcia Foster Mesko: Performed the measurement of iron levels and Methodology. Gustavo Petri Guerra: Supervision, Resources. Marina Prigol: Funding acquisition, Project administration, Supervision, Resources, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing for financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (307099/2017-2), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (PQG 19/2551-0001913-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financial Code 001, for the support and research grants provided.

References

- Araujo, S.M., Poetini, M.R., Bortolotto, V.C., de Freitas Couto, S., Pinheiro, F.C., Meichtry, L.B., et al., 2018. Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Brain Res.* 351, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.016>.
- Babot, Z., Cristófol, R., Suñol, C., 2005. Excitotoxic death induced by releases glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur. J. Neurosci.* 21 (1), 103–112.
- Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., et al., 2020. Serotonin in animal cognition and behavior. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (5), 1649. <https://doi.org/10.3390/ijms21051649>.
- Barin, J.S., Pereira, J.S., Mello, P.A., Knorr, C.L., Moraes, D.P., Mesko, M.F., Nobrega, J.A., Korn, M.G., Flores, E.M., 2012. Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. *Talanta* 94, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.048>.
- Bianchini, M.C., Gularate, C.O.A., Nogara, P.A., Krum, B.N., Gayer, M.C., Bridi, J.C., et al., 2019. Thimerosal inhibits *Drosophila melanogaster* tyrosine hydroxylase (Dm TyrH) leading to changes in dopamine levels and impaired motor behavior: implications for neurotoxicity. *Metallomics* 11 (2), 362–374. <https://doi.org/10.1039/c8mt00268a>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.027>.
- Connolly, K., 1966. Locomotor activity in *Drosophila*: II. Selection for active and inactive strains. *Anim. Behav.* 14 (4), 444–449. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(66\)80043-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(66)80043-X).

- Cronin, S.J.F., Woolf, C.J., Weiss, G., Penninger, J.M., 2019. The role of iron regulation in immunometabolism and immune-related disease. *Front. Mol. Biosci.* 6, 116. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00116>.
- Couto, S.F., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., Poetini, M.R., Pinheiro, F.C., Musachio, E.A.S., Meichtry, L.B., Sacramento, M., Alves, D., Novo, D. La R., Mesko, M.F., Prigol, M., 2019. 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline prevents dopamine depletion in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's-like disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.10.015>.
- de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Caldana, F., Grazziotin, M.M., Scalco, F.S., et al., 2007. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.002>.
- Edwards, A.C., Rollmann, S.M., Morgan, T.J., Mackay, T.F.C., 2006. Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2, 1386–1395. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020154>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Giurfa, M., Pflüger, Hans-Joachim, 2019. The contribution of invertebrates to the understanding of the vertebrate nervous system, its mechanisms, functions and pathological dysfunctions. Available in: <https://www.braincouncil.eu/wp-content/uploads/2020/01/Position-Paper-Invertebrates-24.09.2019.pdf>. Access date access date November 15th, 2020.
- Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior-A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav. Brain Res.* 284, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.001>.
- Kaushik, P., Gorin, F., Vali, S., 2007. Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis. *J. Comput. Neurosci.* 22 (2), 147–160. <https://doi.org/10.1007/s10827-006-0004-8>.
- Kim, J., Wessling-Resnick, M., 2014. Iron and mechanisms of emotional behavior. *J. Nutr. Biochem.* 25 (11), 1101–1107. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.07.003>.
- Lushchak, O.V., Rovenko, B.M., Gospodaryov, D.V., Lushchak, V.I., 2011. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 160, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.04.019.013>.
- Maaroufi, K., Ammari, M., Jeljeli, M., Roy, V., Sakly, M., et al., 2009. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by Feus sulfate. *Physiol. Behav.* 96, 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.10.019>.
- Mandilaras, K., Pathmanathan, T., Missirlis, F., 2013. Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients* 5, 1622–1647. <https://doi.org/10.3390/nu5051622>.
- Meder, D., Herz, D.M., Rowe, J.B., Lehericy, S., Siebner, H.R., 2019. The role of dopamine in the brain-lessons learned from Parkinson's disease. *Neuroimage* 15 (190), 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.11.021>.
- Monier, M., Nöbel, S., Danchin, E., Isabel, G., 2019. Dopamine and serotonin are both required for mate-copying in *Drosophila melanogaster*. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 334. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00334>.
- Musachio, E.A.S., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., de Freitas Couto, S., Dahleh, M.M.M., Poetini, M.R., et al., 2020. Bisphenol A exposure is involved in the development of Parkinson like disease in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 137, 111128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111128>.
- Nascimento, J.C. do, et al., 2002. Genetic components affecting embryonic developmental time of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.* v. 25 (2), 157–160. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000200008>.
- Pérez-Severiano, F., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Ríos, C., Segovia, J., 2004. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem. Res.* 29 (4), 729–733. <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000018843.83770.4b>.
- Pritchett, T.L., Tanner, E.A., McCall, K., 2009. Cracking open cell death in the *Drosophila* ovary. *Apoptosis* 14 (8), 969–979. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0369-z>.
- Poetini, M.R., Araujo, S.M., de Paula, M.T., Bortolotto, V.C., Meichtry, L.B., de Almeida, F.P., et al., 2018. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. *Chem. Biol. Interact.* 279, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.018>.
- Puig, M.V., Rose, J., Schmidt, R., Freund, N., 2014. Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents, and birds. *Front. Neural Circ.* 8, 93. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00093>.
- Rao, R., Georgieff, M.K., 2007. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12 (1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.10.007>.
- Raza, M.F., Su, S., 2019. Differential roles for dopamine D1-like and D2-like receptors in learning and behavior of honeybee and other insects-. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 18 (1), 1317–1327. https://doi.org/10.15666/aeer/1801_13171327.
- Silva, N.C., Poetini, M.R., Bianchini, M.C., Almeida, F.P., Dahle, M.M.M., Araujo, S.M., Bortolotto, V.C., Musachio, E.A.S., Ramborger, B.P., Novo, D. La R., Roehrs, R., Mesko, M.F., Prigol, M., Puntel, R.L., 2021. Protective effect of gamma-oryzanol against manganese-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11848-z>.
- Shin, M., Copeland, J.M., Venton, B.J., 2018. *Drosophila* as a model system for neurotransmitter measurements. *ACS Chem. Neurosci.* 9 (8), 1872–1883. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00456>.
- Tang, X., Zhou, B., 2013. Iron homeostasis in insects: insights from *Drosophila* studies. *IUBMB Life* 65 (10), 863–872. <https://doi.org/10.1002/iub.1211>.
- Tauber, J.M., Vanlandingham, P.A., Zhang, B., 2011. Elevated levels of the vesicular monoamine transporter and a novel repetitive behavior in the *Drosophila* model of fragile X syndrome. *PLoS One* 6 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027100>.
- Ternes, A.P.L., Zemolin, A.P., da Cruz, L.C., da Silva, G.F., Sidelles, A.P.F., de Paula, M.T., et al., 2014. *Drosophila melanogaster*-an embryonic model for studying behavioral and biochemical effects of manganese exposure. *EXCLI J.* 13, 1239. <https://doi.org/10.17877/DE290R-7402>.
- Verlinden, H., Vleugels, R., Marchal, E., Badisco, L., Pflüger, H.J., Blenau, W., Broeck, J.V., 2010. The role of octopamine in locusts and other arthropods. *J. Insect Physiol.* 56 (8), 854–867. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.018>.
- Vermeer, L.M., Higgins, C.A., Roman, D.L., Doorn, J.A., 2013. Real-time monitoring of tyrosine hydroxylase activity using a plate reader assay. *Anal. Biochem.* 432 (1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.09.005>.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J.P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M.B., Gilbert, L.I., 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11043–11048. <https://doi.org/10.1073/pnas.162375799>.
- Youdim, M.B.H., Manfred, Gerlach, M., Peder Riederer, P., 2009. In: Yehuda, S., Mostofsky, D. (Eds.), *Iron Deficiency and Overload. Nutrition and Health.* Humana Press, Totowa, NJ.

4. DISCUSSÃO

Nesta tese, nosso objetivo foi avaliar se a exposição à sobrecarga de Fe durante os períodos adulto e embrionário de *Drosophila melanogaster* está relacionada a alterações neurodegenerativas em adultos e neurodesenvolvimentais da prole (F1), bem como os efeitos terapêuticos da Hsd frente as possíveis alterações neurodegenerativas nas moscas. Os dados obtidos a partir disso, foram dispostos em 2 trabalhos: o manuscrito que trata da exposição à sobrecarga de Fe durante o período adulto de *Drosophila melanogaster* e sua relação a alterações neurodegenerativas, bem como os efeitos terapêuticos da Hsd frente as possíveis alterações neurodegenerativas. E o artigo que trata de verificar se a exposição à sobrecarga de Fe durante o período embrionário de *Drosophila melanogaster* está relacionada a alterações neurodesenvolvimentais da prole (F1). Abaixo apresentamos a discussão integrada dos 2 trabalhos.

Os resultados do manuscrito demonstram que a exposição ao Fe em *Drosophila melanogaster* adultas levou a um aumento nos níveis deste metal no cérebro. Considerando que o aumento dos níveis de Fe no cérebro está relacionado ao desenvolvimento a doenças neurodegenerativas como a DP (HARE e DOUBLE, 2016) e o modelo de mosca é eficiente para investigar alterações não motoras (JULIENNE et al., 2017). Nesse sentido, as alterações não motoras podem servir de base para pesquisas relacionadas à busca de novas alternativas farmacológicas que melhorem a qualidade de vida e a longevidade dos pacientes com doenças neurodegenerativas. A Hsd diminuiu os níveis de Fe na cabeça, mas não no corpo das moscas. Este resultado pode ser devido a Hsd apresentar uma biodisponibilidade diferente em diferentes segmentos intestinais e são parcialmente absorvidos por tecidos intestinais na forma de metabólitos como sulfatos de Hsd que podem ser absorvidos no duodeno e íleo, metabólitos de desglicosilação poderiam ser absorvidos no ceco e ácidos fenólicos poderiam ser absorvidos no íleo, cecos e cólon em camundongos (GUO et al., 2020). Hsd ou hesperitina são suscetíveis á metilação e desmetilação durante o processo de transporte da membrana intestinal, no entanto a Hsd pode entrar na corrente sanguínea circulante em suas formas conjugadas de hesperitina, homoeriodictil ou eridictilol (NECTOUX et al., 2019).

O presente estudo a exposição crônica ao Fe reduziu significativamente a expectativa de vida e a locomoção. No entanto, uma das alternativas de tratamento

são compostos antioxidantes, entre esses antioxidantes naturais incluem a Hsd, uma flavanona encontrada principalmente em frutas cítricas, que podem aumentar a sobrevivência desses pacientes e minimizar os efeitos causados pelo excesso de Fe no organismo. A Hsd (10 μ M) protegeu as moscas do aumento da mortalidade e aumentou a atividade locomotora na exposição crônica ao Fe, demonstrando ser uma alternativa promissora nas doenças causadas pelo aumento do Fe no organismo. Nesse sentido, vários estudos realizados em diferentes modelos animais descrevem a ação neuroprotetora da Hsd relacionada ao aumento da taxa de longevidade, preservação do estado redox, níveis dopaminérgicos e atividade locomotora (POETINI et al., 2018; ANTUNES et al., 2014; 2016; ROOHBAKHSH et al., 2014; CENGIZ et al., 2012).

Nossos resultados estão de acordo com estudos que mostram que o acúmulo de Fe no cérebro está relacionado a danos aos neurônios dopaminérgicos e ao aumento do estresse oxidativo pela reação de Fenton, danificando proteínas de membrana e fosfolipídios (DIAS e MOURADIAN, 2013). Um resultado importante e central de nosso estudo é que observamos um aumento do nível de Fe em moscas, relacionado à capacidade do Fe de se acumular como resultado da exposição crônica, o que explicaria esse resultado. Hsd em nosso estudo aumentou os níveis de DA em relação ao grupo Fe. Antunes (2021) demonstrou em seu estudo que a suplementação oral de Hsd (50 mg/Kg) por 28 dias promoveu efeitos neuroprotetores contra disfunções motoras, cognitivas e olfativas induzidas por 6-OHDA. Assim como, atenuou o déficit nos neurônios dopaminérgicos e aumentou os níveis de DA pela atenuação de disfunção mitocondrial e marcadores de apoptose no estriado de camundongos.

A exposição ao Fe reduziu os níveis dos neurotransmissores DA e OA, onde os níveis diminuídos de DA são facilmente encontrados em doenças neurodegenerativas como a DP. Assim, observamos que os compostos quelantes de Fe podem ser uma terapia-alvo eficaz em doenças neurodegenerativas induzidas por sobrecarga de Fe porque melhoram os sintomas característicos, como em doenças neurológicas (VISWANATH et al., 2001). Os quelantes se ligam ao Fe e removem o excesso que circula no corpo e esse mesmo mecanismo também ocorre no cérebro (BAGWE-PARABI e KAUR, 2019). Além disso, junto com o quelante, também é interessante investigar moléculas com ação antioxidante para proteger os neurônios dopaminérgicos dos danos causados pelo estresse oxidativo,

sugerindo um potencial tratamento para DP.

Nessa visão, diversas terapias tratam os danos causados pelo excesso de Fe no SN decorrentes da exposição crônica a esse metal, porém ainda são escassos os compostos terapêuticos que atuam na prevenção do acúmulo de Fe e conseqüentemente na patogênese da DP. Nesse sentido, destacamos o efeito preventivo da Hsd nas alterações parkinsonianas induzidas pela exposição crônica ao Fe em *Drosophila melanogaster*. A Hsd atenuou esse aumento dos níveis de Fe na cabeça das moscas, apresentando efeito neuroprotetor, devido à diminuição dos níveis de Fe na cabeça. Acredita-se que a ação quelante da Hsd ocorra por meio dos grupos hidroxilas presentes em sua estrutura, aumentando sua excreção e conseqüentemente diminuindo o acúmulo de Fe nos tecidos (PARI et al., 2015).

A capacidade do metal de formar complexos com certos compostos é um fenômeno bem conhecido que tem ganhado cada vez mais interesse nos últimos anos (RONCONI e SADLER, 2007). Complexos de certas drogas podem melhorar suas propriedades físico-químicas e farmacológicas ou, em alguns casos, diminuir seus potenciais efeitos colaterais (SANCHES et al., 1994). Compostos como flavonoides e fenólicos são conhecidos por formar complexos de quelato com vários íons metálicos (PEREIRA et al., 2007).

Com base na estrutura da Hsd e estudos anteriores com flavonoides, a coordenação da Hsd com íons metálicos ocorre provavelmente através do grupo carbonil na posição 4 e do grupo hidroxílico aromático na posição 5 (TAN et al., 2009). No entanto, para que ocorra uma forte formação complexa, o hidroxil aromático deve adquirir uma carga negativa (ionizada). Como o valor esperado para o grupo hidroxil fenólico é de cerca de 10, então o pH da solução deve estar acima de 10 para permitir a ionização significativa, sendo assim a Hsd não formará complexos com íons metálicos em pH fisiológico (solvente aquoso e valor de pH quase neutro) (ZHANG et al., 2007; DAOUG et al., 2014).

No estudo de ABOLAJI (2017) demonstrou que o flavonoide cítrico Hsd (400 mg/10 g) apresentou potencial antioxidante, sendo possivelmente atribuído à sua estrutura fenólica única, capaz de doar um elétron ou próton aos radicais livres, atuando como elemento chave do equilíbrio redox em sistemas biológicos. Assim, uma possível explicação é que a Hsd apresenta atividade antioxidante e quelante de metais, provavelmente por inativar os radicais livres, atenuando a depleção dos níveis dopaminérgicos e diminuindo os níveis de EROs e peroxidação lipídica

(ABOLAJI et al., 2017).

No presente estudo a exposição ao Fe diminuiu os parâmetros comportamentais não motores avaliados pelo comportamento (fototaxia aversiva) o qual avalia a memória e motor avaliados pelo teste de equilíbrio. Assim como, aumentou os episódios de limpeza e eventos agressivos. Essas alterações comportamentais em nosso estudo foram atenuadas pelo composto Hsd. Antunes (2020) demonstrou em seu estudo que a Hsd (50 mg/Kg) amenizou os comportamentos relacionados à ansiedade e depressivos induzidos por 6-OHDA em camundongos.

No artigo demonstramos que a exposição ao Fe nos progenitores pode causar alterações comportamentais na prole (F1). Embora os níveis de Fe sejam controlados por meio de mecanismos complexos, onde são ajustados com o objetivo de evitar a toxicidade, possíveis alterações no metabolismo do Fe podem ocorrer, sendo importante uma investigação a fim de se estudar o efeito da exposição de Fe em adultos (POETINI et al., 2018) e na prole (POETINI et al., 2021), principalmente o seu excesso em *Drosophila melanogaster*.

Nosso estudo demonstrou que a exposição das fêmeas progenitoras ao Fe na dieta na concentração de Fe 5 mM causou danos no sistema reprodutivo das moscas. Assim, nossos resultados sugerem que o Fe 5 mM reduziu a viabilidade celular, levando com isso a um dano no tecido ovariano. Esse resultado foi importante no nosso estudo pois não se encontra muitos estudos sobre a avaliação dos níveis de Fe na reprodução, onde na concentração de Fe 5 mM ocorreu um atraso na eclosão e reduziu o número de moscas eclodidas F1. Fato este que na concentração de 5 mM causou reprotoxicidade nas moscas. No entanto, as demais concentrações de Fe (0,5 e 1 mM) não foram encontradas uma redução no número de eclosão das moscas, o que pode ser verificado através da viabilidade do tecido ovariano, onde nas concentrações de Fe (0,5 e 1 mM) não ocorreu diferença significativa em relação ao grupo controle.

Modelos com a *Drosophila* são importantes para o estudo reprodutivo, onde a morte de células ovarianas pode ocorrer em diferentes estágios e em resposta a vários estímulos, incluindo exposição química ou agressões de desenvolvimento, como a disponibilidade de nutrientes na dieta, fatores estes que podem causar danos no meio da oogênese (PRITCHETT et al., 2009). Avaliando os resultados deste estudo podemos fazer duas observações importantes, primeiro que a exposição do progenitor à sobrecarga de Fe (Fe 5 mM) parece influenciar o número de

descendentes gerados e em segundo lugar que o desenvolvimento das moscas F1 (ovo, larva e pupa) no meio com sobrecarga de Fe parece influenciar as mudanças comportamentais e bioquímicas observadas nas moscas F1 ao atingirem a fase adulta.

A sobrecarga de Fe durante o período de desenvolvimento embrionário aumentou os níveis de Fe nas moscas recém eclodidas (F1), essa exposição alterou os sistemas aminérgicos aumentando os níveis cerebrais de DA e 5-HT (POETINI et al., 2021), onde as monoaminas desempenham um papel essencial no controle da cognição, atenção e são neuromoduladores dos comportamentos motores, controle da formação da memória e da plasticidade comportamental no SNC (RAZA e SU, 2019; BACQUÉ-CAZENAVE et al., 2020).

Em nosso estudo demonstramos que elevados níveis cerebrais de DA e 5-HT estão relacionados a uma modulação positiva dessa sobrecarga de Fe, causando um aumento na atividade da enzima TH, uma vez que o Fe atua como um cofator do TH e auxilia na catálise de TH, uma etapa limitante na taxa de síntese desses neurotransmissores (KIM e WESSLING-RESNICK, 2014; POETINI et al., 2021). A enzima TH requer Fe ferroso para a atividade, ou seja, a forma ferrosa é a espécie ativa, onde se liga aos substratos e passa pelo ciclo catalítico, terminando ainda na forma ferrosa. No entanto, a forma férrica do Fe pode reagir com um catecol como DOPA ou DA, formando um complexo inativo, onde a reativação do complexo requer a fosforilação da enzima (RAMSEY, HILLAS e FITZPATRICK, 1996), onde um aumento de sulfato ferroso (10 μ M) resultaria em um aumento de dez vezes a atividade da enzima (FITZPATRICK, 1989).

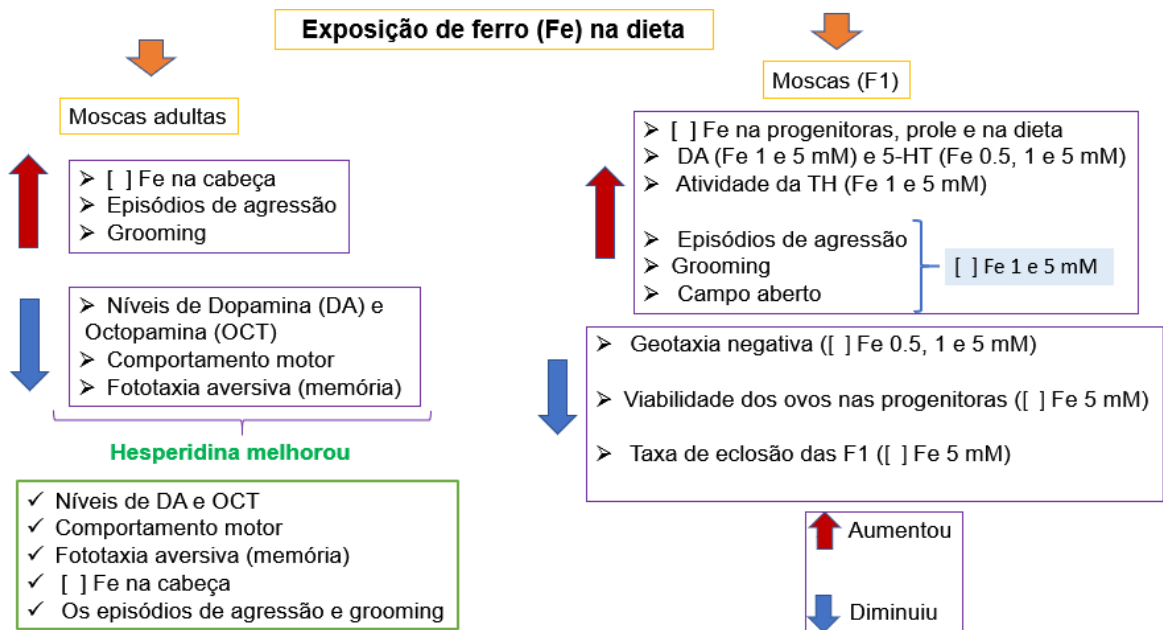
A exposição a altos níveis de Fe durante o período de desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster* está associada com resultados desfavoráveis em sua prole, onde o excesso de Fe pode levar a um comportamento tipo hiperativo semelhante a etiologia do transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) nas moscas (POETINI et al., 2021), assim como a exposição ao Mn no desenvolvimento embrionário aumentou a atividade locomotora das moscas (TERNES et al., 2014). No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor como o excesso de Fe pode prejudicar o desenvolvimento neural e como suplementar o Fe para atender às características individuais de cada mulher, evitando assim a super exposição ao excesso de Fe durante a gravidez (IGLESIAS et al., 2018).

Demonstramos em nosso estudo que a exposição materna a elevados níveis de Fe pode causar distúrbios de neurodesenvolvimento na prole, semelhantes aos encontrados em TDAH. Entre os principais distúrbios que afetam o SNC, os mais comuns são o TEA e o TDAH, onde são afetadas muitas características das funções biológicas controladas pelo cérebro; em particular, alterações nas funções executivas sensoriais, motoras, aprendizagem, memória, emoção, ansiedade e habilidade social (THAPAR , COPPER , RUTTER, 2017). O aumento da prevalência desses TND estão associados a fatores etiológicos e de risco como a exposição a fatores ambientais como a exposição ao Fe, durante o desenvolvimento fetal e infantil.

O fato de o organismo humano não possuir mecanismos de excreção do Fe é preocupante e por isso a importância de se monitorar a regulação homeostática do Fe. Mulheres são aconselhadas a fazer uso de 30-60 mg de Fe diariamente a partir da primeira visita pré-natal, no entanto, muitas vezes sem a necessidade pois seus níveis de Fe estão dentro da normalidade (BREYMANN, 2015). SANGKHAE (2020) demonstrou em seu estudo com camundongos fêmeas que as adaptações homeostáticas maternas durante a gravidez incluem a supressão do hormônio regulador de Fe hepcidina, fato este que promoveria a rápida absorção de suplementos de Fe, expondo potencialmente as gestantes ao excesso de Fe. No entanto, o excesso de Fe fetal em humanos pode ter consequências e efeitos adversos sobre o crescimento, risco de infecções, cognição e no desenvolvimento cerebral (DOMELLÖF, 2010).

Nosso estudo sugere que a exposição ao Fe durante o período embrionário causou comportamentos tipo hiperativo e de ansiedade na prole (F1) e em moscas adultas causou alterações consistentes com doenças neurodegenerativas, conforme demonstrado no fluxograma abaixo (figura 8).

Figura 8 – Fluxograma esquemático mostrando os principais resultados deste trabalho



5. Considerações finais

O presente estudo investigou o efeito da sobrecarga de Fe durante os períodos adulto e embrionário de *Drosophila melanogaster* onde:

Em moscas adultas a exposição ao Fe aumentou os níveis na cabeça, onde esse aumento desencadeou em mortalidade e levou a alterações locomotoras (motor e não motor) e monoaminérgicas em *Drosophila melanogaster*. Assim como, aumentou os episódios de limpeza, eventos agressivos e de ansiedade e diminui o equilíbrio e a memória. A exposição ao Fe também causou uma diminuição na longevidade das moscas e nos níveis dopaminérgicos e octopaminérgicos, onde essas alterações podem ser encontradas em doenças neurodegenerativas. Nossos resultados sugerem que estas alterações podem ser atenuadas pela exposição ao composto Hsd e L-dopa. No entanto, os efeitos do composto Hsd superiores a L-dopa que é padrão ouro.

A sobrecarga de Fe nas moscas progenitoras levou a uma reprotoxicidade na maior concentração avaliada neste estudo (5 mM), onde ocorreu uma diminuição na viabilidade do tecido ovariano. Assim como, a exposição de Fe na dieta das moscas levou a uma redução na eclosão das moscas na concentração de 5mM.

Na prole (F1) a exposição ao Fe no período embrionário elevou a atividade locomotora, onde foi demonstrado através dos comportamentos tipo agressivo, de limpeza e exploratório, o que pode sugerir que o Fe possa estar envolvido em transtornos como hiperatividade, desatenção e ansiedade. Assim como, a exposição ao Fe no período embrionário aumentou os níveis das monoaminas (DA e 5-HT), assim como elevou a atividade da tirosina hidroxilase, fato este que se deve ao aumento nos níveis corporais de Fe nas moscas.

6. Referências

- ABOLAJI, A. O., BABALOLA, O. V., ADEGOKE, A. K., FAROMBI, E. O. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, alleviates trichloroethylene-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 55, p.202-207, 2017.
- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P. G., SCHEELER, F. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- ADEFEGHA, S. A., ROSA LEAL, D. B., OLABIYI, A. A., OBOH, G., CASTILHOS, L. G. Hesperidin attenuates inflammation and oxidative damage in pleural exudates and liver of rat model of pleurisy. **Redox Report**, v. 22, n. 6, p. 563-571, 2017.
- ALLOCCA, M.; ZOLA, S.; BELLOSTA, P. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: the making of a model (Part I). **Drosophila melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. Rijeka, Croatia: InTech**, p. 113-130, 2018.
- ANDERSON, R. A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmanimals. **Biotechnology in the feed industry**, p. 267-274, 1994.
- ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.
- ANDERSON, G. J., FRAZER, D. M. Current understanding of iron homeostasis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, n. suppl_6, p. 1559S-1566S, 2017.
- ANTUNES, M. S., LADD, F. V. L., LADD, A. A. B. L., MOREIRA, A. L., BOEIRA, S. P., SOUZA, L. C. Hesperidin protects against behavioral alterations and loss of dopaminergic neurons in 6-OHDA-lesioned mice: the role of mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 1, p. 153-167, 2021.
- ANTUNES, M. S., GOES, A. T., BOEIRA, S. P., PRIGOL, M., JESSE, C. R. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1415-1422, 2014.
- ANTUNES, M. S., CATTELAN SOUZA, L., LADD, F. V. L., LADD, A. A. B. L., MOREIRA, A. L., BORTOLOTTI, V. C., SILVA, M.R.P., ARAUJO, M. A., PRIGOL, M., NOGUEIRA, C. W., BOEIRA, S. P. Hesperidin ameliorates anxiety-depressive-like behavior in 6-OHDA model of Parkinson's disease by regulating striatal cytokine and neurotrophic factors levels and dopaminergic innervation loss in the striatum of mice. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 3027-3041, 2020.
- AXELROD, J.; SAAVEDRA, J. M. Octopamine. **Nature**, v. 265, n. 5594, p. 501-504, 1977.
- BACON, B. R., POWELL, L. W., ADAMS, P. C., KRESINA, T. F., HOOFNAGLE, J. H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 193-207, 1999.

BADIN, R. A., BINLEY, K., VAN CAMP, N., JAN, C., GOURLAY, J., ROBERT, C., HANTRAYE, P. Gene Therapy for Parkinson's Disease: Preclinical Evaluation of Optimally Configured TH: CH1 Fusion for Maximal Dopamine Synthesis. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 14, p. 206-216, 2019.

BAGWE-PARAB, S.; KAUR, G. Molecular targets and therapeutic interventions for iron induced neurodegeneration. **Brain research bulletin**, v. 156, p. 1-9, 2020.

BARANWAL, A. K.; SINGHI, S. C. Acute iron poisoning: management guidelines. **Indian pediatrics**, v. 40, n. 6, p. 534-540, 2003.

BARTZOKIS, G., SULTZER, D., CUMMINGS, J., HOLT, L. E., HANCE, D. B., HENDERSON, V. W., MINTZ, J. In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging. **Archives of general psychiatry**, v. 57, n. 1, p. 47-53, 2000.

BEARD, J. L.; CONNOR, J. R.; JONES, B. C. Iron in the brain. **Nutrition reviews**, v. 51, n. 6, p. 157-170, 1993.

BEGUM, N. N., MIAH, M. F., SHIPA, S. A., RANA, M. M., TANIA, T. K., IQBAL, A. Effects of dietary iron on phenotypic characteristics of fruit fly (*Drosophila melanogaster*). 2018.

BEITOLLAHI, H.; SAFAEI, M.; TAJIK, S. Different electrochemical sensors for determination of dopamine as neurotransmitter in mixed and clinical samples: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 6, n. 1, p. 81-96, 2019.

BIEDERMAN, J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1215-1220, 2005.

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

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

BORUE, X., COOPER, S., HIRSH, J., CONDRON, B., VENTON, B. J. Quantitative evaluation of serotonin release and clearance in *Drosophila*. **Journal of neuroscience methods**, v. 179, n. 2, p. 300-308, 2009.

BOWMAN, A. B., KWAKYE, G. F., HERNÁNDEZ, E. H., ASCHNER, M. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 25, n. 4, p. 191-203, 2011.

BREYMAN, C. Iron deficiency anemia in pregnancy. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, p. 339-347, 2015.

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

BURBULLA, L. F., SONG, P., MAZZULLI, J. R., ZAMPESE, E., WONG, Y. C., JEON, S., KRAINC, D. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. **Science**, v. 357, n. 6357, p. 1255-1261, 2017.

CAO, J. Y., DIXON, S. J. Mechanisms of ferroptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 2195-2209, 2016.

CALAP-QUINTANA, P., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J., SEBASTIÁ-ORTEGA, N., LLORENS, J. V., MOLTÓ, M. D. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1456, 2017.

CAMIOLO, G., TIBULLO, D., GIALLONGO, C., ROMANO, A., PARRINELLO, N. L., MUSUMECI, G., PALUMBO, G. A. α -Lipoic Acid Reduces Iron-induced Toxicity and Oxidative Stress in a Model of Iron Overload. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 609, 2019.

CAROCCI, A., CATALANO, A., SINICROPI, M. S., GENCHI, G. Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron. **Biometals**, v. 31, n. 5, p. 715-735, 2018.

CENGIZ, A., TABAK, S., KURU, S., DEMIREL, A. H., BARLAS, A. M., ALTUN, T., KILICOGLU, B. Effects of diosmine-hesperidine on experimental colonic anastomosis. **Bratislavske lekarske listy**, v. 113, n. 12, p. 692-697, 2012.

CHANG, Yan-Zhong (Ed.). **Brain Iron Metabolism and CNS Diseases**. Springer, 2019.

CHEN, P., TOTTEN, M., ZHANG, Z., BUCINCA, H., ERIKSON, K., SANTAMARÍA, A., ASCHNER, M. Iron and manganese-related CNS toxicity: Mechanisms, diagnosis and treatment. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 243-260, 2019.

CLARIDGE-CHANG, A., ROORDA, R. D., VRONTOU, E., SJULSON, L., LI, H., HIRSH, J., MIESENBOCK, G. Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 405-415, 2009.

CLARK, C. T.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v.210, n. 1, p. 139-148, 1954.

CONNOR, S. L., GUSTAFSON, J. R., SEXTON, G., BECKER, N., ARTAUD-WILD, S., CONNOR, W. E. The Diet Habit Survey: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 92, n. 1, p. 41-47, 1992.

COOKSON, M. R. Parkinson's disease. In: **Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders**. Academic Press, 2017. p. 157-174.

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

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, p. 1-36, 1965.

DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1-12, 2011.

DAVIES, P.; MOUALLA, D.; BROWN, D. R. Alpha-synuclein is a cellular ferri-reductase. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e15814, 2011.

DE LAU, L. M., VERBAAN, D., MARINUS, J., VAN HILTEN, J. J. Survival in Parkinson's disease. Relation with motor and non-motor features. **Parkinsonism & related disorders**, v. 20, n. 6, p. 613-616, 2014.

DEVOS, D., MOREAU, C., DEVEDJIAN, J. C., KLUZA, J., PETRAULT, M., LALOUX, C., BORDET, R. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 2, p. 195-210, 2014.

DEXTER, D. T., CARAYON, A., JAVOY-AGID, F., AGID, Y., WELLS, F. R., DANIEL, S. E., MARSDEN, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain**, v. 114, n. 4, p. 1953-1975, 1991.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013.

DIXON, S. J., LEMBERG, K. M., LAMPRECHT, M. R., SKOUTA, R., ZAITSEV, E. M., GLEASON, C. E., STOCKWELL, B. R. Feptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DIXON, S. J. Ferroptosis: bug or feature?. **Immunological reviews**, v. 277, n. 1, p. 150-157, 2017.

DO VAN, B., GOUEL, F., JONNEAUX, A., TIMMERMAN, K., GELÉ, P., PÉTRAULT, M., DEVEDJIAN, J. C. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. **Neurobiology of disease**, v. 94, p. 169-178, 2016.

DOMELLÖF, M. Benefits and harms of iron supplementation in iron-deficient and iron-sufficient children. In: **Importance of Growth for Health and Development**. Karger Publishers, 2010. p. 153-165.

EARLEY, C. J., CONNOR, J., GARCIA-BORREGUERO, D., JENNER, P., WINKELMAN, J., ZEE, P. C., ALLEN, R. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease). **Sleep medicine**, v. 15, n. 11, p. 1288-1301, 2014.

FABBRINI, G., BROTCHE, J. M., GRANDAS, F., NOMOTO, M., GOETZ, C. G. Levodopa-induced dyskinesias. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 22, n. 10, p. 1379-1389, 2007.

FARINA, M., AVILA, D. S., DA ROCHA, J. B. T., ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 575-594, 2013.

FAROOQUI, T. Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. **Neurochemical research**, v. 32, n. 9, p. 1511-1529, 2007.

FAROOQUI, T. Review of Octopamine in insect nervous systems. **Open access insect physiology**, v. 4, p. 1-17, 2012.

FITZPATRICK, P. F. The metal requirement of rat tyrosine hydroxylase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 161, n. 1, p. 211-215, 1989.

FLEMING, R. E., PONKA, P. Iron overload in human disease. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 4, p. 348-359, 2012.

FOLWELL, J. L.; BARTON, C. H.; SHEPHERD, D. Immunolocalisation of the *Drosophila melanogaster* Nrapm homologue Malvolio to gut and Malpighian tubules provides evidence that Malvolio and Nrapm2 are orthologous. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 10, p. 1988-1995, 2006.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 235-244, 2005.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 23-32, 2002.

FRIGGI-GRELIN, F., COULOM, H., MELLER, M., GOMEZ, D., HIRSH, J., BIRMAN, S. Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. **Journal of neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 618-627, 2003.

GARG, A., GARG, S., ZANEVELD, L. J. D., SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

GHORAYEB, I., GAMAS, A., MAZURIE, Z., MAYO, W. Attention-deficit hyperactivity and obsessive-compulsive symptoms in adult patients with primary restless legs syndrome: different phenotypes of the same disease?. **Behavioral sleep medicine**, v. 17, n. 3, p. 246-253, 2019.

GIRDHAR, S., GIRDHAR, A., VERMA, S. K., LATHER, V., PANDITA, D. Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases: from animal models to clinical

trials. **J Ayurvedic Herb Med**, v. 1, n. 3, p. 91-100, 2015.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 232-242, 2003.

GREEN, R., CHARLTON, R., SEFTEL, H., BOTHWELL, T., MAYET, F., ADAMS, B., LAYRISSE, M. Body iron excretion in man: a collaborative study. **The American journal of medicine**, v. 45, n. 3, p. 336-353, 1968.

GUO, X., LI, K., GUO, A., LI, E. Absorção intestinal e distribuição de naringina, hesperidina, e seus metabólitos em camundongos. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104158, 2020.

GUTTERIDGE, J. MC; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stressor redox success?. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 502, n. 2, p. 183-186, 2018.

GWALTNEY-BRANT, S. M.; ALBRETSSEN, J. C.; KHAN, S. A. 5-Hydroxytryptophan toxicosis in dogs: 21 cases (1989–1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 12, p. 1937-1940, 2000.

HAJIALYANI, M., HOSEIN FARZAEI, M., ECHEVERRÍA, J., NABAVI, S. M., URIARTE, E., SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Hesperidin as a neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 648, 2019.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction?. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 32, n. S1, p. S10-S15, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update. **FEBS letters**, v. 307, n. 1, p. 108-112, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HANNA, M. E., BEDNÁŘOVÁ, A., RAKSHIT, K., CHAUDHURI, A., O'DONNELL, J. M., KRISHNAN, N. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. **Journal of insect physiology**, v. 73, p. 11-19, 2015.

HOGARTH, P. Neurodegeneration with brain iron accumulation: diagnosis and management. **Journal of movement disorders**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.

HOMAYOUNI, F., HAIDARI, F., HEDAYATI, M., ZAKERKISH, M., AHMADI, K. Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 1073-1079, 2018.

HOSKINS, R. A., CARLSON, J. W., KENNEDY, C., ACEVEDO, D., EVANS-HOLM, M., FRISE, E., CELNIKER, S. E. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1625-1628, 2007.

HONG, Y., AN, Z. Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF- κ B signaling. **Archives of pharmacal research**, v. 41, n. 6, p. 655-663, 2018.

IANKOVA, Vassilena et al. Emergentes terapias modificadoras da doença em distúrbios de neurodegeneração com acúmulo de Fe no cérebro (NBIA). **Frontiers in Neurology**, v. 12, 2021.

IWAI, K. Regulation of cellular iron metabolism: Iron-dependent degradation of IRP by SCFFBXL5 ubiquitin ligase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p. 64-68, 2019.

JACOMIN, A. C., GERAKI, K., BROOKS, J., TJENDANA-TJHIN, V., COLLINGWOOD, J. F., NEZIS, I. P. Impact of Autophagy and Aging on Iron Load and Ferritin in *Drosophila* Brain. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 142, 2019.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; DAZA-RESTREPO, A.; VELEZ-PARDO, C. The cannabinoid CP55, 940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: implications in Parkinson's disease. **Neuroscience research**, v. 61, n. 4, p. 404-411, 2008.

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

JOHNSON, C. C., GORELL, J. M., RYBICKI, B. A., SANDERS, K., PETERSON, E. L. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. **International journal of epidemiology**, v. 28, n. 6, p. 1102-1109, 1999.

KANDEL, E. Depression, mania and anxiety disorders. **Principles of Neural Science. McGraw-Hill, New York**, p. 1209-1225, 2001.

KASTNER, A., HIRSCH, E. C., LEJEUNE, O., JAVOY-AGID, F., RASCOL, O., AGID, Y. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content?. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 3, p. 1080-1089, 1992.

KE, Y. A.; QIAN, Zhong Ming. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. **Progress in neurobiology**, v. 83, n. 3, p. 149-173, 2007.

KHAN, M. H. A.; PARVEZ, S. Hesperidin ameliorates heavy metal induced toxicity mediated by oxidative stress in brain of Wistar rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 53-60, 2015.

KIM, J.; WESSLING-RESNICK, M. Iron and mechanisms of emotional behavior. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1101-1107, 2014.

KONOFAL, E., LECENDREUX, M., ARNULF, I., MOUREN, M. C. Iron deficiency in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 158, n. 12, p. 1113-1115, 2004.

KUMAR, H., LIM, H. W., MORE, S. V., KIM, B. W., KOPPULA, S., KIM, I. S., CHOI, D. K. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n.8, p. 10478-10504, 2012.

KUMAR, S., SINGH, R. K., AMAN, A. K., KUMAR, J., KAR, M. Evaluation of iron oxide nanoparticles (NPs) on aging and age related metabolism and physiological changes in *C. elegans*. **International Journal of Pharmaceutical sciences and Research**, v. 8, p. 1000-04, 2017.

KUME, K., KUME, S., PARK, S. K., HIRSH, J., JACKSON, F. R. Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7377-7384, 2005.

KWOK, J. B.J. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Epigenomics**, v. 2, n. 5, p. 671-682, 2010.

LEBESTKY, T., CHANG, J. S. C., DANKERT, H., ZELNIK, L., KIM, Y. C., HAN, K. A., ANDERSON, D. J. Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. **Neuron**, v. 64, n. 4, p. 522-536, 2009.

LESAGE, S.; BRICE, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Human molecular genetics**, v. 18, n. R1, p. R48-R59, 2009.

LEVI, S.; ROVIDA, E. The role of iron in mitochondrial function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 7, p. 629-636, 2009.

LI, C., ZUG, C., QU, H., SCHLUESENER, H., ZHANG, Z. Hesperidin ameliorates behavioral impairments and neuropathology of transgenic APP/PS1 mice. **Behavioural brain research**, v. 281, p. 32-42, 2015.

LI, S. J., REN, Y. D., LI, J., CAO, B., MA, C., QIN, S. S., LI, X. R. The role of iron in Parkinson's disease monkeys assessed by susceptibility weighted imaging and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Life sciences**, v. 240, p. 117091, 2020.

LI, Y., KANDHARE, A. D., MUKHERJEE, A. A., BODHANKAR, S. L. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of hesperidin isolated from orange peel extract in Sprague Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 105, p. 77-85, 2019.

LIEU, P. T., HEISKALA, M., PETERSON, P. A., YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 1-87, 2001.

LIND, M. I., MISSIRLIS, F., MELEFORS, Ö., UHRIGSHARDT, H., KIRBY, K., PHILLIPS, J. P., ROUAULT, T. A. Of two cytosolic aconitases expressed in *Drosophila*, only one functions as an iron-regulatory protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18707-18714, 2006.

LIU, C., LIANG, M. C., SOONG, T. W. Nitric oxide, iron and neurodegeneration. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 114, 2019.

LIU, W. Y., LIOU, S. S., HONG, T. Y., LIU, I. M. Protective effects of hesperidin (citrus flavonone) on high glucose induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for diabetic retinopathy. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1312, 2017.

LOEFFLER, D. A., CONNOR, J. R., JUNEAU, P. L., SNYDER, B. S., KANALEY, L., DEMAGGIO, A. J., LEWITT, P. A. Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 2, p. 710-716, 1995.

MANEV, H.; DIMITRIJEVIC, N.; DZITOYEVA, S. Techniques: fruit flies as models for neuropharmacological research. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 1, p. 41-43, 2003.

MARRAS, C.; GOLDMAN, S. M. Genetics meets environment: evaluating gene-environment interactions in neurologic diseases. In: **Seminars in neurology**. © Thieme Medical Publishers, v. 31, n. 05, p. 553-562, 2011.

MATIAS, I., DINIZ, L. P., BUOSI, A., NEVES, G., STIPURSKY, J., GOMES, F. C. A. Flavonoid hesperidin induces synapse formation and improves memory performance through the astrocytic TGF- β 1. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 9, p. 184, 2017.

MCCORD, J. M. Iron, free radicals, and oxidative injury. In: **Seminars in hematology**. 1998. p. 5-12.

MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 26, n. 7, p. 341-344, 2005.

MESQUITA, S. D., FERREIRA, A. C., SOUSA, J. C., SANTOS, N. C., CORREIA-NEVES, M., SOUSA, N., MARQUES, F. Modulation of iron metabolism in aging and in Alzheimer's disease: relevance of the choroid plexus. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 6, p. 25, 2012.

MILLBURN, G. H., CROSBY, M. A., GRAMATES, L. S., TWEEDIE, S. FlyBase portals to human disease research using *Drosophila* models. **Disease models & mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 245-252, 2016.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 187-199, 2008.

NDAYISABA, A., KAINDLSTORFER, C., WENNING, G. r. K. Iron in

neurodegeneration—cause or consequence?. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 180, 2019.

NECKAMEYER, W. S.; WHITE, K. Drosophila tyrosine hydroxylase is encoded by the pale locus. **Journal of neurogenetics**, v. 8, n. 4, p. 189-199, 1993.

NECTOUX, A. M., ABE, C., HUANG, S. W., OHNO, N., TABATA, J., MIYATA, Y., MATSUI, T. Absorption and metabolic behavior of hesperidin (Rutinosylated Hesperetin) after single oral administration to sprague-dawley rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 35, p. 9812-9819, 2019.

NICHOLS, C. D. Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 677-700, 2006.

NÚÑEZ, M. T., URRUTIA, P., MENA, N., AGUIRRE, P., TAPIA, V., SALAZAR, J. Iron toxicity in neurodegeneration. **Biometals**, v. 25, n. 4, p. 761-776, 2012.

ORTEGA-ARELLANO, H. F., JIMENEZ-DEL-RIO, M., VELEZ-PARDO, C. Minocycline protects, rescues and prevents knockdown transgenic parkin Drosophila against paraquat/iron toxicity: Implications for autosomic recessive juvenile parkinsonism. **Neurotoxicology**, v. 60, p. 42-53, 2017.

OTT, M., GOGVADZE, V., ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, 2007.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.

PARI, L., KARTHIKEYAN, A., KARTHIKA, P., RATHINAM, A. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. **Toxicology reports**, v. 2, p. 46-55, 2015.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 393-408. e2, 2010.

POETINI, M. R., ARAUJO, S. M., DE PAULA, M. T., BORTOLOTTI, V. C., MEICHTRY, L. B., DE ALMEIDA, F. P., PRIGOL, M. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in Drosophila melanogaster model of Parkinson's disease. **Chemico-biological interactions**, v. 279, p. 177-186, 2018.

POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C. M., HALLIDAY, G. M., BRUNDIN, P., VOLKMANN, J., LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.

POEWE, W., ANTONINI, A. New formulations and delivery modes of levodopa. **Movement Disorders**, v. 30, no. 1, p. 114-120, 2015.

POWERS, K. M., SMITH-WELLER, T., FRANKLIN, G. M., LONGSTRETH, W. T., SWANSON, P. D., CHECKOWAY, H. Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. **Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1761-1766, 2003.

POLLAK, A., HAYDE, M., HAYN, M., HERKNER, K., LOMBARD, K. A., LUBEC, G., WIDNESS, J. A. Effect of intravenous iron supplementation on erythropoiesis in erythropoietin-treated premature infants. **Pediatrics**, v. 107, n. 1, p. 78-85, 2001.

RAMSEY, A. J., HILLAS, P. J., FITZPATRICK, P. F. Characterization of the active site iron in tyrosine hydroxylase: redox states of the iron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24395-24400, 1996.

PLOTNIKOV, A., ZEHORAI, E., PROCACCIA, S., SEGER, R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619-1633, 2011.

RIEMENSPERGER, T., ISABEL, G., COULOM, H., NEUSER, K., SEUGNET, L., KUME, K., BIRMAN, S. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 834-839, 2011.

RIEMENSPERGER, T., ISABEL, G., COULOM, H., NEUSER, K., SEUGNET, L., KUME, K., BIRMAN, S. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 834-839, 2011.

RIEMENSPERGER, T., VÖLLER, T., STOCK, P., BUCHNER, E., FIALA, A. Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. **Current biology**, v. 15, n. 21, p. 1953-1960, 2005.

ROEDER, T. Octopamine in invertebrates. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 5, p. 533-561, 1999.

ROEDER, T. Tyramine and Octopamine: ruling behavior and metabolism. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 447-477, 2005.

ROOHBAKHSH, A., PARHIZ, H., SOLTANI, F., REZAEI, R., IRANSHAHI, M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—A mini-review. **Life sciences**, v. 113, n. 1-2, p. 1-6, 2014.

SALVADOR, G. A.; URANGA, R. M.; GIUSTO, N. M. Iron and mechanisms of neurotoxicity. **International journal of Alzheimer's disease**, v. 2011, 2011.

SARRIA, A. L. F., VILELA, A. F. L., FRUGERI, B. M., FERNANDES, J. B., CARLOS, R. M., CASS, Q. B., CARDOSO, C. L. Copper (II) and zinc (II) complexes with flavanone derivatives: identification of potential cholinesterase inhibitors by on-flow

assays. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 164, p. 141-149, 2016.

SANGKHAE, V., FISHER, A. L., WONG, S., KOENIG, M. D., TUSSING-HUMPHREYS, L., CHU, A., NEMETH, E. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 2, p. 625-640, 2020.

SEBASTIANI, G.; PANTOPOULOS, K. Disorders associated with systemic or local iron overload: from pathophysiology to clinical practice. **Metallomics**, v. 3, n. 10, p.971-986, 2011.

SESCOUSSE, G., LIGNEUL, R., VAN HOLST, R. J., JANSSEN, L. K., DE BOER, F., JANSSEN, M., COOLS, R. Spontaneous eye blink rate and dopamine synthesis capacity: preliminary evidence for an absence of positive correlation. **European Journal of Neuroscience**, v. 47, n. 9, p. 1081-1086, 2018.

SEUGNET, L., SUZUKI, Y., VINE, L., GOTTSCHALK, L., SHAW, P. J. D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 18, n. 15, p. 1110-1117, 2008.

SIDDIQI, A., HASAN, S. K., NAFEES, S., RASHID, S., SAIDULLAH, B., SULTANA, S. Chemopreventive efficacy of hesperidin against chemically induced nephrotoxicity and renal carcinogenesis via amelioration of oxidative stress and modulation of multiple molecular pathways. **Experimental and molecular pathology**, v. 99, n. 3, p. 641-653, 2015.

SOFIC, E., RIEDERER, P., HEINSEN, H., BECKMANN, H., REYNOLDS, G. P., HEBENSTREIT, G., YODIM, M. B. H. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **Journal of neural transmission**, v. 74, n. 3, p. 199-205, 1988.

SOMASUNDARAM, I., SUMATHI, S., BHUVANESHWARI, S. P., SHAFIQ, K. M., SHANMUGARAJAN, T. S. Formulation and evaluation of hesperidin-loaded chitosan nanosuspension for brain targeting. **Drug Invention Today**, v. 10, n. 3, 2018.

STANDAERT, D.; GALANTER, Joshua M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatologia da farmacoterapia**, p. 166-185, 2009.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 101, 2017.

SUSSULINI, A.; HAUSER-DAVIS, R. Ann. Metallomics applied to the study of neurodegenerative and mental diseases. **Metallomics**, p. 21-37, 2018.

SUN, Y., LIU, W. Z., LIU, T., FENG, X., YANG, N., ZHOU, H. F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600-604, 2015.

TANAKA, N. K.; TANIMOTO, H.; ITO, K. E. I. Neuronal assemblies of the Drosophila mushroom body. **Journal of Comparative Neurology**, v. 508, n. 5, p. 711-755, 2008.

TANG, X.; ZHOU, B. Iron homeostasis in insects: insights from Drosophila studies. **IUBMB life**, v. 65, n. 10, p. 863-872, 2013.

THAPAR, A.; COOPER, M.; RUTTER, M. Neurodevelopmental disorders. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 339-346, 2017.

THENMOZHI, A. J., RAJA, T. R. W., JANAKIRAMAN, U., MANIVASAGAM, T. Neuroprotective effect of hesperidin on aluminium chloride induced Alzheimer's disease in Wistar rats. **Neurochemical research**, v. 40, n. 4, p. 767-776, 2015.

THIRUPATHI, A.; CHANG, Y. Brain iron metabolism and CNS diseases. **Brain Iron Metabolism and CNS Diseases**, p. 1-19, 2019.

THOMAS, G., ZARKALI, A., RYTEN, M., SHMUELI, K., GIL MARTINEZ, A., LEYLAND, L., WEIL, R. Regional brain iron and gene expression provide insights into neurodegeneration in Parkinson's disease. **Brain**, 2021.

TRAN, N. Q. V.; MIYAKE, K. Neurodevelopmental disorders and environmental toxicants: epigenetics as an underlying mechanism. **International journal of genomics**, v. 2017, 2017.

VISWANATH, V., WU, Y., BOONPLUEANG, R., CHEN, S., STEVENSON, F. F., YANTIRI, F., ANDERSEN, J. K. Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n.24, p. 9519-9528, 2001.

XIE, Y., HOU, W., SONG, X., YU, Y., HUANG, J., SUN, X., TANG, D. Ferroptosis: process and function. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 3, p. 369-379, 2016.

WÄCHTERSCHÄUSER, G. On the chemistry and evolution of the pioneerorganism. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 4, p. 584-602, 2007.

WANG, D., LIU, L., ZHU, X., WU, W., WANG, Y. Hesperidin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 34, n. 8, p. 1209-1221, 2014.

WANG, Y., HUANG, L., ZHANG, L., QU, Y., MU, D. Iron status in attention-deficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169145, 2017.

WESSLING-RESNICK, M. Biochemistry of iron uptake. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 5, p. 285-314, 1999.

WELBAT, J. U., NAEWLA, S., PANNANGRONG, W., SIRICHOAT, A., ARANAROCHANA, A., WIGMORE, P. Neuroprotective effects of hesperidin against methotrexate-induced changes in neurogenesis and oxidative stress in the adult rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 114083, 2020.

WHITWORTH, A. J. Drosophila models of Parkinson's disease. **Advances in genetics**, v. 73, p. 1-50, 2011.

WILLIAMSON, G1. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition bulletin**, v. 42, n. 3, p. 226-235, 2017.

YANG, R., ZHANG, Y., GAO, W., LIN, N., LI, R., ZHAO, Z. Blood levels of trace elements in children with attention-deficit hyperactivity disorder: results from a case-control study. **Biological trace element research**, v. 187, n. 2, p. 376-382, 2019.

YANG, W. S., STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 3, p. 165-176, 2016.

YE, Y., XI, W., PENG, Y., WANG, Y., GUO, A. Long-term but not short-term blockade of dopamine release in Drosophila impairs orientation during flight in a visual attention paradigm. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1001-1007, 2004.

YELLMAN, C., TAO, H., HE, B., HIRSH, J. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated Drosophila. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 94, n. 8, p. 4131-4136, 1997.

YOU DIM, M. B. Nutrient deprivation and brain function: iron. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 16, n. 7-8, p. 504-508, 2000.

YU, J., QI, F., WANG, N., GAO, P., DAI, S., LU, Y., CHE, F. Increased iron level in motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients: an in vivo MR study. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 15, n. 5-6, p. 357-361, 2014.

YUAN, H., PRATTE, J., GIARDINA, C. Ferroptosis and its potential as a therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, p. 114486, 2021.

ZECCA, L., YOU DIM, M. B., RIEDERER, P., CONNOR, J. R., CRICHTON, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 863, 2004.

ZHANG, K., GUO, J. Z., PENG, Y., XI, W., GUO, A. Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in Drosophila. **science**, v. 316, n.5833, p. 1901-1904, 2007.

ZHANG, Na et al. New Insights into the Role of Ferritin in Iron Homeostasis and Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, p. 1-12, 2021.

ZHU, Z. J., WU, K. C., YUNG, W. H., QIAN, Z. M., KE, Y. Differential interaction between iron and mutant alpha-synuclein causes distinctive Parkinsonian phenotypes in *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 4, p. 518-525, 2016.

ZUCCA, F. A., SEGURA-AGUILAR, J., FERRARI, E., MUÑOZ, P., PARIS, I., SULZER, D., ZECCA, L. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 155, p. 96- 119, 2017.

Anexo 1:

1. Resumo gráfico do artigo 1

