

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PAMELA BRAMBILLA BAGATINI

**EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM  
BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO E RESVERATROL  
NA LOCOMOÇÃO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COM  
MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR PARAQUAT**

PORTO ALEGRE

2010

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Efeitos dos tratamentos com bloqueadores de canais de cálcio  
e resveratrol na locomoção de *Drosophila melanogaster* com  
modelo de parkinsonismo induzido por paraquat**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
como requisito para obtenção do  
grau de Mestre.

Autora  
Pamela Brambilla Bagatini

Orientador  
Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Porto Alegre, RS  
Julho, 2010

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador e amigo, Professor Léder, pela paciência, sabedoria e por todo o empenho para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelos incentivos e pela confiança.

À Professora Mônica, pelo interesse em me auxiliar e pelas ideias sábias.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, pelo companheirismo e dedicação em todas as etapas deste estudo.

À Raquel, técnica do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, pela amizade, competência e disponibilidade em me auxiliar a desenvolver este trabalho.

À Patrícia do Nascimento, doutoranda do Laboratório de Histofisiologia Comparada da UFRGS, pela colaboração durante a realização deste estudo.

À PUCRS, pela bolsa concedida (Probolsas PUCRS).

À CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

Estudos recentes demonstram que a perda neuronal na doença de Parkinson pode estar relacionada à atividade marca-passo dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars* compacta, que é gerada por canais de cálcio voltagem-dependentes, os quais substituem canais de sódio voltagem-dependentes, nessas células, durante o envelhecimento. Além desse mecanismo, que leva ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio, outros fatores também são implicados na morte de células dopaminérgicas observada na doença de Parkinson, como a elevada geração de espécies reativas de oxigênio. Deste modo, o tratamento com diidropiridinas, uma classe de bloqueadores de canais de cálcio, e com resveratrol, um polifenol que apresenta propriedades antioxidantes, podem representar alternativas terapêuticas para a prevenção da doença de Parkinson. Neste estudo foram testados os efeitos das diidropiridinas isradipina, nifedipina e nimodipina e do resveratrol no comportamento motor de *Drosophila melanogaster*. Assim como em estudos anteriores, o tratamento com paraquat foi capaz de induzir parkinsonismo, evidenciado pelos déficits motores observados nos animais. Além disso, nenhuma das drogas testadas foi capaz de prevenir os déficits locomotores induzido pelo paraquat. Ademais, os tratamentos isolados com isradipina, nifedipina, resveratrol e etanol (veículo) foram capazes de gerar diminuição da atividade motora nesses animais. Este estudo é o primeiro a demonstrar que os tratamentos com diidropiridinas e resveratrol são incapazes de reverter os déficits locomotores induzidos por paraquat em *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: Canais de cálcio voltagem-dependentes. Diidropiridinas. *Drosophila melanogaster*. Paraquat. Parkinson. Resveratrol.

## ABSTRACT

Studies have suggested that neuronal loss in Parkinson's disease could be related to the pacemaker activity of the substantia *nigra pars compacta* generated by L-type  $Ca_v1.3$  calcium channels, which progressively substitute voltage-dependent sodium channels in this region during aging. Besides this mechanism, which leads to increases in intracellular calcium, other factors are also known to play a role in dopaminergic cell death due to overproduction of reactive oxygen species. Thus, dihydropyridines, a class of calcium channel blockers, and resveratrol, a polyphenol that presents antioxidant properties, may represent therapeutic alternatives for the prevention of PD. In the present study we tested the effects of the dihydropyridines isradipine, nifedipine and nimodipine and of resveratrol upon locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. As previously described, paraquat induced parkinsonian-like motor deficits. Moreover, none of the drugs tested were able to prevent the motor deficits produced by paraquat. Additionally, isradipine, nifedipine, resveratrol and ethanol (vehicle), when used in isolation, induced motor deficits in flies. This study is the first demonstration that dihydropyridines and resveratrol are unable to reverse the locomotor impairments induced by paraquat in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Dihydropyridines. *Drosophila melanogaster*. Paraquat. Parkinson's disease. Resveratrol. Voltage-dependent calcium channels.

## SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1.....	6
1.1.	INTRODUÇÃO.....	7
1.1.1.	Doença de Parkinson.....	7
1.1.1.1.	Relação entre paraquat e a doença de Parkinson.....	10
1.1.1.2.	Relação entre canais de cálcio voltagem-dependentes e a doença de Parkinson.....	12
1.1.1.3.	Agentes neuroprotetores na doença de Parkinson.....	14
1.1.1.3.1.	Bloqueadores de canais de cálcio.....	14
1.1.1.3.2.	Resveratrol.....	17
1.1.2.	<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal para a doença de Parkinson.....	18
1.1.3.	<i>Drosophila melanogaster</i> e canais de cálcio voltagem-dependentes.....	21
1.2.	OBJETIVOS.....	23
1.2.1.	Objetivo geral.....	23
1.2.2.	Objetivos específicos.....	23
2.	CAPÍTULO 2.....	24
2.1.	ARTIGO.....	24
3.	CAPÍTULO 3.....	57
3.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	ANEXO A - Considerações técnicas sobre a secção tecidual e o procedimento imunoistoquímico em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	67
	ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo.....	73

## 1. CAPÍTULO 1

## 1.1. INTRODUÇÃO

### 1.1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva relacionada à idade, apresentando manifestações clínicas e patogênese resultantes de interações complexas entre o processo de envelhecimento e fatores de suscetibilidade<sup>(1)</sup>. Ela é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer<sup>(2)</sup>, apresentando um risco de desenvolvimento ao longo da vida em torno de 2%<sup>(3)</sup>.

A DP é diagnosticada em todos os grupos étnicos, mas com diferenças geográficas em prevalência. Cerca de 1 a 2% da população acima dos 65 anos desenvolve a DP, aumentando essa prevalência para 3 a 5% em pacientes com 85 anos ou mais; com isso, ela se torna cada vez mais comum em países desenvolvidos, onde há elevados índices de longevidade populacional<sup>(4)</sup>. Desta maneira, considera-se provável que as diferenças na prevalência mundial da DP estejam associadas às variações na expectativa de vida das populações e às apurações dos casos da doença<sup>(1)</sup>.

A DP é neuropatologicamente caracterizada pela perda de células nigroestriatais e pela presença de inclusões intracelulares com acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína, denominadas corpos de Lewy. A morte dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars* compacta (SNpc) resulta em um déficit importante de dopamina no estriado. Desta forma, a DP é clinicamente diagnosticada pela



presença de disfunções motoras, como tremores de repouso, bradicinesia, acinesia, rigidez e instabilidade postural<sup>(5,6,7)</sup>.

Grande parte dos sintomas motores da DP estão relacionados à neurodegeneração dopaminérgica na SNpc, porém outros sistemas neurotransmissores e distintas regiões encefálicas estão envolvidas, incluindo o *locus coeruleus*, núcleos motores dorsais, substância inominata, campo retrorubral, área tegmental ventral, o sistema nervoso vegetativo e o córtex cerebral; conseqüentemente, é observada uma perda neuronal que vai além dos neurônios dopaminérgicos, incluindo outros sistemas como o serotoninérgico e o colinérgico. A degeneração não-dopaminérgica destaca-se como principal responsável pelo desenvolvimento de sintomas não-motores da DP, como constipação, disfunção olfativa, declínio cognitivo, depressão, ansiedade e distúrbios do sono<sup>(8,9,10)</sup>.

Mesmo possuindo etiologia desconhecida, alguns fatores parecem estar envolvidos no desenvolvimento dessa doença. O fumo e a ingestão de cafeína estão associados a um menor risco de desenvolvimento da DP<sup>(11)</sup>. Além disso, foram evidenciadas diferenças no risco de desenvolvimento da doença entre os sexos, prevalecendo altos níveis de incidência em homens, particularmente em grupos de idade avançada. As possíveis causas da diferença entre os gêneros estão relacionadas às propriedades neuroprotetoras dos hormônios esteróides femininos, a diferenças dos sexos quanto às exposições ambientais e ocupacionais e a influências genéticas gênero-específicas<sup>(4,12)</sup>.

Ademais, a atuação combinada de tóxicos ambientais e de genes de suscetibilidade podem estar associados ao seu desenvolvimento; essa relação tornou-se ainda mais considerável após a identificação de genes de suscetibilidade relacionados à DP e de patologias nigroestriatais resultantes de exposições a agentes neurotóxicos<sup>(7)</sup>. A moradia em zonas rurais, a ingestão de água de poços e

a exposição a pesticidas parecem exercer influência no aumento do risco de desenvolvimento da DP<sup>(3,5)</sup>.

A patogênese da DP consiste em uma cascata de eventos que levam à morte celular. Nessa cascata, incluem-se fatores como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade glutamatérgica e acúmulo de proteínas via disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma. Além disso, reações imunes humorais e inflamação podem contribuir com os processos associados à morte celular por apoptose<sup>(1)</sup>.

Ademais, a dopamina é um neurotransmissor que pode ser metabolizado pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO) ou por auto-oxidação, levando à geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ânions superóxido e radicais hidroxila, contribuindo para a neurotoxicidade via estresse oxidativo relacionada à DP<sup>(13,14)</sup>.

Em relação à disfunção mitocondrial na DP, diferentes mecanismos demonstram estar envolvidos, tais como: interações mitocondriais, de forma direta ou indireta, exercidas por diversas proteínas promotoras de doenças associadas às formas familiares da DP; modificações mitocondriais relacionadas à idade, como alterações no DNA mitocondrial; anomalias na dinâmica mitocondrial e na sua distribuição intra-neuronal<sup>(15)</sup>.

Foi observada uma diminuição substancial na atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial na SNpc de indivíduos com DP esporádica, e essa alteração não afeta nenhum outro segmento da cadeia respiratória. Além disso, nenhum defeito na atividade mitocondrial foi identificado em outra região encefálica de indivíduos com DP, refletindo a atuação direta de danos oxidativos na CTE. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros radicais decorrem de ineficiências na CTE, a qual é responsável pela geração do

gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna e pela síntese de ATP através da ATP sintase<sup>(3,16)</sup>.

#### 1.1.1.1. Relação entre paraquat e a doença de Parkinson

Inúmeros fatores de risco ambientais estão associados à DP, seja na modulação da doença e/ou na sua progressão. Dados de estudos epidemiológicos demonstram uma associação entre o aumento no risco de desenvolvimento da DP em humanos e determinados fatores ambientais, como a exposição a agroquímicos, incluindo o paraquat (PQ)<sup>(17,18)</sup>.

O PQ é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente, considerado não-seletivo e de rápida ação<sup>(19)</sup>. Ele possui a capacidade de induzir lesões associadas à DP em animais, como ratos e algumas linhagens de camundongos, através de mecanismos neurodegenerativos direta ou indiretamente relacionados às ERO<sup>(18)</sup>.

A administração sistêmica repetida de baixas doses de PQ em ratos, via intraperitoneal, levam à geração de ERO no encéfalo e podem desencadear processos degenerativos lentos e progressivos, sem efeitos tóxicos em tecidos periféricos<sup>(20)</sup>. Além disso, foi evidenciado que a exposição sistêmica subcrônica experimental ao PQ é capaz de provocar mudanças degenerativas em neurônios impregnados por sais de prata e, também, de induzir à perda significativa de neurônios dopaminérgicos da SNpc; esses achados foram confirmados por contagem estereológica do número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH) e do número total de células coradas pelo método de Nissl na SNpc<sup>(21)</sup>.

O PQ possui semelhança estrutural com o 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>), metabólito tóxico do agente neurotóxico 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

(MPTP), capaz de induzir neurodegeneração dopaminérgica<sup>(22)</sup>. Embora esses compostos estejam associados à toxicidade via estresse oxidativo, o PQ exerce seu efeito deletério em neurônios dopaminérgicos de uma maneira única, se comparado ao MPP<sup>+</sup><sup>(23)</sup>.

A mitocôndria é a principal organela celular responsável pela geração de ERO induzida por PQ em encéfalos de ratos<sup>(23)</sup>. O PQ possui a capacidade de atravessar livremente a membrana dos neurônios dopaminérgicos e de acumular-se nas mitocôndrias, levando a alterações no complexo I da CTE e, conseqüentemente, à geração de ERO e à diminuição da síntese de ATP<sup>(5)</sup>. Esses dados são suportados por evidências que demonstram um bloqueio no complexo I mitocondrial de neurônios dopaminérgicos da SNpc em modelos experimentais da DP<sup>(15)</sup>.

O mecanismo de toxicidade do PQ está associado ao seu ciclo redox, onde o referido composto é reduzido principalmente via NADPH-citocromo P450 redutase, NADPH-citocromo *c* redutase e pelo complexo I mitocondrial. Com isso, há a formação de um radical-livre monocátion (PQ<sup>•+</sup>) que é rapidamente reoxidado na presença de oxigênio, gerando o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). A geração desse radical é o ponto de partida para a cascata de reações que levam à síntese de outras ERO, especialmente peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais hidroxila (OH<sup>•</sup>), resultando em efeitos celulares deletérios. De fato, os radicais hidroxila têm sido implicados na iniciação do dano de membrana por peroxidação lipídica durante a exposição ao PQ *in vitro* e *in vivo*<sup>(17)</sup>.

### 1.1.1.2. Relação entre canais de cálcio voltagem-dependentes e a doença de Parkinson

Os canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD) são proteínas multiméricas que contêm subunidades  $\alpha_1$  formadoras de poros na membrana plasmática<sup>(24)</sup>. Os CCVD podem permitir o influxo de cálcio extracelular em resposta à despolarização e são responsáveis por mediar uma grande variedade de processos intra e extracelulares, como neurotransmissão, contração muscular, liberação de hormônios, regulação de atividades enzimáticas e de padrões de expressão gênica. Esses canais são divididos em duas grandes famílias, baseadas em suas ativações voltagem-dependentes: CCVD de ativação por baixa voltagem (LVA – *Low-Voltage-Activated*) e CCVD de ativação por alta voltagem (HVA – *High-Voltage-Activated*)<sup>(25)</sup>.

Diferentemente da maioria dos neurônios no encéfalo, os neurônios dopaminérgicos adultos da SNpc funcionam como marca-passo autônomos dependentes de cálcio, ou seja, são capazes de gerar potenciais de ação na ausência de sinapses. Sua atividade basal é intrinsecamente controlada por CCVD tipo-L, pertencentes à superfamília HVA<sup>(26,27)</sup>.

Em neurônios do sistema nervoso central (SNC), os canais tipo-L possuem uma das duas subunidades  $\alpha$ :  $Ca_v$  1.2 ou  $Ca_v$  1.3. Canais de cálcio com subunidades  $Ca_v$  1.2 abrem apenas em potenciais de membrana onde a membrana encontra-se relativamente despolarizada, tornando-a inadequada para a tarefa de controle do marca-passo. Diferentemente destes, os canais de cálcio com subunidades  $Ca_v$  1.3 têm uma menor distribuição no SNC, uma menor afinidade por bloqueadores de canais de cálcio (como as diidropiridinas) e abrem-se em potenciais de membrana sub-limiais, com a membrana relativamente

hiperpolarizada, tornando-os adequados para a função de marca-passo. Além disso, células dopaminérgicas da SNpc expressam intensamente RNA mensageiro para a subunidade  $Ca_v$  1.3, sugerindo que os canais de cálcio com essa subunidade são as bases fisiológicas dos marca-passo dopaminérgicos encefálicos, como a substância *nigra*<sup>(24,28)</sup>.

Os neurônios utilizam a entrada de cálcio como uma maneira de monitorar suas atividades e interações com outros neurônios. Devido a sua relevância na função celular, há uma complexa rede homeostática dentro dos neurônios que permite aumentos transitórios na concentração de cálcio livre e que, também, tenta manter o nível basal desse íon, que é 10.000 vezes menor (cerca de 50-100nmol/L) que o nível do meio extracelular (1-2mmol/L). Para a manutenção do gradiente de concentração, a entrada de íons cálcio na célula ocorre através dos poros de membrana (como os canais de cálcio tipo-L), e o efluxo é realizado através de transportadores lentos de membrana, os quais consomem energia na forma de ATP. Devido à atividade marca-passo dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, o influxo de cálcio parece ser muito maior, resultando em uma maior demanda energética celular<sup>(29)</sup>.

No meio intracelular, o retículo endoplasmático (RE) utiliza transportadores ATP-dependentes que levam íons cálcio do citoplasma até o seu lúmen. Esses canais são frequentemente encontrados em aposição próxima à mitocôndria, de forma que a abertura dos mesmos gera uma elevada concentração local de cálcio, levando a um influxo desse íon à matriz mitocondrial. O acúmulo de cálcio na matriz leva ao retorno desse íon ao citoplasma, onde pode ser bombeado para fora através da membrana ou ser recapturado pelo RE. Na maioria dos neurônios, essa interação é episódica, porém em neurônios dopaminérgicos isso ocorre frequentemente, havendo consumo de ATP produzido na fosforilação oxidativa mitocondrial. Esse

mecanismo, portanto, é capaz de gerar uma demanda na fosforilação oxidativa, podendo provocar um aumento na geração de ERO, causando morte neuronal e danos celulares associados ao envelhecimento<sup>(29)</sup>. Ademais, o alto nível basal de estresse oxidativo nessas células pode somar-se à elevada concentração intracelular de cálcio, exercendo um efeito sinérgico junto à ação de toxinas ambientais ou de polimorfismos e mutações genéticas, resultando no perfil multifatorial da DP<sup>(24)</sup>.

#### 1.1.1.3. Agentes neuroprotetores na doença de Parkinson

Com base nos dados apresentados, que confirmam a patogênese multifatorial relacionada à DP e demonstram o envolvimento de diferentes mecanismos celulares e moleculares no processo de neurodegeneração dopaminérgica, torna-se relevante o desenvolvimento de estudos que envolvam a análise dos efeitos de fármacos com possível atuação nesses mecanismos-alvo, contribuindo para a demonstração de que tais drogas possam representar potentes opções terapêuticas ou preventivas para a DP.

##### 1.1.1.3.1. Bloqueadores de canais de cálcio

Os bloqueadores de canais de cálcio são um grupo heterogêneo de drogas capazes de inibir o influxo de cálcio em diferentes tecidos, incluindo a musculatura lisa e o miocárdio. Esses antagonistas têm a capacidade de bloquear os canais de cálcio tipo-L, sendo classificados em dois grupos: as diidropiridinas (isradipina,

nifedipina, nimodipina) e não-diidropiridinas (diltiazem e verapamil). As diidropiridinas têm ação preferencial no bloqueio de canais de cálcio na musculatura lisa vascular, sendo utilizadas como potentes vasodilatadores<sup>(30)</sup>.

Estima-se que os antagonistas do cálcio possam exercer um efeito protetor em pacientes parkinsonianos e em outras condições em que a apoptose contribui substancialmente à morte celular<sup>(31)</sup>. Neste sentido, foi evidenciado que o bloqueador de CCVD tipo-L nimodipina possui propriedades neuroprotetoras, observadas em culturas de neurônios cerebelares de ratos submetidos a um modelo de neurotoxicidade mediado por NMDA<sup>(32)</sup>.

Além disso, foi demonstrado que, em fatias da porção ventral do mesencéfalo, as diidropiridinas são capazes de interromper a atividade marca-passo dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra*. O mais interessante desse achado é que a atividade marca-passo dos neurônios nigrais retorna após 2-4 horas de exposição aos bloqueadores de canais de cálcio, porém regidos predominantemente por correntes de sódio<sup>(24)</sup>.

Nos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral, o marca-passo nos canais de cálcio  $Ca_v 1.3$  dessas células depende de canais de sódio voltagem-dependentes para alcançar o limiar de membrana. Neste sentido, os canais de cálcio  $Ca_v 1.3$  dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral assemelham-se aos neurônios dopaminérgicos juvenis da SNpc, uma vez que nos neurônios dopaminérgicos juvenis da SNpc o marca-passo é praticamente inafetado por antagonistas de canais de cálcio tipo-L, porém é completamente abolido por antagonistas de canais de sódio. Com isso, a mudança no mecanismo do marca-passo durante o envelhecimento parece ser desencadeada pela inserção de canais de cálcio  $Ca_v 1.3$ , o que poderia explicar as distintas taxas de morte neuronal



existentes entre a porção compacta da substância *nigra* e a área tegmental ventral no paciente parkinsoniano<sup>(24)</sup>.

Neste mesmo sentido, o mecanismo de “rejuvenescimento” torna os neurônios dopaminérgicos adultos da SNpc resistentes às toxinas mitocondriais empregadas para gerar modelos animais da DP - assim como as células dopaminérgicas juvenis da SNpc - além de inibir o desenvolvimento de déficits motores e cognitivos nesses animais<sup>(27,29)</sup>.

Deste modo, demonstrou-se que há uma troca compensatória nas bases iônicas da atividade do marca-passo nigral após a exposição dos neurônios da substância *nigra* a diidropiridinas, sugerindo que tratamentos com esses fármacos possam auxiliar na prevenção da perda de células nigrais, observada na DP<sup>(33)</sup>.

Até o presente momento, a inexistência de antagonistas seletivos de canais de cálcio  $Ca_v$  1.3 nos conduz à escolha das diidropiridinas como bloqueadores de canais de cálcio tipo-L mais seletivos para uso em seres humanos dentre todos os bloqueadores de canais de cálcio, além do fato das diidropiridinas atravessarem a barreira hematoencefálica e, portanto, possuírem boa biodisponibilidade no SNC<sup>(29)</sup>. Dessa forma, o fármaco isradipina, que possui uma afinidade relativamente elevada aos canais de cálcio  $Ca_v$  1.3, é capaz de bloquear efetivamente a neurodegeneração induzida por agentes neurotóxicos. Além desses dados, um estudo retrospectivo demonstrou que pacientes que utilizavam diidropiridinas apresentaram uma incidência menor do que a esperada da DP, comparados aos pacientes não-tratados com os bloqueadores de canais de cálcio<sup>(31)</sup>.

#### 1.1.1.3.2. Resveratrol

A forma esporádica ou não-genética da DP representa grande parcela dos casos dessa doença, e diversas reações tóxicas estão relacionadas a essa forma, entre elas processos inflamatórios, disfunção da atividade mitocondrial e do sistema ubiquitina-proteassoma, ativação das vias de apoptose e alteração da homeostase entre antioxidantes/oxidação. Desta forma, agentes como os polifenóis, capazes de atuar em múltiplos mecanismos-alvo, podem representar uma potencial opção terapêutica para a DP<sup>(34)</sup>.

O resveratrol é um polifenol não-flavonóide encontrado em uvas e no vinho tinto, com capacidade de se ligar a várias moléculas sinalizadoras e de modular a atividade de genes reguladores do ciclo celular, além de induzir à ativação de enzimas antioxidantes<sup>(35)</sup>.

Os efeitos biológicos do resveratrol são mediados principalmente pela ativação das sirtuínas (SIRT), uma família de deacetilases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) capazes de regular muitas funções celulares através da deacetilação de histonas. *Sir2* em *Saccharomyces cerevisiae* é o membro fundador da família de genes *SIRT*, e sete diferentes homólogos de *Sir2* foram identificados em humanos (*SIRT1* à *SIRT7*), com distintos alvos e localizações celulares<sup>(35,36)</sup>. As SIRT podem atuar na modificação de mecanismos associados a diversas doenças, devido à descoberta do envolvimento dessas enzimas nos processos de apoptose, sobrevivência celular, transcrição, metabolismo e envelhecimento<sup>(36)</sup>.

Há uma crescente evidência de que, além das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do resveratrol, a ativação da SIRT1 possa exercer ação terapêutica no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao

envelhecimento<sup>(37)</sup>. Foi demonstrado que o resveratrol, juntamente com outro composto ativador de SIRT, a quercetina, são capazes de proteger neurônios dopaminérgicos mesencefálicos contra diferentes tipos de insultos relacionados à patogênese da DP - como a neurotoxina dopaminérgica MPP<sup>+</sup> - sugerindo que o resveratrol exerce efeito neuroprotetor através de distintos mecanismos celulares e moleculares, que envolvem ações antioxidantes e regulação da ativação de *SIRT*<sup>(38)</sup>.

Em *Drosophila melanogaster* transgênica (com modelo da DP através da expressão gênica de  $\alpha$ -sinucleína humana), o tratamento com Regraprex-R<sup>®</sup>, extrato botânico que contém polifenóis em sua composição, incluindo o resveratrol, foi capaz de reverter o déficit locomotor nesse modelo experimental, evidenciado pela melhora na performance de escalada dos animais<sup>(39)</sup>.

Ademais, a administração de resveratrol foi capaz de atenuar as alterações motoras relacionadas ao parkinsonismo induzido por MPTP, além de diminuir o dano neuronal e a sobrecarga de radicais-livres na substância *nigra* de camundongos<sup>(40)</sup>.

### **1.1.2. *Drosophila melanogaster* como modelo animal para a doença de Parkinson**

A mosca das frutas *Drosophila melanogaster* e os humanos compartilham inúmeros genes em comum, conservam vias metabólicas e sinalizadoras a nível celular e, além disso, há uma crescente evidência de conservação a nível comportamental e de seus mecanismos moleculares, incluindo ritmos circadianos, aprendizagem e memória e sono. Mais recentemente, exemplares desse grupo

estão sendo empregados como modelos animais de doenças humanas que afetam o sistema nervoso, como a doença de Alzheimer e a DP<sup>(41)</sup>.

Uma via potencial de estudos envolvendo a descoberta de fármacos é a escolha de organismos-modelo na área genética, como a *Drosophila melanogaster*. A similaridade entre o mecanismo de ação da droga, o comportamento e a resposta genética em *Drosophila melanogaster* e em mamíferos fazem dessa mosca um sistema atrativo para o estudo dos processos neurofarmacológicos relevantes às doenças humanas<sup>(42)</sup>.

Apesar de possuir uma distribuição de neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso central de forma diferenciada do sistema nervoso de vertebrados, a *Drosophila melanogaster* demonstra conservação de muitos recursos celulares e moleculares de desenvolvimento e função neuronal. Como prova disso, o sequenciamento do genoma do referido animal revelou a homologia de cinco dos seis genes relacionados à DP em humanos<sup>(43)</sup>.

Mutações dominantes nos genes  $\alpha$ -Sinucleína e *LRRK2/dardarin*, e mutações recessivas nos genes *Parkin*, *DJ-1* e *Pink1* têm sido associadas à forma familiar rara da DP. Desses cinco genes,  $\alpha$ -Sinucleína, *Parkin* e *DJ-1* estão sendo intensivamente estudados. Modelos animais *in vivo* e culturas celulares *in vitro* vinculam as mutações desses genes a prejuízos na estrutura e função mitocondrial e na resposta ao estresse oxidativo, reforçando o envolvimento da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo na patogênese da DP. Essas proteínas demonstram interagir com proteínas mitocondriais ou, até mesmo, estarem presentes na mitocôndria, sugerindo uma ação direta das mesmas na função mitocondrial<sup>(44)</sup>.

Em *Drosophila melanogaster*, a expressão de  $\alpha$ -Sinucleína humana é capaz de provocar perda de neurônios dopaminérgicos em moscas adultas, inclusões de

filamentos intraneuronais contendo  $\alpha$ -sinucleína e disfunção locomotora, remetendo às características essenciais da DP em humanos<sup>(45)</sup>.

*Drosophila melanogaster* com gene *Parkin* nulo exibe defeitos locomotores, os quais estão associados à degeneração apoptótica generalizada do tecido muscular, e patologias mitocondriais são as manifestações precoces da degeneração muscular. Além disso, vias de estresse oxidativo parecem exercer uma função direta na patogênese envolvendo o gene *Parkin*<sup>(46)</sup>. Esses mutantes também apresentam degeneração de neurônios dopaminérgicos em determinados *clusters* - pequenos agrupamentos dessas células no sistema nervoso da *Drosophila melanogaster* adulta - e significativa redução do conteúdo dopaminérgico no encéfalo<sup>(43)</sup>. Ademais, *Drosophila melanogaster* com gene *Parkin* mutante possui uma sensibilidade aumentada à toxicidade do paraquat, quando exposta ao meio alimentar contendo o herbicida<sup>(47)</sup>.

O gene *DJ-1a* em *Drosophila melanogaster*, homólogo do gene *DJ-1* humano, exerce papel importante na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção neuronal. A inibição da função do *DJ-1a* resulta em acúmulo celular de ERO, hipersensibilidade do organismo ao estresse oxidativo e disfunção e degeneração de neurônios dopaminérgicos e fotorreceptores<sup>(48)</sup>. Além disso, foi demonstrado que mutantes *DJ-1b* (outro homólogo do gene humano *DJ-1*) apresentam elevada sensibilidade ao paraquat, apresentando uma redução na habilidade de escalada em relação às moscas selvagens também expostas ao herbicida<sup>(49)</sup>.

O estudo de Lee e cols (2008) demonstrou que o aumento das concentrações de paraquat em meios de cultivo de *Drosophila melanogaster* apresenta uma correlação negativa com a expressão do gene *Parkin*, relacionado à DP.

Além desses dados, a exposição de *Drosophila melanogaster* ao paraquat é capaz de reduzir os índices de sobrevivência e prejudicar a atividade locomotora em

animais adultos<sup>(51)</sup>, além de induzir à perda seletiva de *clusters* de neurônios dopaminérgicos e gerar alterações motoras como tremores de repouso, bradicinesia, comportamentos rotacionais e instabilidade postural, mimetizando certas características comportamentais associadas à DP<sup>(52)</sup>.

### 1.1.3. *Drosophila melanogaster* e canais de cálcio voltagem-dependentes

Os insetos possuem um menor repertório de CCVD, se comparados aos vertebrados. A mosca das frutas *Drosophila melanogaster* possui apenas um único gene ortólogo de cada uma das subunidades Ca<sub>v</sub> 1, Ca<sub>v</sub> 2 e Ca<sub>v</sub> 3 de vertebrados, o que sugeriu a classificação genética dos CCVD em *Drosophila melanogaster* como Dmca1D (~ subunidade Ca<sub>v</sub> 1), Dmca1A (~ subunidade Ca<sub>v</sub> 2) e Ca- $\alpha_{1T}$  (~ subunidade Ca<sub>v</sub> 3), pertencentes às subunidades  $\alpha_1$  de *Drosophila melanogaster*. Apesar dessa classificação, a porcentagem de identidade entre as subunidades Ca<sub>v</sub>  $\alpha_1$  codificadas nos genomas humanos e do referido animal não excedem 68%<sup>(25)</sup>.

A classificação Dmca1D em *Drosophila melanogaster* designa canais de cálcio tipo D com subunidades  $\alpha_1$ , devido à similaridade sequencial à expressão gênica de canais de cálcio tipo D em cérebros de ratos<sup>(53)</sup>. Em *Drosophila melanogaster*, esses canais possuem um percentual de identidade de 66% com os canais de cálcio tipo-L Ca<sub>v</sub> 1.3 de humanos<sup>(25)</sup>.

Sabe-se que as correntes tipo-L em mamíferos são bloqueadas pelas três maiores classes de ligantes de canais tipo-L, as diidropiridinas, as fenilalquilaminas e as benzotiazepinas. Entretanto, a potência desses antagonistas em bloquear correntes de cálcio em invertebrados é menor<sup>(54)</sup>.

Embora os canais de cálcio em *Drosophila melanogaster* apresentem uma diversidade molecular via *splicing* alternativo, subunidades de multigenes codificados e montagem diferencial dos tipos de subunidades, as sensibilidades farmacológicas dos canais às diidropiridinas e fenilalquilaminas são conferidas pela subunidade  $\alpha_1$ , e dois genes de subunidade  $\alpha_1$  de canais de cálcio, Dmca1A e Dmca1D, têm sido clonados e investigados funcionalmente<sup>(55)</sup>.

Por ser parcialmente homólogo aos canais de cálcio tipo-L em vertebrados, a expressão de Dmca1D é responsável por correntes sensíveis às diidropiridinas, amplamente registradas no sistema nervoso embrionário e em fibras musculares de larvas de *Drosophila melanogaster* e, em adultos, nos músculos da perna. Dmca1D e Dmca1A são aparentemente essenciais, já que mutações importantes de perda de função em um desses genes causam morte embrionária<sup>(56,57)</sup>.

Além de atuar na contração muscular (ou em sua modulação neuronal), a expressão de Dmca1D parece ser requerida em outras funções, como a realização de movimentos de incubação pela larva, enchimento de gás na traquéia através de esforço metabólico ou de movimento físico, e modulação da contração do coração e das vísceras<sup>(58)</sup>.

Junto a esses dados, foi evidenciada a expressão preferencial de Dmca1D no desenvolvimento larval e também no sistema nervoso adulto de *Drosophila melanogaster*<sup>(55)</sup>. Demonstrou-se também, através de análises eletrofisiológicas, que a expressão de Dmca1D atua com uma contribuição majoritária em correntes de CCVD pertencentes aos processos dendríticos de motoneurônios, tornando-o, portanto, alvo preferencial para o bloqueio de correntes de cálcio<sup>(57)</sup>.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

Analisar a atividade motora de *Drosophila melanogaster* selvagem da linhagem *Canton-S* exposta ao paraquat (ion 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto, Gramoxone<sup>®</sup> 200, Syngenta, Brasil), avaliando as possíveis melhorias funcionais de três bloqueadores de canais de cálcio - isradipina (Lomir<sup>®</sup>, Novartis, Brasil), nifedipina (Adalat Retard<sup>®</sup>, Bayer, Brasil) e nimodipina (Nimotop<sup>®</sup>, Bayer, Brasil) - e do resveratrol nesse modelo experimental.

### 1.2.2. Objetivos específicos

Analisar o comportamento motor, por meio do ensaio locomotor simples, no 22º dia de vida adulta de moscas machos e fêmeas dos seguintes grupos experimentais: 1-Controle; 2-PQ; 3-Isradipina; 4-Nifedipina; 5-Nimodipina; 6-Resveratrol; 7-Etanol; 8-Isradipina+PQ; 9-Nifedipina+PQ; 10-Nimodipina+PQ; 11-Resveratrol+PQ; 12-Etanol+PQ.



## 2. CAPÍTULO 2

### 2.1. ARTIGO

**The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster* - a locomotor analysis**

Submetido ao periódico: Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology

**The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster* - A locomotor analysis**

Pamela Brambilla Bagatini<sup>1</sup>, Lisiani Saur<sup>1</sup>, Mariana Freitas Rodrigues<sup>1</sup>, Guilherme Cardoso Bernardino<sup>1</sup>, Mariana Fontoura Paim<sup>1</sup>, Pâmela Sachs Nique<sup>1</sup>, Ismael Pacheco<sup>1</sup>, Raquel Mattos de Oliveira<sup>1</sup>, Helena Schirmer<sup>3</sup>, André Arigony Souto<sup>3</sup>, Mônica Ryff Moreira Roca Vianna<sup>2</sup>, Léder Leal Xavier<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e <sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências. <sup>3</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Léder Leal Xavier, PhD

E-mail address: llxavier@pucrs.br

Phone : 55 51 33203545 Fax: 55 51 33203612

Address: Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

## ABSTRACT

Studies have suggested that neuronal loss in Parkinson's disease (PD) could be related to the pacemaker activity of the substantia *nigra pars compacta* generated by L-type Ca<sub>v</sub>1.3 calcium channels, which progressively substitute voltage-dependent sodium channels in this region during aging. Besides this mechanism, which leads to increases in intracellular calcium, other factors are also known to play a role in dopaminergic cell death due to overproduction of reactive oxygen species. Thus, dihydropyridines, a class of calcium channel blockers, and resveratrol, a polyphenol that presents antioxidant properties, may represent therapeutic alternatives for the prevention of PD. In the present study we tested the effects of the dihydropyridines isradipine, nifedipine and nimodipine and of resveratrol upon locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. As previously described, paraquat induced parkinsonian-like motor deficits. Moreover, none of the drugs tested were able to prevent the motor deficits produced by paraquat. Additionally, isradipine, nifedipine, resveratrol and ethanol (vehicle), when used in isolation, induced motor deficits in flies. This study is the first demonstration that dihydropyridines and resveratrol are unable to reverse the locomotor impairments induced by paraquat in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: Dihydropyridines, *Drosophila melanogaster*, Paraquat, Parkinson's disease, Resveratrol, Voltage-dependent calcium channels.

## 1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is primarily characterized by motor symptoms including bradikinesia, akinesia and tremor. PD patients present neuronal loss in different brain areas, mainly in the substantia *nigra pars compacta* (SNpc) and, to a lesser degree, in the ventral tegmental area (VTA) and retrorubral field (Halliday et al., 1996; Dauer and Przedborski, 2003).

Recently, it has been suggested that the neuronal loss related to PD could be associated to SNpc neurons' pacemaker activity generated mainly by L-type voltage-dependent calcium channels (VDCC), which substitute voltage-dependent sodium channels, in this region, during aging (Chan et al., 2007). In the VTA, a dopaminergic brain region damaged to a lesser extent in PD (Damier et al., 1999), the pacemaker activity is continuously generated by sodium channels, suggesting VDCC activity may have a causal role in the neuronal loss seen in PD (Chan et al., 2007; Sulzer and Schmitz, 2007).

Increases in intracellular calcium are known to play an important role in neuronal death, mainly by inducing dysfunctions in mitochondrial function and reactive oxygen species (ROS) production; protein synthesis, folding and proteasomal degradation and transcriptional regulation in the nucleus (Mattson, 2007; Chan et al., 2009).

High levels of VDCC Ca<sub>v</sub> 1.3 subunit mRNA are present in the dopaminergic neurons of the SNpc, suggesting that this subunit may be related to neuronal death in PD (Chan et al., 2007). Importantly, patients treated for hypertension with dihydropyridines exhibited a lower than expected incidence of PD when compared with patients not treated with calcium channel blockers (Rodnitzky, 1999). Thus, it is possible that calcium channel blockers, particularly the dihydropyridines that have the

capacity to cross the blood brain barrier, could be used as preventive and neuroprotective agents against PD (Farkas et al., 2001; Surmeier et al., 2007).

Similarly, drugs that reduce ROS generation, such as resveratrol, can provide some degree of neuroprotection in PD, probably due to their ability to reduce oxidative damage to macromolecules, including proteins, nucleic acids and polyunsaturated fatty acids, which are responsible for plasma membrane integrity (Sun et al., 2008; Marambaud et al., 2009). Factors such as gene mutations and exposure to herbicides are related to free-radical-mediated damage in the SNpc, contributing to the development of PD (Schapira, 2009).

Resveratrol is a polyphenol found in red grapes, among other plants, to which the benefits from wine consumption have been attributed. Resveratrol presents antioxidant properties that are related to the activation of Sir2 enzymes, a family of protein deacetylases that are NAD<sup>+</sup>-dependent, also called sirtuins, whose homolog in mammals is known as SIRT. These enzymes are important for many cellular processes including gene silencing, regulation of p53, fatty acid metabolism, cell cycle regulation and extension of longevity (Yang et al., 2007; Sun et al., 2010).

Furthermore, a recent study has shown that resveratrol promotes neuronal survival in a rat model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), with enhancement in the content of dopamine and its metabolite DOPAC, tyrosine hydroxylase (TH) expression and improvement in motor behavior (Khan et al., 2010). Thus, resveratrol could also be considered as a therapeutic candidate for PD treatment or prevention.

A number of animal models have been employed in order to better understand the mechanisms involved in PD, including primates (Decamp and Schneider, 2009), rodents (Lindgren et al., 2010) and *Drosophila melanogaster* (Bayersdorfer et al., 2010). These models are mainly based on the neurotoxic induction of PD-like

symptoms using different agents, such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) (Xu et al., 2010), 6-OHDA (Chuang et al., 2010), rotenone (Hu et al., 2010) and paraquat (Dinis-Oliveira et al., 2006; Jimenez-Del-Rio et al., 2008).

*Drosophila melanogaster* is considered one of the most suitable organisms to evaluate PD and other neurological dysfunctions for several reasons, such as: 1- Rapid generation time (Botella et al., 2009); 2- A well described nervous system (Ito and Awasaki, 2008); 3- Similarities between the cellular and molecular mechanisms of *Drosophila melanogaster* neurons and those of vertebrates (Nichols, 2006; Whitworth et al., 2006); 4- Similarities, in terms of motor behavior, between the parkinsonism induced in flies and PD in humans (when flies with parkinsonism induced by neurotoxic agents, as paraquat, are compared with PD patients, for example, flies also present bradikinesia that can be easily estimated using very simple locomotor assays) (Chaudhuri et al., 2007); 5- Homologies in genes related to PD in humans (Whitworth et al., 2006; Botella et al., 2009); 6- Significant homologies between the *Drosophila melanogaster* and human calcium channels, for example, in *Drosophila melanogaster*, the  $Ca_v$  1 subunit, designated as Dmca1D, has a percentage identity of 66% with the  $Ca_v$  1.3 subunit of humans (King, 2007).

The aim of the present study was evaluate the effects of chronic exposure to three different dihydropyridines - isradipine, nifedipine and nimodipine - and resveratrol upon the motor behavior of *Drosophila melanogaster* with paraquat-induced parkinsonism.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Drosophila strain and culture maintenance

A total of 1440 flies wild-type *Canton-S Drosophila melanogaster* (from Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University, USA) were used, including 480 in pilot studies to determine the paraquat dose to be used, and 960 in the behavioral screenings. They were maintained at 25°C on a 12 hours light/dark cycle, under 60-70% humidity, in bottles containing standard medium prepared with 10g agar, 10g methylparaben (to prevent fungal growth), 100g of rye flour, 50g of brown sugar, 1L of water and dried yeast.

### 2.2. Experimental groups

An initial study was performed in order to establish a sub lethal dose of paraquat capable of significantly reducing the flies' locomotion to be used in the following analyzes. Doses of 2.0mM, 7.5mM, 10mM and 15mM of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion (Syngenta, Brazil)) were tested in animals from the 14<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> days of life. Control group animals received normal medium for the equivalent period. This experiment was performed using 14-day old male flies, day one being considered the day of pupae eclosion, and the survival rate and locomotion were evaluated 48 hours after.

Experimental groups for the main experiment are depicted in Table 1. Each experimental group consisted of 80 flies from both genders (40 males and 40 females).

### 2.3. Experimental procedures

The dihydropyridines, isradipine (Novartis, Brazil), nifedipine (Bayer, Brazil) and nimodipine (Bayer, Brazil) were purchased from commercial sources. Resveratrol (*trans*-3, 4', 5-trihydroxystilbene, extracted from *Polygonum cuspidatum*) was purchased from Chengdu Hawk Bio-Engineering (Beijing, China) and presented > 99% of purity (confirmed by High Performance Liquid Chromatography), as previously described (Souto et al., 2001).

Treatments were performed by adding drugs to the cooked medium of the corresponding group, at a final concentration of 1mM. The choice of these doses was based in similar studies (Pendleton et al., 2002; Bass et al., 2007).

The flies treated with paraquat received a dose of 10mM of the herbicide during a 48 hour period between the 14th and 16th days of life. The groups, paraquat + dihydropyridines, paraquat + resveratrol and paraquat + ethanol (vehicle of resveratrol) were treated with the corresponding drug or vehicle during the period of paraquat exposure (Chaudhuri et al., 2007) (Table 1).

### 2.4. Locomotor assay

Adult flies were separated by sex under cryoanesthesia for 5 minutes. Locomotor tests were conducted in the morning (between 9 and 12 p.m.), in a room with controlled temperature (25°C) and humidity (60-70%).

On the 22<sup>nd</sup> day of life, the flies were submitted to a locomotor evaluation according to Neckameyer and Matsuo (2008), with slight modifications as follows. A single fly was placed into an empty 60mm Petri dish marked with a grid of 1cm squares, allowed to recover for 30 s, after which the locomotor activity was observed



for the first 2 and last 2 minutes of a 10 minutes period. The locomotion observed in the first period was considered exploratory; while that in the second was considered basal locomotion, since 6 – 8 minutes was considered sufficient time for the flies to become accustomed to the environment (Neckameyer and Matsuo, 2008). The number of grid lines crossed during each observation period was recorded by an observer. In this environment, the flies are unable to fly, so the number grid lines crossed represents a measure of locomotor activity. The chambers were wiped clean and exposed to air after use in order to minimize any pheromonal or waste products that might affect subsequently tested flies behavior.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test, using SPSS11.0 software.

## 3. RESULTS

Results from the initial study performed to determine the paraquat dose to be used in the subsequent analyses (Figure 1) confirmed paraquat's impact on the animals' survival and locomotion during both exploratory and basal activity periods (Girardot et al., 2004; Neckameyer and Matsuo, 2008).

When given between the 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> days of life, paraquat significantly affected survival in a dose dependent manner (Figure 1a). While paraquat at 15mM caused 100% lethality, 10mM, 7.5mM and 2mM caused 95.7%, 70% and 19.6%, respectively. In the locomotor assay, the performance of flies from these three groups (2mM, 7.5mM and 10mM) revealed a significant reduction in the basal

locomotor activity when compared with the control group (Fig 1c). However, only flies exposed to 10mM of paraquat presented a significant decrease in exploratory locomotion (Fig 1b). Thus, the final concentration of paraquat selected in our study was 10mM, because it was the most toxic sub-lethal dose, capable of inducing deficits in basal and exploratory locomotion in our flies.

Interestingly, when control males and females were compared in the locomotor assays, a significant decrease was revealed in the exploratory and basal locomotion in females ( $p < 0.01$ ) (Figure 2a and 2b).

When analyzing the locomotor performance of the dihydropyridine groups composed of male flies, a decrease was observed in exploratory activity in the groups PQ ( $p < 0.001$ ), Isr ( $p < 0.01$ ), Isr + PQ ( $p < 0.001$ ), Nif + PQ ( $p < 0.01$ ) and Nim + PQ ( $p < 0.01$ ) when compared with the control group (Fig 3a). Observing basal locomotion in males, there was a significant decrease in the following groups: PQ ( $p < 0.01$ ), Isr ( $p < 0.001$ ) and Nif ( $p < 0.05$ ) (Fig 3b). In females, the exploratory and basal locomotion were unaffected when compared with control (Fig 3c and 3d).

The locomotor performance of male groups related to resveratrol and ethanol treatments showed a significant decrease in exploratory locomotion of the groups PQ 10mM ( $p < 0.001$ ), resveratrol ( $p < 0.05$ ), ethanol ( $p < 0.001$ ), resveratrol + PQ ( $p < 0.001$ ) and ethanol + PQ ( $p < 0.001$ ), when compared to the control group (Figure 3a). In relation to the basal locomotion of males, only the groups PQ 10mM ( $p < 0.01$ ) and ethanol + PQ ( $p < 0.001$ ) revealed a reduced locomotor index, when compared with the control group (Figure 3b). In females, the exploratory and basal locomotion were unaffected when compared with control (Fig 3c and 3d).

#### 4. DISCUSSION

In our study, paraquat doses of 2mM, 7.5mM, 10mM and 15mM were found to be significantly lethal (Figure 1a). This finding is similar to the results described by Girardot and coworkers (2004) and Chaudhuri and coworkers (2007). The dose of paraquat used in our study to induce a significant deficit in both exploratory and basal locomotion (10mM) (Figure 1b and 1c) was similar to those used in other studies (Girardot et al., 2004; Chaudhuri et al., 2007). However, we found a 100% lethality at the 15mM paraquat dose, while previous studies have been performed using higher concentrations of paraquat, such as 20mM, in the same *Drosophila melanogaster* strain, *Canton-S*, and failed to observe such significant mortality (Jimenez-Del-Rio et al., 2008, 2010). We believe that the discrepancy between the lethal dose of paraquat found in our study and those used in other related studies probably originates in the different administration methods used. In the other studies, paraquat was administrated using a filter paper saturated in paraquat; in our experiment, paraquat was dissolved in the medium (Jimenez-Del-Rio et al., 2008, 2010).

Our choice of drug administration was based on previous studies in which the drugs were dissolved in the standard medium, so increasing the exposure area of the drug and, consequently, the possibility of the flies coming into contact with the paraquat and other drugs is more homogeneous for all the animals maintained in the bottle and is not altered by the variations in motor behavior inherent to each fly (Pesah et al., 2004; Chaudhuri et al., 2007; Lee et al., 2008). In our dose-assessment study, we only used male flies. The rate of food ingestion is higher in female flies when compared with males, this is probably related to the higher metabolism of females required for ovipositing, and large body mass when compared with males (Jimenez-Del-Rio et al., 2008). Thus, females are more susceptible to

drugs mixed in the medium, for this reason we chose to use males in the dose-assessment study because the first dose capable of reducing locomotion in females would probably be ineffective in males.

Analyzing different patterns of locomotion between the genders in control flies, male flies were found to have higher levels of exploratory and basal locomotion (Figure 2a and 2b). This difference is well documented in previous studies which demonstrate that the average walking velocity is higher in males (Martin, 2004), while females present more periods of locomotor inactivity than males (Belgacem and Martin, 2002).

Analyzing the effects of dihydropyridines in the exploratory locomotion of males, we noticed that none of the drugs used (isradipine, nifedipine and nimodipine) were able to prevent the locomotor impairment produced by paraquat exposure (Figure 3a). Moreover, isradipine was found to reduce exploratory locomotion. This inhibitory effect of isradipine on spontaneous locomotor activity was previously described in mice with hyper-excitability induced by alcohol withdrawal (Watson and Little, 2002). Our data are also in accordance with a previous study in which the rotarod test was used to demonstrate isradipine was not able to inhibit akinesia generated by L-DOPA in rats (Rylander et al., 2009).

However, these results differ from those obtained in mice with parkinsonism produced by MPTP injection or a combination of MPTP and probenecid. In these animals, isradipine was able to reduce the MPTP-induced motor deficits (Chan et al., 2007; Meredith et al., 2008). Isradipine also prevents the dyskinesia induced by L-DOPA in rats with parkinsonism generated by 6-OHDA injection (Schuster et al., 2009). Regarding these studies and locomotor activity, it should be taken into account that none of them included a group treated only with isradipine (Chan et al.,

2007; Meredith et al., 2008; Schuster et al., 2009). Thus, the role of isradipine alone in locomotor activity in rodents cannot be evaluated in these studies.

Like isradipine, nifedipine was unable to prevent the deficit in the exploratory locomotion of males after paraquat administration (Figure 3a). Additionally, a decrease in basal locomotion could be observed in flies treated only with nifedipine (Figure 3b). In mice, this drug did not change locomotor activity (Sansone et al., 1995). Nifedipine was previously tested in *Drosophila melanogaster* larvae and was shown to be unable to block the calcium inflow mediated by VDCC (Worrell and Levine, 2008), but was able to reduce the contractility mediated by *DPKQDFMRamide*, so generating inhibition in the larval muscular tonus (Clark et al., 2008).

Nimodipine was also unable to revert the paraquat-induced deficits in exploratory locomotion of males and used alone this drug does not present any effect on either exploratory or basal locomotion (Fig 3a and 3b). Studies based on alcohol and nicotine withdrawal protocols show that nimodipine is able to reduce the resultant locomotor hyperactivity (Hart et al., 1996; Watson and Little, 2002). However, it is difficult compare the results from previous studies with those of the present study because studies showing the effects of nimodipine in non-treated animals are very scarce.

Analyzing the effects of resveratrol and ethanol in the exploratory locomotion of males, we noticed that none of the drugs used were able to prevent the locomotor impairment produced by paraquat exposure (Figure 4a). Furthermore, resveratrol and ethanol were found to reduce exploratory locomotion in this group. Similar findings were reported in a previous study that shows that doses of more than 200 $\mu$ M of resveratrol in *Canton-S Drosophila melanogaster* inhibits spontaneous locomotor activity when they are submitted to caloric restriction (Parashar and Rogina, 2009).

Likewise, another study showed that resveratrol is able to prevent diet induced obesity generated by a high fat diet in mice, and consequently reduce body weight. This decrease is probably generated by enhancement of the basal metabolism, because resveratrol in this case was unable to increase locomotion, but instead promoted a significant decrease in ambulatory locomotor activity as well as a tendency to decrease the number of rears in these mice (Lagouge et al., 2006).

On the other hand, it was demonstrated that resveratrol can provide a neuroprotective effect in 6-OHDA-induced PD in rats. In these animals, resveratrol also led to a significant improvement in motor coordination (Khan et al., 2010). Other evidence also suggests that resveratrol improves neuromuscular function, generating increases in muscle force and improving motor performance in the rotarod test (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006).

Our findings are also in contrast with the results found in flies that are used as a genetic model of PD (a transgenic  $\alpha$ -synuclein *Drosophila melanogaster*). In these flies, treatment with Regrapex-R - a botanical formulation comprised of extract of whole grape (*Vitis vinifera*) and *Polygonum cuspidatum* - shows increases in antioxidant activity and improvements in the locomotor functions of these animals (Long et al., 2009). Some technical considerations should be noted when comparing our study with that of Long and coworkers (2009). The first is that while both studies used *Drosophila melanogaster*, Long and coworkers (2009) used a transgenic type of fly; the second is they also employed a climbing assay to estimate the locomotor activity in flies. We tested this assay exhaustively in pilot studies, but unfortunately the results obtained using this protocol always presented high variability, a lower degree of reproducibility and unreliable results, at least in our experiments. Thus, we decided to use a new protocol, the simple locomotor assay (Neckameyer and Matsuo, 2008), which is currently one of the most widely used protocols for the

evaluation of locomotion in flies, mainly because it is very similar to the open field protocol used in rodents and presents less variability when compared with the climbing assay.

We agree that in future studies other doses of resveratrol should be tested to evaluate the effects of this substance in *Drosophila melanogaster* locomotor activity. Recent studies have shown that the effects of resveratrol are dose dependent, a study using dopaminergic culture cells exposed to paraquat and higher doses of resveratrol showed that this association presents a strong neurotoxic effect, increasing endoplasmic reticulum stress and caspase-mediated programmed cell death, while low doses of resveratrol do not present the same effects (Chinta et al., 2009). The choice of dose of resveratrol used in our study was based on a previous study that showed that it to be the highest safe dose that does not alter the lifespan in *Drosophila melanogaster* (Bass et al., 2007).

In conclusion, our study is the first to demonstrate that dihydropyridines and resveratrol are unable to reverse motor deficits induced by paraquat in *Drosophila melanogaster*. Additionally, we demonstrated that two of the tested dihydropyridines (isradipine and nifedipine), resveratrol and ethanol (vehicle of resveratrol) in the doses tested are responsible for locomotor impairments in flies while nimodipine alone did not alter locomotor behavior in flies.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 5. REFERENCES

1. Bass, T.M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D., Partridge, L., 2007. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 128, 546-552.
2. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., et al., 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444, 337-342.
3. Bayersdorfer, F., Voigt, A., Schneuwly, S., Botella, J.A., 2010. Dopamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* models of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* (Article in press).
4. Belgacem, Y.H., Martin, J.R., 2002. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 15154–15158.
5. Botella, J.A., Bayersdorfer F, Gmeiner F, Schneuwly S., 2009. Modelling Parkinson's disease in *Drosophila*. *Neuromolecular Med.* 11, 268-280.
6. Chan, C.S., Gertler, T.S., Surmeier, D.J., 2009. Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends. Neurosci.* 32, 249-256.



7. Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, R.C., Tkatch, T., Meredith, G.E., Surmeier, D.J., 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*. 447, 1081-1089.
8. Chaudhuri, A., Bowling, K., Funderburk, C., Lawal, H., Inamdar, A., Wang, Z., O'Donnel, J.M., 2007. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. *J. Neurosci.* 27, 2457-2467.
9. Chinta, S.J., Poksay, K.S., Kaundinya, G., Hart, M., Bredesen, D.E., Andersen, J.K., Rao, R.V., 2009. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death in dopaminergic cells: effect of resveratrol. *J. Mol. Neurosci.* 39, 157-168.
10. Chuang, C.S., Su, H.L., Cheng, F.C., Hsu, S.H., Chuang, C.F., Liu, C.S., 2010. Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Biomed. Sci.* 17, 9.
11. Clark, J., Milakovic, M., Cull, A., Klose, M.K., Mercier, A.J., 2008. Evidence for postsynaptic modulation of muscle contraction by a *Drosophila* neuropeptide. *Peptides*. 29, 1140-1149.
12. Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., Graybiel, A.M., 1999. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 122, 1437-1448.
13. Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39, 889-909.

14. Decamp, E., Schneider, J.S., 2009. Interaction between nicotinic and dopaminergic therapies on cognition in a chronic Parkinson model. *Brain. Res.* 1262, 109-114.
15. Dinis-Oliveira, R.J., Remião, F., Carmo, H., Duarte, J.A., Sánchez, N.A., Bastos, M.L., Carvalho, F., 2006. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *NeuroToxicology.* 27, 1110-1122.
16. Farkas, E., De Jong, G.I., Apró, E., Keuker, J.I.H., Luiten, P.G.M., 2001. Calcium antagonists decrease capillary wall damage in aging hypertensive rat brain. *Neurobiol. Aging.* 22, 299-309.
17. Girardot, F., Monnier, V., Tricoire, H., 2004. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult drosophila melanogaster. *BMC Genomics.* 5, 74.
18. Halliday, G.M., McRitchie, D.A., Cartwright, H.R., Pamphlett, R.S., Hely, M.A., Morris, J.G.L., 1996. Midbrain neuropathology in idiopathic Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. *J. Clin. Neurosci.* 3, 52-60.
19. Hart, C., Kisro, N.A., Robinson, S.L., Ksir, C., 1996. Effects of the calcium channel blocker nimodipine on nicotine-induced locomotion in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 128, 359-361.

20. Hu, L.F., Lu, M., Tiong, C.X., Dawe, G.S., Hu, G., Bian, J.S., 2010. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell*. 9, 135-146.
21. Ito, K., Awasaki, T., 2008. Clonal Unit Architecture of the Adult Fly Brain. In: Technau, G.M. (Ed.), *Brain Development in Drosophila melanogaster*, Springer series: Advances in Experimental Medicine and in Experimental Biology. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, New York, pp. 137-158.
22. Jimenez-Del-Rio, M., Daza-Restrepo, A., Velez-Pardo, C., 2008. The cannabinoid CP55,940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: implications in Parkinson's disease. *Neurosci. Research*. 61, 404-411.
23. Jimenez-Del-Rio, M., Guzman-Martinez, C., Velez-Pardo, C., 2010. The Effects of Polyphenols on Survival and Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster* Exposed to Iron and Paraquat. *Neurochem. Res*. 35, 227-238.
24. Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khan, M.B., Hoda, M.N., Khuwaja, G., Raza, S.S., Khan, A., Javed, H., Vaibhav, K., Islam, F., 2010. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 1328, 139-151.
25. King, G.F., 2007. Modulation of insect  $Ca_v$  channels by peptidic spider toxins. *Toxicon*. 49, 513-530.

26. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 127, 1109–1122.
27. Lee, H-S., Lee, K-S., Yu, K., Hong, S-Y., 2008. Expression of genes related to parkinson's disease after paraquat treatment in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 19-23.
28. Lindgren, H.S., Andersson, D.R., Lagerkvist, S., Nissbrandt, H., Cenci, M.A., 2010. L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. *J. Neurochem.* 112, 1465-1476.
29. Long, J., Gao, H., Sun, L., Liu, J., Zhao-Wilson, X., 2009. Grape extract protects mitochondria from oxidative damage and improves locomotor dysfunction and extends lifespan in a *Drosophila* Parkinson's disease model. *Rejuvenation Res.* 12, 321-331.
30. Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V., 2009. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 4, 20.
31. Martin, J.R., 2004. A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behav. Processes.* 67, 207-219.

32. Mattson, M.P., 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*. 6, 337-350.
33. Meredith, G.E., Totterdell, S., Potashkin, J.A., Surmeier, D.J., 2008. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat. Disord.* 14, S112–S115.
34. Neckameyer, W.S., Matsuo, H., 2008. Distinct neural circuits reflect sex, sexual maturity, and reproductive status in response to stress in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*. 156, 841-856.
35. Nichols, C.D., 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 112, 677-700.
36. Parashar, V., Rogina, B., 2009. dSir2 mediates de increased spontaneous physical activity in flies on calorie restriction. *Aging*. 1, 529-541.
37. Pendleton, R.G., Parvez, F., Sayed, M., Hillman, R., 2002. Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 91-96.
38. Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M., Bellen, H., Mardon, G., 2004. *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development*. 131, 2183-2194.

39. Rodnitzky, R.L., 1999. Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs*. 57, 845–849.
40. Rylander, D., Recchia, A., Mela, F., Dekundy, A., Danysz, W., Cenci, M.A., 2009. Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia: effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 227-235.
41. Sansone, M., Battaglia, M., Pavone, F., 1995. Enhancement by nifedipine of cholinergic-induced depression of locomotor activity in mice. *Funct. Neurol.* 10, 163-167.
42. Schapira, A.H.V., 2009. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 41-47.
43. Schuster, S., Doudnikoff, E., Rylander, D., Berthet, A., Aubert, I., Ittrich, C., Bloch, B., Cenci, M.A., Surmeier, D.J., Hengerer, B., Bezard, E., 2009. Antagonizing L-type Ca<sup>2+</sup> channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol. Psychiatry.* 65, 518-526.
44. Souto, A.A., Carneiro, M.C., Seferin, M., Senna, M.J.H., Conz, A., Gobbi, K., 2001. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *J. Food Compost. Anal.* 14, 441-445.

45. Sulzer, D., Schmitz, Y., 2007. Parkinson's disease: return of an old prime suspect. *Neuron*. 55, 8-10.
46. Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A., Sun, G.Y., 2008. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* 10, 259–274.
47. Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A., Sun, G.Y., 2010. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 41, 375-383.
48. Surmeier, D.J., 2007. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 6, 933-938.
49. Watson, W.P., Little, H.J., 2002. Selectivity of the protective effects of dihydropyridine calcium channel antagonists against the ethanol withdrawal syndrome. *Brain Res.* 930, 111-122.
50. Whitworth, A.J., Wes, P.D., Pallanck, L.J., 2006. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov. Today.* 11, 119-126.
51. Worrell, J.W., Levine, R.B., 2008. Characterization of voltage-dependent Ca<sup>2</sup> currents in identified *Drosophila* motoneurons in situ. *J. Neurophysiol.* 100, 868–878.
52. Xu, K., Xu, Y.H., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., 2010. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 167, 475-481.

53. Yang, H., Baur, J.A., Chen, A., Miller, C., Adams, J.K., Kisielewski, A., Howitz, K.T., Zipkin, R.E., Sinclair, D.A., 2007. Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan. *Aging Cell.* 6, 35-43.



## LEGENDS

Table 1. Table showing the different treatments that flies were submitted to in the main experiment. The concentrations presented (1mM for dihydropyridines, ethanol and resveratrol, and 10mM for paraquat) were the final concentrations of drugs in the medium. The first day of life of flies was considered the day of eclosion from pupae. 40 males and 40 females were used in each experimental group (960 flies in total).

Figure 1. a) Percentage of surviving flies exposed to four different concentrations of paraquat (2mM, 7.5mM, 10mM and 15mM) during 48 hours. b) Exploratory locomotion index of the dose-assessment study with control and surviving male flies exposed to three different concentrations of paraquat (2mM, 7.5mM and 10mM) during 48 hours. c) Basal locomotion index of the dose-assessment study with control and surviving male flies exposed to three different concentrations of paraquat (2mM, 7.5mM and 10mM) during 48 hours. (Mean  $\pm$  SE).

Figure 2. a) Comparison of exploratory locomotion index between control males and control females. b) Comparison of basal locomotion index between control males and control females. (Mean  $\pm$  SE). \*\*  $p < 0.01$ .

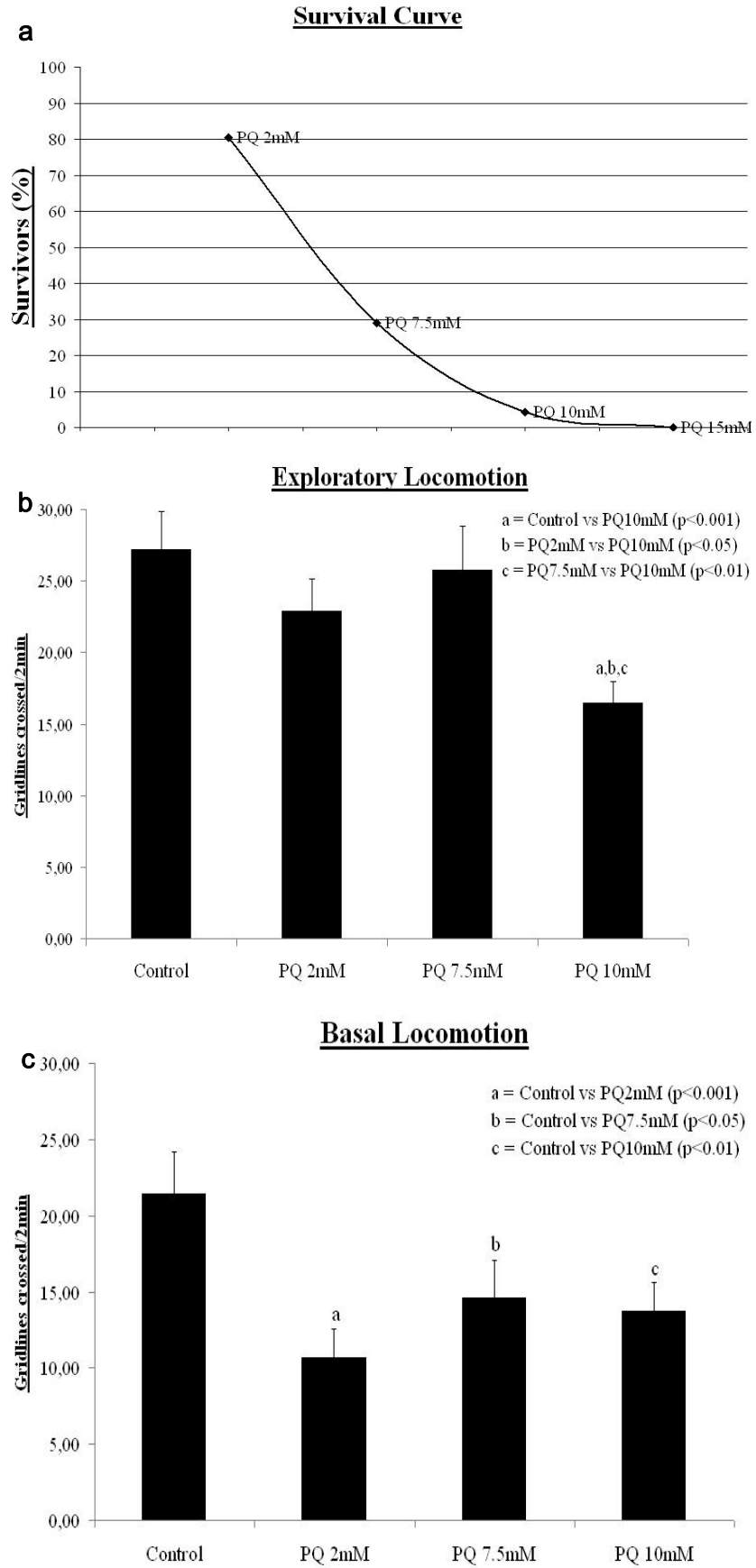
Figure 3. Treatment with Dihydropyridines. a) Exploratory locomotion index of experimental groups of males. b) Basal locomotion index of experimental groups of males. c) Exploratory locomotion index of experimental groups of females. d) Basal locomotion index of experimental groups of females. (Mean  $\pm$  SE).

Figure 4. Resveratrol and Ethanol Treatments. a) Exploratory locomotion index of experimental groups of males. b) Basal locomotion index of experimental groups of males. c) Exploratory locomotion index of experimental groups of females. d) Basal locomotion index of experimental groups of females. Note: Control and Paraquat groups are the same as those presented in figure 3. (Mean  $\pm$  SE).

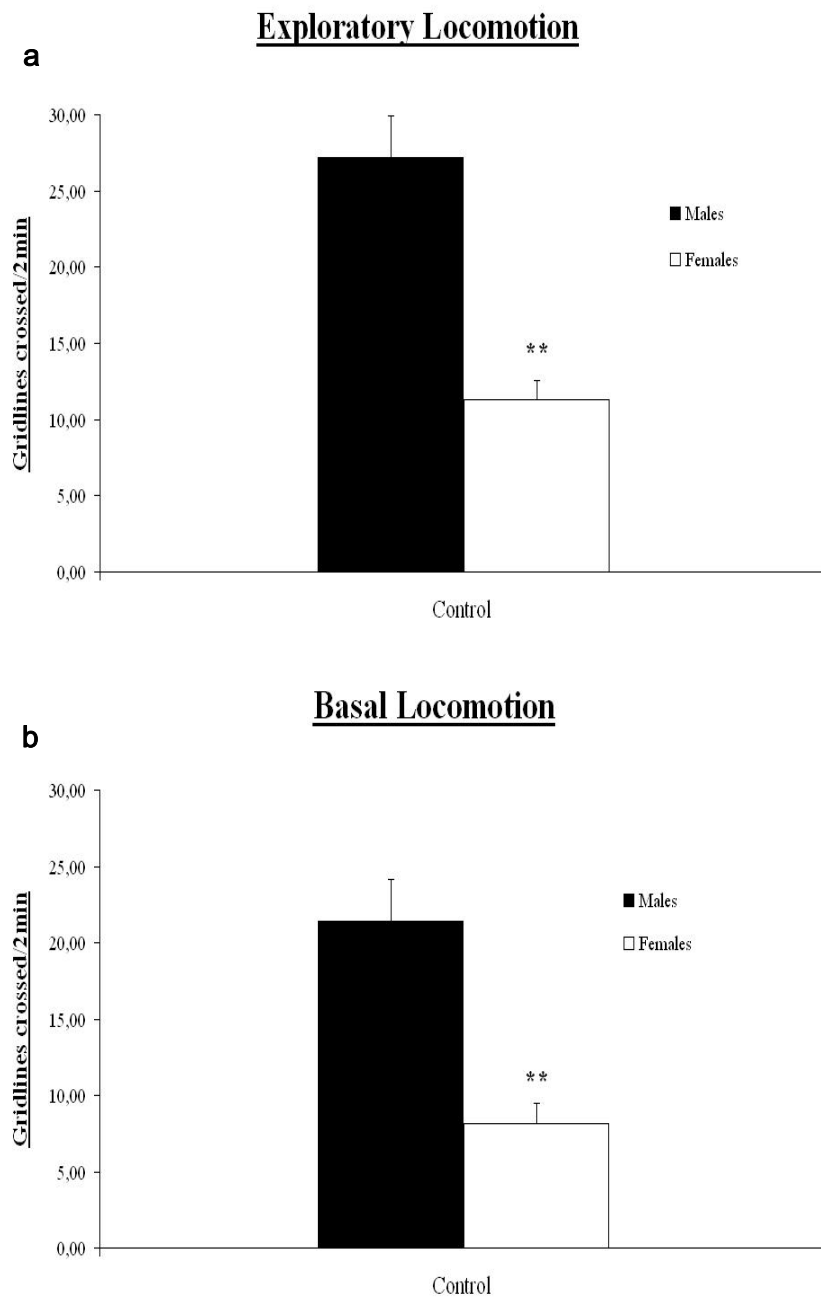
**TABLE 1**

Experimental Groups	Dihydropyridine Treatments (1mM – 7 <sup>th</sup> to 22 <sup>nd</sup> days)			Ethanol Treatment (1mM – 7 <sup>th</sup> to 22 <sup>nd</sup> days)	Resveratrol Treatment (1mM – 7 <sup>th</sup> to 22 <sup>nd</sup> days)	Paraquat Treatment (10mM – 14 <sup>th</sup> to 16 <sup>th</sup> days)
	Isradipine	Nifedipine	Nimodipine			
Control						
Paraquat (PQ)						X
Isradipine (Isr)	X					
Nifedipine (Nif)		X				
Nimodipine (Nim)			X			
Ethanol (vehicle of resveratrol)				X		
Resveratrol					X	
Isradipine + Paraquat (Isr + PQ)	X					X
Nifedipine + Paraquat (Nif + PQ)		X				X
Nimodipine + Paraquat (Nim + PQ)			X			X
Ethanol + Paraquat (PQ)				X		X
Resveratrol + Paraquat (PQ)					X	X

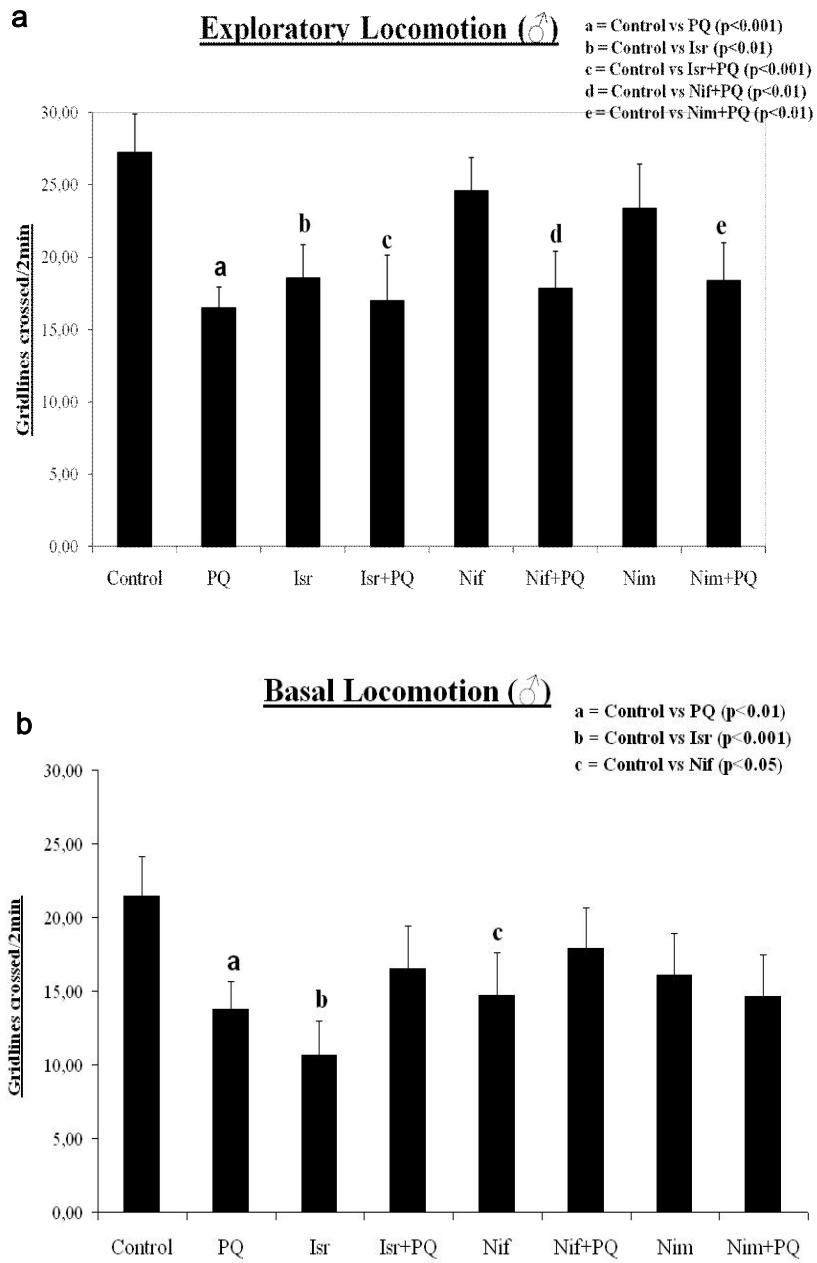
**FIGURE 1**



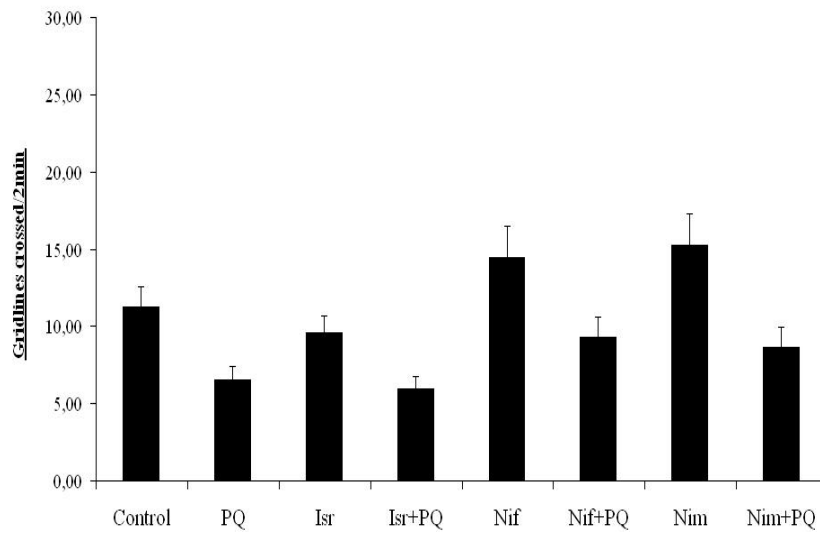
**FIGURE 2**



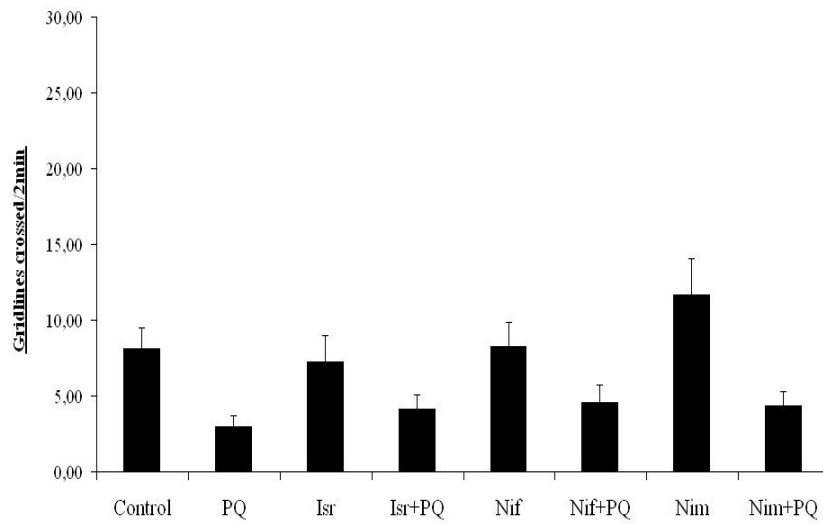
**FIGURE 3**



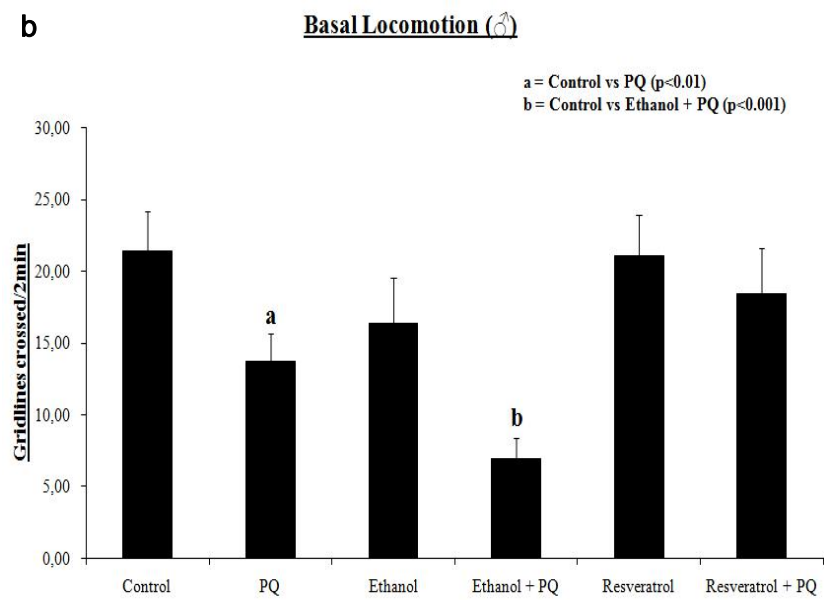
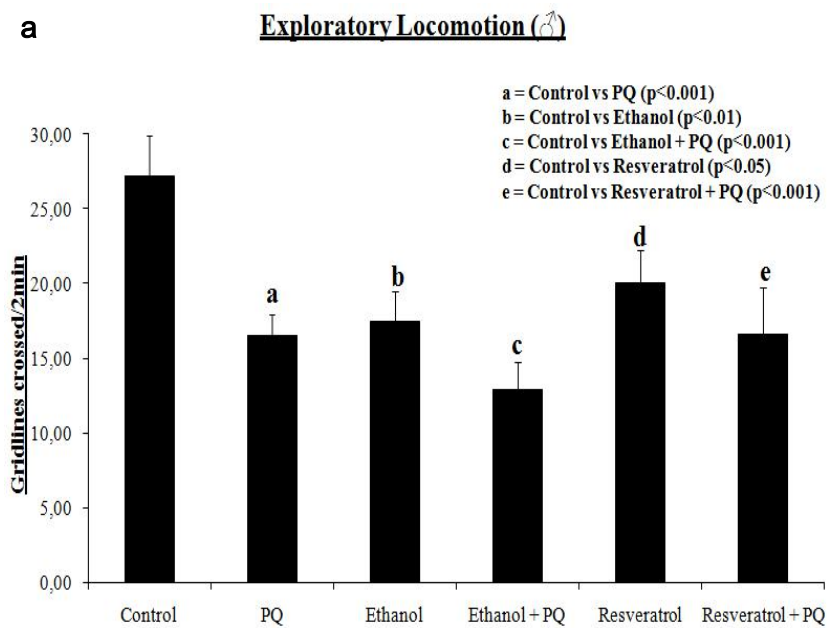
**c** Exploratory Locomotion (♀)



**d** Basal Locomotion (♀)

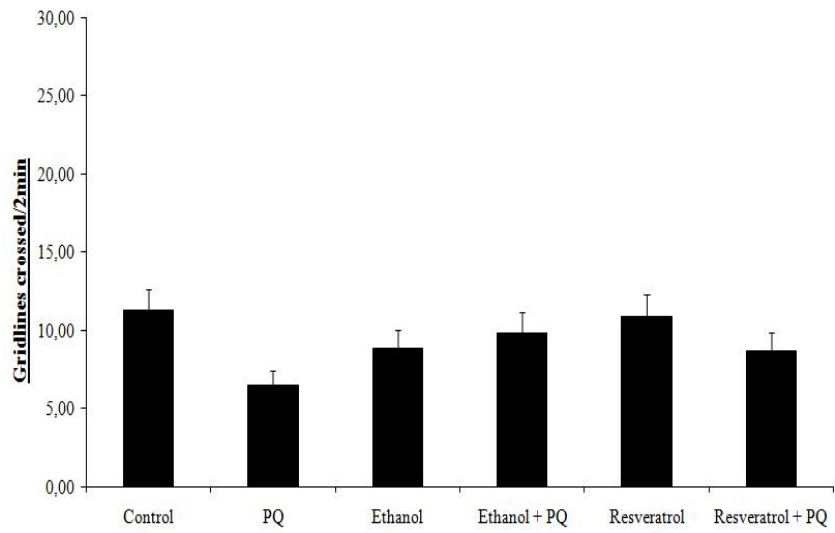


**FIGURE 4**

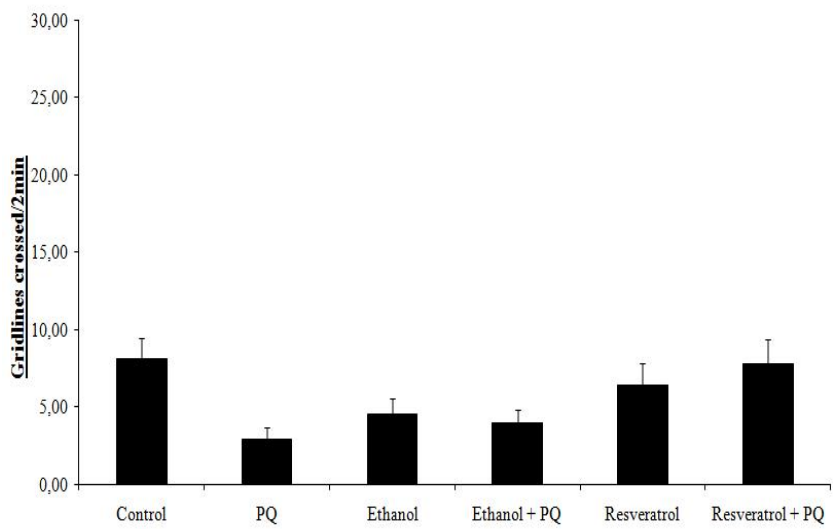




**c** Exploratory Locomotion (♀)



**d** Basal Locomotion (♀)



### 3. CAPÍTULO 3

### 3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relação entre a exposição ao PQ e o desenvolvimento de parkinsonismo é relevante no estudo das causas e possíveis tratamentos relacionados à DP. Devido ao baixo custo, rápida ação e características ambientais, o PQ é um dos herbicidas mais empregados mundialmente. A exposição crônica ao PQ vem sendo sugerida em alguns estudos como fator etiológico da DP, já que em estudos com animais ele demonstra ação tóxica em neurônios dopaminérgicos, além de promover acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína e aumento do estresse oxidativo<sup>(59,60,61)</sup>.

O protocolo de indução de parkinsonismo em *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido a partir de testes-piloto anteriores à execução dos tratamentos experimentais. As concentrações de PQ testadas - 2mM, 7.5mM, 10mM e 15mM - mostraram efeitos tóxicos dose-dependentes, ou seja, a menor dose testada demonstrou o maior índice de sobrevivência, enquanto que a concentração de 15mM foi capaz de promover 100% de letalidade. Em relação ao comportamento motor, a concentração final de 10mM de PQ foi selecionada como a dose sub-letal mais adequada, por ser a única dose capaz de diminuir significativamente as locomoções exploratória e basal de moscas machos submetidas ao ensaio locomotor simples.

A exposição de *Drosophila melanogaster* à concentração de 10mM de PQ durante 16 horas demonstra efeito neurotóxico em células dopaminérgicas<sup>(62)</sup>, sustentando os achados do presente estudo - que evidenciou alterações motoras significativas no referido modelo experimental - e os achados do estudo de Chaudhuri e cols (2007), que associou a exposição ao PQ à perda de neurônios dopaminérgicos e ao déficit locomotor em *Drosophila melanogaster*.

Além desses dados, foi evidenciada uma relação gênero-dependente no comportamento motor de *Drosophila melanogaster*, avaliado através do ensaio locomotor simples. Moscas machos controle demonstraram níveis de locomoção exploratória e basal significativamente maiores que moscas fêmeas controle, e esses achados estão relacionados aos de estudos prévios<sup>(63,64)</sup>.

Em relação aos tratamentos experimentais, a análise do comportamento motor - através do ensaio locomotor simples - dos grupos relacionados aos bloqueadores de canais de cálcio, demonstrou que nenhuma das diidropiridinas testadas (isradipina, nifedipina e nimodipina) foram capazes de reverter o déficit locomotor induzido pelo PQ em exemplares machos de *Drosophila melanogaster*, enquanto que, em moscas fêmeas, nenhuma diferença no comportamento motor foi evidenciada. Além disso, os tratamentos isolados com isradipina e nifedipina demonstraram efeitos inibitórios na atividade locomotora de moscas machos.

Da mesma forma, a análise do comportamento motor através do ensaio locomotor simples mostrou que o tratamento com resveratrol foi ineficaz, pois não reverteu a diminuição da atividade locomotora em exemplares machos de *Drosophila melanogaster* expostos ao PQ. Em moscas fêmeas, não foram observadas alterações no comportamento motor. Ademais, os tratamentos isolados com resveratrol e etanol (veículo do resveratrol) foram capazes de prejudicar a atividade locomotora de moscas machos.

Por fim, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que os tratamentos com diidropiridinas - isradipina, nifedipina e nimodipina - e resveratrol foram incapazes de inibir o déficit locomotor induzido pelo tratamento com PQ em machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster* da linhagem *Canton-S*. Desta forma, estudos adicionais envolvendo a aplicação de diferentes concentrações das drogas em questão, distintos protocolos de análise locomotora e avaliação da histofisiologia

dopaminérgica em *Drosophila melanogaster* são necessários, no intuito de demonstrar se, efetivamente, os tratamentos com diidropiridinas e resveratrol são incapazes de promover neuroproteção e melhoria do déficit locomotor neste modelo experimental da DP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*. 2010;39:156-161.
2. Yokoyama H, Kuroiwa H, Yano R, Araki T. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 2008;29:293-301.
3. Schapira AHV. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30:41-47.
4. Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Gjerstad MD, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2008;255:18-32.
5. Eriksen JL, Petrucelli, L. Parkinson's disease - molecular mechanisms of disease. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2004;1:399-405.
6. Allain H, Bentué-Ferrer D, Akwa Y. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2008;84:25-39.
7. Maguire-Zeiss KA.  $\alpha$ -Synuclein: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Pharmacol Res*. 2008;58:271-280.
8. Schapira AHV, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B *et al*. Novel Pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Disc*. 2006;5:845-854.
9. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*. 2010;16:653-661.
10. Watson GS, Leverenz JB. Profile of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain Pathol*. 2010;20:640-645.
11. Powers KM, Kay DM, Factor SA, Zabetian CP, Higgins DS, Samii A, Nutt JG, Griffith A, Leis B, Roberts JW, Martinez ED, Montimurro JS, Checkoway H, Payami H. Combined effects of smoking, coffee, and NSAIDs on Parkinson's disease risk. *Mov Disord*. 2008;23:88-95.

12. Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 2010;62:155-198.
13. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 1992;32:804–812.
14. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* 2008;10:259–274.
15. Vila M, Ramonet D, Perier C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. *J Neurochem.* 2008;107:317-328.
16. Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium.* 2010;47:175-182.
17. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JÁ, Sánchez NA, Bastos ML *et al.* Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *NeuroToxicology.* 2006;27:1110-1122.
18. Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 2010;17:1115-1125.
19. Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30:475-483.
20. Kuter K, Nowak P, Gołombiowska K, Ossowska K. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats. A comparison with peripheral tissues. *Neurochem Res.* 2010;35:1121-1130.
21. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston W, Cory-Slechta DA *et al.* Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002;10:119-127.
22. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39:889-909.

23. Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain. *J Biol Chem.* 2007;282:14186-14193.
24. Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick RC, Tkatch T *et al.* 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* 2007;447:1081-1089.
25. King GF. Modulation of insect Ca<sub>v</sub> channels by peptidic spider toxins. *Toxicol.* 2007;49:513–530.
26. Shepard PD, Stump D. Nifedipine blocks apamin-induced bursting activity in nigral dopamine-containing neurons. *Brain Res.* 1999;817:104–109.
27. Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ. A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010;25:S63-70.
28. Wilson CJ, Callaway JC. Coupled oscillator model of the dopaminergic neuron of the substantia nigra. *J Neurophysiol.* 2000;83:3084-3100.
29. Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2007;6:933-938.
30. Thadani U. Selective L-type, T-type, and nonspecific calcium-channel blockers for stable angina pectoris. *Am Heart J.* 2002;144:8-10.
31. Rodnitzky RL. Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs.* 1999;57:845–849.
32. Düzenli S, Bakuridze K, Gepdiremen A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicol In Vitro.* 2005;19:589-594.
33. Sulzer D, Schimtz Y. Parkinson's disease: return of an old prime suspect. *Neuron.* 2007;55:8-10.
34. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol.* 2006;545:51-64.



35. Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2125-2128.
36. Han SH. Potential role of sirtuin as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Clin Neurol.* 2009;5:120-115.
37. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2010;41:375–383.
38. Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:550-560.
39. Long, J., Gao, H., Sun, L., Liu, J., Zhao-Wilson, X., 2009. Grape extract protects mitochondria from oxidative damage and improves locomotor dysfunction and extends lifespan in a *Drosophila* Parkinson's disease model. *Rejuvenation Res.* 12, 321-331.
40. Lu KT, Ko MC, Chen BY, Huang JC, Hsieh CW, Lee MC *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. *J Agric Food Chem.* 2008;56:6910-6913.
41. Greenspan RJ, Dierick HA. 'Am not I a fly like thee?' From genes in fruit flies to behavior in humans. *Hum Mol Genet.* 2004;13:267-273.
42. Nichols CD. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol Ther.* 2006;112:677-700.
43. Whitworth AJ, Wes PD, Pallanck LJ. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov Today.* 2006;11:119-126.
44. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW *et al.* Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:10793–10798.
45. Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000;404:394-398.

46. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:4078–4083.
47. Pesah Y, Pham T, Burgess H, Middlebrooks B, Verstreken P, Zhou Y *et al.* *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. Development. 2004;131:2183-2194.
48. Yang YF, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang LC *et al.* Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:13670-13675.
49. Park J, Kim SY, Cha GH, Lee SB, Kim S, Chung J. *Drosophila melanogaster* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. Gene. 2005;361:133-139.
50. Lee H-S, Lee K-S, Yu K, Hong S-Y. Expression of genes related to parkinson's disease after paraquat treatment in *Drosophila melanogaster*. Pestic Biochem Physiol. 2008;92:19-23
51. 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. Neurosci Res. 2008;61:404–411.
52. Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, Lawal H, Inamdar A, Wang Z *et al.* Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. J Neurosci. 2007;27:2457-2467.
53. Zheng W, Feng G, Ren D, Eberl D, Hannan F, Dubald M *et al.* Cloning and Characterization of a Calcium Channel  $\alpha 1$  Subunit from *Drosophila melanogaster* with Similarity to the Rat Brain Type D Isoform. J Neurosci. 1995;15:1132-1143.
54. Jeziorski MC, Greenberg RM, Anderson PAV. The molecular biology of invertebrate voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. J Exp Biol. 2000;203:841–856.
55. MacPherson MR, Pollock VP, Broderick KE, Kean L, O'Connell FC, Dow AT *et al.* Model organisms: new insights into ion channel and transporter function. L-type calcium channels regulate epithelial fluid transport in *Drosophila melanogaster*. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280:394–407.

56. Wicher D, Walther C, Wicher C. Non-synaptic ion channels in insects - basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol.* 2001;64:431-525.
57. Worrell JW, Levine RB. Characterization of voltage-dependent Ca<sup>2</sup> currents in identified *Drosophila* motoneurons in situ. *J Neurophysiol.* 2008;100:868–878.
58. Eberl DF, Ren D, Feng G, Lorenz LJ, Vactor DV, Hall LM. Genetic and developmental characterization of *Dmca1D*, a calcium channel  $\alpha 1$  subunit gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1998;148:1159–1169.
59. Chanyachukul T, Yoovathaworn K, Thongsaard W, Chongthammakun S, Navasumrit P, Satayavivad J. Attenuation of paraquat-induced motor behavior and neurochemical disturbances by L-valine in vivo. *Toxicol Lett.* 2004;150:259-269.
60. Brown TP, Rumsby PC, Capelton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease - is there a link? *Environ Health Perspect.* 2006;114:156–164.
61. Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact.* 2010 (Article in press).
62. Lawal HO, Chang HY, Terrell AN, Brooks ES, Pulido D, Simon AF, Krantz DE. The *Drosophila* vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons. *Neurobiol Dis.* 2010 (Article in press).
63. Belgacem YH, Martin JR. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15154–15158.
64. Martin JR. A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behav Processes.* 2004;67:207-219.

## ANEXO A - Considerações técnicas sobre a secção tecidual e o procedimento imunistoquímico em *Drosophila melanogaster*

Inicialmente, no projeto de pesquisa proposto para esta dissertação de mestrado, tínhamos a previsão de realização da técnica imunistoquímica para a detecção de TH, um marcador de neurônios catecolaminérgicos. Contudo, até o presente momento, não conseguimos realizar de modo satisfatório a secção tecidual da *Drosophila melanogaster*, principalmente pelas dificuldades encontradas nesse animal devido às diferentes densidades dos tecidos que compõem a mosca. Portanto, ainda não temos à disposição um número significativo de animais processados para essa técnica imunistoquímica, no intuito de obtermos conclusões adequadas. Deste modo, os protocolos de secção tecidual e procedimento imunistoquímico para TH estão em andamento em nosso laboratório, para publicação destes resultados em um futuro próximo.

Com o objetivo de que esta dissertação de mestrado sirva de guia para experimentos futuros com histologia de *Drosophila melanogaster*, descreveremos, sob forma de tabela, todos os protocolos de inclusão e secção tecidual que foram testados em nosso estudo, mostrando os protocolos que tivemos resultados insatisfatórios e satisfatórios. Foram considerados resultados satisfatórios aquelas secções onde foi possível a observação das diferentes estruturas anatômicas que compõem o corpo da *Drosophila melanogaster* e que foram imunorreativas para TH, sendo suscetíveis à análise semi-quantitativa por densitometria óptica regional e celular (Tabela 1 e Figura 1).

Todos os protocolos testados foram baseados em estudos prévios sobre secção tecidual em moscas e técnicas imunistoquímicas<sup>(1,2)</sup>.

Em relação às metodologias aplicadas para o corte do inseto em criostato, com inclusão em *tissue-tek*, foram realizadas diferentes alternativas quanto ao recolhimento dos cortes - *free-floating*, diretamente em lâmina gelatinizada ou diretamente em lamínula gelatinizada. No método *free-floating*, não foi possível realizar o recolhimento dos cortes, devido ao pequeno tamanho das secções obtidas. As secções coletadas diretamente em lâminas ou em lamínulas gelatinizadas demonstraram uma delimitação anatômica insatisfatória devido ao rompimento tecidual significativo, promovido pelo processo de congelamento.

Quanto às metodologias referentes ao corte em ultramicrotomo, foram realizados diferentes protocolos de pós-fixação - com ou sem tetróxido de ósmio - e de inclusão - em resina Durcupan ou metacrilato. De qualquer forma, nenhuma das metodologias empregadas foram satisfatórias, uma vez que houve apenas a inclusão de tecidos moles, sem a inclusão do exoesqueleto de quitina, gerando bolhas de ar que impossibilitavam o seccionamento dos insetos.

Por fim, nas metodologias relacionadas ao corte em microtomo, foram empregados diferentes fixadores e distintas estratégias de fixação. Nos grupos de animais fixados em solução de Bouin ou formol 10%, com ou sem descalcificação em EDTA e não submetidos ao tratamento prévio em micro-ondas, não foi obtido padrão de seccionamento satisfatório em parafina. Entretanto, a fixação em formol 10%, sem o agente quelante EDTA, e o posterior tratamento em micro-ondas - 5 sessões de 2 minutos, com intervalos de 30 segundos entre cada sessão - demonstrou ser o protocolo mais adequado para obtenção de cortes teciduais em *Drosophila melanogaster*.

Posteriormente ao tratamento no micro-ondas, os animais permaneceram em formol 10% durante 48h, a 4°C. Após esse período, os insetos foram incluídos na seguinte sequência: 1 - Álcool 70% por 3 minutos; 2 - Álcool 80% por 3 minutos; 3 -

Álcool 90% por 3 minutos; 4 - Álcool 100% (I) por 3 minutos; 5 - Álcool 100% (II) por 3 minutos; 6 - Xilol (I) por 3 minutos; 7 - Xilol (II) por 4 minutos; 8 - Parafina (I) por 10 minutos; 9 - Parafina (II) por 10 minutos. Após serem emblocados em parafina, os animais foram seccionados a seis micrômetros de espessura em micrótomo (Leica SM 200R). Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina, permitindo a diferenciação clara das diferentes estruturas anatômicas que constituem o corpo da *Drosophila melanogaster*, como o lóbulo, placa lobular, medula e distintas regiões protocerebrais (ventromedial, ventrolateral e posterior lateral), que constituem o sistema nervoso do inseto, assim como a diferenciação das regiões corticais e medular do animal, mostrando nitidamente os corpos neuronais e seus prolongamentos (Figura 1).

A partir desses resultados, estão sendo realizados testes-piloto para a execução do procedimento imunistoquímico para TH nos cortes obtidos em micrótomo, com fixação em formol 10% e tratamento em micro-ondas. O protocolo de imunistoquímica para TH está sendo desenvolvido de acordo com Xavier e cols (2005), com algumas modificações, como: recuperação antigênica com aplicação de tampão citrato (0,01M) nos cortes, antes da etapa do bloqueio da imunistoquímica, e aplicação de uma menor diluição do anticorpo anti-TH (1:100 ao invés de 1:750).

## Referências Bibliográficas - ANEXO A

1. Drobysheva D, Ameel K, Welch B, Ellison E, Chaichana K, Hoang B, *et al.* An Optimized Method for Histological Detection of Dopaminergic Neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:1049-1063.
2. Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA, *et al.* A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2005;16:58-64.

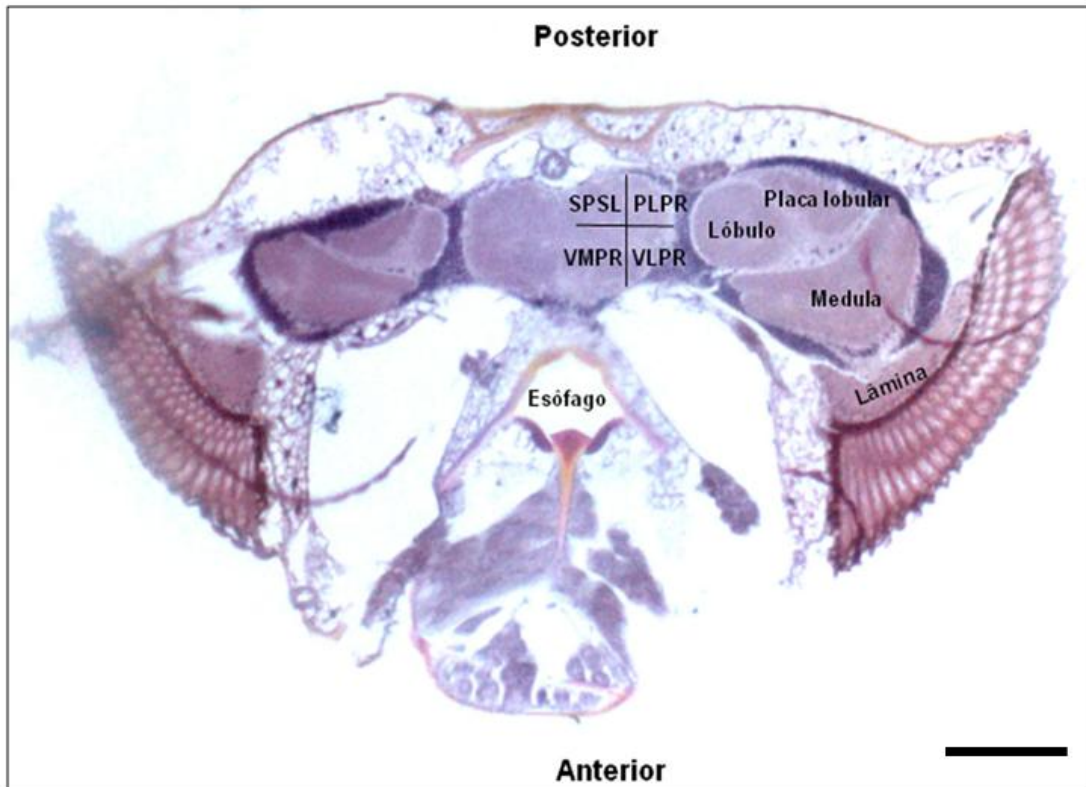
Tabela 1 – ANEXO A

Fixador	Método de fixação	Método de inclusão	Método de seccionamento	Espessura da secção	Resultado
PFA 4% + Sacarose 30% em PBS 0.1M	Simples	<i>Tissue-tek</i>	Criostato	50µm	I
GLT 2.5% em PBS 0.1M	Simples	Durcupan	Ultramicrótomo	1µm	I
GLT 2.5% em PBS 0.1M + TO 1% em PBS 0.2M	Simples	Durcupan	Ultramicrótomo	1µm	I
GLT 2.5% em PBS 0.1M	Simples	Metacrilato	Ultramicrótomo	1µm	I
GLT 2.5% em PBS 0.1M + TO 1% em PBS 0.2M	Simples	Metacrilato	Ultramicrótomo	1µm	I
Solução de Bouin	Simples	Parafina	Micrótomo	6µm	I
EDTA + Solução de Bouin	Simples	Parafina	Micrótomo	6µm	I
Solução de Bouin	Micro-ondas*	Parafina	Micrótomo	6µm	I
Formol 10%	Simples	Parafina	Micrótomo	6µm	I
EDTA + Formol 10%	Simples	Parafina	Micrótomo	6µm	I
Formol 10%	Micro-ondas*	Parafina	Micrótomo	6µm	S

Resumo dos protocolos histológicos realizados em *Drosophila melanogaster*. Em todos os procedimentos testados, foram utilizados ao menos 5 animais. Legendas: EDTA = Ácido Etilenodiaminotetracético; PFA = Paraformaldeído; PBS = Tampão Fosfato Salino (pH 7.4); GLT = Glutaraldeído; TO = Tetróxido de Ósmio; I = Insatisfatório; S = Satisfatório. \*OBS: os animais fixados em micro-ondas foram submetidos a variações de 5 a 13 sessões de 2 minutos, com intervalos de 30 segundos, em micro-ondas convencional, na potência máxima. Os melhores resultados foram obtidos com 5 sessões no micro-ondas.



Figura 1 - ANEXO A



Secção da cabeça de *Drosophila melanogaster* corada com hematoxilina e eosina, mostrando diferentes regiões do sistema nervoso. Legendas: SPSL = Declive Pósterio-Superior; PLPR = Protocérebro Pósterio-Lateral; VLPR = Protocérebro Ventro-Lateral; VMPR = Protocérebro Ventro-Medial. Barra de calibração = 100 $\mu$ m.

## ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo

**De:** Editorial Express Mail System em nome de Comp Biochem Physiol Edit. Office

**Enviada:** seg 5/7/2010 09:23

**Para:** Leder Leal Xavier

**Assunto:** Submission to CBP Part C: Toxicology and Pharmacology completed successfully

Dear Dr. Xavier:

This email is to confirm that you have successfully completed your submission, titled The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster* - A locomotor analysis to Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.

Now that your submission is complete, we have disabled further access to it via the online submission form. This means that neither you nor any other person can access it. Your submission has been transferred to a 'secure holding tank' at Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.

Thus, the url we sent you in the first confirmation email will no longer work. This is to protect your anonymity and ensure the confidentiality of your submission, subject to the technical caveats that you agreed to at step 1 of the submission (i.e. that it is impossible to offer a 100% guarantee of confidentiality).

The secure holding tank where your submission has been transferred is inspected periodically by the staff at Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.

Once a staff member inspects it and verifies that your submission is complete, your manuscript is readable, and your submission is appropriate for this journal, it will be assigned a Manuscript ID number and an editor who will be in charge of it. You should expect to receive another email confirmation at this time.

Note that your manuscript ID number will be different from the submission ID number your submission has been temporarily assigned, 8467, to uniquely identify it while it is awaiting final inspection in the secure holding tank at Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.

If you have questions about your submission, please contact "Comp Biochem Physiol Edit. Office" <CBPjrnl@editorialexpress.com>.

However please let a reasonable period of time elapse before making further inquiries (say at least 14 days), since the staff of Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology is not always able to inspect the submission holding tank on a daily basis.

Sincerely,

"Comp Biochem Physiol Edit. Office" <CBPjrnl@editorialexpress.com>