

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Validação de diferentes meios de cultura para estudos da progressão da doença
de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*

Lucas Matos Martins Bernardes

Uberlândia - MG
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Validação de diferentes meios de cultura para estudos da progressão da doença
de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*

Lucas Matos Martins Bernardes

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira
Orientador

Msc. Jéssica Reginna da Costa Silva
Co-Orientadora

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Validação de diferentes meios de cultura para estudos da progressão da doença
de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*

Lucas Matos Martins Bernardes

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira
Orientador

Msc. Jéssica Reginna da Costa Silva
Co-Orientadora

Homologado pelo curso de
Biotecnologia em ___/___/_____

Edgar Silveira Campos
Coordenador do Curso

Uberlândia
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Validação de diferentes meios de cultura para estudos da progressão da doença
de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*

Lucas Matos Martins Bernardes

Aprovação pela Banca Examinadora em: ___/___/____ Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

*Do you understand with every seed you sow
You make this cold world beautiful?*

(Florence + the Machine – Patricia)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Núbia Regina Matos Bernardes** e **Mauricio Martins Bernardes**, e à minha avó, **Dina Regina de Oliveira Matos**, por toda confiança depositada em mim, pelo amor e pelo apoio oferecidos durante toda a minha graduação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à **Universidade Federal de Uberlândia (UFU)**, por oferecer a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

Agradeço também o meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira**, por me oferecer a oportunidade de estagiar no Laboratório de Genética (LABGEN/UFU), e por dividir os seus conhecimentos comigo. Obrigado pelos incentivos, por acreditar em mim e no meu potencial.

Agradeço à minha co-orientadora, **Jéssica Reginna da Costa Silva**, pelo apoio, pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos e pelos ensinamentos. Sou muito grato por ter tido a oportunidade de trabalhar com alguém tão especial quanto você.

À **Prof.^a Ana Maria Bonetti**, deixo os meus mais sinceros agradecimentos, por também ter me recebido tão bem no laboratório e por sempre acreditar no meu potencial. Sempre me incentivando a ir mais longe e buscar o melhor, pois eu sou capaz. Com certeza uma lição que carregarei para a vida toda.

Às minhas amigas de curso e de laboratório, **Serena Mares Malta e Letícia Leandro Batista**, por serem as melhores companhias possíveis para essa etapa. Sempre se ajudando, compartilhando conhecimento, dando apoio um ao outro e sempre nos incentivando a ser a melhor versão de nós mesmos. Obrigado por fazerem parte não só da realização desse projeto, como da minha graduação. Serei eternamente grato.

Obrigado a **todos** que de alguma parte me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

No mundo, atualmente, existem cerca de 50 milhões de pessoas vivendo com demência, sendo que 70% desses casos estão ligados à doença de Alzheimer (DA). São diversos os fatores que podem levar à DA, entre eles, a dieta. Sabe-se que seguir certas dietas alimentares pode aumentar ou reduzir as chances de um indivíduo apresentar esta patologia. Um dos organismos modelos utilizados para estudos sobre a DA é a *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta). Sabendo que a dieta influencia no desenvolvimento da DA e que existem diferentes meios de cultura que podem ser utilizados na manutenção das moscas, é importante entender de que forma os meios poderiam influenciar na patologia destas moscas, para assim, evitar a utilização de meios que possam levar a resultados duvidosos quando realizado um experimento o utilizado. Sendo assim, foram realizados testes comportamentais com moscas criadas em meios de banana, fubá, purê e purê enriquecido com o objetivo de entender como cada meio afeta o desenvolvimento da DA. Os resultados obtidos apontam que o uso de certos meios pode causar alteração no desenvolvimento da DA e, sendo assim, pode levar a interferência nos resultados, o os tornaria menos confiáveis.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, doença de Alzheimer, meios de cultura.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	14
3. Metodologia.....	15
3.1 Meios de cultivo.....	15
3.2 Obtenção dos organismos utilizados.....	16
3.3 Análise da taxa de eclosão de indivíduos adultos em linhagem Canton S.....	16
3.4 Obtenção da linhagem modelo para a doença de Alzheimer.....	17
3.5 Teste piloto.....	17
3.6 Avaliação dos meios de cultura na atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer	18
3.7 Teste de escalada (Teste RING).....	18
3.8 Análise estatística.....	19
4. Resultados e Discussão.....	19
5. Conclusão.....	25
6. Referências Bibliográficas.....	26

LISTA DE FIGURAS

1. Clivagem da proteína APP.....	11
2. Sistema UAS-GAL4.....	13
3. Resultados da análise de número de pupas e eclosão de indivíduos adultos em linhagem <i>Canton S</i>	20
4. Resultados do teste piloto.....	22
5. Atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer em meio de fubá e purê enriquecido	23
6. Comparação da progressão do Alzheimer na avaliação da atividade locomotora.....	24

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2018), no mundo todo, existem cerca de 50 milhões de pessoas vivendo com demência. A soma dos custos dos cuidados desses indivíduos fica em torno de 818 bilhões de dólares, sendo que a família de quem sofre com demência, geralmente, é quem arca com os custos. Além disso, a demência é a sétima maior causadora de mortes no mundo.

Visto que, segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), 70% dos casos de demência estão ligados à doença de Alzheimer (DA), encontrar maneiras de combater ou prevenir esta doença se torna uma questão pública.

A DA foi descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer, um médico alemão. Realizando um estudo *post mortem*, utilizando o cérebro de sua primeira paciente afetada por esta doença, Alzheimer identificou dois dos seus mecanismos de ação: as placas amiloides e os emaranhados neurofibrilares (HUNTING, 2015).

O acúmulo de placas amiloides acontece devido à clivagem inadequada da proteína transmembranar precursora amiloide (APP) no cérebro. Normalmente, a APP é clivada, tanto em seu domínio extracelular, quanto em seu domínio intracelular, pelas enzimas secretases α e γ , formando um polipeptídeo contendo 40 aminoácidos. Essa clivagem leva a dificuldades de aprendizado, mas não causa neurodegeneração. No entanto, quando a APP é clivada pelas secretases β e γ , um polipeptídeo de 42 aminoácidos é formado (A β 42) (**Figura 1**). Os dois aminoácidos a mais neste polipeptídeo tornam o A β 42 hidrofóbico, o que leva ao seu aglutinamento, gerando as placas amiloides. Estas placas são responsáveis por prejudicar processos normais das células do cérebro através de estresse oxidativo, resultando em perda de atividade sináptica e morte dos neurônios (SARKAR et al., 2016).

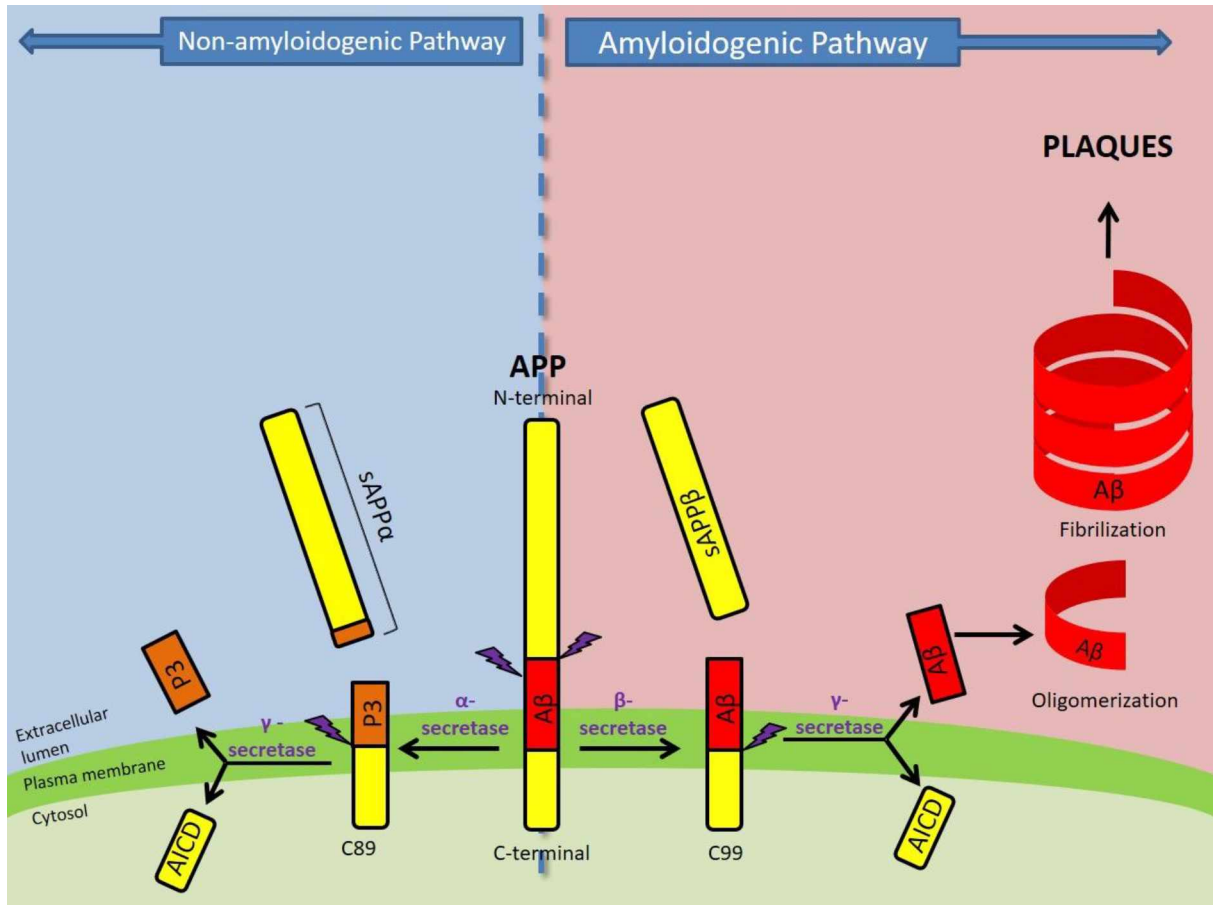


Figura 1 - Clivagem da proteína APP. A proteína APP pode ser clivada seguindo a via não-amiloidogênica (pela ação das secretases α e γ) e a via amiloidogênica (pela ação das secretases β e γ), sendo esta patológica, pois resulta na formação das placas β -amiloides (FLORENCE, H. P. T.; GHOWS; GHOWS, 2017).

A fosfoproteína Tau promove a formação e a estabilização de microtúbulos, estruturas que permitem a comunicação entre os neurônios. Em seu estado fosforilado, esta proteína contém aproximadamente três moles de fosfato por mol de proteína. Contudo, na DA, esta proporção sobe para 7 a 10 moles de fosfato por mol de proteína. A hiperfosforilação da proteína Tau antecede a formação dos emaranhados neurofibrilares. Quando hiperfosforilada, esta proteína se torna menos susceptível à degradação, o que gera seu acúmulo no cérebro, formando os emaranhados neurofibrilares (ALONSO et al., 2008).

São vários os fatores que estão relacionados à prevenção ou à propensão à doença de Alzheimer. Entre eles, a dieta. Diversos estudos já foram realizados com o intuito de esclarecer

como a alimentação contribui para o aumento do risco do indivíduo desenvolver a DA. Dentre esses trabalhos, podemos citar a dieta alimentar mediterrânea, que parece reduzir as taxas de desenvolvimento da DA, devido ao consumo de certos micro e macronutrientes presentes nesta dieta (SAFOURIS et al., 2015; SOLFRIZZI et al., 2011).

Conduzir estudos clínicos em pacientes com DA ainda é um desafio, devido à dificuldade encontrada no recrutamento de possíveis participantes. Um problema encarado por cientistas que buscam a realização destes testes é encontrar pacientes que abranjam diversas etnias, pois existem algumas complicações que impedem a participação destes, como uma barreira linguística, barreira logística e custo (para viajar até o centro de pesquisa, ou a própria falta de tempo). Além disso, nas pesquisas clínicas envolvendo a DA, são realizados procedimentos invasivos, tais como varreduras do cérebro utilizando agentes radioativos e punção lombar (coleta de líquido cefalorraquiano na medula espinhal) (WATSON et al., 2014).

Tendo em vista a dificuldade no estudo da DA em humanos, procurar organismos modelos que tenham um fenótipo similar ao desta neuropatologia é essencial para que não haja uma estagnação das pesquisas acerca desta doença. Para esse fim, podem ser utilizados camundongos (FERRETTI et al., 2011; SARASA; PESINI, 2009), ratos (COHEN et al., 2013), *C. elegans* (WU; LUO, 2005), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) (MOLONEY et al., 2009), entre outros.

O organismo modelo utilizado neste estudo foi a mosca *D. melanogaster*. Este animal têm sido utilizado no estudo de diversos mecanismos celulares, como envelhecimento (HE; JASPER, 2014), doença de Parkinson (STAVELEY, 2014), doença de Huntington (LU et al., 2013) e obesidade (SKORUPA et al., 2008). O uso da mosca-da-fruta em pesquisa apresenta diversas vantagens, como possuir seu genoma sequenciado, ser de fácil manuseio, anatomia simples e bem elucidada e ciclo de vida curto. Com o surgimento de novas ferramentas

moleculares, esse organismo modelo passou a ser utilizado em estudos específicos, ampliando seu uso com o advento da engenharia genética, através da construção de linhagens transgênicas, principalmente utilizando o sistema UAS-GAL4 (COWAN; SHEPHERD; MUDHER, 2010).

O sistema UAS-GAL4 é formado por dois componentes: GAL4 (*driver*), um ativador de transcrição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, expressado em tecidos específicos; e UAS (*responder*), um transgene sob controle da sequência de ativação *upstream* que está ligada ao GAL4. Para ativar o sistema, é necessário cruzar duas diferentes linhagens, uma expressando GAL4 e outra expressando UAS. A progênie deste cruzamento expressará o gene ligado ao UAS, sob controle da expressão de GAL4 (**Figura 2**) (DAHMAN, 2008).

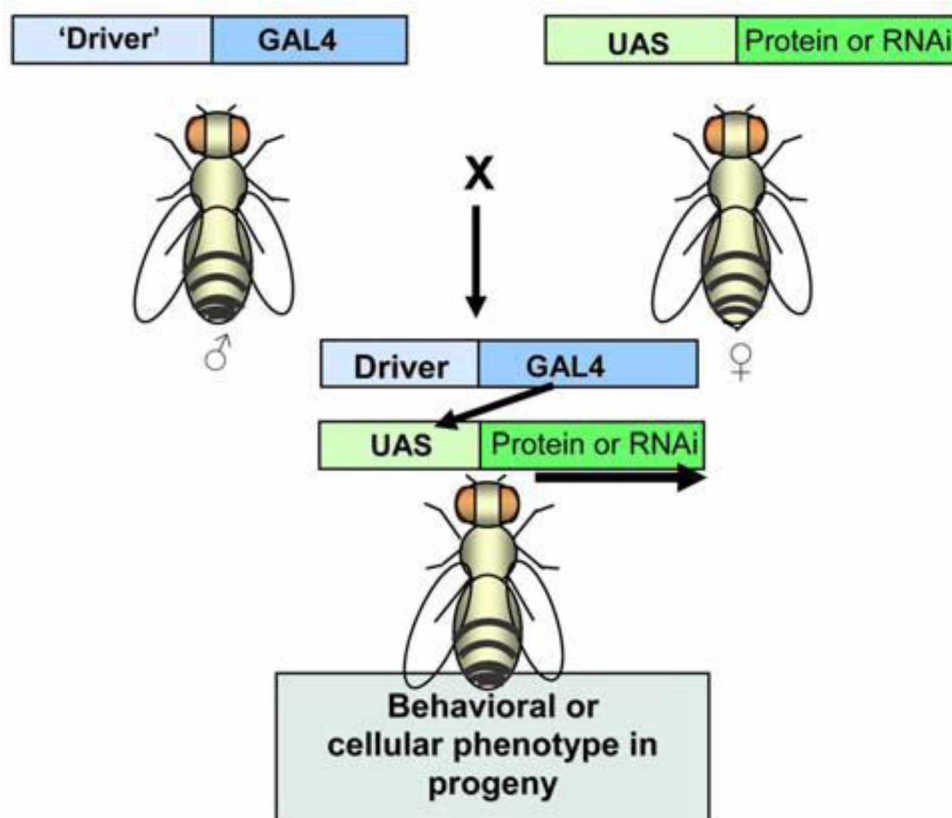


Figura 2 - Sistema UAS-GAL4. Esse sistema é formado pelo GAL4 (*driver*) e pelo UAS (*responder*). A transcrição do gene de interesse, nesse caso o gene BACE, só irá acontecer quando a proteína moduladora, produzida a partir da transcrição do gene GAL4, se ligar ao gene UAS. Essa transcrição será tecido-específica (SCHOLZ; MUSTARD, 2011).

Para obtenção de moscas com fenótipo similar ao de DA, o sistema UAS-GAL4 tem como característica o acoplamento do gene precursor da enzima β -secretase (BACE) (LIU et al., 2003) e do gene codificador da APP ao *responder*, e o uso de linhagens como elav-Gal4 para serem portadoras do *driver* que orientam a expressão do *responder* em neurônios. O resultado do cruzamento é uma prole que mimetiza características importantes da doença como a formação de placas amiloides no cérebro (KOUSHIKA; LISBIN; WHITE, 1996).

Quando criadas em laboratórios, existem diferentes meios de cultivo que podem ser utilizados para alimentar as moscas-da-fruta. Tendo em vista que dietas distintas podem aumentar ou diminuir o risco de um indivíduo apresentar DA, é necessário entender como os meios de cultivo afetarão a progressão da doença em *D. melanogaster*. Sendo assim, selecionamos quatro meios de cultura: banana, fubá (BLOOMINGTON DROSOPHILA STOCK CENTER, [s.d.]), purê e purê enriquecido (KLIETHERMES, 2011) e os testamos de forma a averiguar se algum deles causaria alguma alteração no fenótipo Alzheimer.

Sabendo que a dieta é um possível interferente na progressão da doença de Alzheimer e que existe uma dificuldade em se estudar essa doença em humanos, propomos compreender e avaliar se os meios de banana, fubá, purê e purê enriquecido afetam o desenvolvimento dessa patologia. Além disso, o uso de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* se torna excelente no sentido de que estes animais, além de serem, comprovadamente, modelos biológicos para esta doença, podem ser criados em diferentes condições alimentares, que serão a base deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a progressão da doença de Alzheimer, em *Drosophila melanogaster*, sob a influência de diferentes meios de cultura.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a taxa de eclosão de moscas, em linhagem selvagem *Canton S*, nos meios testados.
- Identificar e selecionar os meios mais eficientes, para moscas fenótipo Alzheimer, através de testes de escalada, em 5 e 21 dias de tratamento.
- Analisar a escalada das moscas fenótipo Alzheimer nos meios selecionados, durante 28 dias de tratamento.

3 METODOLOGIA

3.1 Meios de cultivo

Foram utilizados no experimento quatro meios de cultivo (banana, fubá, purê e purê enriquecido). Os ingredientes específicos para o preparo de cada meio se encontram na Tabela 1. As quantidades apresentadas na tabela são as necessárias para o preparo de 1000 mL de meio, para os meios de banana e fubá, e 1000 g, para os meios de purê e purê enriquecido.

Tabela 1: Ingredientes para preparação dos meios de teste

Banana		Fubá		Purê		Purê Enriquecido	
Água	1000 ml	Água	1000 ml	Água	3333,3 ml	Água	4000 ml
Ágar	13,41 g	Ágar	6 g	Purê de Batata	1000 g	Extrato de Levedura	150 g
Banana	190,24 g	Farinha de Soja	10 g			Glicose	93 g
Fermento biológico	30,48 g	Fubá	73 g			Nipagin	7 g
Nipagin	1,21 g	Levedura	18 g			Purê de Batata	750 g
		Solução Ácida	5 ml				
		Solução de Nipagin	6 ml				
		Xarope de Glicose	154 g				

O meio de banana pode ser preparado utilizando banana a fresco ou pedras de banana. As pedras de banana são feitas a partir banana e água apenas, batido em liquidificador. A mistura resultante pode ser armazenada em freezer, podendo ser utilizada posteriormente.

Os meios de cultura foram trocados de 7 em 7 dias, para os meios de fubá e banana, e de 3 em 3 dias, para os meios de purê e purê enriquecido.

3.2 Obtenção dos organismos utilizados

As linhagens utilizadas nesse estudo foram obtidas do *Bloomington Drosophila Stock Center* da Universidade de Indiana (EUA), sendo elas $P\{GawB\}elav^{C155}, P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4, P\{hsFLP\}1, w^*(BL\#5146)$ e $w^{1118}; P(UAS-BACE, UAS-APP1.L)2$ (BL#33797), além da linhagem selvagem *Canton S*. Moscas foram cruzadas para obter o modelo de Alzheimer. Na análise da taxa de eclosão de indivíduos adultos, foi utilizada a linhagem *Canton S*. Já nos testes envolvendo moscas modelo para a doença de Alzheimer, as linhagens *elav-Gal4* e *UAS-BACE,UAS-APP*, linhagens humanizadas, foram utilizadas. Portanto, moscas com sintomas similares ao Alzheimer apresentam genótipo *elav-Gal4>UAS-BACE,UAS-APP*.

As moscas foram mantidas em incubadoras BOD a uma temperatura de 25°C, com ciclos de 12/12 horas de claro e escuro e com umidade controlada.

3.3 Análise da taxa de eclosão de indivíduos adultos em linhagem *Canton S*

Primeiramente, foi realizado um teste utilizando-se os quatro meios de cultivo, com objetivo de avaliar o desenvolvimento das moscas que deles se alimentaram. Foram utilizados cinco casais (moscas de 0 a 5 dias pós-eclosão) da linhagem *Canton S*, linhagem selvagem, em cada frasco de teste. Esse tratamento foi realizado em triplicata técnica e biológica. No intervalo de 7 a 10 dias após as moscas terem sido alocadas nos meios, as pupas foram contabilizadas.

Passados 10 dias do início do teste, os adultos foram anestesiados com éter etílico e contados, diferenciando-os em machos e fêmeas.

3.4 Obtenção da linhagem modelo para doença de Alzheimer

Para a obtenção da linhagem modelo para DA, é necessário realizar o cruzamento entre duas outras linhagens: *elavGal4* e *UAS-BACE,UAS-APP*. Ambas estas linhagens foram expandidas em meio padrão (fubá), durante 10 dias. No dia da eclosão, as fêmeas virgens de *elavGal4* foram coletadas, assim como os machos da linhagem *UAS-BACE,UAS-APP*. Os indivíduos coletados foram alocados juntos em um novo meio, seguindo a proporção de três fêmeas virgens para um macho. Entre sete a nove dias após o cruzamento ter sido realizado, pupas alongadas (indivíduos com a doença de Alzheimer) foram coletadas e separadas das demais (*tubby – TB*), sendo alocadas em meio de fubá. No 10º dia após o cruzamento houve eclosão dos indivíduos modelo para doença de Alzheimer.

3.5 Teste piloto

Com objetivo de triar os meios testados para o experimento final, um teste piloto foi realizado, utilizando-se moscas provenientes do cruzamento *elavGal4 > UASBACE,UAS-APP*. Este teste consistiu em avaliar a progressão da D.A, nas moscas modelo dessa doença, quando inseridas nos meios testados. Foi utilizado um n experimental médio de 15 moscas por frasco. Este experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. No início do teste, as moscas utilizadas tinham de 0 a 5 dias pós-eclosão.

3.6 Avaliação dos meios de cultura na atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer

A partir dos resultados obtidos nos testes anteriores, foi determinado que os meios de fubá e purê enriquecido prosseguiriam para a avaliação dos meios de cultivo na atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer, devido aos seus desempenhos mais satisfatórios. Foi utilizado um n experimental de 25 moscas fenótipo Alzheimer por frasco, sendo que o tratamento foi feito em triplicata técnica e biológica. No início do teste, as moscas tinham de 0 a 5 dias pós-eclosão.

3.7 Teste de escalada (Teste RING)

O teste de escalada (ou teste RING) (GARGANO et al., 2005), utilizado para avaliar a função motora de *Drosophila melanogaster*, consiste na alocação destas moscas em frascos novos e limpos de 9,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. Em seguida, estes frascos são dispostos em uma raque, com uma fonte luminosa à 40 cm de distância. Antes do teste ser iniciado, as moscas passaram por um período de ambientação, sendo mantidas sob a iluminação de uma luz fluorescente de cor branca, com as especificações seguintes, 18W, 220V, 6500K e 122mA, por 20 minutos, privadas de barulhos externos. Os testes foram realizados sempre no mesmo período do dia, não sendo realizados em dias chuvosos. Passado o período de aclimatação, o teste pode ser iniciado. Uma câmera, localizada à 40 cm de distância da raque, foi utilizada para filmar todo o experimento. O teste consiste em bater a raque três vezes seguidas em esponjas colocadas sob a bancada. Esse processo é repetido por cinco vezes, com intervalo de um minuto entre cada repetição. Para a análise dos vídeos obtidos, determina-se como tempo zero, o momento da terceira batida da raque na bancada. Passados quatro segundos após a terceira batida, são contabilizadas quantas moscas atingiram uma altura de 5 cm, marcada na própria raque. O programa utilizado para a análise dos vídeos foi o QuickTime, versão 7.7.9.

No teste piloto, os testes de escalada foram realizados em 5 e 21 dias de tratamento. Já na avaliação dos meios de cultura na atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer, os testes de escalada foram realizados com 0, 14, 21 e 28 dias de tratamento.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos neste projeto foram analisados em aplicativo Prism 7 (GraphPad 7). Para avaliar se os mesmos estavam normalizados, foi utilizado o teste D'Agostino e Pearson. Para os dados com distribuição normal, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e pós-teste Tukey com significância estabelecida em 0,01%. O teste t bicaudal, com significância de 0,01%, foi utilizado para avaliar os dados de ambos os meios num mesmo intervalo de tempo. Para dados não normalizados, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's com significância estabelecida de 0,05%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise do número de pupas e eclosão de indivíduos adultos em linhagem *Canton S* estão representados na **Figura 3**. O meio que apresentou o maior número de pupas foi o purê enriquecido (**Figura 3A**). Houve diferença significativa entre os meios de banana e purê enriquecido e banana e purê ($P = 0,0001$).

Com relação ao total de indivíduos adultos, o meio que se destacou apresentando os maiores valores também o purê enriquecido (**Figura 3B**). O meio de banana apresentou valores menores do que todos os outros meios, sendo esta diferença significativa ($P < 0,0001$).

Já quando analisada a taxa de eclosão (calculada pela divisão da quantidade de indivíduos adultos pela quantidade de pupas), o meio que se destacou foi o de fubá, com uma taxa de eclosão superior aos outros meios (**Figura 3C**). No entanto, não houve diferença significativa para nenhum meio. Por fim, foi calculada a porcentagem de machos e fêmeas

eclodidos em cada meio, sendo que a proporção foi similar para todos os meios, ficando em torno de 50% de machos e 50% de fêmeas, não havendo diferença significativa (**Figura 3D**).

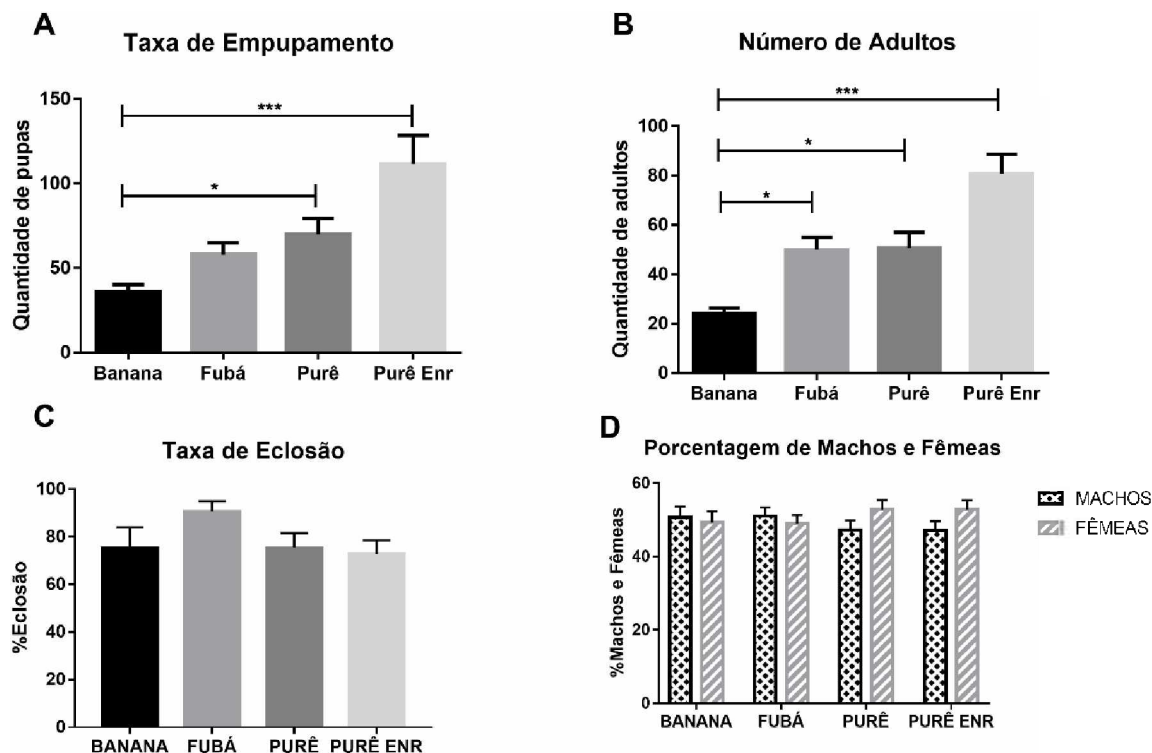


Figura 3 – Resultados da análise de número de pupas e eclosão de indivíduos adultos em linhagem *Canton S*. Os valores são apresentados com média \pm desvio do erro. Nas figuras A, B e C, o teste utilizado foi *One-Way ANOVA*, com pós-teste *Kruskal-Wallis*. Na figura D, o teste utilizado foi *Two-Way ANOVA* com pós-teste *Tukey*. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparando os meios entre si.

O meio de banana apresentou uma taxa de eclosão similar à de outros meios, porém a sua taxa de formação de pupas e, conseqüentemente, a quantidade de indivíduos adultos são baixas. Isso pode ter acontecido devido ao fato de o meio de banana ter sido preparado utilizando pedras de banana que estavam armazenadas no freezer, sendo assim, alguns nutrientes podem ter sido perdidos durante o congelamento. Seria interessante repetir esse teste utilizando meios de banana feito a fresco, para averiguar se o desempenho seria similar ou não. O meio de fubá, estatisticamente, não é diferente dos meios de purê e purê enriquecido.

Após verificar a influência de diferentes meios em uma linhagem selvagem, iniciamos os testes em modelo Alzheimer. No teste piloto, os resultados obtidos estão representados na **Figura 4**. As moscas de 0 a 5 dias pós-eclosão foram colocadas nos meios (este dia foi considerado dia 0 de tratamento). No quinto dia de tratamento, o primeiro teste de escalada foi realizado. A linhagem modelo para doença de Alzheimer apresentou uma escalada média de aproximadamente 80%, independente dos meios avaliados. Já a linhagem *elav-Gal4* (controle), um de seus parentais, apresentou uma escalada média de aproximadamente 60%, independente do meio (**Figura 4A**). Não houve diferença na escalada na linhagem *elav-Gal4* entre os meios. O mesmo ocorreu para a linhagem modelo para doença de Alzheimer. A diferença foi significativa apenas comparando as linhagens entre si, nos meios de fubá, purê e purê enriquecido.

No 21º dia após o início do tratamento, a escalada foi similar tanto para a linhagem modelo, quanto para a *elav-Gal4*, em todos os meios, ficando em torno de 20% (**Figura 4B**). Entre os testes de 5 dias e 21 dias, o meio de purê foi perdido, por ser um meio susceptível à contaminação fúngica e bacteriana, visto que não há adição de agente antimicrobiano, como há nos outros meios (solução ácida e nipagin).

Inicialmente, foram utilizadas 15 moscas por frasco. No entanto, no teste de escalada de 21 dias após o início do experimento, este *n* se encontrava ainda menor, visto que, algumas moscas morreram ou foram perdidas durante a troca dos meios. Sendo assim, o grupo percebeu a necessidade em aumentar a quantidade de moscas.

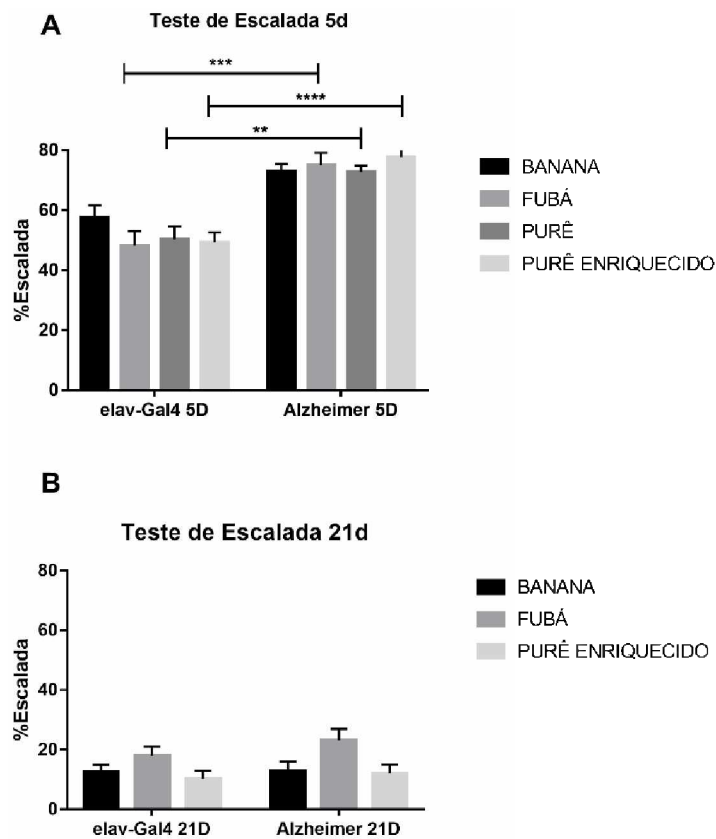


Figura 4 – Resultados do teste piloto. A figura A demonstra os resultados do teste de escalada após 5 dias de tratamento, enquanto a figura B demonstra os resultados após 21 dias de tratamento. O teste utilizado foi Two-Way ANOVA e pós-teste Bonferroni, sendo que os valores estão representados com média \pm desvio do erro. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,001$, comparando as duas linhagens.

Utilizando os resultados dos dois testes anteriores (piloto e análise da taxa de eclosão de indivíduos adultos em linhagem *Canton S*), os meios de cultura escolhidos para a avaliação da atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer foram os de fubá e o de purê enriquecido. A razão da escolha se dá ao fato de que o meio de fubá se mostrou com bons resultados na formação de pupas e eclosão de indivíduos adultos em linhagem *Canton S* (alta taxa de formação de pupas e de eclosão) e também os melhores resultados no teste piloto, no qual as moscas alimentadas por este obtiveram maiores taxas de escalada. Já a escolha do purê enriquecido se deve ao fato de que neste meio foi verificado a maior taxa de formação de pupas entre os quatro meios, como também obteve bons resultados no teste piloto. Além disso, os meios de purê enriquecido e de fubá têm custo menor, quando comparado aos outros meios.

A avaliação dos meios de cultura na atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer, foi realizada utilizando-se os meios de fubá e de purê enriquecido (**Figura 5**). O teste de escalada realizado no dia 0 de tratamento (**Figura 5A**), apresentou resultados similares para ambos os meios (60%), não havendo uma diferença significativa.

Passados 14 dias do início do experimento (**Figura 5B**), as moscas que foram alocadas no meio de fubá tiveram uma escalada de aproximadamente 20%, enquanto as moscas do meio de purê enriquecido tiveram uma escalada menor, apresentando diferença significativa entre eles ($P < 0,0001$). Após 21 dias, a escalada das moscas alimentadas com meio de fubá estabilizou, enquanto a escalada das moscas do meio de purê enriquecido teve uma queda significativa, chegando a 6% (**Figura 5C**). Por fim, após 28 dias de tratamento, as moscas do meio de fubá escalaram em torno de 8%, enquanto as do meio de purê enriquecido escalaram 0,46%, sendo esta diferença também significativa ($P < 0,0001$) (**Figura 5D**).

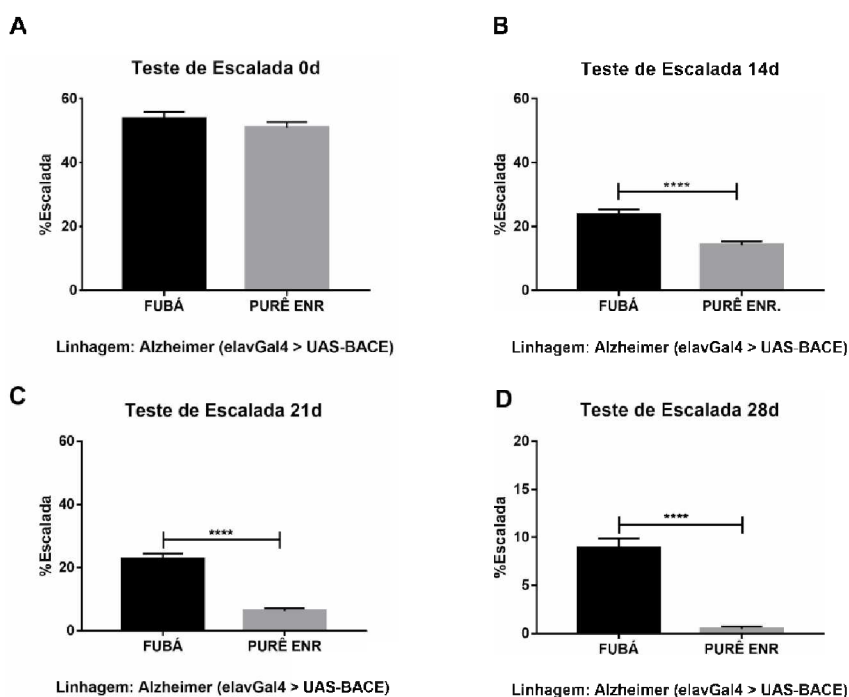


Figura 5 – Atividade locomotora de moscas fenótipo Alzheimer em meio de fubá e purê enriquecido. As figuras demonstram a escalada das moscas com fenótipo Alzheimer criadas nos dois meios. O teste utilizado foi o teste t bicaudal, sendo que os valores estão representados com média \pm desvio do erro. **** $P < 0,0001$.

O desempenho das moscas modelo Alzheimer analisados durante o período de 28 dias de tratamento estão representados na **Figura 6**. O meio de fubá houve redução significativa ($P < 0,0001$), exceto entre 14 dias e 21 dias (**Figura 6A**). Já no meio de purê enriquecido, houve redução na escalada em todos os dias de tratamento, sendo quase inexistente após 28 dias (**Figura 6B**).

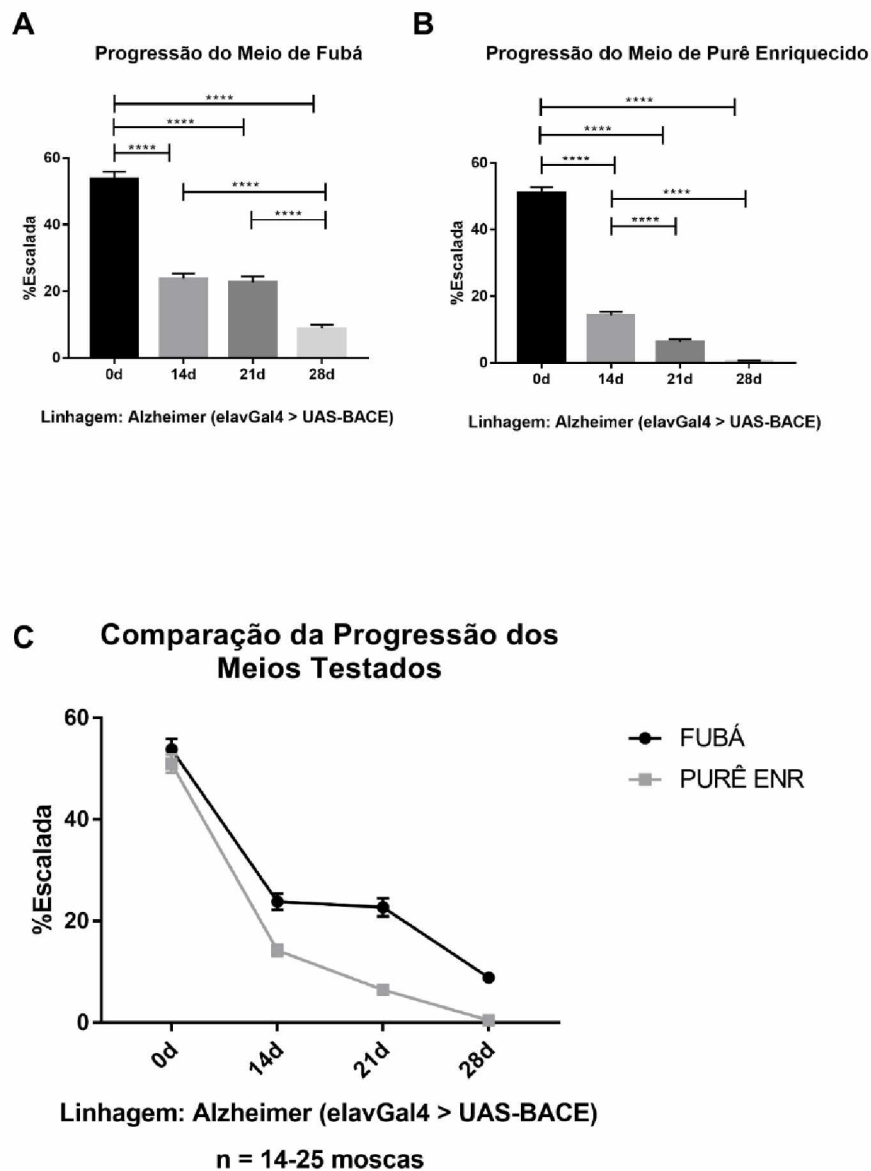


Figura 6 – Comparação da progressão do Alzheimer na avaliação da atividade locomotora. Nas figuras A e B, estão representados os valores da escalada das moscas fenótipo Alzheimer nos meios de fubá e de purê enriquecido. A figura C mostra uma comparação da escalada nos dois meios. Os valores estão representados na figura com média \pm desvio do erro. O teste utilizado foi One-Way ANOVA e pós-teste Tukey. **** $P < 0,0001$.

A partir dos resultados obtidos nos testes realizados, é possível inferir que o meio de fubá contribui, de alguma forma, para a estabilidade da escalada nas moscas fenótipo Alzheimer a longo prazo. Um dos componentes do meio de fubá é a soja, que possui em sua composição aproximadamente 20,4% do seu conteúdo lipídico na forma de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e 62,95% como ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (RUSYDI et al., 2011). Além disso, a soja possui doze diferentes isômeros de isoflavona, considerada um fitoestrógeno, por ter origem vegetal e por ser um modulador seletivo para o receptor de estrógeno (MESSINA, 2014).

Buscando na literatura, encontramos estudos que mostram que seguir a dieta mediterrânea é comprovadamente uma forma de prevenir a DA. O foco desta dieta está no alto consumo de frutas e vegetais, cereais, peixe e MUFA (SAFOURIS et al., 2015; SOLFRIZZI et al., 2011). Além disso, sabe-se que ingerir PUFA, como ômega 3 e ômega 6, diminui a chance de um indivíduo apresentar DA (SOLFRIZZI et al., 2005). Por fim, alguns estudos já sugerem que a ingestão de estrógeno pode reduzir a incidência de DA (FRISARDI et al., 2010; MERLO; SPAMPINATO; SORTINO, 2017). Como esses componentes são encontrados na soja, é esperado que ela também apresente um papel auxiliar na prevenção da DA.

Quando comparamos os dados coletados da literatura com a receita dos outros três meios testados (banana, purê e purê enriquecido), não foram encontrados ingredientes que pudessem estabilizar a doença de Alzheimer, o que justificaria o fato de a escalada das moscas que se alimentaram desse meio não ter sido alterada (continuou em declínio constante).

5 CONCLUSÃO

- Quando comparadas as escaladas das moscas dos quatro meios, as que se alimentaram dos meios de fubá e de purê enriquecido apresentam desempenho superior às que se alimentaram dos meios de purê e de banana.

- Comparando-se somente os meios de fubá e purê enriquecido, a escalada das moscas que estavam se alimentando com o meio de fubá foi superior ao meio de purê enriquecido.
- Com base nos resultados, é possível inferir que o meio de fubá consegue, por si só, amenizar a evolução da doença de Alzheimer, enquanto o purê enriquecido não interfere nesse processo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A. DEL et al. Mechanism of Tau-Induced Neurodegeneration in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. **Current Alzheimer Research**, 2008.

BLOOMINGTON DROSOPHILA STOCK CENTER. **BDSC Cornmeal Food**.

COHEN, R. M. et al. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A β , and Frank Neuronal Loss. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 15, p. 6245–6256, 2013.

COWAN, C. M.; SHEPHERD, D.; MUDHER, A. Insights from Drosophila models of Alzheimer's disease. **Biochemical Society transactions**, v. 38, n. 4, p. 988–992, 2010.

DAHMANN, C. **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.].

FERRETTI, M. T. et al. Transgenic mice as a model of pre-clinical Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 8, p. 4–23, 2011.

FLORENCE, H. P. T.; GHOWS, A. Drosophila melanogaster: Deciphering Alzheimer's Disease. v. 23, n. 6, p. 6–20, 2017.

FRISARDI, V. et al. Towards disease-modifying treatment of Alzheimer's disease: drugs targeting beta-amyloid. **Current Alzheimer research**, v. 7, n. 1, p. 40–55, 2010.

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, 2005.

HE, Y.; JASPER, H. Studying aging in Drosophila. **Methods**, v. 68, n. 1, p. 129–133, 2014.

HUNTING, P. Alois Alzheimer (1864–1915). **Journal of Medical Biography**, v. 23, n. 4, p. 238–239, 2015.

KLIETHERMES, C. L. An instant fly medium and a convenient method to dispense it. **Drosophila Information Service**, v. 94, p. 132–133, 2011.

KOUSHIKA, S. P.; LISBIN, M. J.; WHITE, K. ELAV, a Drosophila neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. **Current Biology**, v. 6, n. 12, p. 1634–1641, 1996.

LIU, H. C. et al. The association of beta-site APP cleaving enzyme (BACE) C786G polymorphism with Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 961, n. 1, p. 88–91, 2003.

LU, B. et al. Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntingtin toxicity via enhanced protein clearance. **Nature Neuroscience**, 2013.

MERLO, S.; SPAMPINATO, S. F.; SORTINO, M. A. Estrogen and Alzheimer's disease: Still an attractive topic despite disappointment from early clinical results. **European Journal of Pharmacology**, v. 817, p. 51–58, 2017.

MESSINA, M. **Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women**. American

Journal of Clinical Nutrition. **Anais...**2014

MOLONEY, A. et al. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 228–234, 2009.

RUSYDI, M. et al. Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 2, p. 705–713, 2011.

SAFOURIS, A. et al. Mediterranean Diet and Risk of Dementia. **Current Alzheimer research**, 2015.

SARASA, M.; PESINI, P. Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**, 2009.

SARKAR, A. et al. Alzheimer's disease: the silver tsunami of the 21 st century. **Neural Regeneration Research**, 2016.

SCHOLZ, H.; MUSTARD, J. A. Invertebrate models of alcoholism. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 13, n. 205, p. 433–457, 2011.

SKORUPA, D. A. et al. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. **Aging Cell**, 2008.

SOLFRIZZI, V. et al. Dietary fatty acids intake: Possible role in cognitive decline and dementia. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 4, p. 257–270, 2005.

SOLFRIZZI, V. et al. Mediterranean Diet in Predementia and Dementia Syndromes. **Current Alzheimer Research**, 2011.

STAVELEY, B. E. *Drosophila* Models of Parkinson Disease. In: **Movement Disorders: Genetics and Models: Second Edition**. [s.l: s.n.]. p. 345–354.

WATSON, J. L. et al. Obstacles And Opportunities In Alzheimer's Clinical Trial Recruitment. **Health Affairs**, v. 33, n. 4, p. 574–579, 2014.

World Health Organization. **Dementia**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

World Health Organization. **Towards a dementia plan: a WHO guide**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en/>. Acesso em: 25 jun. 2018.

WU, Y.; LUO, Y. Transgenic *C. elegans* as a model in Alzheimer's research. **Current Alzheimer Research**, v. 2, p. 37–45, 2005.