

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do kefir de leite em *Drosophila melanogaster*
modelo da Doença de Alzheimer

Letícia Leandro Batista

Uberlândia - MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do kefir de leite em *Drosophila melanogaster*
modelo da Doença de Alzheimer

Letícia Leandro Batista

Carlos Ueira Vieira

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

Uberlândia - MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do kefir de leite em *Drosophila melanogaster*
modelo da Doença de Alzheimer

Letícia Leandro Batista

Carlos Ueira Vieira
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____ / ____ / ____

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do kefir de leite em *Drosophila melanogaster*
modelo da Doença de Alzheimer

Letícia Leandro Batista

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

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

*Wenn einer allein träumt, ist es nur ein Traum.
Wenn viele gemeinsam träumen, ist das der
Anfang einer neuen Wirklichkeit.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Universidade Federal de Uberlândia por toda infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira por acreditar no meu potencial de desenvolver este trabalho e me transmitir tantos conhecimentos e inspirações.

Aos meus pais, Wendel e Patrícia, que mesmo sem entender porque eu passava tanto tempo no laboratório, sempre me apoiaram a seguir meus sonhos. Ao meu irmão, Arthur, que sempre trouxe alegria para meus dias. À minha avó, Osmaria, que sempre me apoiou nas viagens longas e distantes, confiando em mim mesmo de coração apertado.

Aos meus incontáveis amigos do curso de História, que me acolheram desde meu primeiro dia de aula. Sou extremamente grata pela amizade, carinho, abraços e risos. Pelos rolês temáticos, amigos secretos e ombros amigos. Pelas conversas gigantes e sinceras sobre a vida, tardes e tardes no C.A. e viagens aleatoriamente gostosas. Mariana, Debs, Lulu, João, Geovan, Mateus, Kath. Vocês são incríveis.

Aos meus colegas de curso, especialmente à Layssa, Luanna, Karen e Ian, que me ensinaram a sempre ter esperança e a superar aulas complicadas, porque um dia o semestre acaba e fica tudo bem. Obrigado pelos risos desesperados antes das provas, os abraços sem precisar dizer os motivos. As brigas - até exageradas - e as comidinhas maravilhosas do Santa Mônica.

Aos meus companheiros de laboratório, Serena, Jéssica e Lucas, que me ajudaram incansavelmente em todos esses meses. Obrigado pelos almoços no posto, pelos docinhos e místicas na grama. Não sei se teria conseguido sem vocês.

Ao meu companheiro de jornada, com quem dividi sonhos e esperanças desde minha primeira semana na UFU. Obrigado por não me deixar desistir e me ensinar sobre como paciência e amor mudam tudo. Obrigado por caminhar ao meu lado e segurar forte minha mão.

Ao meu vô, Antônio, que mesmo já longe, me ensinou sobre como ser firme com amor e teimoso com ouvidos. Que não importa a idade, sempre há espaço para colo e abraços. Quem a gente ama está sempre conosco em nossos corações.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (D.A.) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por mudanças comportamentais, cognitivas e motoras com amplo impacto na qualidade de vida. Neuropatologicamente, é descrita pela presença de emaranhados neurofibrilares e alta densidade de placas senis. Além, há evidências da atuação de processos oxidativos e inflamatórios em seu desenvolvimento. Pela importância da D.A., há a necessidade de descobrir novos compostos que possam ser usados como tratamento. Para tal fim, é atestada a eficácia de extratos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias – características também presentes no kefir, um probiótico que pode ser cultivado em leite ou em água com açúcar mascavo. Seus metabólitos possuem diversas ações farmacológicas, principalmente como indutor de apoptose em células cancerígenas. Testes para avaliação de novos compostos podem ser feito através de organismos modelos como *Drosophila melanogaster*, que possui curto ciclo de vida, baixo custo e capacidade de mimetizar comportamentos complexos relacionados à idade - como memória e habilidade motora. Além, pode-se obter linhagens transgênicas capazes de mimetizar a via amiloidogênica da doença e sua resposta a tratamentos. Neste estudo buscamos investigar os efeitos do kefir de na Doença de Alzheimer como tratamento, através de *Drosophila melanogaster* utilizando o sistema GAL4/UAS. Para tal, foi verificada a atividade locomotora das moscas após tratamento e sua sobrevivência. Os indivíduos modelos de Alzheimer tratados com kefir não obtiveram melhora em sua escalada, apesar de apresentarem melhor sobrevivência – sugerindo potencial benéfico deste composto.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, Leite, Kefir

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Organismos Modelo	23
3.2	Cruzamentos	23
3.3	Manutenção e Preparo do Kefir.....	23
3.4	Tratamentos	24
3.5	Avaliação do kefir no desenvolvimento dos indivíduos.....	24
3.6	Teste RING (<i>Rapid Iterative Negative Geotaxis</i>).....	24
3.7	Teste de Sobrevivência.....	25
3.8	Análise Estatística.....	25
4.	RESULTADOS	26
4.1	Avaliação da linhagem utilizada como organismo modelo para Doença de Alzheimer 26	
4.2	Avaliação do efeito do kefir na linhagem de Alzheimer.	27
4.3	Avaliação da sobrevivência das moscas modelo de Alzheimer.	31
4.4	Avaliação da ação do kefir sobre o desenvolvimento das moscas modelo de Alzheimer.	33
5.	DISCUSSÃO.....	34
6.	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	38

LISTA DE FIGURAS

1. Avaliação da linhagem utilizada como organismo modelo para Doença de Alzheimer.....	19
2. Avaliação dos efeitos do kefir através do tempo.....	20
3. Avaliação dos efeitos do kefir em moscas modelo de Alzheimer.....	22
4. Avaliação dos efeitos do kefir na linhagem UAS-BACE,UAS-APP.....	23
5. Avaliação dos efeitos do kefir na linhagem elav-GAL4.....	24
6. Avaliação da sobrevivência de moscas modelo de Alzheimer tratadas com kefir.....	25
7. Avaliação dos efeitos do kefir no desenvolvimento de moscas modelo de Alzheimer.....	26
8. Avaliação dos efeitos do leite no desenvolvimento de moscas modelo de Alzheimer.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

1. APP – Proteína Beta Amilóide
2. BACE - β -Site APP Cleaving Enzyme
3. D.A. – Doença de Alzheimer
4. EPM – Erro Padrão Médio
5. g – gramas
6. RING – *Rapid Iterative Negative Geotaxis*
7. MAP – Proteína Associada a Microtúbulos
8. UHT – *Ultra High Temperature*

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde uma das maiores causas de dependência e incapacidade entre idosos é a demência, que atinge cerca de 47 milhões de pessoas. Suas características vão além do envelhecimento comum, englobando grande perda de funções cognitivas como a memória e habilidade de realizar tarefas rotineiras (World Health Organization - WHO, 2017).

A Doença de Alzheimer (D.A.) é uma doença neurodegenerativa, responsável por cerca de 70% dos casos de demência (WHO, 2017). Seus principais sintomas englobam mudanças comportamentais - incluindo apatia e depressão -, deteriorações motoras e cognitivas como perda de memória recente, dificuldade em tomar decisões e confusão em relação ao tempo ou espaço (Alzheimer's Association, 2016).

Atualmente, cerca de 800 milhões de pessoas são maiores de 60 anos e estima-se que esse número chegue a 2 bilhões até 2050 (WASAY, 2016). Além disso, estudos indicam que indivíduos acima de 70 anos possuem 10% de risco de desenvolver D.A., o que aumenta para 45% em população acima de 85 anos (BIRD, 2008). Assim, juntamente ao aumento da expectativa de vida, os impactos físicos, sociais, psicológicos e econômicos da D.A. fazem com que esta seja uma doença cada dia mais relevante.

Neuropatologicamente a D.A. é caracterizada por uma alta densidade de placas senis e presença de emaranhados neurofibrilares - causados pelo acúmulo de precipitados de β -amiloides e de proteína Tau hiperfosforilada (BLOOM et al., 2014). Os conjuntos destes fenômenos geram perda de neurônios, funções sinápticas e conexões entre diferentes partes do cérebro - e deste com outros músculos e órgãos (SERRANO-POZO et al., 2011).

A presença de placas senis é natural – apesar de ser ausente durante a juventude - e pode ser observada em indivíduos cognitivamente intactos, sendo que a patologia é caracterizada de forma quantitativa. Estas são formadas primariamente por peptídeos β -amiloides derivados da

clivagem da proteína precursora de β -amiloide (APP), componente do metabolismo celular em geral, expressa em todos tecidos e células nucleadas. Esta proteína pode ser processada proteoliticamente pela via amiloidogênica ou não amiloidogênica, sendo a primeira, alvo de uma das principais hipóteses sobre o desenvolvimento da D.A. (CASTELLANI et al., 2013).

A via não amiloidogênica é constituída pela clivagem da APP pela enzima α -secretase gerando um fragmento C-terminal da APP de 83 aminoácidos, que é processado pela γ -secretase, gerando o fragmento β -amiloide truncado, conhecido como P3 (com retenção do componente amiloidogênico) e um fragmento intracelular da APP, que não auxiliam no desenvolvimento da D.A. (HARDY et al., 2002)

Por sua vez, a via amiloidogênica é caracterizada pela clivagem da APP pela enzima β -secretase na região N-terminal (extracelular), que gera um fragmento C-terminal de 99 aminoácidos - também substrato para γ -secretase na região C-terminal (transmembrana) -, gerando o peptídeo β -amiloide completo e um fragmento intracelular da APP menor que o gerado pela outra via. Este peptídeo varia seu tamanho – sendo os de 40 e 42 aminoácidos os mais relevantes para a doença – e se oligomeriza e fibriliza, gerando placas β -amiloides que são depositadas no cérebro. (HARDY et al., 2002)

A β -secretase, também conhecida como BACE (*β -Site APP Cleaving Enzyme*) é uma aspartil protease de membrana que possui dois homólogos que se diferem na localização tecidual e celular, BACE-1 e BACE-2, sendo que apenas a primeira atua na produção de peptídeo β -amiloide. Por estar centralmente envolvida na via amiloidogênica e ser um fator limitante, a BACE-1 é um grande alvo para terapias para a D.A. (CASTELLANI et al., 2013)

Os emaranhados neurofibrilares presente na D.A e sua neurotoxicidade se originam da hiperfosforilação da proteína Tau, uma MAP (proteína associada a microtúbulos) altamente solúvel, encontrada em neurônios e também outras células do sistema nervoso, porém em baixos níveis. A função principal desta proteína é a estabilização de microtúbulos e regulação

de transportes axonais, permitindo a estruturação de neurônios e o trânsito de nutrientes e proteínas para as células. Na D.A., a proteína Tau é hiperfosforilada, não permitindo o desempenho de seu papel e prejudicando a organização do citoesqueleto, levando à morte neuronal (HARDY et al., 2002).

Devido à falta de sucesso em desenvolver terapias efetivas para a Doença de Alzheimer e o aumento dos custos com o tratamento de demência, há uma grande necessidade em descobrir novos compostos que possam ser usados como tratamento (WINBLAD et al., 2016). O uso de produtos naturais neste processo tem sido emergente (SHAL et al., 2018), principalmente com o uso de extratos de *Ginko biloba* que possui eficaz ação antioxidante e anti-inflamatória (LIU et al., 2015; MÜLLER et al., 2017).

Estudos indicam que a presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares na D.A. podem estar relacionados ao estresse oxidativo e processos inflamatórios, sendo que o primeiro atua gerando aumento de APP, disfunção mitocondrial e hiperfosforilação da proteína Tau (JIANG et al., 2016; KIM et al., 2015) enquanto que o segundo, pela fagocitose ineficiente da microglia sobre a proteína β -amiloide (SPANGENBERG et al., 2017). Desta forma, a busca por outros produtos naturais com características semelhantes ao *Ginko biloba* pode ser uma boa alternativa de encontrar outros candidatos para combater a D.A.

A partir disso temos o kefir, um probiótico oriundo da região do Cáucaso que possui compostos provenientes do metabolismo bacteriano e de leveduras com ação antioxidante (CENESIZ et al., 2008; CHEN et al., 2015) e anti-inflamatória, observada pela ação benéfica em lesões causadas por ácido acético em camundongos (RODRIGUES et al., 2005; DINIZ et al., 2003).

Considerado como o iogurte do século XXI (SCHNEEDORF; ANFITEATRO, 2004), o kefir é composto por bactérias e leveduras - mais frequentemente isolados os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*. (FIORDA et al., 2017).

Seus grãos são envoltos por um complexo de heteropolissacarídeos denominados de kefirano e ao fermentar o leite, utilizado como substrato, há produção de metabólitos como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol e peptídeos (HSIEH et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2010). Estudos indicam que tais compostos possuem papel como indutores de apoptose em células cancerígenas de diferentes tipos (SHARIFI et al., 2017) e moduladores inflamatórios da via JKA2 (CHEN et al., 2016), o que sugerem alto potencial farmacológico deste probiótico.

De forma a testar os efeitos de diversos produtos naturais sobre a D.A., pode ser utilizado organismos modelos como *Drosophila melanogaster*, que possui seu genoma completamente sequenciado (ADAMS et al., 2000). Isto permite a obtenção de linhagens transgênicas, disponíveis em centros de estoque como o Bloomington, por sistemas como GAL4/UAS (COOK et al, 2010).

Este sistema é derivado de leveduras e ativado pelo cruzamento entre linhagens que expressam Gal4 (*driver*) responsável por direcionar o gene de interesse para um tecido específico – com linhagens contendo o elemento UAS (*responder*) - que modulam transcrição do gene de interesse. Desta forma, a prole resultante irá expressar o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por Gal4 (ELLIOTT et al, 2008). Assim, é possível expressar proteínas específicas da Doença de Alzheimer direcionadas ao cérebro, como a proteína precursora de amiloide (APP) e a enzima β -secretase (BACE) e mimetizar a via amiloidogênica da doença e sua resposta a tratamentos (CHAKRABORTY et al., 2011).

Além dos benefícios genéticos, este organismo modelo possui anatomia simples, curto ciclo de vida, baixo custo de manutenção, facilidade de manejo e capacidade de mimetizar comportamentos complexos relacionados à idade (YAMAGUCHI et al, 2018). Através do Teste RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*), por exemplo, é possível determinar a redução de atividade locomotora associada à idade ou neurodegeneração (GARGANO et al., 2008; MCCURK et al., 2015).

Assim, sendo a demência uma doença que já aflige grande parte da população - e se espera chegar a 75 milhões de indivíduos até 2030 pela última estimativa da Organização Mundial da Saúde - novas abordagens para o tratamento da D.A. são necessárias. O crescente uso do kefir na alimentação e suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias podem contribuir para a atenuação da D.A., devido ao possível papel benéfico destas características em atenuar seu desenvolvimento. Desta forma, o estudo dos efeitos do kefir em *D. melanogaster* como organismo modelo para D.A. é uma alternativa para avaliar de fato e compreender os efeitos de seus componentes na progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do kefir em indivíduos *Drosophila melanogaster* modelo para a Doença de Alzheimer em.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Obter e validar moscas utilizadas como organismo modelo para Doença de Alzheimer.
- 2) Avaliar a atividade locomotora de moscas modelo de Alzheimer tratadas com kefir.
- 3) Avaliar o efeito do kefir na sobrevivência dos organismos modelo para Doença de Alzheimer.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos Modelo

As linhagens de *Drosophila* utilizadas foram obtidas por meio Centro Bloomington e mantidas no estoque de *Drosophila* do Laboratório de Genética (LABGEN) em estufas com ciclos de claro-escuro (12/12h) a 25°C. As moscas foram mantidas em frascos de vidro ou *vials* (tubos transparentes de 8 cm de altura por 3 cm de diâmetro) contendo meio Bloomington padrão (farinha de soja 0,01% m/v, xarope de glicose 7,2% m/v, ágar 0,6% m/v, fubá 0,073% m/v, levedura 0,018% m/v, solução Nipagin 0,06% m/v e solução ácida 0,05% m/v).

3.2 Cruzamentos

Indivíduos das linhagens parentais, *elav-Gal4^{c155}* (BL# 458) e *UAS-BACE,UAS-APP* (BL#29877) foram anestesiados utilizando éter etílico e separados de acordo com seu sexo com o auxílio de uma lupa com luz. De forma a obter organismos modelo para Doença de Alzheimer, fêmeas virgens da linhagem *elav-Gal4* - coletadas até duas horas após sua eclosão e contendo mecônio - e machos *UAS-BACE,UAS-APP* foram cruzados na proporção 3:1 respectivamente. As pupas resultantes foram selecionadas dos frascos de cruzamento após 7-10 dias e mantidas em *vials* com meio padrão até sua eclosão, 10-13 dias a partir do cruzamento. Paralelamente, foram mantidos cruzamentos das linhagens parentais – de forma a serem utilizados como controle nos teste subsequentes - e os frascos esvaziados após sete dias.

3.3 Manutenção e Preparo do Kefir

Grãos de Kefir foram mantidos em leite UHT (*Ultra High Temperature*) 3%, sendo diariamente coados e novamente misturados ao seu meio após a fermentação total do leite. O fermentado – kefir – foi mantido na geladeira a 4°C e utilizado como componente do meio para

as moscas. Para manutenção de estoque e estudos futuros, grãos excedentes foram congelados à -20°C com meio de cultivo em volume reduzido.

3.4 Tratamentos

Visando avaliar sua escalada, moscas um a quatro dias após sua eclosão, provenientes dos cruzamentos acima mencionados foram transferidas para *vials* com os meios respectivos à seus tratamentos em triplicata, com cerca de 25 indivíduos em cada. Foi utilizado meio de purê enriquecido (purê de batata instantâneo 75%, extrato de levedura 15%, glicose 9,3%, metilparabeno 0,7% e 4x do peso dos ingredientes em água), variando seu líquido - água filtrada (utilizada como controle), leite (de forma a verificar seu efeito como diluente) ou kefir como tratamento. Os meios foram trocados três vezes por semana até a finalização dos testes, com duração de sete dias.

3.5 Avaliação do kefir no desenvolvimento dos indivíduos

De forma a avaliar os efeitos do kefir no desenvolvimento das moscas modelo de Alzheimer (*elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP*), cerca de dez fêmeas *elav-Gal4* e dez machos *UAS-BACE,UAS-APP* foram cruzadas em meio de purê enriquecido com água filtrada, leite ou kefir. Paralelamente, as linhagens parentais também foram mantidas nas mesmas condições. Sete dias após o cruzamento das linhagens parentais foram retirados e a quantidade de pupas presente nos vials avaliada. Dez dias após o cruzamento foi avaliada a quantidade de indivíduos eclodidos.

3.6 Teste RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*)

Para avaliar sua escalada, cerca de 25 moscas para cada condição de tratamento em triplicata foram colocadas em *vials* e então alocadas no raque de madeira utilizado para o teste.

As moscas foram expostas à luz e mantidas em ambiente silencioso por 20 minutos para ambientação.

Após este período, as moscas foram deslocadas para o fundo por meio de três batidas da raque. O progresso da escalada à uma altura igual ou superior à 5 cm foi avaliado considerando 120 frames – quatro segundos - a partir do que momento que o raque toca na bancada.

O teste foi realizado com um, dois e sete dias de tratamento em triplicata e registrados por meio de vídeos, reproduzidos e analisados no *software QuickTime 7.7.9*.

3.7 Teste de Sobrevivência

Paralelo ao teste de escalada, também foi avaliado a sobrevivência das diferentes linhagens (elav-Gal4, UAS-BACE e Alzheimer) em meio de purê enriquecido com água, leite ou kefir. A cada troca de meio foi feita contagem manual das moscas que morreram nas últimas 48 horas e os dados foram analisados pelo teste Kaplan-Meier.

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram comparados de acordo com a normalidade constatada pelo teste D'Agostino&Pearson e conseqüentemente por meio de teste t (para dados não normalizados) ou ANOVA de duas vias (para dados normalizados) com nível de significância estabelecido em $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism*.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da linhagem utilizada como organismo modelo para Doença de Alzheimer

A fim de avaliar o desempenho das moscas resultantes do cruzamento *elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP* como organismo modelo para Doença de Alzheimer, sua escalada foi comparada à seus parentais (Figura 1) primeiramente em uma situação controle, utilizando moscas de 1-4 dias mantidas em meio de purê enriquecido sem adição de kefir ou leite.

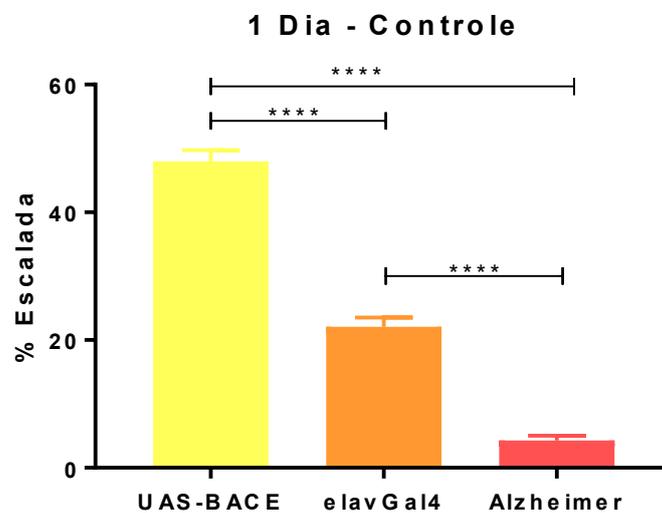


Figura 1: Avaliação da linhagem utilizada como organismo modelo para Doença de Alzheimer. Avaliação da escalada de moscas UAS-BACE, *elav-Gal4* e fenótipo de Alzheimer, após um dia de tratamento em meio de purê enriquecido controle. Valores representam média ± EPM (erro padrão médio), (****) indica $P < 0.0001$ quando comparado pelo teste t entre os grupos indicados.

Foi possível observar diferença significativa entre os organismos provenientes do cruzamento – modelos de Alzheimer – e indivíduos das linhagens parentais. A progênie demonstrou uma menor porcentagem de escalada em relação à *elav-Gal4* e UAS-BACE,UAS-APP e demonstrou-se apta a ser utilizada como organismo modelo.

4.2 Avaliação do efeito do kefir na linhagem de Alzheimer.

Os efeitos do kefir em comparação aos grupos controle e leite, nas diferentes linhagens trabalhadas ao longo do tempo, podem ser observados na Figura 2. No que tange as moscas modelo de Alzheimer (elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP) não foi possível identificar qualquer diferença significativa em nenhum dos testes realizados.

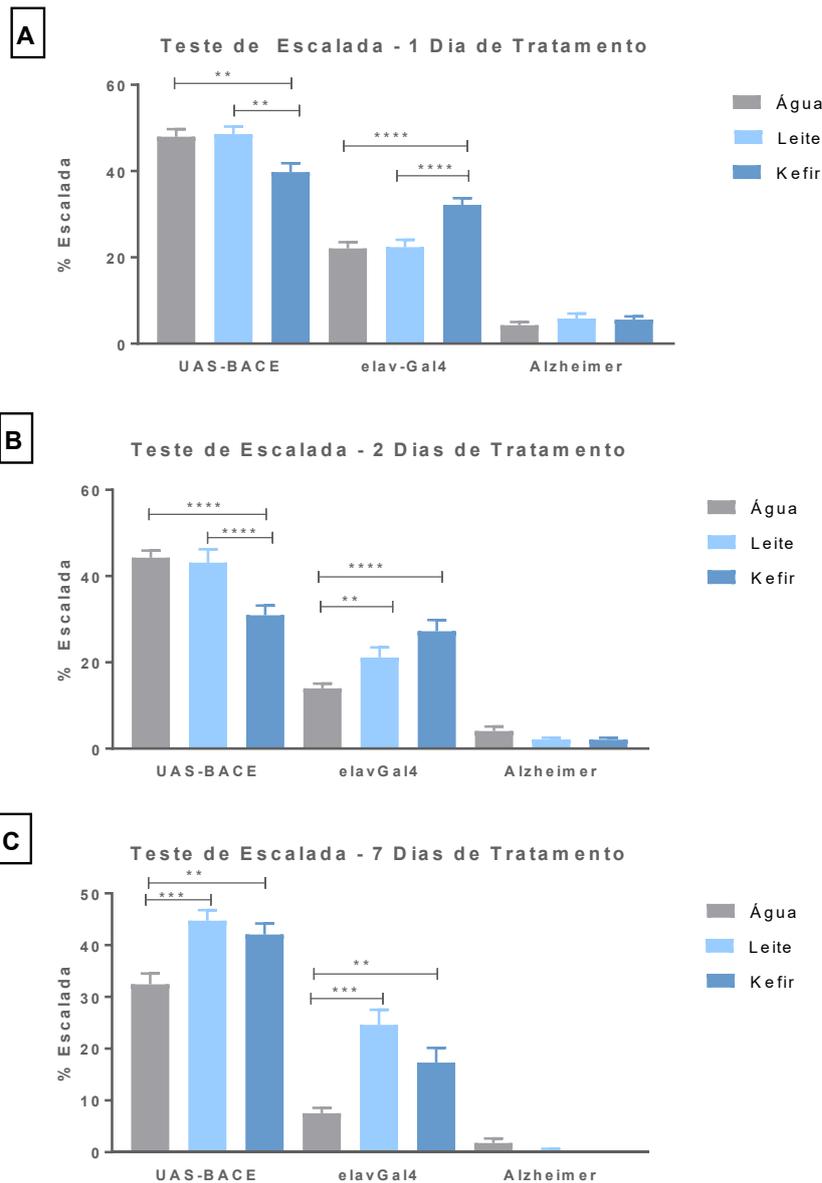


Figura 2: Avaliação dos efeitos do kefir através do tempo. Testes de escalada realizados com as linhagens parentais UAS-BACE,UAS-APP, elav-Gal4 e moscas fenótipo de Alzheimer após um (A), dois (B) ou

sete (C) dias de tratamento. Valores representam média \pm EPM, (****) indica $p < 0.0001$, (***) indica $p < 0.001$, (**) indica $p < 0.01$, (*) indica $p < 0.05$ quando comparado pelo teste t a medida referente aos grupos indicados.

Apesar disso é possível perceber uma tendência na melhora da escalada dos indivíduos modelo de Alzheimer tratados com leite e kefir em relação ao controle (água) no primeiro dia de tratamento (Figura 2A) – padrão que não permanece nos próximos dias avaliados. Considerando uma semana de tratamento (Figura 2C), e indivíduos com 8-11 dias de idade, a escalada destes indivíduos tratados com kefir chega a ser nula.

Em relação às linhagens parentais, é possível notar o diferente perfil de atuação deste produto em UAS-BACE e elav-Gal4 nos dias avaliados pelo teste. Apenas no primeiro dia ambas linhagens apresentam diferença estatística da escalada do grupo tratado com kefir em relação ao controle (água) e ao leite. No segundo dia de tratamento (Figura 2B) é possível notar diferença estatística entre o grupo tratado com kefir em relação ao tratado com leite, mostrando sua notável diminuição na escalada desta linhagem. Porém, no mesmo teste é possível perceber a alta melhora na escalada da linhagem elav-Gal4 tratada com kefir em relação ao grupo controle, embora já não haja diferença entre as moscas tratadas com leite ou do grupo controle.

Por fim, observando o teste realizado com sete dias de tratamento (Figura 2C) o padrão observado em UAS-BACE é modificado e se assemelha à elav-Gal4 neste mesmo período. O grupo tratado com kefir apresenta escalada superior ao controle – embora não tão significativa quanto ao grupo tratado com leite, apesar de não haver diferença entre leite e kefir.

A taxa da escalada das moscas modelo de Alzheimer ao longo do tempo (Figura 3) indica uma diminuição significativa no grupo comparando os dois primeiros dias de tratamento, assim como o kefir. O grupo tratado com leite, no entanto, apresenta diferença estatística apenas em relação a escalada de sete dias de tratamento – comparando com a de dois dias. Isso indica que o leite foi o tratamento que menos houve queda da escalada de um para dois dias – ao contrário do que ocorre no controle e no kefir.

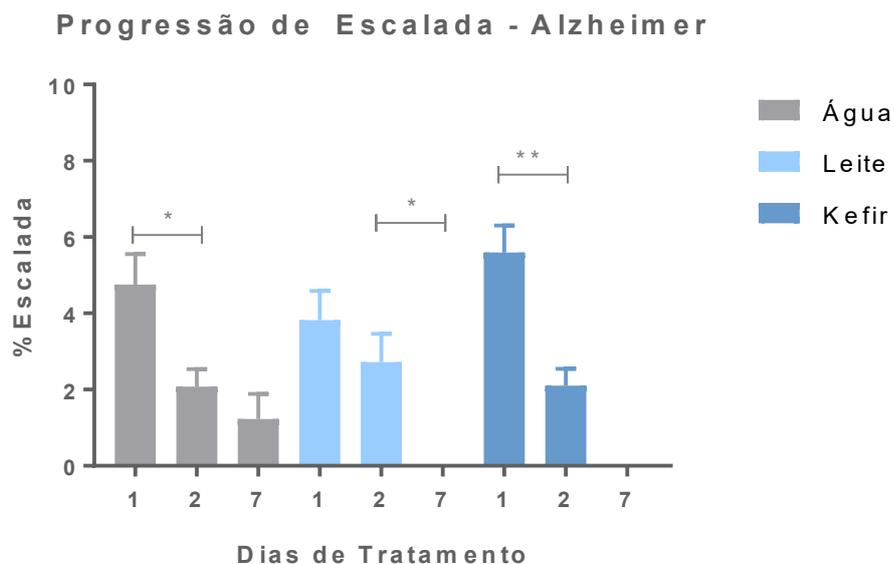


Figura 3: Avaliação dos efeitos do kefir em moscas modelo de Alzheimer. Avaliação da escalada de moscas fenótipo de Alzheimer tratadas com kefir, leite ou do grupo controle ao longo dos sete dias de tratamento. Valores representam média \pm EPM, (**) indica $p < 0.01$, (*) indica $p < 0.05$ quando comparado pelo teste t a medida referente aos grupos indicados.

De acordo com os testes de escalada da linhagem parental BACE (Figura 4) observamos que o grupo tratado com kefir foi o único que apresentou queda significativa na escalada, comparando os dois primeiros dias de avaliação. Porém, ao comparar a escalada destas mesmas moscas nos testes realizados com dois e sete dias, este também foi o único grupo que apresenta uma melhora significativa de escalada. Isto se contrasta com a queda significativa do grupo controle (água) neste mesmo período. Apesar da escalada do grupo tratado com leite não apresentar diferença estatística, é possível notar que este é o grupo com menos variações de escalada ao longo do tempo analisado, se mantendo tão alto quanto – ou acima – dos outros grupos.

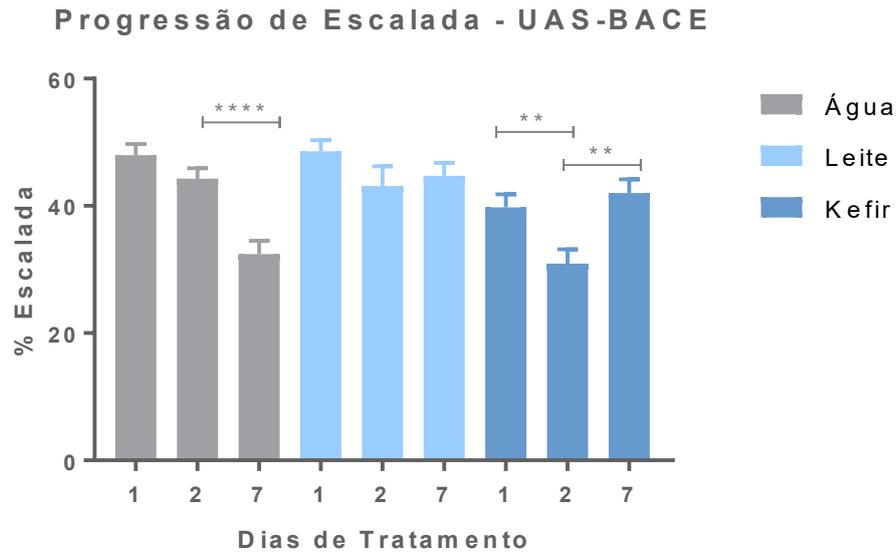


Figura 4: Avaliação dos efeitos do kefir na linhagem UAS-BACE,UAS-APP. Avaliação da escalada da linhagem UAS-BACE,UAS-APP tratadas com kefir, leite ou do grupo controle ao longo dos sete dias de tratamento. Valores representam média \pm EPM, (***) indica $p < 0.001$, (**) indica $p < 0.01$, quando comparado pelo teste t a medida referente aos grupos indicados.

Por meio dos testes de escalada da linhagem parental *elav-GAL4* (Figura 5) é possível perceber queda significativa do grupo controle (água), tanto comparando os testes realizados com um e dois dias quanto comparando aos testes de dois e sete dias. O mesmo ocorre no grupo tratado com kefir, apesar de sua escalada ser superior aos outros tratamentos. Por sua vez, o grupo tratado com leite apresenta uma escalada com menos variações entre os dias e ainda superior ao controle (água).

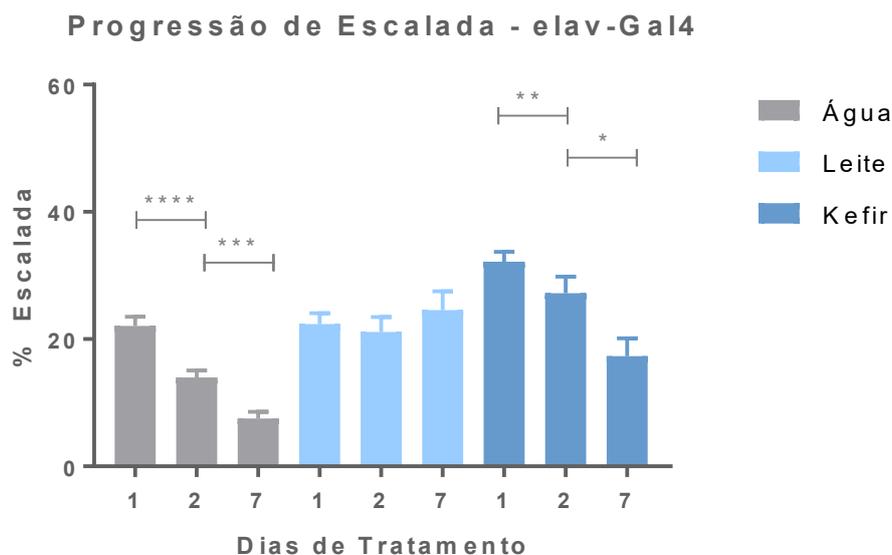


Figura 5: Avaliação dos efeitos do kefir na linhagem elav-GAL4. Avaliação da escalada da linhagem elav-Gal4 tratada com kefir, leite ou do grupo controle ao longo dos sete dias de tratamento. Valores representam média \pm EPM, Valores representam média \pm EPM, (****) indica $p < 0.0001$, (***) indica $p < 0.001$, (**) indica $p < 0.01$, (*) indica $p < 0.05$, quando comparado pelo teste t a medida referente aos grupos indicados.

4.3 Avaliação da sobrevivência das moscas modelo de Alzheimer.

Através da avaliação da sobrevivência das moscas modelo de Alzheimer em seus diferentes tratamentos (Figura 6), foi possível observar que o kefir apresenta melhora significativa na sobrevivência das moscas em comparação aos grupos água e leite. As linhagens parentais por sua vez, não apresentam uma melhora tão acentuada com o tratamento com kefir, apesar de ambas serem prejudicadas pelo tratamento com leite. Moscas elav-Gal4 tratadas com kefir tendem a uma melhor sobrevivência nos primeiros dias e nos últimos se igualam ao controle. Por sua vez, moscas UAS-BACE tratadas com kefir possuem sua sobrevivência próxima ao controle de água.

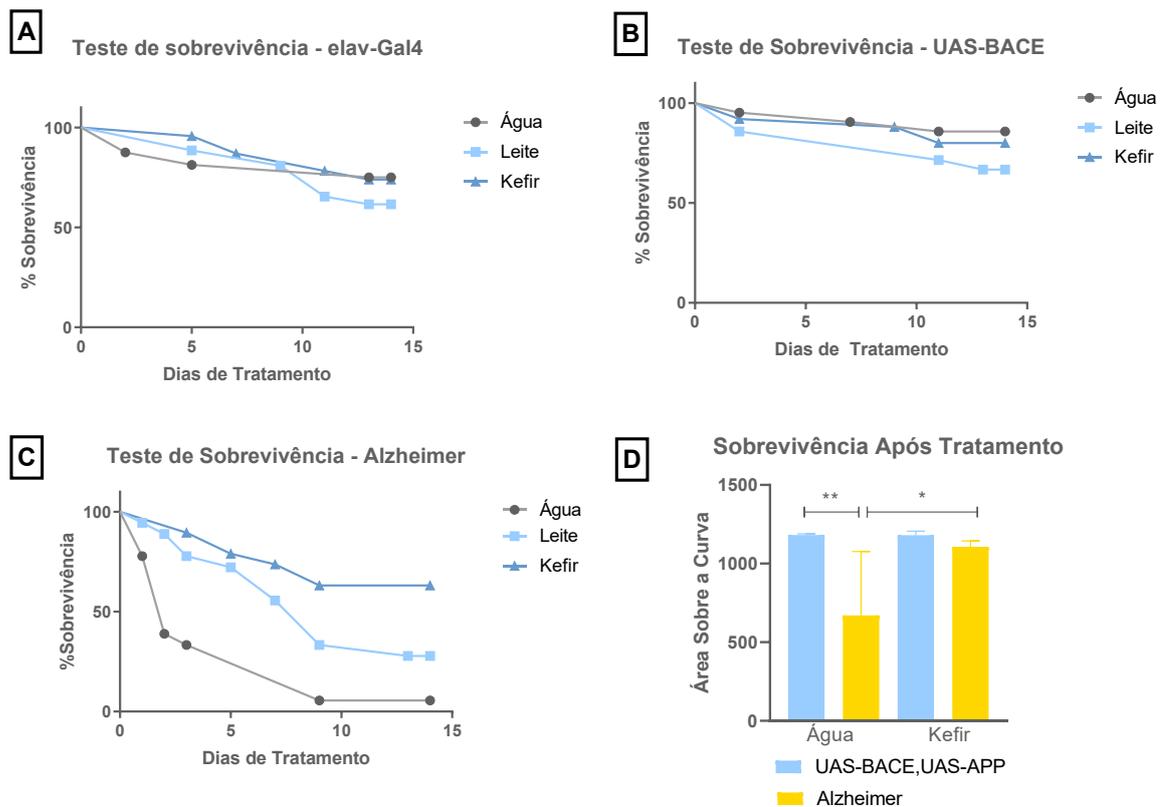


Figura 6: Avaliação da sobrevivência de moscas modelo de Alzheimer tratadas com kefir. Avaliação da sobrevivência das linhagens elav-Gal4 (A), UAS-BACE,UAS-APP (B) e moscas modelo de Alzheimer (C) após tratamento com leite ou kefir por 14 dias e controle de água. (D) Comparação da área sobre a curva de UAS-BACE,UAS-APP e indivíduos com Alzheimer.

Além disso, é possível observar na Figura 6D que após tratamento com kefir, a área sobre a curva dos indivíduos modelo de Alzheimer não teve diferença significativa com sua linhagem parental UAS-BACE,UAS-APP – o que indica um efeito do kefir na melhora da sobrevivência destes indivíduos, que se igualam à moscas saudáveis.

4.4 Avaliação da ação do kefir sobre o desenvolvimento das moscas modelo de Alzheimer.

Após o cruzamentos de linhagens parentais (UAS-BACE,UAS-APP e elav-Gal4^{C155}) ou entre elas (para obtenção de moscas modelo de Alzheimer elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP) realizado em meio de purê enriquecido contendo kefir (Figura 7) ou leite (Figura 8), suas pupas – e a consequente eclosão - foram avaliadas de forma a inferir sobre o efeito do kefir no desenvolvimento das moscas.

As larvas tratadas com kefir se transformaram em pupa (Figura 7), mas apenas moscas UAS-BACE,UAS-APP eclodiram (Figura 7A), enquanto que elav-Gal4 e moscas modelo de Alzheimer não eclodiram.

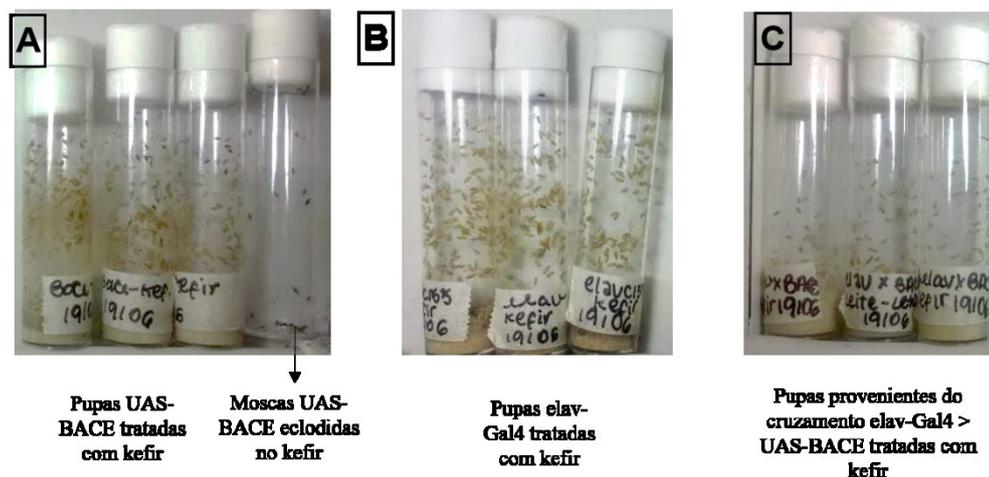


Figura 7: Avaliação dos efeitos do kefir no desenvolvimento de moscas modelo de Alzheimer. Avaliação da presença de pupas e sua eclosão das linhagens UAS-BACE,UAS-APP (A), elav-Gal4 (B) e moscas modelo de Alzheimer (C) em meio de purê enriquecido contendo kefir.

Porém, ao avaliar as larvas tratadas com leite (Figura 8), apenas moscas elav-Gal4 eclodiram com sucesso (Figura 8A), enquanto que moscas UAS-BACE,UAS-APP e modelo de Alzheimer não eclodiram.

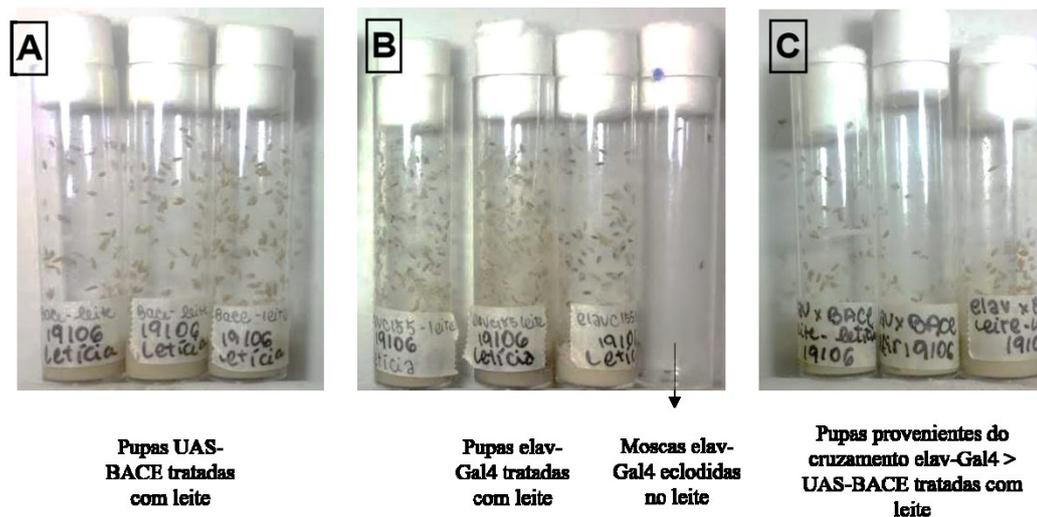


Figura 8: Avaliação dos efeitos do leite no desenvolvimento de moscas modelo de Alzheimer. Avaliação da presença de pupas e sua eclosão das linhagens UAS-BACE,UAS-APP (A), elav-Gal4 (B) e moscas modelo de Alzheimer (C) em meio de purê enriquecido contendo leite.

Assim, é possível perceber a diferença de ação tanto do leite quanto do kefir em diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*.

5. DISCUSSÃO

O uso de moscas provenientes do cruzamento de linhagens elav-Gal4^{C155} (BL# 458) e UAS-BACE,UAS-APP (BL#29877) para o estudo da Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster* foi categorizado em 2011 por Chakraborty e colaboradores. No trabalho supracitado também foi realizado teste RING de forma a avaliar o desempenho locomotor das moscas, com indivíduos com 2-10 dias de vida das linhagens parentais – elav-Gal4 e UAS-BACE – apresentando escalada equivalente (cerca de 90%) enquanto que as moscas modelo de Alzheimer apresentaram cerca de 75% de escalada.

No entanto, estes dados contrastam com nossos resultados já que no primeiro dia de tratamento (Figura 1) – no qual as moscas possuíam 1-4 dias de vida – a escalada de UAS-

BACE é significativamente maior que de elav-Gal4 (cerca de 45 e 20% sucessivamente). Além, o valor obtido para o modelo de Alzheimer no mesmo teste não chega a sequer 6%.

Desta forma, a escalada das moscas utilizadas foi inferior ao esperado. Esta diferença em elav-Gal4 pode se dar por ser uma linhagem ainda em adaptação, já que chegou ao Laboratório de Genética (onde foram conduzidos os experimentos) à menos de seis meses. Em 2012, OROZCO-TERWENGEL e colaboradores indicaram que *D. melanogaster* apresenta instabilidade até 15 gerações após ser introduzida em um novo ambiente laboratorial (et al., 2012), o que ainda não foi atingido na data de realização dos experimentos.

A não-adaptação completa ao ambiente de elav-Gal4 pode indicar uma explicação ao porque da linhagem modelo de Alzheimer apresentar uma escalada mais de 10 vezes menor ao esperado. Apesar disso, a linhagem UAS-BACE,UAS-APP está bem estabelecida ao ambiente laboratorial, mas também apresenta escalada inferior ao esperado.

Outro aspecto a ser observado em relação à escalada esperada em contraste com a obtida se dá pela análise do teste de escalada. Chakraborty e colaboradores analisaram a escalada 18 segundos após a raque encostar na bancada, enquanto que analisamos 4 segundos após tal evento de acordo com o protocolo sugerido por Gargano e colaboradores em 2005.

Além, para todos os testes foram utilizados machos e fêmeas, ao contrário do sugerido no protocolo utilizado. Isto pode ser uma complicação para a determinação real da capacidade locomotora dos indivíduos pelo fato das fêmeas poderem estar carregando ovos, o que aumentaria seu peso e prejudicaria sua escalada.

Analisando os efeitos do tratamento com kefir nos indivíduos modelo de Alzheimer não é possível identificar diferença significativa em relação o controle e ao tratamento com leite (Figura 2). Apesar disso, indivíduos tratados com kefir apresentam uma sobrevivência superior aos tratados com leite ou pertencentes ao grupo controle (Figura 6C). Assim, o meio de purê enriquecido com kefir poderia ser utilizado em *Drosophila melanogaster* modelo de Alzheimer

para aumentar sua sobrevivência – já que os indivíduos do grupo controle apresentam alta taxa de morte nos primeiros dias, o que dificulta o andamento dos testes por gerar um n experimental abaixo do indicado.

Em um estudo de 2018, Karatas e Demir indicam que o número de indivíduos da linhagem Oregon-R (selvagem) provenientes de cruzamentos realizados com leite ou kefir é inferior ao obtido no grupo controle. Considerando os efeitos do kefir sobre as linhagens parentais é possível identificar diferença em relação aos indivíduos tratados com kefir (Figura 7) ou leite (Figura 8) desde a fase larval. Enquanto indivíduos *elav-Gal4* não foram capazes de eclodir quando tratados com kefir (Figura 7B), *UAS-BACE,UAS-APP* não eclodiu quando tratado com leite. Apesar disso, o kefir não prejudica a sobrevivência das linhagens parentais (Figura 6). Tal fato pode ser explicado pela maior susceptibilidade dos indivíduos em fase larval à compostos potencialmente nocivos em comparação ao indivíduo adulto (EL-TOUKHY; GIRGIS 1993). Além, a mesma diferença de perfil é presente na escalada de *elav-Gal4* em relação à *UAS-BACE* (Figura 2), o que pode indicar um diferente efeito tanto do leite quanto do kefir dependendo da linhagem de *D. melanogaster* a ser estudada.

6. CONCLUSÃO

- O modelo de Alzheimer utilizado apresenta baixa escalada quando comparado aos parentais.
- Não houve diferença na escalada de moscas modelo de Alzheimer tratadas com kefir
- O kefir apresenta melhora na sobrevivência de moscas modelo de Alzheimer.
- O kefir impediu o desenvolvimento de moscas *elav-Gal4* e provenientes do cruzamento *elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP* (modelo de Alzheimer)

- O leite impediu o desenvolvimento de moscas UAS-BACE,UAS-APP e provenientes do cruzamento $elav-Gal4 > UAS-BACE,UAS-APP$ (modelo de Alzheimer)
- O uso de kefir pode ser útil de forma a melhorar a sobrevivência de moscas modelo de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185 - 2195, 2000.
- ALI, Yousuf O. et al. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 49, 2011.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, p. 459 - 509, 2016.
- BIRD, T. D. Genetic aspects of Alzheimer disease. **Genetics in Medicine**, v. 10, n. 4, p. 231, 2008.
- BLOOM, G. S. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. **JAMA neurology**, v. 71, n. 4, p. 505 - 508, 2014.
- CENESIZ, S et al. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). **DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v. 115, n. 1, p. 15 - 19, 2008.
- CHAKRABORTY, R. et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20799, 2011.
- CHEN, HL et al. Kefir peptides prevent high-fructose corn syrup-induced non-alcoholic fatty liver disease in a murine model by modulation of inflammation and the JAK2 signaling pathway. **Nutrition & diabetes**, v. 6, n. 12, p. e237, 2016.
- CHEN, Z. et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 15 - 21, 2015.
- COOK, Kevin R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* stock Center. 2010.
- DINIZ, RO et al. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 19 - 21, 2003.

EL-TOUKHY, M. A.; GIRGIS, R. S. In vivo and in vitro studies on the effect of larvin and cypermethrin on adenosine triphosphatase activity of male rats. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 28, n. 5, p. 599-619, 1993.

ELLIOTT, David A.; BRAND, Andrea H. The GAL4 system. **In: Drosophila**. Humana Press, 2008. p. 79-95.

FIORDA, F. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. **Food microbiology**, v. 66, p. 86 - 95, 2017.

GARGANO, J. 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.

HARDY, John; SELKOE, Dennis J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HSIEH, H.-H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73 - 81, 2012.

JIANG, T.; SUN, Q.; CHEN, S. Oxidative stress: a major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 147, p. 1 - 19, 2016.

KIM, G. et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325 - 340, 2015.

LIU, Xu et al. Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Brain, behavior, and immunity**, v. 46, p. 121-131, 2015.

MAGALHAES, Karina Teixeira et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, 2010.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 377 - 402, 2015.

MÜLLER, W. E. et al. Therapeutic efficacy of the Ginkgo special extract EGb761® within the framework of the mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease. **The World Journal of Biological Psychiatry**, p. 1 - 17, 2017.

ORGANIZATION, W.; ORGANIZATION, W. Dementia fact sheet. **World Health Organization, Geneva, Switzerland**, 2016.

OROZCO-TERWENGEL, PABLO et al. Adaptation of Drosophila to a novel laboratory environment reveals temporally heterogeneous trajectories of selected alleles. **Molecular ecology**, v. 21, n. 20, p. 4931-4941, 2012.

RODRIGUES, K. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404 - 408, 2005.

SCHNEEDORF, JM; ANFITEATRO, D. Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação. **Fitoterapicos Antiinflamatorios. São Paulo, Tecmedd**, p. 443o462, 2004.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, 2011.

SHAL, Bushra et al. Anti-neuroinflammatory potential of natural products in attenuation of Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.

SHARIFI, M. et al. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, v. 34, n. 11, p. 183, 2017.

SPANGENBERG, E. E.; GREEN, K. N. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. **Brain, behavior, and immunity**, v. 61, p. 1 - 11, 2017.

WASAY, M. et al. World Brain Day 2016: celebrating brain health in an ageing population. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 10, p. 1008, 2016.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M.-J. R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural product reports**, v. 28, n. 1, p. 48 - 77, 2011.

WINBLAD, Bengt et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 5, p. 455-532, 2016.

YAMAGUCHI, Masamitsu; YOSHIDA, Hideki. *Drosophila* as a Model Organism.
In: *Drosophila Models for Human Diseases*. Springer, Singapore, 2018. p. 1-10.