

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DE MELATONINA EM *Drosophila melanogaster* MODELO PARA DOENÇA
DE ALZHEIMER

Michelle Ribeiro Sales

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

Uberlândia – MG

Novembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DE MELATONINA EM *Drosophila melanogaster* MODELO PARA DOENÇA
DE ALZHEIMER

Michelle Ribeiro Sales

Profª. Dra. Ana Maria Bonetti

Orientador

MSc. Tamiris Sabrina Rodrigues

Co-Orientador

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

Uberlândia – MG

Novembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DE MELATONINA EM *Drosophila melanogaster* MODELO PARA DOENÇA
DE ALZHEIMER

Michelle Ribeiro Sales

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti
Orientador

MSc. Tamiris Sabrina Rodrigues
Co-Orientador

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Profa. Dra. Celine de Melo

Uberlândia – MG

Novembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DE MELATONINA EM *Drosophila melanogaster* MODELO PARA DOENÇA
DE ALZHEIMER

Michelle Ribeiro Sales

Aprovado pela Banca Examinadora em: 25/11/2019

Nota: 100 pontos

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 25 de Novembro de 2019

“Aos meus pais, em especial ao meu irmão, que sempre esteve ao meu lado e quando já não tinha mais forças para continuar, foi ele que me incentivou e não me deixou desistir de tentar. Hoje, essa é a prova de que nunca devemos desistir dos nossos sonhos. Deus sempre sabe o que faz.”

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer infraestrutura para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Flávio e Kátia e ao meu irmão Guilherme que acreditaram no meu potencial e investiram no que puderam para realizar meu sonho, não me deixando desistir em nenhum momento, provando que são exemplos de vida para a busca por um futuro cada vez melhor.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Bonetti pela oportunidade, pelas valiosas orientações, por me receber como aluna no laboratório e se preocupar com cada detalhe. Obrigada por acreditar no meu trabalho e reconhecer todo o meu esforço em cada etapa realizada. Também agradeço à Msc. Tamiris Sabrina Rodrigues pela co-orientação, pelo incentivo e por não desistir de me colocar no caminho certo na busca pelos resultados.

À todos os colegas, alunos e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC/UFU) pelos serviços prestados e apoio. À toda equipe do LABGEN, Prof^o Dr. Carlos Ueira, Jéssica Regina, Romualdo Morandi, Luiz Fernando, Victória Finzi, Luiza Diniz e Mariana Gonçalves que sempre estiveram presentes ajudando, participando dos experimentos, pela colaboração e disposição no processo de obtenção de dados. Em especial à Serena Mares Malta, muito obrigada pelo apoio, pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos e pelos ensinamentos transmitidos que permitiram o enriquecimento deste trabalho. Sou muito grata pela oportunidade de ter uma “co orientadora” que não mede esforços em querer ajudar o próximo. Obrigada pela convivência, pelas risadas e, pelo principal, pela oportunidade de aprendizado.

Aos amigos que conheci na faculdade e fizeram parte dessa experiência, compartilhando cada momento de desespero, de alegria, de tristezas e correrias do dia a dia, gratidão ao Matheus Campos e ao Fernando Luciano por estarem sempre presentes.

À secretaria da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Leandro Duarte Fraga, Stephania Olímpio Marçal e Gilvane Gonçalves Côrrea por todo o empenho que tem pela Universidade e seus estudantes. Agradeço ao CNPq, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica, assim como a CAPES e UFU pelos equipamentos e instalações concedidas.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente conosco e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho!

Resumo

Conhecida como uma patologia neurodegenerativa, a doença de Alzheimer está associada à idade e às manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas, que resultam em deficiência progressiva e incapacitante. O sintoma inicial da doença é identificado pela perda progressiva da memória recente. Estudos indicam que indivíduos portadores da doença de Alzheimer apresentam alterações nos níveis de produção e secreção de melatonina. A melatonina é um neurohormônio (N-acetil-5-metoxitriptamina) produzido e secretado pela glândula pineal, que se localiza na parte superior do terceiro ventrículo do encéfalo, regulado com precisão pelo ciclo circadiano e é produzida somente no escuro. Com a progressão da doença de Alzheimer, a taxa de produção e secreção de melatonina, pelo organismo humano, diminui gradativamente. Um organismo modelo para estudo de mecanismos moleculares de doenças neurodegenerativas e avaliação dos comportamentos que as acompanham é *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca da fruta. Por se tratar de um organismo de fácil manuseio e conservação, baixo custo e fácil cultivo em laboratório, o seu uso para entendimento dos eventos envolvidos na doença de Alzheimer é uma ferramenta muito adequada. Essa investigação teve por objetivo avaliar o efeito da melatonina no tratamento da doença de Alzheimer, utilizando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo e demonstrou que a melatonina não foi tóxica para a mosca, apresentando, portanto, efeito de melhora de comportamento motor quando submetidas ao teste comportamental.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, doenças neurodegenerativas, Alzheimer, melatonina

Abstract

Known as a neurodegenerative condition, Alzheimer's disease is associated with age and cognitive and neuropsychiatric manifestations, which result in progressive and disabling disability. The initial symptom of the disease is identified by the progressive loss of recent memory. Studies indicate that individuals with Alzheimer's disease show changes in melatonin production and secretion levels. Melatonin is a neurohormonium (N-acetyl-5-methoxytryptamine) produced and secreted by the pineal gland, which is located in the upper third ventricle of the brain, precisely regulated by the circadian cycle and is produced only in the dark. As Alzheimer's disease progresses, the rate of melatonin production and secretion by the human body gradually decreases. A model organism for studying the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases and assessing their accompanying behaviors is *Drosophila melanogaster*, popularly known as the fruit fly. Because it is an easy-to-handle, low-cost organism that is easy to grow in the laboratory, its use to understand the events involved in Alzheimer's disease is a very suitable tool. This research aimed to evaluate the effect of melatonin in the treatment of Alzheimer's disease, using *Drosophila melanogaster* as a model organism, and demonstrated that melatonin was not toxic to the fly, thus presenting motor behavior improvement effect when subjected to behavioral testing.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, neurodegenerative diseases, Alzheimer's, melatonin

Lista de Figuras

1. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2. Sistema GAL4/UAS em <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3. Cruzamento entre linhagens (elav-Gal4 e UAS-BACE) para obtenção do organismo modelo de Alzheimer	21
4. Estrutura química da MELATONINA (N-acetil-5-metoxitriptamina)	21
5. Aparato RING utilizado para o Teste de Escalada	23
6. Curva de Toxicidade da Melatonina	26
7. Visualização da presença de pupas	27
8. Avaliação da presença de pupas e eclosão de adultos em meios contendo Melatonina e nos Controles	27
9. Resultados do Teste de escalada das moscas modelos de Alzheimer e seus parentais (A-D)	29
10. Resultado do Teste de Escalada de moscas modelo de Alzheimer em Controle Positivo (Etanol) e Controle Negativo (água) (A-D).....	30
11. Resultado do Teste de Escalada de <i>Drosophila melanogaster</i> modelo de Alzheimer em Tratamento com Melatonina e Controles Positivo (Etanol) (A-D)	32

Lista de Abreviaturas

1. APP - Proteína Precursora Amilóide
2. β A - Beta Amiloide
3. DA - Doença de Alzheimer
4. mg - miligrama
5. mL - mililitro
6. RING - *Rapid Iterative Negative Geotaxis*
7. MAP – Proteína Associada à Microtúbulos
8. BACE - β -Site APP Cleaving Enzyme
9. TNFs - Emaranhados Neurofibrilares

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	19
2.1. GERAL.....	19
2.2. ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. ÁREA DE ESTUDO	20
3.2. OBTENÇÃO DO ORGANISMO MODELO <i>Drosophila melanogaster</i>	20
3.3. HORMÔNIO MELATONINA	21
3.4. ENSAIO DE TOXICIDADE	22
3.5. TRATAMENTO	22
3.6. TESTE DE ESCALADA – RING	23
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1- INTRODUÇÃO

Com o acelerado envelhecimento da população mundial, o alto índice de crescimento de casos de demência tornou-se um dos principais desafios de saúde pública da atualidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019 mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam demência e a cada ano são registrados quase dez milhões de novos casos. A estimativa da OMS é de que 152 milhões de pessoas serão afetadas até 2050. No conjunto da população, entre 5 e 8% das pessoas com 60 anos ou mais têm demência em algum momento. Cerca de 60% das pessoas com demência vivem em países de baixa e média renda. A demência gera custos adicionais para as famílias e, também, para os governos, bem como uma perda de produtividade para as economias (OMS, 2019).

O envelhecimento populacional é uma consequência do desenvolvimento econômico e social e, nesse processo, há aumento da prevalência de demência, especialmente a doença de Alzheimer (DA), uma doença que progride de forma lenta e gradual, com morte celular, resultando em danos cerebrais. (RIZZI, et al. 2014). 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).

A DA pode manifestar-se de maneira precoce ou tardia, relacionado com características genéticas específicas. A DA precoce, torna-se perceptível antes dos 60 anos, evolui rapidamente e está relacionada com alterações genéticas que podem se manifestar em gerações sucessivas. Por outro lado, a DA tardia, tem sido a causa de demência mais comum após os 65 anos e está associada ao aumento da predisposição para a formação de placas senis e de emaranhados neurofibrilares (TNFs) no cérebro, com perdas de neurônios colinérgicos, redução de massa encefálica, dentre outras alterações do SNC. (VIEGAS, et al. 2011).

A DA é descrita como um distúrbio neurodegenerativo em humanos, caracterizada pelo declínio progressivo da memória, alterações histológicas como, perda neuronal e formação de TNFs além de placas senis (SELKOE, et al. 2001). Neurônios e suas conexões degeneram e morrem, provocando atrofia do cérebro e declínio global da função mental.

Essas alterações causam demência, quando o indivíduo perde sua capacidade de raciocínio, julgamento e memória.

Dentre as características patológicas da doença estão presença de placas amilóides, que são fibrilas proteicas que se depositam em vários tecidos, prejudicando a função dos órgãos e placas neurofibrilares (NFTs) intracelulares, compostas pela proteína Tau hiperfosforilada, que não consegue ligar-se aos microtúbulos e promover a estabilidade do citoesqueleto neuronal e dessa forma, desestabiliza os microtúbulos, provocando a morte do neurônio (IQBAL, et al. 2005). A proteína Tau é 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. (HARDY et al., 2002).

As placas amilóides são depósitos extracelulares compostos, principalmente, de um pequeno peptídeo (~4 kD) chamado β -amilóide, (LAFERLA, F. M.; ODDO, S. et al. 2005) de 36 a 43 aminoácidos, encontrado no cérebro de indivíduos portadores da doença. A literatura científica mostra que a DA está relacionada ao acúmulo no cérebro de placas formadas por essa proteína. Sua aglutinação entre os neurônios impede a transmissão de sinais, prejudicando a atividade neural (CHAKRABORTY, et al. 2011).

Tendo em vista que existem dificuldades no estudo da DA em humanos, procurar organismos modelos com fenótipo correspondente ao dessa neuropatologia é essencial para que não haja estagnação das pesquisas acerca dessa doença. Como alternativa 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) e outros.

D. melanogaster vêm sendo empregada como um excelente instrumento nas pesquisas relacionadas aos mecanismos moleculares e celulares de diversas doenças humanas tais como, câncer, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Huntington, Ataxia espinocerebelar e Alzheimer) doenças autoimunes, epilepsia, entre outras. Sua utilização para estudo de patologias humanas a torna um modelo alternativo, que reduz o uso de organismos superiores em pesquisas científicas (GOMES, 2001). Além disso, seu uso como modelo para estudo de doenças neurodegenerativas é validada pelo elevado grau de

conservação biológica entre os genomas da mosca e de humanos, a disponibilidade de técnicas para manipulação e a vantagem do curto ciclo de vida (BILEN; BONINI, 2005).

D. melanogaster é um inseto holometábolo, de porte pequeno, encontrado naturalmente em frutas em estado de putrefação e, por isso, é conhecida, popularmente, como mosca da fruta (LYNCH, et al. 2012). Produzem grande número de descendentes em um único cruzamento e sua manutenção é fácil e de baixo custo (GRAF et al., 1996; JENNINGS, 2011). Possui ciclo de vida rápido (Figura 1) e o seu desenvolvimento embrionário, após fertilização e formação do zigoto, ocorre dentro da membrana do ovo, que eclode em larva. A uma temperatura de 25°C, o ciclo de vida deste inseto se completa em um período de 10-12 dias, quando a pupa eclode em adulto (PARVATHI et al., 2009).

O período larval se divide em três estágios (*instars*). No terceiro e último estágio (3º instar – L3) a larva pode alcançar o comprimento de 4,5 milímetros, desenvolvendo-se para o próximo estágio, que é o de pupa. Possui quatro pares de cromossomos ($2n = 8$) sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais.

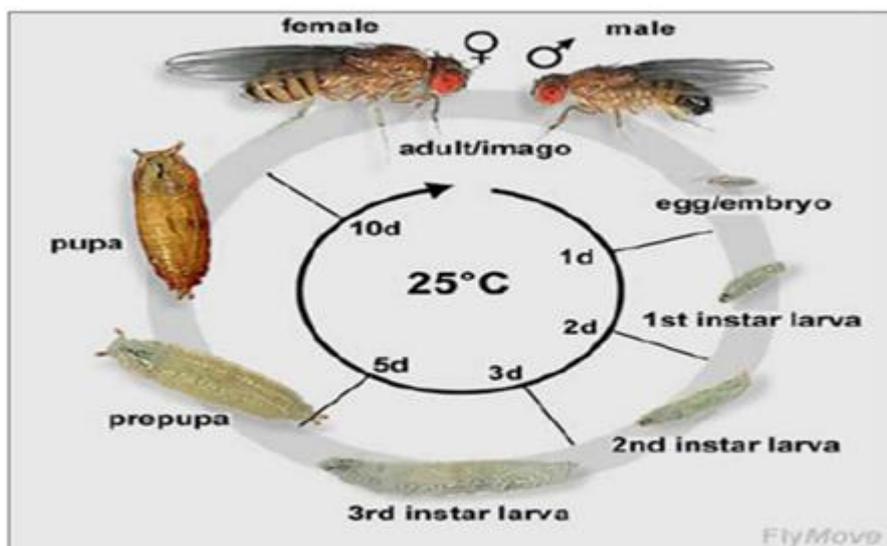


Figura 1 – Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

Fonte: <<http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>>.

Aproximadamente 75% dos genes relacionados à doenças humanas possuem ortólogos funcionais em *D. melanogaster*. A homologia de sequência desses genes com a de humanos é de cerca de 40%, sendo de 80% – 90% em domínios funcionais conservados. Para teste dos efeitos de produtos naturais sobre a DA, pode ser utilizado o organismo modelo *D. melanogaster*, que possui seu genoma completamente sequenciado (ADAMS et al., 2000).

Linhagens transgênicas de *D. melanogaster* são ferramentas nos estudos relacionados à diferentes doenças, incluindo a DA. Essas linhagens podem ser construídas ou obtidas em centros de estoque como o Centro de Estoque Bloomington da Universidade de Indiana, USA, de onde são provenientes as linhagens utilizadas nessa investigação.

A construção de uma linhagem transgênica de *D. melanogaster*, é baseada no uso de transposons. O gene codificador da transposase é retirado e substituído pelo gene de interesse, que se deseja incorporar no genoma da mosca. Esses transposons se inserem no genoma da *D. melanogaster* como um elemento endógeno e a partir disso, é mantido na mesma posição nas gerações seguintes. (BACHMANN, 2008; ROOTE e PROKOP, 2013).

Seu genoma compacto e simples, com apenas quatro pares de cromossomos, permitiu o desenvolvimento de modelos transgênicos de doenças humanas, com genes candidatos expressos em regiões específicas (HALES et al., 2015).

Utilizando o sistema binário de expressão Gal4/UAS, um ativador de transcrição de leveduras, genes humanos podem ser expressos no cérebro da *D. melanogaster* de forma precisa (JACKSON, 2008; JENETT et al., 2012). O sistema Gal4/UAS é um método bioquímico usado para estudar a expressão e a função de genes em organismos como a mosca da fruta. UAS e Gal4 não existem naturalmente em *D. melanogaster* (DUFFY, 2002). A ativação desse sistema acontece pelo cruzamento entre linhagens expressando Gal4 (designados como *drivers*) com linhagens contendo o elemento UAS (designados como *responder*). A prole resultante do cruzamento, expressará o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por Gal4 (Figura 2) (DUFFY, 2002; ELLIOTT e BRAND, 2008). Os genes de interesse podem ser repórter, diferentes isoformas ou outras espécies e RNAs de interferência. O sistema Gal4/UAS permite análise temporal e espacial da expressão gênica (ELLIOTT e BRAND, 2008). É possível expressar proteínas específicas da DA, como a proteína precursora de amiloide (APP) e a enzima β -secretase direcionadas para o cérebro e mimetizar a via amiloidogênica da doença e sua resposta a tratamentos (CHAKRABORTY et al., 2011).

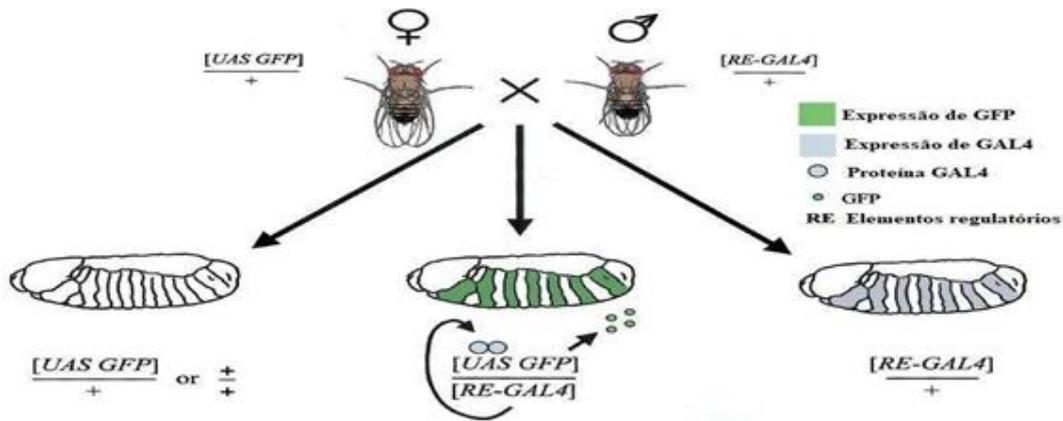


Figura 2 – Sistema GAL4/UAS em *Drosophila melanogaster*. Fêmeas portando o responder (UAS-GFP) cruzadas com machos expressando o driver GAL4 (RE-GAL4) resulta em progênie contendo ambos os elementos do sistema. A presença de GAL4 em segmentos embrionários alternados dirige a expressão do responder (UAS-GFP) para esses locais. Fonte: (DUFFY, 2002).

A falta de sucesso, até o momento, em desenvolver terapias efetivas para a DA e o aumento dos custos com o tratamento de demência, incentiva a busca de novos compostos que possam ser usados como tratamento (WINBLAD et al., 2016).

O hormônio melatonina, derivado a partir de um aminoácido essencial triptofano e sintetizado pela glândula pineal tem como função regular o ritmo circadiano, sono, humor, envelhecimento e reprodução, eliminar radicais livres, melhorar a imunidade e inibir a oxidação das biomoléculas (ZAWILSKA, SKENE et al. 2009). A secreção de melatonina pelo organismo saudável ocorre, principalmente, durante a noite, com níveis de produção elevados no período noturno e reduzidos durante o dia, com base na mudança de duração do fotoperíodo ambiental (LINCOLN; SHORT, 1980; REITER, 1993), isto é, seu pico de liberação ocorre no ciclo escuro do sono e ação da luminosidade nos seus receptores da retina pode inibir sua síntese noturna (REITER et al., 2014; GANIE et al., 2016).

As duas principais vias de metabolização da melatonina ocorrem no fígado e no cérebro. No fígado, ocorre a hidroxilação da melatonina formando 6-hidroximelatonina, seguida de conjugação com sulfato ou glucoronato, posteriormente excretada na urina sob a forma de 6-sulfatoximelatonina (forma mais estável e de fácil avaliação pela determinação urinária). No tecido cerebral, a melatonina é convertida em N-acetil-2-formilmetoxiquinurenamina, que sofre degradação imediata à N-acetil-5-metoxiurenamina.

Uma vez formada, em humanos, a melatonina é liberada nos capilares que penetram na glândula pineal e, posteriormente, é distribuída a todas as células do organismo. Estudos realizados com *Drosophila melanogaster* mostram a presença do hormônio Melatonina em seu organismo, mostrando um pico de produção durante a noite. (FINOCCHIARO et al. 1988).

Em pacientes com DA, os níveis de melatonina no plasma e líquido cefalorraquidiano são baixos e ocorre a perda do controle do ciclo circadiano (WU Y-H, SWAAB et al. 2005). Estudos com animais demonstram que o tratamento com melatonina previne a morte cerebral provocada por deposição de proteína β -amilóide, inibe a agregação dessa proteína e altera os níveis de lipídeos nas membranas mitocondriais. Em camundongos, o tratamento com melatonina parece evitar a hiperfosforilação da proteína Tau, crucial para o desenvolvimento da D.A, sugerindo que a suplementação com a melatonina melhora o ritmo circadiano e produz efeitos benéficos na memória (ZUBENKO, MOOSSY et al. 1991, HONG-QI, ZHI-KUN, SHENG et al. 2012; CORRALES, MARTINEZ et al. 2013).

A deficiência de melatonina pode causar ou favorecer, o desenvolvimento da patologia da DA e investigações têm sido feitas para estabelecer os mecanismos pelos quais a melatonina pode interferir na doença, em nível molecular (ZHOU; LIU; KAMOHORST; HOFMAN; SWAAB et al. 2003). O hormônio melatonina é eficiente para tratamentos em processos inflamatórios de outras doenças neurodegenerativas. Além disso, sabe-se que seus níveis estão alterados no estágio pré-clínico da DA e que essa queda se acentua com a progressão da doença (URRESTARAZU et al. 2016).

Avaliar os efeitos da melatonina em organismo modelo pode acrescentar dados para compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da DA e para a proposição uma alternativa no tratamento, que poderá ser mais explorada em trabalhos futuros.

2- OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Avaliar em *Drosophila melanogaster*, modelo para Doença de Alzheimer, os efeitos do hormônio Melatonina.

2.2 ESPECÍFICOS:

Verificar, por meio do Teste de Toxicidade, as concentrações de melatonina a serem utilizadas em *D. melanogaster*;

Avaliar, por meio do teste de comportamento RING (Teste Interativo Rápido de Geotaxia Negativa) ou Teste de Escalada os efeitos do hormônio melatonina em *D. melanogaster*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética, do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UFU – Universidade Federal de Uberlândia, de Dezembro de 2018 a Junho de 2019. A manutenção das moscas e a execução dos experimentos seguiram normas e condições experimentais estabelecidas e padronizadas.

3.2. OBTENÇÃO DO ORGANISMO MODELO *Drosophila melanogaster*

Foram utilizadas moscas de *Drosophila melanogaster* geneticamente modificadas, obtidas no Centro de Estoque Bloomington da Universidade de Indiana, USA. As linhagens geneticamente modificadas são: P{GawB}elav^{C155}, P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4, P{hsFLP}1, w^{*}(BL#5146) e w¹¹¹⁸; P(UAS-BACE,UAS-APP1.L)2 (BL#29877), que de agora em diante serão mencionadas como elav-Gal4 e UAS-BACE, respectivamente.

As moscas foram mantidas em estufa à temperatura de 25°C, com ciclo circadiano de 12:12 horas claro e escuro, simulando os períodos diurno e noturno.

Para obtenção das moscas modelo para D.A., foi realizado cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 e machos da linhagem UAS-BACE. As linhagens parentais foram previamente expandidas em frascos de vidro contendo meio de cultura padrão *Bloomington*. O cruzamento (expansão) foi mantido durante 10 dias. No 7º dia foram retiradas todas as moscas adultas utilizadas no cruzamento e, a partir do 10º dia, foi realizada a coleta das fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 recém eclodidas, para realização do cruzamento com machos da linhagem UAS-BACE. Após 7 dias de cruzamento, os frascos foram esvaziados e, em seguida, coletadas pupas selecionadas pelo fenótipo, pupas tubby e pupas alongadas (Figura 3). Após eclodirem, as pupas alongadas dão origem à moscas com genótipo w^{*}, elav-Gal4; UAS-BACE,UAS-APP/+, designadas neste trabalho como mosca modelo para Alzheimer.

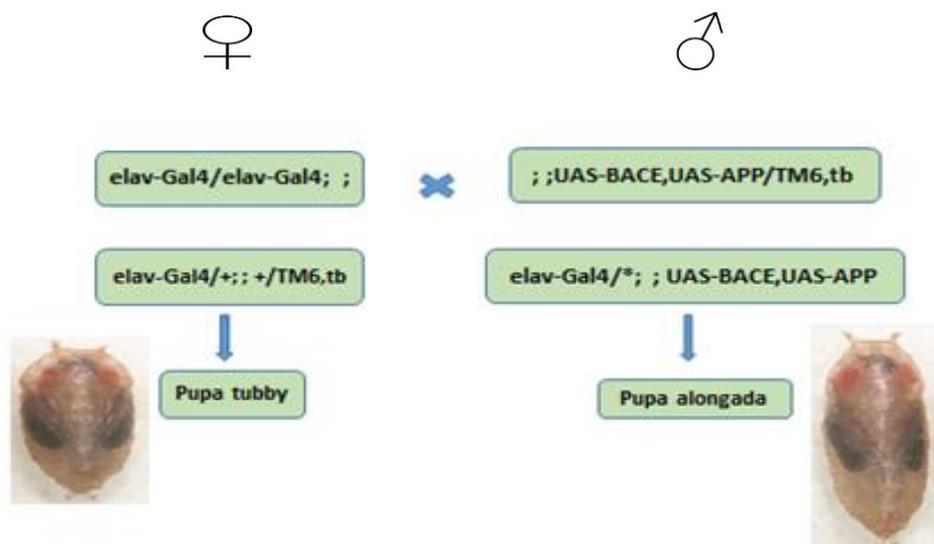


Figura 3 – Cruzamento entre linhagens (elav-Gal4 e UAS-BACE) para obtenção do organismo modelo de Alzheimer

3.3. HORMÔNIO MELATONINA

O hormônio melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é derivado da serotonina que, por sua vez, é derivada do Triptofano, um aminoácido essencial que estimula a glândula pineal a secretar melatonina. A melatonina (Figura 4) possui fórmula molecular $C_{13}H_{16}N_2O_2$ e aspecto de pó branco. Para realização dos testes foi utilizado a melatonina ultra pura adquirida da empresa *Sigma* (EUA).

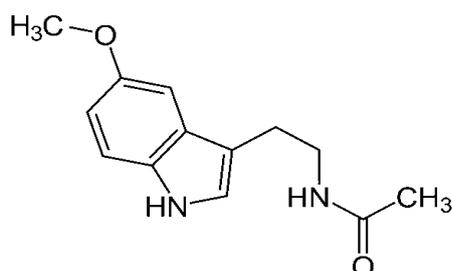


Figura 4 – Estrutura química da MELATONINA (N-acetil-5-metoxitriptamina)

Fonte: <<https://es.wikipedia.org/wiki/Melatonina>>

A Melatonina foi previamente diluída em água milli-Q (MILLIPORE, Direct-Q) e em 0,05% de Álcool Etílico Absoluto 99,8% P.A. (NEON) em volume total de 5 mililitros (mL). Para a obtenção das concentrações de 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,025 mg/mL e a mistura foi homogeneizada por pipetagem.

3.4. ENSAIO DE TOXICIDADE

Moscas da linhagem modelo para D.A., geração F1 do cruzamento realizado entre *elav-GAL4* e *UAS-BACE,UAS-APP/+*, foram submetidas ao Ensaio de Toxicidade.

As moscas foram alimentadas com purê de batata enriquecido suplementado com hormônio melatonina (*Sigma*) nas concentrações de 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL, em *vials* (tubo de acrílico transparente) individuais. O Controle negativo foi preparado com purê de batata diluído em água e o Veículo constou de purê de batata diluído em água e em etanol (concentração de 0,1% v/v).

Em cada *vial* foram colocadas 25 moscas (machos e fêmeas) e cada concentração foi testada em triplicata. Os *vials*, recobertos com papel alumínio para evitar a degradação da melatonina, foram mantidos em estufa à temperatura de 25°C, por 21 dias.

A curva de toxicidade foi obtida pela contagem do número de indivíduos mortos a cada troca do meio, realizada 3 vezes por semana em intervalos de 21 dias. Nesse ensaio, também foi avaliada a empupação de larvas e sua eclosão, o que é o indicativo de taxa de sobrevivência.

3.5. TRATAMENTO

Após obtenção dos resultados do Ensaio de Toxicidade, foram estabelecidas as dosagens de Melatonina a serem utilizadas no tratamento experimental. As concentrações escolhidas foram 0,4 mg/mL; 0,1mg/mL e 0,025 mg/mL e veículo (Etanol) em concentração 0,1% (v/v).

Nos primeiros 10 dias de vida adulta, todas as moscas (Alzheimer e parentais) foram alimentadas apenas com purê enriquecido diluído em água. A partir do 11º. dia de vida, as moscas do grupo Controle negativo continuaram com a mesma alimentação, as do controle positivo, com purê enriquecido preparado com água e etanol e as do Grupo experimental, alimentadas com purê enriquecido suplementado com melatonina nas concentrações supra citadas.

As moscas foram mantidas em estufa a 24 °C, com troca do meio 3 vezes por semana até a finalização de todo o processo.

3.6. TESTE DE ESCALADA - *Rapid Interactive Negative Geotaxis (RING)*

O Teste de Escalada foi realizado conforme descrito por Gargano et al. (2005) e consiste na avaliação do desempenho locomotor de *Drosophila melanogaster* através da capacidade de escalada. Vinte e cinco (25) moscas de cada linhagem (controles/grupo de tratamento) foram transferidas para *vials* vazios e colocados no aparato para RING, uma estante com capacidade para encaixe de até 12 frascos (Figura 5). Após colocar as moscas no aparato, o mesmo foi mantido em ambiente livre de ruídos e em repouso por 20 minutos, para ambientação. A 48 cm de distância do aparato foi posicionada uma câmera fotográfica digital de 13 megapixels e uma fonte luminosa, constituída por lâmpada fluorescente de cor branca de 18W, 220V, 6500K e 122 mA.

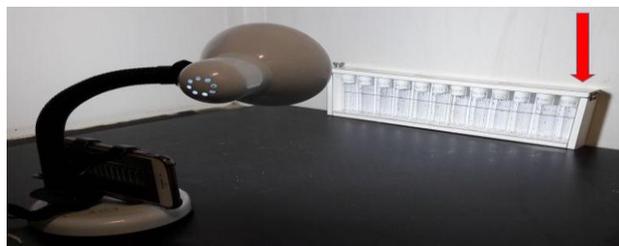


Figura 5 - Aparato RING (seta) utilizado para o Teste de Escalada

Após o período de ambientação deu-se início à avaliação da escalada. O aparato, segurado com as duas mãos, foi batido por 3 vezes sobre uma superfície plana para que todas as moscas se deslocassem para o fundo dos frascos. Após a última batida e com o aparato disposto em superfície plana, iniciou-se a filmagem da escalada das moscas por 20 (vinte) segundos. Contou-se o número de moscas que escalaram uma distância mínima de 5 centímetros nos frascos, durante os primeiros 18 segundos após a última batida, a fim de avaliar o progresso de escalada a uma altura igual ou superior a 5 centímetros. Os procedimentos de ambientação, batidas e filmagem foram repetidos por 5 vezes, com intervalo de 1 minuto entre as repetições.

As moscas foram avaliadas após 48 horas, 7 dias e 14 dias em meio de tratamento. Todos os procedimentos foram filmados e analisados pelo programa Quicktime®, com padronização de 18 segundos completos correspondentes a 540 *frames* de leitura do vídeo. A contagem dos *frames* foram realizadas a partir do tempo em que a raque foi colocada em superfície plana, sendo esse o tempo 0 da escalada.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

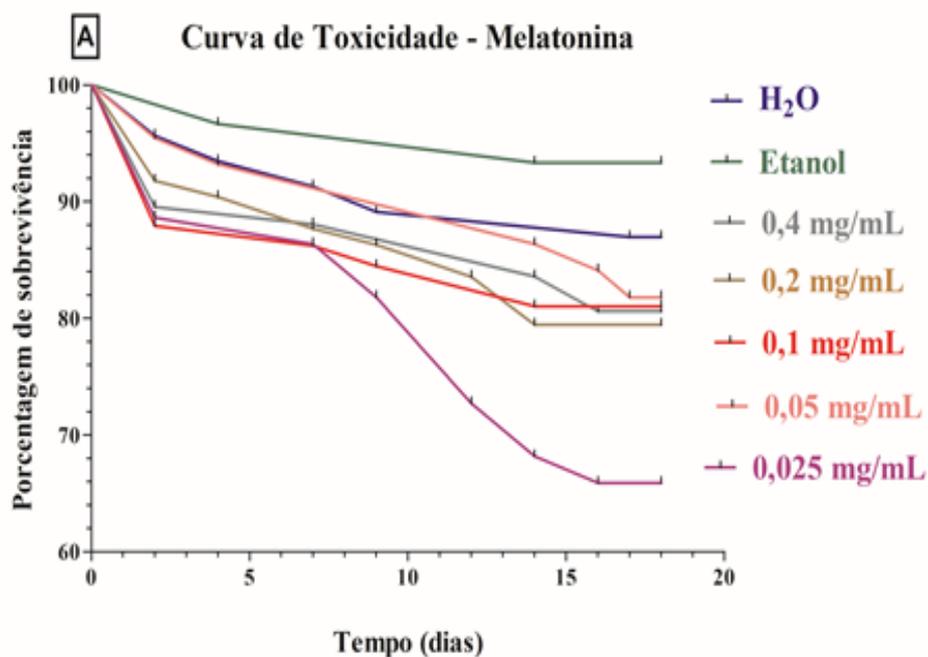
Para as análises estatísticas utilizou-se o *software GraphPad PrismR* versão 5 com apresentação de valores com máximo e desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelos testes D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e KS, todos para avaliação da normalidade com $p < 0,05$. As médias obtidas nos testes de toxicidade foram submetidas ao teste ANOVA (para dados normalizados). No Teste de Escalada foram obtidas médias com comparações múltiplas por meio do teste de *Mann-Whitney U* ($p < 0,05$) (para dados não normalizados).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MELATONINA

Para a avaliação de toxicidade da melatonina para as moscas com fenótipo Alzheimer, foram comparadas as porcentagens de sobrevivência dos tratamentos nas diferentes concentrações (0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) e nos grupos Controle negativo (H₂O) e Veículo (Etanol) (Figura 7).

Foi possível observar, conforme mostrado na Figura 6, alta taxa de mortalidade nos tratamentos com Melatonina em doses de 0,025 e 0,2 mg/mL. O Controle feito com veículo (Etanol) em concentração igual a 0,1% (v/v), provocou pequena taxa de mortalidade. As moscas tratadas com Etanol apresentaram maior taxa de sobrevivência do que as moscas tratadas com a maior concentração de Melatonina (0,4 mg/mL) (Figura 6A). A curva de mortalidade de indivíduos tratados com Melatonina (Figura 6B) não mostrou diferença significativa pelo teste *One-Way ANOVA* entre os controles e os tratamentos.



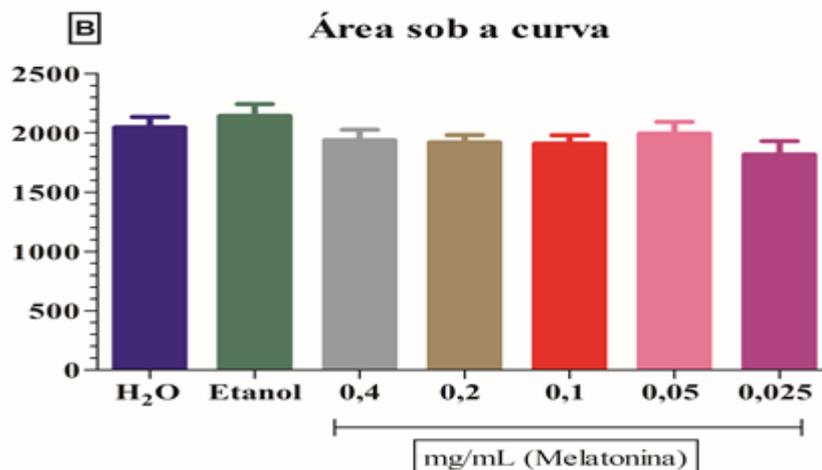
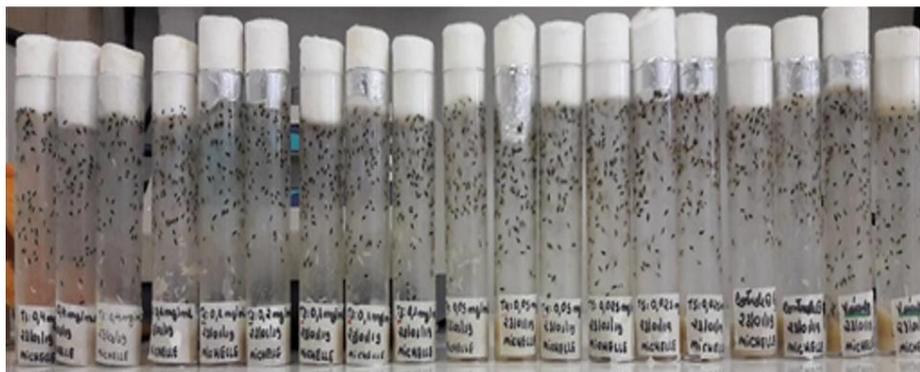


Figura 6 – Curva de Toxicidade da Melatonina – A. Toxicidade (%) da Melatonina para *Drosophila melanogaster*, modelo de Alzheimer, durante 21 dias de ensaio. **B.** A área da curva de cada tratamento é representada nesse Gráfico das diferenças de toxicidade em cada concentração de tratamento e nos Controles

O fato de não ter havido diferença entre os Controles e os Tratamentos com Melatonina pode ser atribuído a certa proteção antioxidante dada pela melatonina, que promove aumento no tempo de vida, sendo esses efeitos atribuídos à prevenção da formação de radicais livres pela melatonina (BONILLA et al., 2002). Foram descritos resultados semelhantes, de baixa toxicidade, em camundongos, o que corrobora com a hipótese de proteção antioxidante do hormônio. Essa proteção se refletiu no aumento significativo do tempo de vida útil das moscas.

Foi avaliada, também, a progênie dos adultos (Alzheimer) tratados com melatonina (Figura 7). Observou-se redução do número de pupas e de eclosão nos *vials* de tratamento com melatonina quando comparados aos *vials* Controle negativo (H₂O) e Veículo (Etanol) (Figura 8).

A



B

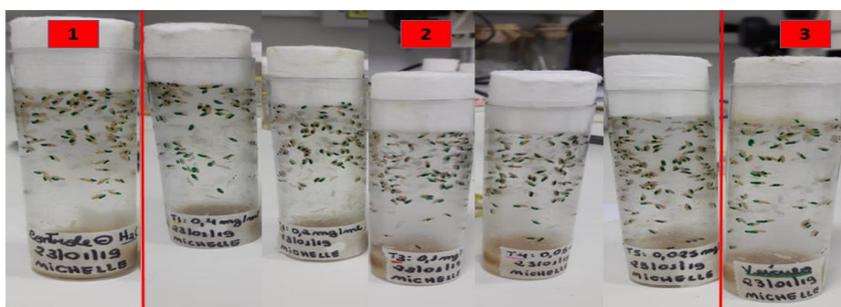
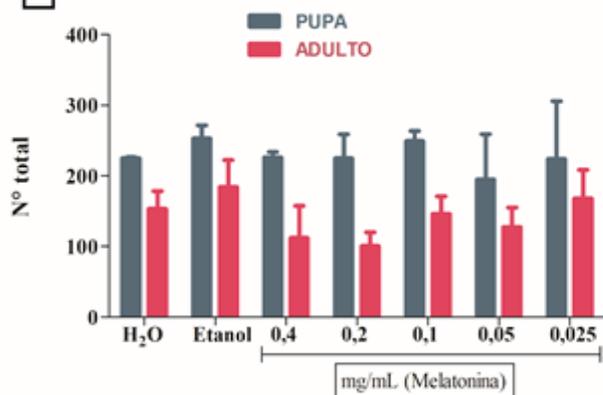


Figura 7 – Visualização da presença de pupas. Pupas resultantes da progênie de *Drosophila melanogaster* em vials com meio contendo Melatonina nas concentrações testadas (A). Em destaque pupas na parede dos vials: 1. Controle negativo (H₂O) 2. Tratamento com Melatonina ((0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) 3. Veículo (Etanol) (B)

A



B

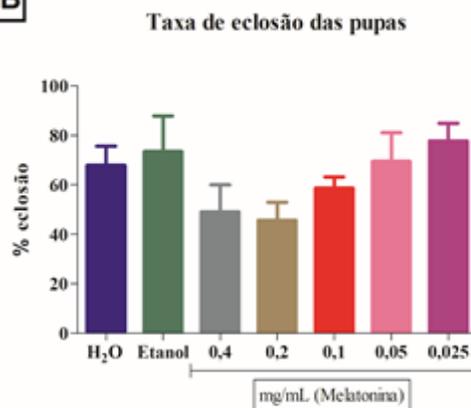


Figura 8 – Avaliação da presença de pupas e eclosão de adultos em meios contendo Melatonina e nos Controles. Total de pupas nos vials de cada tratamento com melatonina e respectiva de eclosão (A). Taxa de eclosão das pupas nos diferentes tratamentos (B). Os valores estão representados com mínimo e máximo e foi utilizado o teste de *Two-Way ANOVA* para cálculo da diferença estatística.

A Figura 8 A-B indica pequena redução na eclosão de adultos nas concentrações de 0,4 e 0,2 mg/mL de melatonina quando comparado ao Controle negativo (H₂O) e Veículo (Etanol) embora não significativa a nível de *Two-Way ANOVA*.

A Melatonina teve sua eficácia comprovada para reduzir, em camundongo, a ativação glial, produção de NO e os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias na isquemia e em alguns modelos de toxicidade do proteína A β amilóide (CLAPP-LILLY et al., 2001; JESUDASON et al., 2007; RODRIGUEZ et al. 2007; SHEN et al., GUNASINGH et al., 2008).

Tendo em vista que a melatonina apresenta poder antioxidante e os seus níveis diminuem com a idade, pesquisadores a sugerem que este hormônio exerce papel crucial na gênese de doenças neurodegenerativas. A melatonina não apenas sequestra radicais livres, tais como o radical superóxido (O₂⁻), hidroxila (*OH), peroxila (LOO*) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), mas também aumenta o potencial antioxidativo da célula, estimulando a síntese de enzimas antioxidativas tais como a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPX) e enzimas envolvidas na síntese de glutathiona. Em vários trabalhos, foi demonstrado que a melatonina aumenta a expressão de mRNA de enzimas antioxidativas (SRINIVASAN et al., 2002).

4.2. TRATAMENTO COM MELATONINA E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO PELO TESTE DE ESCALADA

A partir dos resultados anteriores para toxicidade do hormônio, definiu-se que para o tratamento de moscas modelo de DA seria usado Melatonina nas concentrações de 0,4; 0,1 e 0,025 mg/mL.

O procedimento experimental foi realizado em indivíduos adultos de *D. melanogaster* com cada uma das 2 linhagens (parentais elav-Gal4 e UAS-BACE) e modelo de Alzheimer, sendo todos em triplicata.

Nos indivíduos da progênie de elav-Gal4 e UAS-BACE, que apresentam fenótipo Alzheimer e idade de 9 a 11 dias pós-eclosão, a avaliação (Figuras 9A-D) mostrou que no período de 48 horas (Figura 9A) após o início do controle negativo (H₂O), houve diferença significativa através do teste de *Mann-Whitney U* nos resultados do Teste de Escalada entre

as linhagens *elav-Gal4* e fenótipo Alzheimer ($p < 0,0001$) e, entre as linhagens *UAS-BACE* e fenótipo Alzheimer ($p < 0,0483$). Após 7 dias (Figura 9B), não houve diferença entre os parentais e os indivíduos fenótipo Alzheimer. Aos 14 dias (Figura 9C) os indivíduos do parental *UAS-BACE* morreram e os indivíduos fenótipo Alzheimer mostraram menor porcentagem de escalada do que o parental *elav-Gal4* do que nos intervalos anteriores (48 horas e 7 dias).

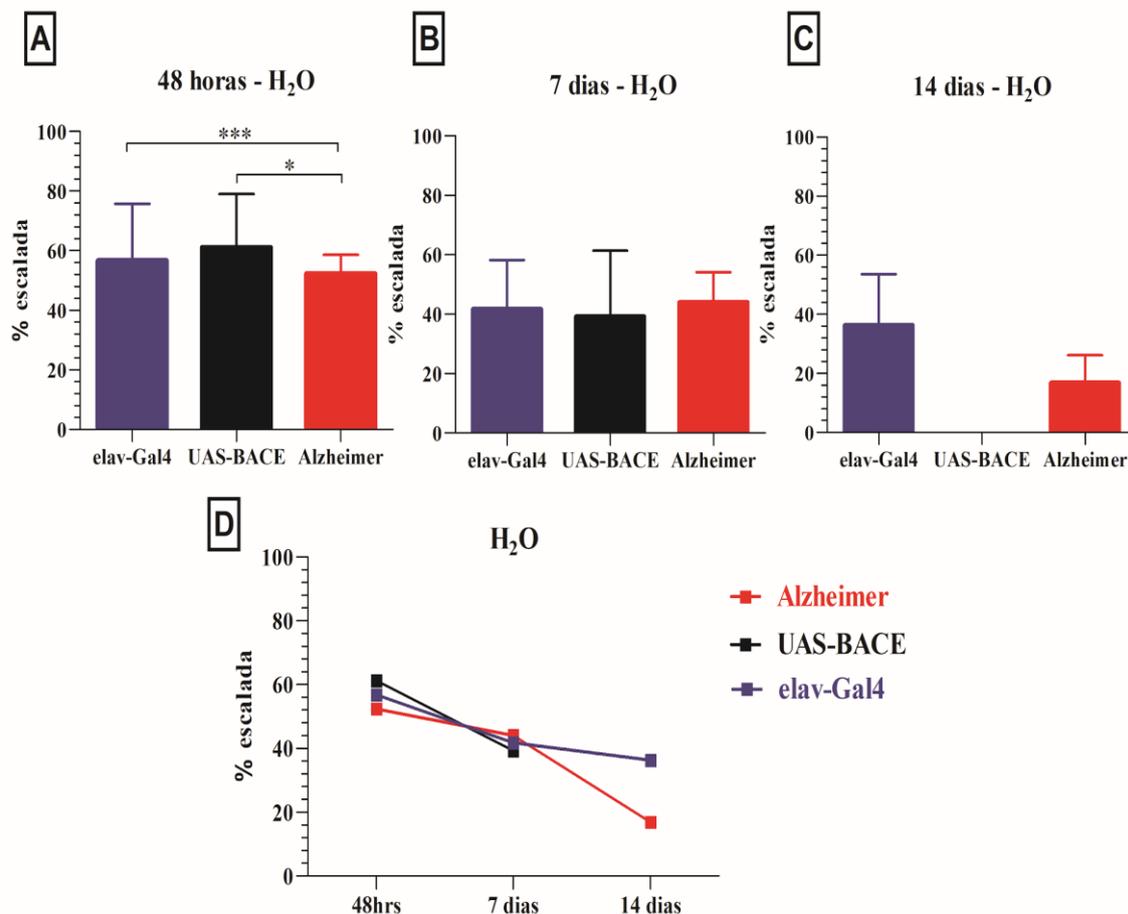


Figura 9 - Resultados do Teste de Escalada das moscas modelo de Alzheimer e seus parentais (A-D). Adultos de *Drosophila melanogaster* em meio preparado apenas com H₂O (A-C). Resultado da escalada após 48 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C) do Controle negativo (H₂O). Comparação ao longo do tempo total de análise do grupo Controle negativo (D). Os valores estão representados com mínimo e máximo e foi utilizado o teste *Mann-Whitney U* em duas etapas - foi comparado *elav-Gal4* com Alzheimer seguido de comparação entre *UAS-BACE* e Alzheimer) para cálculo da diferença estatística. *** indica $p < 0,0001$, * indica $p < 0,0483$.

A partir da análise da atividade locomotora de *D. melanogaster* foi possível avaliar a progressão da doença. Quando submetidos à análise estatística, foi possível identificar diferença significativa pelo teste de *Mann-Whitney U* ($p < 0,0483$) ao comparar a escalada das

moscas modelo de Alzheimer com seus parentais de forma pareada, isto é, Alzheimer x elav-Gal4 e Alzheimer x UAS-BACE.

Aos 48 horas, moscas modelo de Alzheimer, em meio preparado somente com água, mostraram diferença significativa de escalada quando comparados aos parentais, o que era esperado caso a doença e não a água fosse a causa de diferença. Esse resultado validou o modelo para estudo da patologia. Para prosseguimento do experimento, é essencial que não haja interferência do veículo durante o tratamento, a fim de evitar viés no experimento.

Ensaio com observações tridimensionais com diferentes métodos comprovam, também, a dificuldade progressiva das moscas fenótipo Alzheimer em situações de deslocamento vertical (JAHN et al., 2011).

Ao compararmos a escalada das moscas modelo de Alzheimer tratadas com Veículo (Etanol) com as do Controle negativo (água), obtivemos o resultado apresentado na Figura 10.

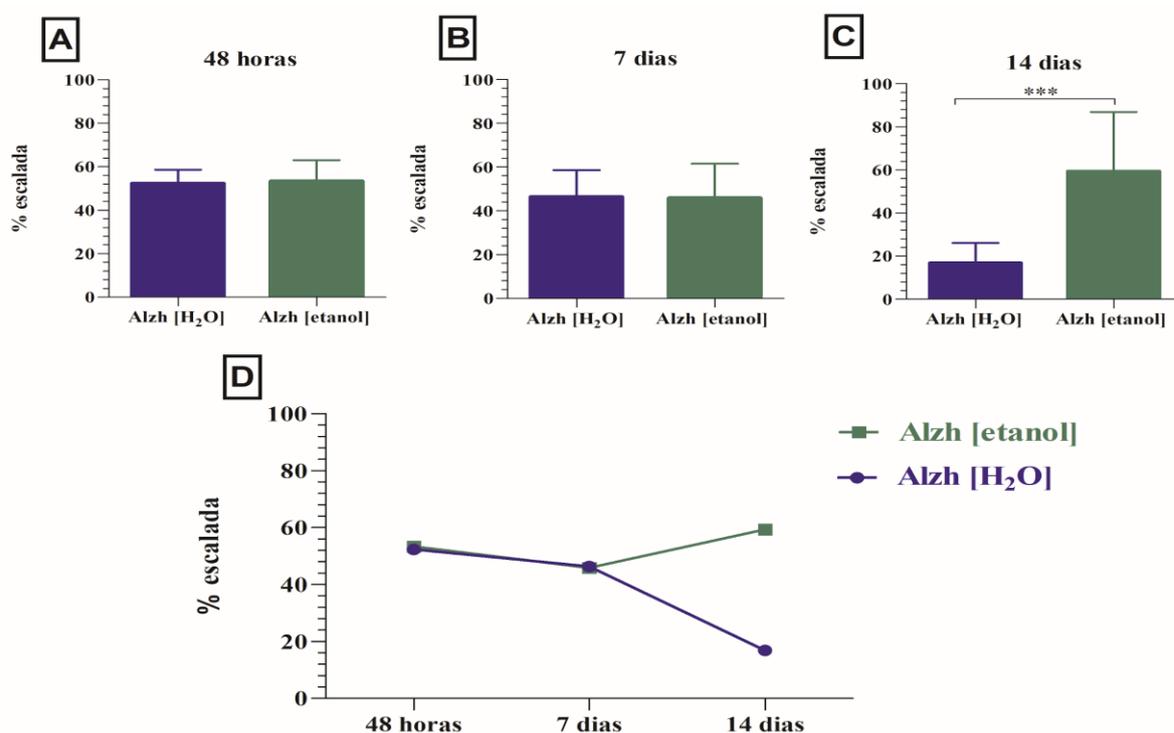


Figura 10 – Resultado do Teste de Escalada de moscas modelo de Alzheimer em Veículo (Etanol) e Controle Negativo (H₂O) (A-D). Porcentagem de escalada após 48 horas (A) após 7 dias (B) e após 14 dias. Comparação ao longo do tempo total de análise do experimento (D). Os valores estão representados com mínimo e máximo e foi utilizado o teste de *Mann-Whitney U* para cálculo da diferença estatística. *** indica $p < 0,0001$.

A comparação (Figuras 10 A-D) entre os Controles com veículo (etanol) e com água mostrou que após 48 horas (Figura 10A) e após 7 dias (Figura 10B) não houve diferença significativa de escalada. No 14º dia (Figura 11C) houve diferença significativa através do teste de *Mann-Whitney U* ($p < 0,0001$) na escalada das moscas dos diferentes meios. As moscas que estavam no meio de cultura preparado apenas com água, apresentaram resultado de escalada inferior àquelas que estavam em meio preparado com Etanol.

A Figura 11 mostra comparação da porcentagem de escalada das moscas modelo de Alzheimer nos diferentes tratamentos com melatonina em moscas dos grupos Controle. A diferença observada entre o Veículo (Etanol) e o hormônio (Melatonina) foi observada a partir do 7º dia de tratamento, quando ocorreu diferença significativa por meio do teste de *Mann-Whitney U* entre moscas do meio com etanol e do meio com concentração 0,1 mg/mL de melatonina. No 14º dia de tratamento ocorreu diferença significativa de escalada por meio do teste de *Mann-Whitney U* entre moscas no meio com Etanol e no meio com concentração 0,025 mg/mL de melatonina e a diferença com concentração 0,1 mg/mL de melatonina desapareceu.

Com a progressão da idade e da doença, verifica-se que apenas a concentração de 0,1 mg/mL de melatonina foi capaz de manter a mesma porcentagem de escalada em 48 horas, 7 dias e 14 dias quando comparado ao Veículo (Etanol). É possível visualizar pela Figura 11, que a porcentagem de escalada das moscas tratadas com as concentrações de 0,4 e 0,025 mg/mL de melatonina foi diminuindo, mantendo-se constante apenas a das moscas tratadas com 0,1 mg/mL da droga.

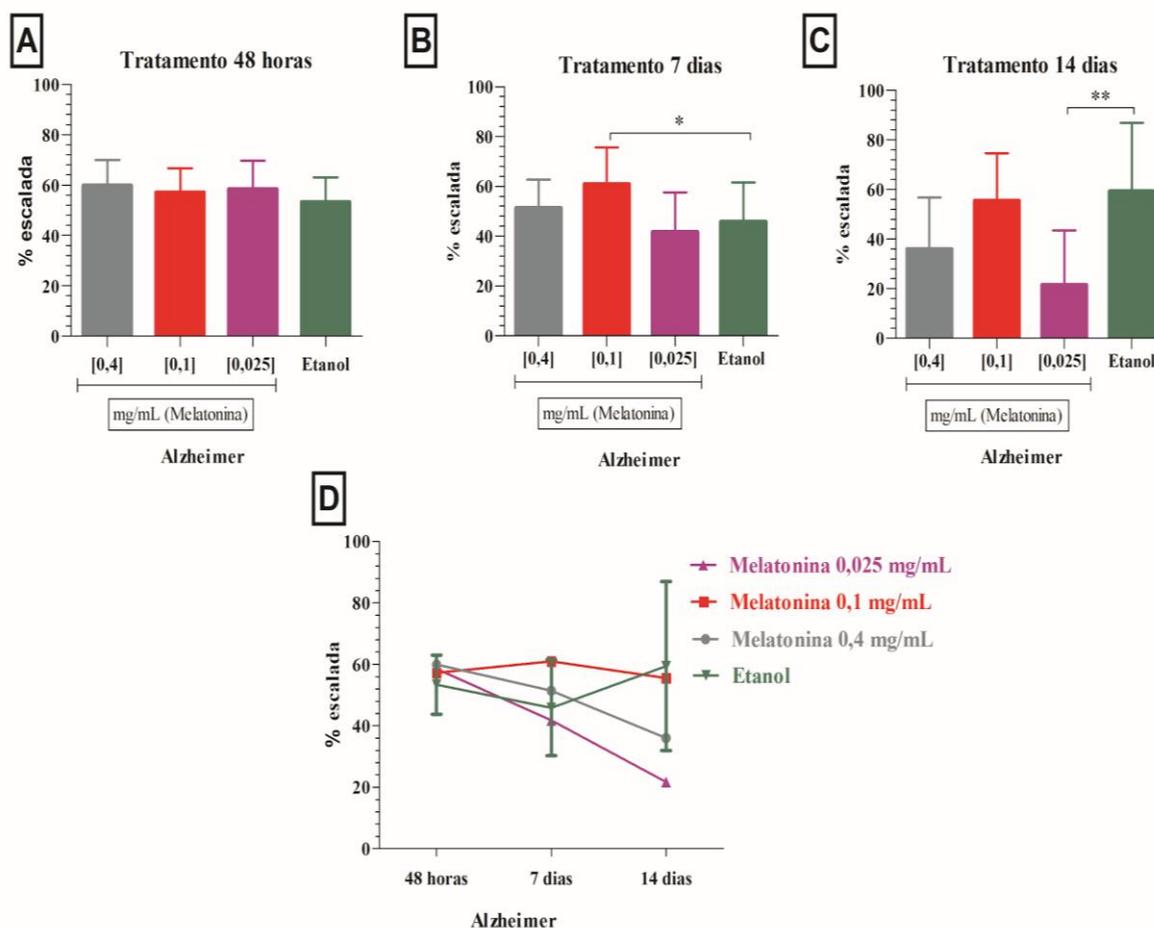


Figura 11 -- Resultado do Teste de Escalada de *Drosophila melanogaster* modelo de Alzheimer em Tratamento com Melatonina e Veículo (Etanol) (A-D). Porcentagem de escalada após 48 horas (A) após 7 dias (B) e após 14 dias. Comparação ao longo do tempo total de análise do experimento (D). Os valores estão representados com mínimo e máximo e foi utilizado o teste de *Mann-Whitney U* para cálculo da diferença estatística. *** indica $p < 0,0612$

A diferença entre os tratamentos com etanol e com a melatonina pode estar relacionada com efeito neuroprotetor do composto. O declínio na produção de melatonina relacionada ao envelhecimento (WIDNER et al., 1999) pode ser um dos principais fatores que contribuem para o aumento do estresse oxidativo e efeitos degenerativos. Nossos resultados com o Teste de Escalada, indicam que o tratamento com melatonina na concentração de 0,1 mg/mL de melatonina foi favorável, impedindo que as moscas apresentassem, nessas condições experimentais, avanço da doença, isto é, o Teste de Escalada mostrou estabilidade de resposta das moscas tratadas com a concentração de 0,1 mg/mL de melatonina, o que não se verificou nos tratamentos com as concentrações de 0,4 e 0,025 mg/mL (Figura 11).

A partir desses resultados é possível inferir que o tratamento com Melatonina contribui, de alguma forma, para a estabilidade da doença nas moscas modelo de Alzheimer ao longo do tempo (48 horas, 7 e 14 dias).

A propriedade antioxidante é a principal aliada no tratamento da DA, reduzindo a toxicidade dos radicais livres, o que atenua a hiperfosforilação da proteína Tau. Em camundongos transgênicos a melatonina aumentou o nível de aprendizagem, assim como a memória. (WANG et al., 2009).

Níveis diminuídos de melatonina podem, assim, estar associados ao processo de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas que são patologias cada vez mais frequentes na população, devido ao aumento da expectativa de vida e, ainda, tornar-se um passo importante no prognóstico e tratamento da Doença de Alzheimer.

5- CONCLUSÕES

A investigação do efeito de Melatonina em *Drosophila melanogaster* modelo para Doença de Alzheimer (DA) permitiu concluir que:

- *D. melanogaster* mostrou ser modelo alternativo adequado para estudo de doenças neurodegenerativas.
- Melatonina não foi tóxica para *D. melanogaster*.
- Concentração de Melatonina: 0,1 mg/mL mostrou efeito de melhora no comportamento de escalada de *D. melanogaster*, em comparação ao Controle negativo (H₂O).

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, 2000 Mar 24; 287 (5461):2185-95.

BILEN, J.; BONINI, N. M. *Drosophila* as a Model for Human Neurodegenerative Disease. **Annual Review of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 153-171, 2005.

BONILLA, E.; LEENDERTZ, S. M.; DÍAZ, S. Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonina. **Experimental Gerontology**. 37 (2002) 629-638.

CHAKRABORTY, R. Caracterização de um Modelo de Doença de Alzheimer de *Drosophila*: Resgate Farmacológico de Defeitos Cognitivos. **Plos One**. 2011.

CLAPP-LILLY, K.L.; SMITH, M.A.; PERRY, G.; HARRIS, P.L.; ZHU, X.; DUFFY, L.K. Melatonin Acts as antioxidant and pro-oxidant in na organotypic slice culture model of Alzheimer disease. **Neuroreport** 12(6): 1277-1280, 2001b.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev**. 2005; 9 (1):11-24.

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

CORRALES, A. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. **J Pineal Res**. 2013;54 (3):346-58.

DUFFY, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. **Genesis**, v. 34, n. 1-2, p. 1-15, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 1526-954X.

ELE, P. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer' disease. **Hormones and behavior**. 2013;64 (1):1-7.

EPSTEIN, F. H. Mechanisms of disease-melatonin in humans. **New Engl J Mes** 336: 186-195, 1997.

ELLIOTT, D. A.; BRAND, A. H. The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. **Methods Mol Biol**, v. 420, p. 79-95, 2008. ISSN 10643745.

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

FINOCCHIARO, L. Melatonin biosynthesis in *Drosophila*: its nature and its effects. **J Neurochem**. 1988; 50(2): 382-7. Epub 1988/02/01.

GANIE, S. A. et al. A. Melatonin: A potential antioxidant therapeutic agent for mitochondrial dysfunctions and related disorders. **Rejuvenation Res** 2016; 19(1): 21-40.

GARGANO, J. W.; MARTIN, I. et al. "Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*." **Experimental Gerontology** 2005; 40(5): 386-395.

GOMES, R. A. P. L. 2001. **Protocolo – Utilização de *Drosophila* em Genética**: 1ª Parte. Dep. Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

GRAF, U. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: Na eficiente tool for detection of genotoxic activity of purê compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxic. **Afr Newlett on Occup Health and safety**. 1996, 6: 9-13

GREEVE, I. Age-Dependent Neurodegeneration and Alzheimer-Amyloid Plaque Formation in Transgenic *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**. 2004. 24 (16) 3899-3906.

HALES, K. G. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815-42, Nov 2015. ISSN 1943-2631.

HARDY, J.; SELKOE, D. 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

HONG-QI, Y.; ZHI-KUN, S.; SHENG-DI, C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. **Transl Neurodegener**. 2012 Oct 30;1 (1):21.

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

IQBAL, K. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*. 2005; 1739 (2-3):198-210. **J. Pineal Res.**, 35 (2003), pp. 125-130.

JACKSON, G. R. Guide to understanding *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. **PLoS Biol**, v. 6, n. 2, p. e53, Feb 2008. ISSN 15457885.

JAHN, T. R. et al. Detection of early locomotor abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 197, n. 1, p. 186-189, 15 abr. 2011.

JENETT, A. A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. **Cell Rep**, v. 2, n. 4, p. 991-1001, Oct 2012. ISSN 2211-1247.

JENNINGS, B. H. *Drosophila* a versatile model in biology & medicine. **Materials today**, v. 14, n. 5, p. 190-195, 2011.

JESUDASON, E.P. et al. Anti-inflammatory effect of melatonin on A β vaccination in mice. **Mol Cell Biochem** 298: 69-81, 2007.

KATZMAN, R. Alzheimer's disease. **N Engl J Med** 1986; 314: 964-73.

LAFERLA, F. M.; ODDO, S. Doença de Alzheimer: A beta, tau e disfunção sináptica. **Tendências Mol Med**. 2005; 11: 170-176.

- LIMA, E. et al. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. **Brain Res** 2005; 1043(1-2):24-31
- LINCOLN, G. A.; SHOERT, R. V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 36, p. 1-52, 1980.
- LLOYD, T. E.; TAYLOR, J. P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Jan. 2010v. 1184, p. e1-20.
- LYNCH, J. A.; EL-SHERIF, E.; BROWN, S. J. Comparison of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*. **Wiley Interdiscip Res Dev Biol**, v. 1, n. 1, p. 16-39, Jan-Feb 2012. ISSN 1759-7692 (Electronic).
- MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinol.** 2004; 25 (3-4):177-95. 4.
- MANNING, G. 2008. A quick and simple introduction to *Drosophila melanogaster*. (On line) **The Virtual Library**. Disponível em: <<http://ceolas.org/VL/fly/intro.html>>.
- MHATRE, S. D. Modelos invertebrados da doença de Alzheimer. **J Alzheimers Dis.** 2013, 33: 3-16.
- MOLONEY, A. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 228-234, 2009.
- PARVATHI, D.; AMRITHA, A.; PAUL, S. F. D. Wonder Animal Model for Genetic Studies – *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – A review. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v.2, p.33-38, 2009.
- PRUBING, K.; VOIGT, A. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration.** 2013. 8: 35.
- REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene. **Pubmed.** 2001, 11 (6): 1114-25.
- REITER, R. J. et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. **Human Reprod Update** 2014c; 20(2): 293–307
- REITER, R. J. Melatonin: clinical relevance. **Best Pract Res Clin Endoc Metab** 17: 273-285, 2003.
- REITER, R.J. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, p. 654-664, 1993.
- RIBEIRO, I. P.; GAIVÃO, I. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. **Rev. Port. Sau. Pub.**[online]. 2010, vol.28, n.2, pp.199-204.
- RIZZI, L.; ROSSET, I.; RORIZ-CRUZ, M. Epidemiologia Global de Demência: Tipos de Alzheimer e Vascular. **BioMed Res Int.** 2014; 1-8.

- RODRIGUEZ, M. I. et al. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. **J Pineal Res** 42(3): 272-279, 2007.
- SARASA, M.; PESINI, P. Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**, 2009.
- SBEM, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia: Posicionamento sobre a melatonina. **AMB**. 2017.
- SEABRA, M. L. V. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. **J Pineal Res**. 2000; 29(4):193-200.
- SELKOE, D.J. Sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research, Physiol.** Rev. 8, 741-766. pmid: 11274343 v. 11, n. 6, p. 1114–1125, 1 jun. 2001.
- SHWN, Y. et al. Supressive effects of melatonin on amyloid-beta-induced glia activation in rat hippocampi. **Arch Med Res** 38(3): 284-290, 2007.
- SKENE, D. J. Swaab Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease *Brain Res.*, 528 (1990), pp. 170-174.
- SRINIVASAN, V. et al. **Indian J Exp Biol**. 2002, 40: 668-679.
- URRESTARAZU. Manejo clínico dos distúrbios do sono na doença de Alzheimer: estratégias atuais e emergentes. **Natureza e Ciência do Sono** (2016).
- WANG, Xin. The anti-apoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci Ther. Boston**, Vol.15, No.4, 2009, pp.345-357
- WIDNER, B. et al. **Adv Exp Med Biol** 1999, 467: 133-138.
- 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.
- WU, Y.; LUO, Y. Transgenic *C. elegans* as a model in Alzheimer's research. **Current Alzheimer Research**, v. 2, p. 37-45, 2005.
- WU, Y-H.; SWAAB, D. F. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. **J Pineal Res**. 2005 Apr; 38(3):145-52.
- ZAWILSKA, J. B.; SKENE D. J.; ARENDT, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. **Pharmacological Reports**. 2009 ; 61(3):383-410.
- ZHOU, J. N. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. **J Pineal Res**. Set 2003; 35 (2): 125-30.
- ZUBENKO, G. S. Neuropathologic and neurochemical correlates of psychosis in primary dementia. **Archives of neurology**. 1991;48(6):619-24.