



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo de doenças
neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação
comportamental**

Aluno: Jéssica Regina da Costa Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Tieme Fujimura

UBERLÂNDIA - MG
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo de doenças neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação comportamental

Aluno: Jéssica Regina da Costa Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-Orientadora: Dr^a. Patrícia Tieme Fujimura

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Genética e Bioquímica (Área Genética).

**UBERLÂNDIA - MG
2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2019	<p>Silva, Jéssica Regina da Costa, 1992- Uso de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de doenças neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação comportamental [recurso eletrônico] / Jéssica Regina da Costa Silva. - 2019.</p> <p>Orientador: Carlos Ueira-Vieira. Coorientadora: Patrícia Tieme Fujimura. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2206 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Ueira-Vieira, Carlos , 1981-, (Orient.). II. Tieme Fujimura, Patrícia, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p>
--------------	--

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 10/2019 - PPGGB				
Data:	Dezessete de julho de 2019	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	12:05h
Matrícula do Discente:	11523GBI0013				
Nome do Discente:	Jéssica Regina da Costa Silva				
Título do Trabalho:	Uso da <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de doenças neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação comportamental.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	RNA-seq de cérebro de modelos biológicos de Doença de Alzheimer e sua utilização na validação de peptídeos neuromoduladores.				

Aos dezessete dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 08:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira, Prof. Dr. Flávio de Oliveira Francisco, Prof^ª. Dr^ª. Renata Graciele Zanon, Prof. Dr. Luiz Carlos Oliveira Júnior e Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata: APROVADA. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Presidente**, em 17/07/2019, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos de Oliveira Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/07/2019, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Graciele Zanon, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/07/2019, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Neves Romcy Pereira, Usuário Externo**, em 17/07/2019, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio de Oliveira Francisco, Usuário Externo**, em 17/07/2019, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1367869** e o código CRC **FD8437FE**.

Dedicatória

A equipe

Dedico esse trabalho a *equipe LabGen*. Desde seus estagiários, discentes, corpo técnico e docentes.

Vocês são a base sólida e humana que possibilitou tanto aprendizado durante esses anos. Quantas vezes estive no nosso laboratório com os olhos cheios d'água, grata por ter exatamente cada pessoa ali, apoiando e confiando no nosso potencial.

A transformação

O ano da defesa já era dito como um ano de *mudança*, mas 2019 simplesmente deu uma reviravolta.

Dedico esse trabalho a toda essa *transformação* que estou vivendo e ainda vou viver. Tive medo, receios, dúvidas, quantas vezes estive perdida, mas graças a ela retornei os olhos ao passado e tive que crescer, amadurecer e enfim confiar em mim e no meu trabalho.

Ao amor próprio

O amor por si só é importante, nos dá o brilho nos olhos ao realizar o que propomos. Mas foi com o amor próprio que além desse brilho pude com essa maravilhosa equipe e as transformações durante o

Doutorado, aprender a me respeitar como ser humano e confiar em todo potencial, acreditar sem receios e com maturidade. Sou extremamente grata por chegar aqui!

A minha família

Meus pais por me acompanharem desde as primeiras frases, ensinar a ler e escrever, apoiar meus sonhos e estudos com tanto carinho, dedicação e amor.

Agradecimentos

Agradeço a *Deus* pelo dom da vida e toda trajetória até aqui.

Agradeço a minha família: *Cláudia, Benedito, Marcella* e bichinhos. Fonte de amor e perseverança. Vocês são as principais pessoas que me possibilitaram estar onde estou, sempre motivando meus estudos, minha carreira e principalmente meus sonhos. Obrigada por serem como são e que possamos seguir juntos evoluindo.

Aos professores *Elaine Freitas Giacomelli* e *Carlos da Costa Jr* representando os Professores e servidores que conheci durante o Ensino Médio na Escola Estadual Neuza Rezende. Docentes que foram essenciais para meu conhecimento sobre a Biotecnologia e escolha deste curso na Graduação.

Meu grande apreço e carinho pelo tempo, paciência e profissionalismo cedidos pelo meu querido orientador Prof^o Dr. *Carlos Ueira-Vieira*. Agradeço pelo excelente professor que é, sempre nos motivando com entusiasmo. Agradeço ao grande ser humano e líder que você é, sempre equilibrando o sucesso da equipe com um olhar empático (principalmente com cada uma das minhas lágrimas – e foram muitas).

A Prof^a Dr^a *Ana Maria Bonetti*, ao seu lado Professora aprendi que sempre poderíamos resolver qualquer perrengue no *LabGen*. Sua dedicação, didática e espontaneidade me inspiram.

A minha co-orientadora, *Patrícia Tieme*. Sou extremamente grata por ter aproximado de você. Por todos os momentos no laboratório, mesmo quando me sentia perdida e duvidava do meu potencial, você me mostrava que era preciso ter inteligência emocional. Saiba que você é exemplo de cientista para mim.

Aos meus amigos, que muitas vezes me afastei durante esse período, mas nunca deixaram de ser ou torcer pelas minhas conquistas: *Leane, Adriana, Yara* e *Jacqueline*. Aos amigos de laboratório reforçando nos momentos de dificuldades o nosso valor, esforço e competência: *Renato Mendonça, Vinícius Borges, Luiza Borges, Manuella, Tamiris Sabrina, Romualdo, Mariana Mendes, Michelle, Luana, Carol Dias, Vitória, Luiz, Victor* e todos que passaram pelo *LabGen*. As *nanogirls* em especial: *Izabella, Roberta, Claudia Mendonça, Emilia Rezende, Mayara Ingrid, Mariana Zoia, Carolzinha do Maranhão, Patrícia Terra* e *Bruna*.

Meu muito obrigada a minha amiga e parceira *Aline Gomes* por me suportar por 10 anos. Você é como uma irmã, sempre com uma palavra de conforto, cuidado e carinho. Agradeço por sua amizade e principalmente por estarmos juntas nessa reta final.

Agradeço aos meus primeiros co-orientandos e as pessoas que tive o prazer de passar um pouco do que aprendi durante esses 4 anos trabalhando com *Drosophila*. Vocês me permitiram descobrir como é estar do outro lado: o de educador. Obrigada *Ana Paula Mendes, Lucas Matos, Marcos Paulo, Letícia Leandro* e em especial a *Serena Malta* por me mostrar que nem tudo é baseado na hierarquia e conseguimos caminhar juntas lado a lado, crescendo e aprendendo, como ser humano e cientista.

Ao grupo *Engenhocas do Riso* e seus coordenadores por mostrar o outro lado da Universidade, que é levar sorrisos aos pacientes do Hospital das Clínicas UFU.

Ao único e melhor funcionário do mês e baixista, *José Luiz*. Por toda parceria durante todos esses anos de UFU e principalmente pelas idas no laboratório para ser nossa mão de obra, pelo apoio e ajuda nas análises, praticamente um robozinho de tão focado. Que você possa brilhar ainda mais.

A *secretaria e Coordenação da Pós* por todo desempenho em sempre oferecer o melhor ao nosso Programa.

Aos *técnicos, docentes* que cumpriram com seu dever e auxiliaram nessa pesquisa e no dia-a-dia durante o Doutorado.

Aos parceiros e colaboradores desde trabalho, como o *Prof. Dr. Serrão* e sua equipe pelos cortes histológicos.

Agradeço a *Universidade Federal de Uberlândia* e ao *Programa de Pós-Graduação Genética e Bioquímica* pela disponibilização de equipamentos e estrutura.

A *CNPq, CAPES e FAPEMIG* pelo investimento realizado para produção científica.

Aos membros da *banca examinadora* por aceitarem contribuir para melhoria deste trabalho e minha como pesquisadora.

Meu obrigado a cada um que percorreu esta caminhada ao meu lado, seja integralmente ou em alguns trechos. Hoje finalizamos uma etapa, a fim de crescer muito mais.

Se não há maneiras para continuar, olhe para dentro de si, tente encontrar. As respostas não vão te responder, mas sim questionar.

Banda 7 Sons

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Doenças neurodegenerativas	15
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2. OBJETIVO GERAL.....	24
2.1. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Linhagens	25
3.2. Cruzamento para obtenção do modelo similar a Doença de Alzheimer	26
3.3. Cruzamento para obtenção do modelo de Demência Frontotemporal	27
3.4. Avaliação comportamental de ambos modelos por teste locomotor	27
3.5. Histologia e índice de neurodegeneração em ambos modelos	28
3.6. Quantificação de amiloide por Tioflavina T	29
3.7. Avaliação do perfil de transcritos no modelo amilóide humano em <i>D. melanogaster</i>	30
3.8. Validação dos GDE por RT-qPCR no modelo <i>AD-like</i>	32
3.9. Avaliação do silenciamento de três genes diferencialmente expressos no modelo amilóide	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Avaliação locomotora.....	34
4.2. Índice de Neurodegeneração	35
4.3. Quantificação de beta amilóide	36
4.4. Análise transcricional por RNA- <i>seq</i> do modelo amilóide.....	37
4.4.1. Envelhecimento (10 d.p.e. <i>versus</i> 0 d.p.e.) do grupo controle e <i>AD-like</i>	40
4.4.1.1. Alteração no nível dos genes olfativos promovidos pelo modelo DA	46
4.4.2. Grupo <i>AD-like versus</i> Controle: 0 d.p.e e 10 d.p.e.	47
4.5. Genes ortólogos	51
4.6. Validação de GDE por RTqPCR.....	52
4.7. Silenciamento dos genes <i>mlc2</i> , <i>CG17754</i> e <i>tn</i> nos olhos de moscas	54
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Vias de processamento da APP.	17
Figura 2- Predisposição genética para Demência Frontotemporal e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) causada pela expansão do hexanucleotídeo GGGGCC	19
Figura 3- Ciclo de vida das moscas <i>Drosophila melanogaster</i> , do ovo até a fase adulta.	21
Figura 4- Representação do sistema Gal4/UAS no modelo similar a Doença de Alzheimer utilizando modelo biológico <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Figura 5- Detalhamento do cruzamento para obtenção do modelo de Alzheimer.	26
Figura 6- Detalhamento do cruzamento para obtenção do modelo de Demência Frontotemporal.	27
Figura 7- Sistema quantitativo para avaliar o índice de neurodegeneração das amostras.	29
Figura 8- Avaliação da taxa de escalada dos modelos em diferentes dias de pós eclosão	34
Figura 9- Índice de neurodegeneração com diferentes dias de eclosão.	36
Figura 10- Quantificação de amilóide por tioflavina T	37
Figura 11- Análise dos genes diferencialmente expressos (GDE) dos grupos controle e Alzheimer.	39
Figura 12- Processos biológicos e vias identificadas no PANTHER	41
Figura 13- Vias identificadas no grupo <i>AD-like</i> com GDE específicos	45
Figura 14- Genes envolvidos no processo olfatório do grupo <i>AD-like</i> .	46
Figura 15- Interação dos GDE do grupo <i>AD-like</i> vs controle 0 d.p.e via ClueGO	48
Figura 16- Interação dos GDE do grupo <i>AD-like</i> vs controle 10 d.p.e via ClueGO	50
Figura 17- Validação RT-qPCR dos níveis de transcrição de sete genes.	53
Figura 18- Supressão gênica direcionada aos olhos da <i>D. melanogaster</i>	54
Figura 19- Supressão do gene CG17754 direcionada aos olhos da <i>D. melanogaster</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

#BL	<i>Bloomington Stock Center</i>
°C	Graus Celsius
ACh	Acetilcolina
AD-like	Modelo amilóide - Doença de Alzheimer
ANOVA	Análise de variância
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> - Proteína Precursora do Amilóide
BACE	<i>β amyloid cleaving enzyme</i> - Beta secretase
Ca²⁺	íons de cálcio
ChAT	acetiltransferase
cm	centímetros
d.p.e	dias pós eclosão
DA	Doença de Alzheimer
dsRNA	Ácido Ribonucleico de fita dupla
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
FTD	Demência Frontotemporal
FTD-like	Modelo similar a Demência Frontotemporal
GDE	genes diferencialmente expressos
GEF	fator de troca de nucleotídeo de guanina
Glu	glutamato
GO	<i>Gene Ontology</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L	litro
M	Molar
Na⁺	Íons de sódio

RESUMO

O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas é uma preocupação atual, sendo a Doença de Alzheimer inclusive uma das prioridades públicas com o público idoso devido à elevação da expectativa de vida. Nesse contexto, alternativas que possibilitem a compreensão das demências como o Alzheimer e a Demência Frontotemporal são relevantes. O uso de modelo biológico, nesse caso a *Drosophila melanogaster*, são excelentes aliados para o estudo e acesso do cérebro. Por meio de cruzamentos foram obtidos dois diferentes modelos para estudo das duas demências citadas acima, com enfoque na compreensão das alterações a nível molecular e comportamental. O modelo de Demência Frontotemporal apresenta uma atividade motora alta quando comparada aos seus controles no início de sua vida (até o 5º dia pós eclosão), similar a um dos sintomas em humanos: inquietação. Já o modelo similar ao Alzheimer, apresenta uma queda significativa em sua atividade motora por volta de 10 dias pós eclosão, também similar ao esperado. Ambos modelos apresentam um alto índice de neurodegeneração com o passar do tempo, identificado pela histologia. Dada a prioridade pública do Alzheimer, o grupo escolheu esse modelo para análise de RNA-*seq* durante a fase inicial da progressão da patologia. Obtivemos mais de 1300 transcritos diferencialmente expressos. Ao mapearmos esses transcritos em plataformas como PANTHER, KEGG e GO obtivemos de forma geral as vias, interações e processos alterados pelo nível de transcritos de cada grupo. Dentre eles sete genes foram validados e apresentaram perfil similar ao encontrado no RNA-*seq*. Desses três genes foram silenciados nos olhos das moscas, sendo que o CG17754 demonstrou alteração morfológica. Nosso trabalho demonstra a eficácia do uso da *Drosophila melanogaster* como modelo alternativo no estudo de doenças neurodegenerativas, possibilitando a triagem de compostos para tratamento e compreensão dos mecanismos de ação de tais patologias.

Palavras-chave: Demências, perfil de transcritos, Doença de Alzheimer

ABSTRACT

The incidence of neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease being one of the public priorities with the aged public due to the increase in life expectancy. In this context, alternatives that allow the understanding of dementias, such as Alzheimer's and Frontotemporal Dementia, are relevant. The biological model, in this study the *Drosophila melanogaster*, are excellent tools for the study and access of the brain. These two models used in our research were support for understanding alterations in molecular and behavioral level through crosses. The Frontotemporal Dementia model demonstrates intense motor activity when compared to its controls at the beginning of its life (from eclosion to the fifth day). Model Alzheimer's like showed a decrease activity motor around 10 days post eclosion, similar to that expected. Either models showed high index of neurodegeneration with the time. Due to relevant health public of Alzheimer's, we focus on from analysis this model for RNA-seq during an early stage of pathology progression. We obtained more than 1300 differentially expressed transcripts. When mapping the transcripts in PANTHER, KEGG and GO for identify interactions and processes of each group. The genes were validated in qPCR were similar to found regulated in RNA-seq. The three genes silenced for RNA interference in the eyes showed no morphological or size change. Our work demonstrating the potential of *Drosophila melanogaster* as a model in investigation of possible treatment, with the purpose of further in screening of components and enlighten the functioning of neuropathologies.

Keywords: Dementias, transcript profile, Alzheimer's disease and RNA-seq

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças neurodegenerativas

O envelhecimento é um processo natural, ocasionado pelo declínio gradual funcional e cognitivo do organismo, sem comprometer, no entanto, a sobrevida e autonomia do idoso frente suas necessidades básicas (BRENMAN-SUTTNER; YOST; FRAME; ROBINSON et al., 2020). O aumento da expectativa de vida, principalmente em países em desenvolvimento, tem ocasionado preocupação principalmente devido a elevada incidência das doenças neurodegenerativas. Ao contrário do envelhecimento, essas patologias são debilitantes e apresentam rápido declínio cognitivo (PODTELEZHNIKOV; TANIS; NEBOZHYN; RAY et al., 2011).

As doenças neurodegenerativas são patologias crônicas, incuráveis e debilitantes, ocasionadas por danos progressivos no cérebro, que podem inclusive culminar na morte dos neurônios (KATSUNO; SAHASHI; IGUCHI; HASHIZUME, 2018). Dentre as doenças neurodegenerativas temos as demências, as quais são definidas pelo déficit cognitivo que acarretam no comprometimento da memória.

Segundo a OMS (2019), cerca de 50 milhões de pessoas sofrem de alguma demência. Estima-se um aumento anual de 10 milhões de novos casos, sendo que até 2030, o número poderá ultrapassar 80 milhões de casos. Dentre as demências, a Demência Frontotemporal exibe um início precoce, acometendo pessoas com faixa etária <65 anos e é considerada a segunda demência pré-senil mais frequente (HODGES; PIGUET, 2018; YOUNG; LAVAKUMAR; TAMPI; BALACHANDRAN et al., 2018). Já a Doença de Alzheimer (DA) apresenta maior incidência, tanto para início precoce quanto para início tardio, com cerca de 60 a 70% dos casos diagnosticados (KEPP, 2017).

1.1.1. Demência Frontotemporal

Descrita pela primeira vez pelo psiquiatra Arnold Pick, em 1892, como um caso de deterioração cognitiva. Esse distúrbio progressivo refere-se a um grupo de desordens que atingem principalmente as células nervosas dos lobos frontais e temporais (LIU; LAU; LIN, 2019). A DFT possui três principais variantes, são elas:

- *Variante comportamental*: a mais comum dentre as variantes. Caracterizada por alterações na personalidade e comportamento social;

- *Afasia primária progressiva*: afeta principalmente a linguagem, podendo levar a dificuldade na construção e compreensão de frases, bem como numa linguagem imprecisa;
- *Distúrbios motores*: afeta principalmente as funções musculares, podendo afetar a parte comportamental ou da linguagem. Relacionada com casos de esclerose lateral amiotrófica (ELA) e DFT.

Alguns dos critérios clínicos considerados para auxiliar o diagnóstico da Demência Frontotemporal, são: alterações referentes ao humor, linguagem, preferência alimentar, hiperoralidade, desinibição verbal, comportamental, apatia, desinteresse social, comportamento estereotipado, inquietação e irritabilidade (CAIXETA, 2009; GALLUCCINETO; TAMELINI; FORLENZA, 2005; MOREIRA; DUARTE; MOREIRA; SANTOS, 2017; YOUNG; LAVAKUMAR; TAMPI; BALACHANDRAN et al., 2018).

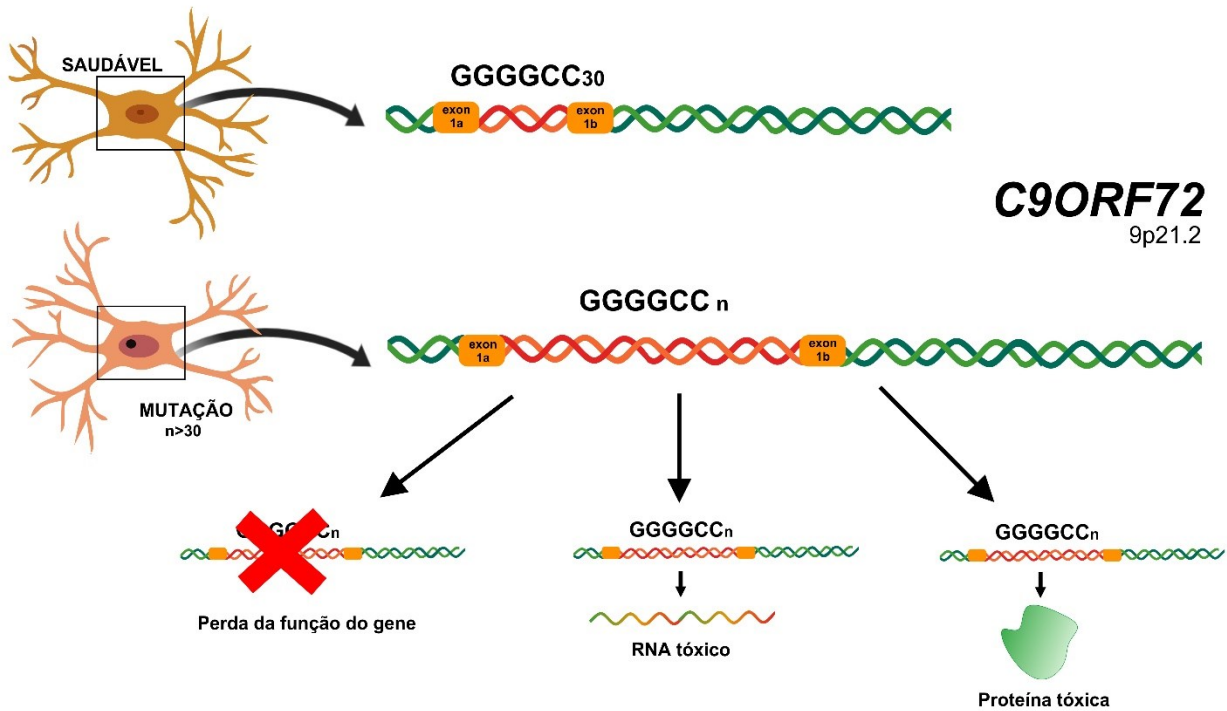
Apesar da heterogeneidade desta neuropatologia é comum a presença de inclusões neuronais, também chamadas de corpos de Pick, bem como dos achados patológicos do tipo microvacuolar (TEIXEIRA-JR; SALGADO, 2006; YOUNG; LAVAKUMAR; TAMPI; BALACHANDRAN et al., 2018).

Uma das principais causas genéticas na Demência Frontotemporal é a mutação no primeiro íntron do gene *C9orf72* (HODGES; PIGUET, 2018; LAI; ICHIDA, 2019). Há um aumento no número de repetições do hexanucleotídeo GGGGCC na região não codificante, levando a uma predisposição de 20% para DFT e 40% para esclerose lateral amiotrófica (ELA) (HODGES; PIGUET, 2018; TEIXEIRA; ARAÚJO; FERREIRA; BARCELOS et al., 2006; YUVA-AYDEMIR; ALMEIDA; KRISHNAN; GENDRON et al., 2019).

Ainda não se sabe ao certo, o número exato do número de repetições necessárias para gerar tal predisposição. Em pacientes saudáveis encontramos cerca de 20-32 repetições, enquanto que pacientes com demência temos de 700-1600 repetições (DEJESUS-HERNANDEZ; MACKENZIE; BOEVE; BOXER et al., 2011).

Desta forma, conforme mostrado na Figura 1, três mecanismos putativo são considerados devido essa mutação: a perda funcional do gene *C9orf72*, acúmulo de mRNA tóxico devido à alta presença das repetições, e por fim, por meio da tradução RAN (não-ATG associada a repetições) a produção de um polipeptídeo tóxico (GOODMAN; PRUDENCIO; KRAMER; MARTINEZ-RAMIREZ et al., 2019; ORR, 2013; ZHANG; AN; CHEN; KOON et al., 2019).

Figura 1- Predisposição genética para Demência Frontotemporal e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) causada pela expansão do hexanucleotídeo GGGGCC. O gene *C9ORF72* encontra-se no cromossomo 9, braço curto, posição 21.2. É expresso em diversos tecidos, principalmente no cérebro. Em marron, temos um neurônio saudável com número de repetições entre 20-32. Em alaranjado, destacamos o éxon 1a e 1b. Entre essa região encontram-se as repetições do hexanucleotídeo. O neurônio rosado representa uma célula que sofreu mutação no gene *C9ORF72* induzindo um aumento de 5 a 50 vezes mais no número de repetições do hexanucleotídeo. Tal expansão pode desencadear na perda funcional do gene, na produção de RNA ou de um polipeptídeo tóxico, culminando em um dos processos presentes na Demência Frontotemporal e Esclerose Lateral Amiotrófica.



FONTE: Adaptado de ORR (2013).

Recentemente, IYER; SUBRAMANIAN e ACHARYA (2018) comprovaram o papel da proteína *C9orf72* como um fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF). Além das evidências já descritas na modulação do citoesqueleto, biogênese do lisossomo, autofagia e homeostase imune (BURK; PASTERKAMP, 2019; LAI; ICHIDA, 2019).

1.1.2. Doença de Alzheimer

Caracterizada pela primeira vez pelo psiquiatra e neuroanatomista Alois Alzheimer (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003), DA é conhecida pela perda irreversível e progressiva da memória e funções cognitivas. Apesar dos mecanismos causadores desta patologia ainda não serem completamente elucidados, seus achados patológicos são bem descritos os quais envolvem a presença de placas senis, gerado pelo acúmulo de peptídeos β -amilóide, e de emaranhados neurofibrilares (NFT), o qual é caracterizado pela hiperfosforilação da proteína

Tau (FINELLI; KELKAR; SONG; YANG et al., 2004; GREEVE; KRETZSCHMAR; TSCHAPE; BEYN et al., 2004).

Com o advento da biologia molecular, diversas hipóteses para explicar a origem da Doença de Alzheimer foram investigadas. Entre elas estão a colinérgica, disfunção glutamatérgica, hipótese da tau e amilóide, conforme indicado no quadro abaixo (FALCO; CUKIERMAN; HAUSER-DAVIS; REY, 2016).

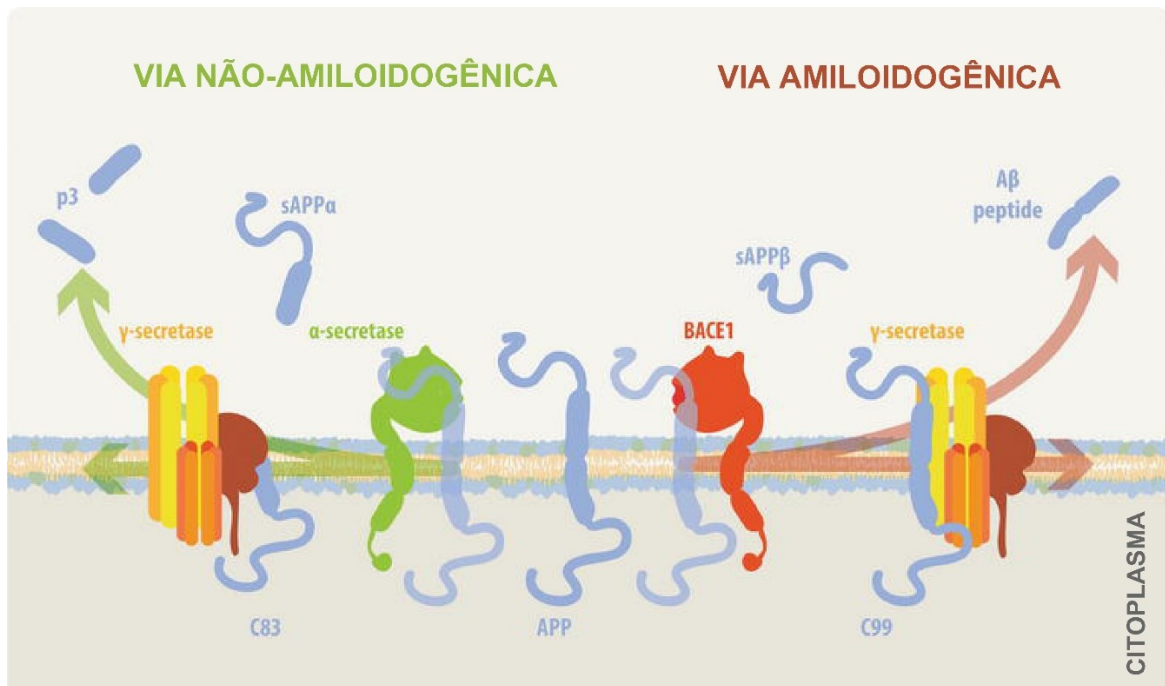
Quadro 1- Resumo das principais hipóteses moleculares da Doença de Alzheimer com suas respectivas bases moleculares.

HIPÓTESE	MOLÉCULA-CHAVE	MECANISMO MOLECULAR
Amilóide	Enzima <i>β secretase</i> (BACE) e proteína precursora amilóide (APP).	Clivagem proteolítica resultando em peptídeos β amilóide, que ao se agregarem são insolúveis e produzem as placas senis.
Tau	<i>Proteína tau</i> têm papel crucial na estabilização dos microtubos neuronais	A hiperfosforilação da Tau produz os emaranhados neurofibrilares, além de afetas as funções biológicas e morfológicas dos neurônios.
Mitocondrial	As <i>mitocôndrias</i> atuam na produção de energia, regulação epigenética e longevidade das células.	Estresse oxidativo por meio da perda da função mitocondrial, além do número reduzido de mitocôndrias intactas.
Colinérgica	A <i>acetilcolina</i> (ACh) é um neurotransmissor que propaga o impulso nervoso nas fendas sinápticas.	Redução da concentração da enzima colina acetiltransferase (ChAT), responsável pela síntese da acetilcolina (ACh), no córtex e no hipocampo.
Disfunção Glutamatérgica	<i>Glutamato</i> (Glu) é um dos aminoácidos mais abundantes do sistema nervoso central. Atua como neurotransmissor excitatório do cérebro.	Redução da captação e dos transportadores do glutamato, levando ao desequilíbrio no fluxo de íons como: Na^+ e Ca^{2+} .

FONTE: Adaptado de DE FALCO; CUKIERMAN; HAUSER-DAVIS e REY (2016) e LIU; XIE; MENG e KANG (2019)

Dentre as investigações citadas, a hipótese da cascata amiloide, estudada neste trabalho, postula que o peptídeo β -amilóide oriundo da clivagem amiloidogênica da APP apresenta toxicidade e podem levar à formação das placas senis, resultando em morte celular dos neurônios.

Figura 2- Vias de processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP). Esquematizado do lado esquerdo a via não amiloidogênica e do lado direito a via amiloidogênica. A APP é uma proteína transmembranar que pode ser clivada em ambas vias. Na via não amiloidogênica, representada de verde, há o processamento da APP primeiramente pela α -secretase liberando um fragmento solúvel indicado na ilustração como sAPP α e posteriormente pela γ -secretase liberando o peptídeo P3 e remanescendo um fragmento C-terminal C83. Já na via amiloidogênica o processamento ocorre por meio da clivagem pelas enzimas β -secretase e posteriormente pela γ -secretase, liberando ao final no meio extracelular o peptídeo β -amiloide.



FONTE: Adaptado de ZOLEZZI e INESTROSA (2017).

A formação do peptídeo A β é o resultado da digestão da APP, na qual pode ocorrer principalmente pelas vias não amiloidogênica ou amiloidogênica (Figura 2). O primeiro processamento conta com a atividade de duas enzimas, a α -secretase produzindo APP α solúvel e depois da γ -secretase culminando na produção do peptídeo p3. Do lado oposto, temos a via amiloidogênica, uma das hipóteses da biopatologia do Alzheimer, duas enzimas estão envolvidas no processamento da APP, a β secretase (BACE) e γ -secretase, geram respectivamente, a formação do APP β solúvel e do peptídeo A β , principal agente neurotóxico descrito na DA (ZOLEZZI; INESTROSA, 2017). O peptídeo β -amiloide é composto por 40 a 42 aminoácidos, ambos podem-se agregar formando as placas senis, no entanto, o A β ₁₋₄₂ é considerado a forma mais neurotóxica (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011; FALCO; CUKIERMAN; HAUSER-DAVIS; REY, 2016). Os mecanismos que ocasionam as alterações de tais processos ainda permanecem obscuros.

Assim, para uma compreensão referente aos mecanismos moleculares, genéticos e obtenção de possíveis tratamento dessas neuropatologias, o uso de organismos modelos é um

excelente aliado, dada as dificuldades de acesso ao cérebro humano para tal diagnóstico (BELFIORI-CARRASCO; MARCORA; BOCAI; CERIANI et al., 2017; BRENMAN-SUTTNER; YOST; FRAME; ROBINSON et al., 2020; MCGURK; BERSON; BONINI, 2015; PRÜBING; VOIGT; SCHULZ, 2013).

1.2. *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é um pequeno inseto estudado inicialmente no laboratório do geneticista Thomas Morgan, com pesquisas envolvendo cromossomos e herança gênica (JENNINGS, 2011). Apresenta 4 pares de cromossomos, sendo o primeiro sexual e o 4º altamente condensado. A distinção entre machos e fêmeas é realizada por dimorfismos sexuais, o que auxilia na obtenção de cruzamentos confiáveis e indivíduos com o genótipo esperado. Os machos apresentam no seu primeiro par de patas o pente sexual que auxilia na cópula, além de ter diferença com relação a fêmea nos padrões de pigmentação abdominal. Ao final do abdômen há um padrão mais escuro que os das fêmeas, que por sua vez apresentam o padrão distribuído igualmente durante o abdômen (HALES; KOREY; LARRACUENTE; ROBERTS, 2015).

O desenvolvimento da *D. melanogaster* da fase de ovo até indivíduos adultos, numa temperatura de 25°C, leva cerca de 10 dias (Figura 3). De forma geral, as moscas são mantidas em meio de fubá, local que cruzam, realizam a postura dos ovos, alimentam-se e desenvolvem (SHELL; SCHMITT; LEE; JOHNSON et al., 2018). Os componentes desse meio são de baixo custo e uma alta eficiência na manutenção das linhagens. Outras formas de alimentação são utilizadas como o meio de banana e purê enriquecido. A escolha do meio ideal para o experimento está sujeita ao delineamento experimental e as características da linhagem avaliada.

A partir do sequenciamento do genoma da *D. melanogaster*, permitiu-se que houvesse uma ampliação do uso dessas moscas, utilizando-as como alternativa aos modelos biológicos de mamíferos (ADAMS; CELNIKER; HOLT; EVANS et al., 2000). Cerca de 70% dos genes envolvidos com patologias humanas apresentam um homólogo funcional na *D. melanogaster* apoiando seu uso na compreensão de diversas doenças (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016).

Além disso, outras características como curto ciclo de vida, similaridade molecular e fisiológica ao corpo humano, pequeno porte e alto número de indivíduos, fazem das moscas da fruta um excelente modelo animal potencializando seu uso na rotina laboratorial (HALES; KOREY; LARRACUENTE; ROBERTS, 2015; UGUR; CHEN; BELLEN, 2016).

Figura 3- Ciclo de vida da mosca *Drosophila melanogaster*, do ovo até a fase adulta. Após o cruzamento entre moscas adultas, ocorre a postura dos ovos no meio, que a 25°C levam cerca de 10 dias até a eclosão dos indivíduos adultos. Durante esse processo temos três *instars* de larva, com duração média de 5-6 dias à 25°C e a fase de pupa do 7º dia até o 9º até que ocorra o processo de eclosão.



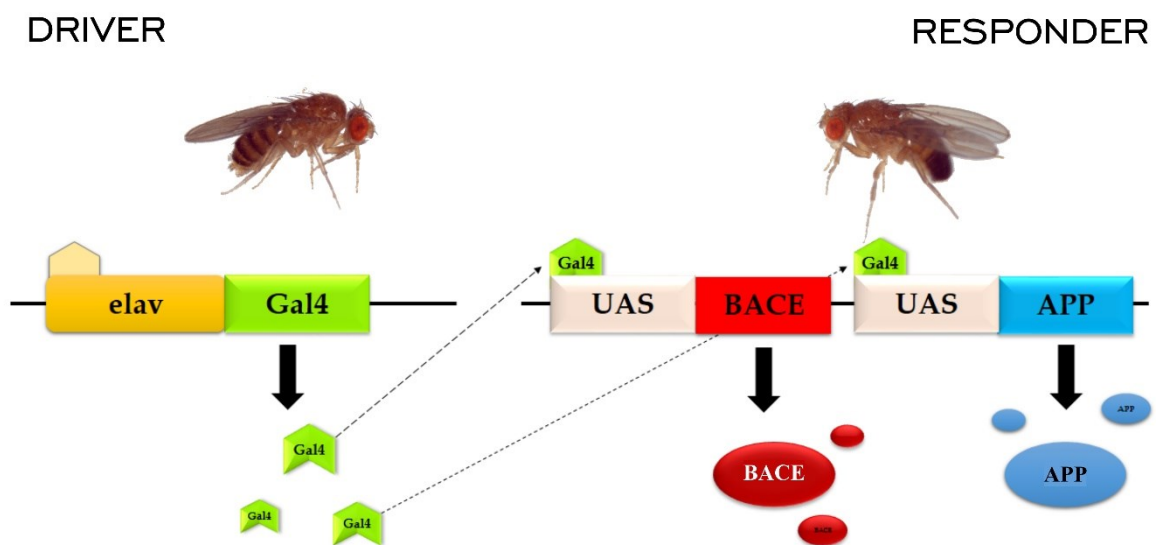
Para auxiliar os estudos em biologia molecular, diversas ferramentas de regulação de expressão gênica são utilizadas nas moscas. Uma delas são os cromossomos balanceadores cuja função é possibilitar a manutenção de genes letais em homocigose, permitindo a averiguação dos cruzamentos por meio de características fenotípicas que auxiliam na diferenciação e compreensão do genótipo esperado (KAUFMAN, 2017).

Um exemplo são balanceadores TM6B, tb presentes no cromossomo 3, eles são responsáveis pelo fenótipo de pupa *tubby*, uma pupa achatada e volumosa com relação a pupa sem a presença do balanceador (KAUFMAN, 2017; LATTAO; BONACCORSI; GUAN; WASSERMAN et al., 2011).

Outro mecanismo é o sistema de expressão UAS/GAL4 que possibilita a expressão de dada proteína em uma região específica do organismo. Esse sistema foi identificado em leveduras e depois transferido para *Drosophila* por FISCHER; GINIGER; MANIATIS e PTASHNE (1988), demonstrando sua eficiência. A proteína GAL4 é uma proteína reguladora que reconhece regiões regulatórias (*enhancer* e promotores) chamada de UAS (*Upstream*

Activating Sequences), que ativação a transcrição do gene a jusante. A expressão da proteína GAL4 pode ser regulada por regiões regulatórias tecido-específico e por isso são denominadas de *driver* (Figura 4) (JEIBMANN; PAULUS, 2009). Juntamente com a linhagem é denominada *responder*, que apresenta uma sequência de DNA que codifica dado produto de interesse.

Figura 4- Representação do sistema UAS/GAL4 no modelo similar a Doença de Alzheimer utilizando modelo biológico *Drosophila melanogaster*. A linhagem *driver* apresenta como região regulatória: *elav*, que dirige a expressão de GAL4 apenas para o cérebro. Já a linhagem *responder* apresenta as regiões regulatórias denominadas de UAS e o gene de interesse: BACE e APP humanas. Moscas obtidas do cruzamento entre linhagem *responder* e *driver*, apresentam então a expressão dirigida das proteínas APP e BACE no cérebro.



Um exemplo é o modelo utilizado em nosso experimento, com uma linhagem *driver* *elav-Gal4* (direcionando a expressão de GAL4 para o cérebro da mosca) e a linhagem *responder* *UAS-BACE,UAS-APP* produzindo β -secretase e APP humana. Naturalmente, a mosca da fruta apresenta os ortólogos a APP e da BACE humana, são eles: *APP-like* (*Appl*) e β -secretase da *Drosophila* (*dBACE*), respectivamente (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011; IIJIMA-ANDO; IIJIMA, 2010). No entanto, pelo fato da *Appl* apresentar uma sequência distinta da APP humana nas posições que constituem os peptídeos A β , a clivagem realizada pela *dBACE* na proteína *Appl* não resulta no fragmento de A β 42, relacionado a DA em humanos (MOLONEY; SATTELLE; LOMAS; CROWTHER, 2010). Nesse cruzamento ocorre a integração do sistema binário UAS/Gal4 na geração F1, em que a expressão da proteína regulatória GAL, bem como as proteínas APP e BACE produzidas no cérebro (Figura 4) (LAMBRECHTS; FABER; SIBON, 2017).

Por fim, outra ferramenta utilizada em conjunto com o sistema UAS/GAL4 é o RNA de interferência (RNAi), por meio do silenciamento gênico (LAMBRECHTS; FABER; SIBON, 2017). Nesse mecanismo, as moscas expressam o dsRNA de determinado gene alvo, que é direcionado ao local de interesse por meio do sistema UAS/GAL4. Desta forma, haverá a ausência de dado produto apenas no local de interesse. Essa redução no produto final do gene acontece por meio da degradação oriunda do anelamento do mRNA do gene de interesse com a fita de dsRNA alvo, o RNA com fita dupla sofre um processamento e é degradado, reduzindo consideravelmente a quantidade de proteínas relacionadas ao gene alvo no local dirigido (HEIGWER; PORT; BOUTROS, 2018).

Tais sistemas auxiliam na avaliação dos efeitos do silenciamento gênico não só espacial, mas temporal, uma vez que podem ser incluídos no transgênico a expressão de GAL80, repressor da GAL4, desativando assim a expressão desse dsRNA (ligado a UAS) por meio da temperatura do ambiente que a mosca se encontra (KAYA-COPUR; SCHNORRER, 2019).

Diversos estudos utilizando as ferramentas citadas, juntamente com o modelo alternativo na Doença de Alzheimer já foram realizados, os quais vão desde a inserção da APP humana *overexpression* e clivagem via dBACE (SARANTSEVA; TIMOSHENKO; BOLSHAKOVA; KARASEVA et al., 2009; WENTZELL; BOLKAN; CARMINE-SIMMEN; SWANSON et al., 2012), indução da produção de peptídeos A β no olho da mosca (GREEVE; KRETZSCHMAR; TSCHAPE; BEYN et al., 2004), até a expressão direta dos fragmento de A β 42 (IIJIMA-ANDO; IIJIMA, 2010). Já na DFT, temos exemplos de estudos envolvendo a autofagia e lisossomos (VANDAL; ZHENG; AHMAD, 2018), o hexanucleotídeo GGGGCC dirigindo sua expressão aos olhos (XU; POIDEVIN; LI; LI et al., 2013) e referente a mutações no gene *TDP-43* (PONS; PRIETO; MIGUEL; FREBOURG et al., 2018; WANG; DENG; DONG; LIU et al., 2019).

Essa importante relevância científica da *Drosophila melanogaster* a torna um excelente organismo modelo para esse estudo (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011; HALES; KOREY; LARRACUENTE; ROBERTS, 2015). Uma vez que, auxilia na identificação de genes ortólogos aos humanos, na compreensão a nível molecular muitos deles inclusive até então desconhecidos e na elucidação de potenciais intervenções terapêuticas (DEAL; YAMAMOTO, 2019; JENNINGS, 2011; MADABATTULA; STRAUTMAN; BYSICE; O'SULLIVAN et al., 2015). Além de permitir a avaliação comportamental frente a determinadas hipóteses (KOON; CHAN, 2017; MCGURK; BERSON; BONINI, 2015).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar e validar os modelos alternativos deste trabalho para compreensão da Doença de Alzheimer e da Demência Frontotemporal utilizando a *Drosophila melanogaster*.

2.1. Objetivos Específicos

- Obter por cruzamento, um modelo similar a Doença de Alzheimer, com moscas expressando nos neurônios, fragmentos de β -amilóide humano, juntamente com a proteína fluorescente verde (GFP);
- Obter por cruzamento, um modelo similar a Demência Frontotemporal, por meio de moscas com as 108 repetições do hexanucleotídeo GGGGCC expressas nos corpos de cogumelo;
- Avaliar e identificar por avaliação locomotora e cortes histológicos, o intervalo temporal que iniciam as alterações nos fenótipos de ambos modelos;
- Avaliar por RNA-*seq*, o perfil de expressão dos transcritos no modelo similar a Doença de Alzheimer, nos dias de pós eclosão definidos;
- Validar a expressão de alguns genes diferencialmente expressos por RT-qPCR, no modelo similar a Doença de Alzheimer;
- Validar *in vivo* os genes diferencialmente expressos por RNAi dirigindo o silenciamento aos olhos das moscas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

As moscas foram obtidas por meio da compra no Banco de Estoque *Bloomington Stock Center*, na Universidade de Indiana. Os estoques são mantidos no Laboratório de Genética do Instituto de Biotecnologia na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A manutenção e expansão das linhagens foram realizadas com a troca do meio padrão do *Bloomington*, sob temperatura controlada (25°C) e ciclo de claro e escuro de 12:12 horas. No quadro abaixo estão detalhadas as linhagens utilizadas.

Quadro 2- Dados referentes as linhagens utilizadas neste estudo, com seus respectivos números de acesso no banco *Bloomington Stock Center* (#BL). Na coluna Genótipo são descritas informações referente aos componentes e genes. A coluna ao lado indica a expressão dos genes e por fim, o local nos cromossomos em *Drosophila melanogaster*.

BL#	GENÓTIPO	EXPRESSÃO	LOCAL
1104	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}12	Expressão de Gal4 dirigida aos olhos	2
5146	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155], P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4], P{ry[+t7.2]=hsFLP}1, w[*]	Expressão de Gal4 dirigida aos neurônios, inicia no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso (estágio 12).	X
33797	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-BACE1.Exel}7b, P{w[+mC]=UAS-APP.695.Exel}1/TM6B, Tb[1]	Expressão regulada pelo responder UAS da isoforma humana da APP e BACE1.	3
50742	w[*]; P{w[+m*]=Mef2-GAL4.247}3	Expressão de GAL4 dirigida aos neurônios do corpo de cogumelos maduros.	3
58690	w[1118]; P{{y[+t7.7] w[+mC]=UAS-GGGGCC.108-RO}attP40	Expressa o RNA com 108 repetições de GGGGCC sob regulação de UAS.	2
31543	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01104}attP2	Expressa dsRNA para RNAi de <i>mlc2</i> (FBgn0002773) sob regulação de UAS.	3
38539	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01830}attP2	Expressa dsRNA para RNAi de CG17754 (FBgn0030114) sob regulação de UAS.	3
67287	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC06390}attP40	Expressa dsRNA para RNAi de <i>tn</i> (FBgn0265356) sob regulação de UAS.	2
65006	y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05880}attP40	Expresses dsRNA for RNAi of <i>kkv</i> (FBgn0001311) sob regulação de UAS.	2

FONTE: *Bloomington Stock Center*

3.2. Cruzamento para obtenção do modelo similar a Doença de Alzheimer

Fêmeas virgens da linhagem $P\{GawB\}elav^{C155},P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4.P\{hsFLP\}1$, w^* (BL#5146), denominadas neste trabalho como: elav-Gal4, foram cruzadas com machos da linhagem $w^{1118}; P(UAS-BACE, UAS-APP^1.L)2/TM6,Tb$ (BL#33797), denominada de forma simplificada como: UAS-BACE. Ambas linhagens tiveram a presença dos genes confirmada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o material genético.

O cruzamento para obtenção do modelo é indicado na Figura 5. Cerca de 50% dos indivíduos apresentam o genótipo de interesse (Modelo β -amilóide). Enquanto, o restante apresenta o balanceador *tubby*, com fenótipo de pupas achatadas. Portanto, foram selecionadas no intervalo de 7 a 9 dias da data do cruzamento das linhagens citadas, as pupas alongadas. Essas foram coletadas e transferidas para novos frascos com meio, enquanto as pupas *tubby* foram descartadas.

Assim, as moscas do modelo amiloide humano para estudo da Doença de Alzheimer foram denominadas como *AD-like* no decorrer deste trabalho e apresentam o genótipo: $P\{GawB\}elav^{C155},P\{UASmCD8::GFP.L\}/w^{1118};+/+;P(UAS-BACE,UASAPP^1.L)2$, simplificado como: elav-Gal4; ;UASBACE,UASAPP.

Figura 5- Detalhamento do cruzamento entre as linhagens elav-Gal4, UAS-GFP (fêmeas virgens) e UAS-BACE, UAS-APP (machos), **para obtenção do modelo amiloide humano em *Drosophila melanogaster***. Os três pares de cromossomos são indicados na imagem e separados pelo símbolo ponto e vírgula (;), enquanto que os alelos são separados pela barra (/), o símbolo mais (+) indica alelos selvagens. Dentre os genótipos resultantes possíveis, apenas o genótipo das pupas alongadas foi utilizado.

CRUZAMENTO



GENÓTIPOS RESULTANTES POSSÍVEIS:



3.3. Cruzamento para obtenção do modelo de Demência Frontotemporal

Moscas da linhagem $w[*]; P\{w[+m^*]=Mef2-GAL4.247\}3$ (BL#50742), denominadas a partir de agora nesse trabalho como: Mef2-Gal4, tiveram fêmeas virgens separadas e cruzadas com machos da linhagem $P\{UAS-GGGGCC.108-RO\}attP40$ (BL#58690), identificadas como UAS-G4C2. O genótipo resultante deste cruzamento (UAS-GGGGCC; Mef2-GAL4) é ilustrado na Figura 6. Desta forma, denominamos esse modelo como similar ou semelhante a Demência Frontotemporal (FTD-like).

Figura 6- Detalhamento do cruzamento para obtenção do modelo similar a Demência Frontotemporal. Todos indivíduos que eclodem nesse cruzamento apresentam o genótipo de interesse. Os três pares de cromossomos são indicados na imagem e separados pelo símbolo ponto e vírgula (;), o símbolo de mais (+) indicam alelos selvagens e o Y representa o cromossomo sexual masculino.

CRUZAMENTO

$$+ ; + ; \mathbf{Mef2-Gal4} \quad \times \quad \frac{+}{Y} ; \mathbf{UAS-GGGGCC} ; +$$

GENÓTIPOS RESULTANTES POSSÍVEIS:

$$\frac{+}{+} ; \frac{\mathbf{UAS-GGGGCC}_{108}}{+} ; \frac{\mathbf{Mef2-Gal4}}{+}$$

$$\frac{+}{Y} ; \frac{\mathbf{UAS-GGGGCC}_{108}}{+} ; \frac{\mathbf{Mef2-Gal4}}{+}$$

3.4. Avaliação comportamental de ambos modelos por teste locomotor

A avaliação comportamental das moscas foi realizada por teste de geotaxia negativa. Esse ensaio locomotor consiste na resposta natural das moscas, que escalam de forma ascendente (contra a gravidade) após um estímulo mecânico suficiente para levá-las ao fundo do recipiente (GARGANO; MARTIN; BHANDARI; GROTEWIEL, 2005).

Para cada replicata do ensaio utilizamos cerca de 15-25 moscas alocadas no frasco limpo e vazio, com as medidas de 9,5 cm de altura e 2,3 de diâmetro. O experimento foi realizado com, no mínimo, triplicata biológica. Nenhum tipo de anestésico foi utilizado na transferência dos animais. Quando necessário, os mesmos foram sugados. Não houve separação entre machos e fêmeas, ambos foram incluídos no experimento.

Diferentes tempos de eclosão foram analisados, conforme mostrado no Quadro 3, com o intuito de determinar se haveria diferença nos intervalos avaliados. E em caso afirmativo, qual

idade adulta as moscas apresentariam alterações locomotoras com diferença significativa. Como controle, utilizamos as linhagens *driver* dos cruzamentos resultante das moscas *AD-like* e *FD-like*, sendo *elav-Gal4* e *Mef2Gal4*, respectivamente.

Quadro 3- Dias pós eclosão dos indivíduos analisados em ambos modelos.

Tempos analisados	<i>AD-like</i>	<i>FD-like</i>
	0 dia pós eclosão (d.p.e.); 3 d.p.e. 5 d.p.e. 10 d.p.e.	0-2 dias pós eclosão (d.p.e.); 3-5 d.p.e. 7-10 d.p.e. 15-25 d.p.e.

Previamente, as moscas foram aclimatadas durante 20 minutos. Todas já alocadas nos frascos e ambiente da realização do experimento. Nessa etapa, a aclimação levava em consideração, a iluminação da sala, que consistia numa fonte de luz branca posicionada próxima aos *vials* do experimento. Bem como na temperatura do local, que poderia ser distinta da temperatura encontrada na estufa incubadora (25°C).

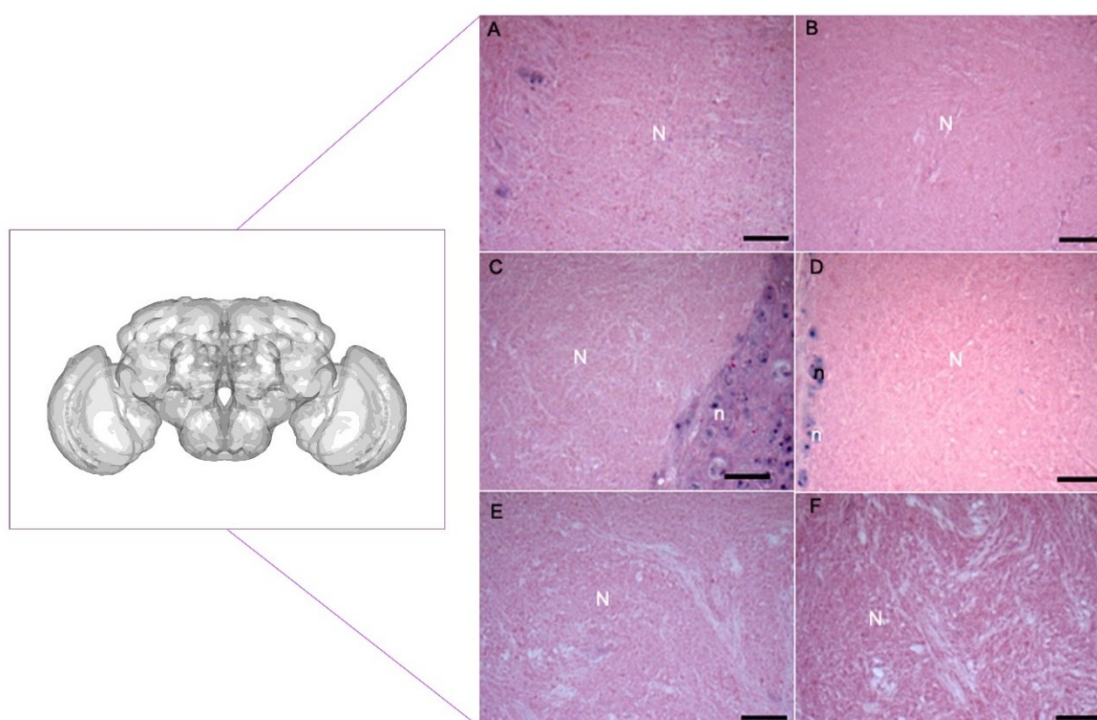
Todo experimento foi realizado com o mínimo de ruídos externos possíveis, com intuito de minimizar possíveis alterações comportamentais. Após a aclimação, as moscas foram dispostas numa raque e submetidas a três batidas consecutivas sob a mesa, com apoio de uma esponja. Após a terceira batida, a raque era colocada na superfície da mesa novamente e iniciava a contagem de tempo. Os testes foram registrados por meio de filmagem, sempre no mesmo equipamento de gravação. As análises foram realizadas por meio da contagem das moscas que chegaram ou ultrapassaram a linha delimitada de 5 cm após 4 segundos da terceira batida da raque. Foram realizadas 5 replicatas técnicas, com intervalo de 1 minuto entre os ensaios. Para visualização do vídeo e contagem dos frames utilizamos o software *QuickTime*. As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism* Versão 7.0. O teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de *Bonferroni* foi realizado com significância estabelecida do valor de P menor que 0,05.

3.5. Histologia e índice de neurodegeneração em ambos modelos

Grupos controle (linhagem *driver* de cada cruzamento) e *AD-like* com 0 d.p.e. e 18 d.p.e., com um *n* amostral de 10 cabeças, foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2. Em seguida, as amostras foram desidratadas numa série gradual de etanol (70, 80, 90 e 95%) e transferidas para metanol por 16 horas a 4 °C. As amostras foram

emblocadas em historesina (Leica) e seccionadas com espessura de 2 μm , coradas com hematoxilina e eosina. Imagens da região do neurópilo foram utilizadas para calcular o índice neurodegenerativo, cujo score vai de 0 a 5, conforme mostrado na Figura 7, dos quais os valores maiores indicam uma neurodegeneração grave (CAO; CHTARBANOVA; PETERSEN; GANETZKY, 2013).

Figura 7- Índice de neurodegeneração das amostras. Cada cérebro foi analisado individualmente e pontuado uma nota de 0 a 5, sendo 0 uma amostra com baixo nível de neurodegeneração e 5 com maior severidade. (A) Representação do escore 0; (B) Representação do escore 1; (C) Representação do escore 2; (D) Representação do escore 3; (E) Representação do escore 4; (F) Representação do escore 5. As barras de escalas são todas com 10 μm . N- neurópilo e n- núcleo.



FONTE: Imagem do cérebro Adaptado de COSTA; MANTON; OSTROVSKY; PROHASKA et al. (2016).
Cortes histológicos - autoria própria.

3.6. Quantificação de amiloide por Tioflavina T

Para quantificação de amiloide nas amostras do modelo amiloide, utilizamos o protocolo WESTFALL; LOMIS e PRAKASH (2019), com adaptações. O ensaio foi realizado em triplicata, consistindo no grupo AD-like e Controle.

Para extração das proteínas foram maceradas vinte cabeças em 200 μL de Tampão de extração de Proteínas (50mM Tris-HCl buffer pH 8.0 contendo 1mM EDTA e 1% Triton X-100), juntamente com inibidores de protease (pastilha cComplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail diluída em 10ml do tampão gelado). Para separação dos debris, centrifugar a

10.000 rpm por 2 min. Transferir o sobrenadante para novo microtubo e acondicionar em gelo até que seja utilizado na quantificação de β -amilóide por Tioflavina T e proteínas totais por Bradford.

Para quantificação de amiloide por Tioflavina T foi preparada uma solução estoque (5X), dissolvendo 8 mg de Tioflavina T em 10 mL de PBS pH 7,0. Dessa solução utilizamos 1 parte de solução de estoque (5X), diluída em quatro partes de PBS (1X). Em placas de 96 poços, adicionamos 198 μ l da solução de trabalho e 2 μ l do homogeneizado (sobrenadante da proteína extraída). A leitura da fluorescência seguiu os parâmetros: excitação a 450 nm e emissão 482nm. Na análise dos dados, foi descontado o valor do branco (apenas tioflavina T) das quantificações, normalizados os níveis de amiloide com proteínas totais dosada por Bradford. E por fim, foi normalizada com fluorescência encontrada no grupo controle (*elav-Gal4*).

3.7. Avaliação do perfil de transcritos no modelo amilóide humano em *D. melanogaster*

Moscas do grupo controle (*elav-Gal4*) e *AD-like* (modelo amilóide) com idade de 0 dias pós eclosão (d.p.e.) e 10 dias pós eclosão tiveram seu perfil de transcritos avaliado. Esse intervalo será denominado nesse trabalho como envelhecimento, uma vez avaliamos quais efeitos deste processo em ambos grupos, na faixa de tempo detectada com alterações significativas no comportamento.

Cada um desses 4 grupos (controle 0 d.p.e.; controle 10 d.p.e.; *AD-like* 0 d.p.e. e *AD-like* 10 d.p.e) continham cerca de 50 moscas. O perfil de transcritos desses grupos foi então avaliado por meio do *RNA-seq*, considerando o envelhecimento do grupo controle nessa fase adulta e a progressão do modelo de Alzheimer, bem como as comparações temporais dos grupos distintos (grupo controle *versus* grupo *AD-like*).

Os indivíduos analisados tiveram suas cabeças retiradas, transferidas para microtubo e foram devidamente refrigeradas com nitrogênio líquido e estocadas à 80°C. Para extração do mRNA dos grupos foram seguidas as recomendações do fabricante do kit *Dynabeads mRNA Direct* (*Life Technologies*) para isolar mRNA de tecidos. A quantificação de ácidos nucleicos (RNA) foi feita por meio do *Qubit* (*Thermo Fisher*) conforme o fabricante.

Foram montadas 8 bibliotecas, considerando os 4 grupos em duplicata. O kit *Total Ion RNA-seq v2* (*Life Technologies*) foi utilizado conforme recomendações do fabricante seguindo a seguinte ordem dos procedimentos: hibridização e ligação do RNA; Transcriptase reversa, purificação do cDNA, avaliar o tamanho e distribuição do DNA amplificado; inserção dos

barcodes, determinação da diluição da biblioteca para preparo do sequenciamento e por fim preparo do *template*.

O sequenciamento foi realizado com chip e o kit *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200* (Life Technologies) conforme as recomendações do fabricante. Os dados brutos gerados foram depositados no NCBI, com número de acesso: PRJNA500107.

A expressão diferencial dos grupos foi analisada por meio da plataforma *Galaxy* (<https://usegalaxy.org/>). A remoção do adaptador e trimagem das sequências foi por meio do *CutAdapt*. Os dados foram avaliados pelo *FastQC* antes e após o corte, garantindo o controle de qualidade dos resultados obtidos. Os dados resultantes foram então mapeados com o genoma de *D. melanogaster* (Dm6) usando *RNA STAR*.

A expressão gênica foi feita por meio do software *featureCounts*, e as tabelas resultantes foram inseridas no DESeq2 para avaliar a expressão diferencial. Tabelas com genes diferencialmente expressos (Log2 da variação dobra <-1,5 ou> 1,5 e valor de P <0,05) foram enriquecidas com anotação usando o *Batch Download* do banco de dados *FlyBase*.

Para avaliar a Análise de Componentes Principais utilizou o plotPCA do DESeq2 verificando assim a distância de cada um dos grupos.

O mapeamento no *Gene Ontology* utilizando o PANTHER foi realizado com a submissão dos identificadores do FlyBase, respectivos a cada gene diferencialmente expresso (MI; MURUGANUJAN; EBERT; HUANG et al., 2018). O *Gene Ontology* é um consórcio de banco de dados biológicos com intuito de padronizar a anotação dada aos produtos gênicos. Além de ser uma eficiente ferramenta na compreensão a nível molecular de diferentes organismos, conta com uma organização padronizada por meio de 4 classes hierárquicas: Processos biológicos, função molecular, componente celular, além das vias biológicas (GONÇALVES, 2016; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2018).

Também avaliamos as vias encontradas no KEGG (KANEHISA; SATO; FURUMICHI; MORISHIMA et al., 2018), a fim de complementar as informações obtidas de cada plataforma. Além, da análise por enriquecimento dos genes foi realizada no ClueGO (Versão 2.5.2) juntamente com o plugin *CluePedia* (Versão 1.5.2) no software *Cytoscape*. Nessa análise foram considerados apenas os genes diferencialmente expressos com interações significativas (valor de $P \leq 0,05$), por meio do teste hipergeométrico bilateral (com enriquecimento e depleção) e pós teste de Bonferroni. Na análise dos grupos de envelhecimento, tanto controle quanto *AD-like*, identificamos quais genes *down-regulated* eram comuns a ambos grupos, o mesmo foi feito para os GDE *up-regulated*. Desta forma, as análises realizadas no *Cytoscape* para os dois grupos de envelhecimento, levaram em consideração os GDE específicos de acordo com sua

regulação. Esse tipo de refinamento nos dados permite, por exemplo, que um gene com regulação aumentada no grupo *AD-like* não seja excluído, caso esteja com regulação reduzida no grupo controle, e vice-versa.

A busca por ortólogos humanos foi feita na plataforma *Drosophila RNAi Screening Center Integrative Ortholog Prediction Tool* - DIOPT (Versão 7.1) e posterior avaliação de todos os genes com ortólogos (consideramos todos scores) no ClueGO, contra os bancos REACTOME e KEGG. Novamente, foram consideradas apenas interações significativas entre os genes diferencialmente expressos com ortólogos para humanos.

3.8. Validação dos GDE por RT-qPCR no modelo *AD-like*

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) determina com alta sensibilidade, os níveis de expressão dos transcritos de interesse. Nesse trabalho, a técnica foi utilizada para validar os dados encontrados na análise de transcriptoma por meio do RNA-seq, verificando se o nível de expressão dos transcritos era o mesmo. Para validar alguns dos GDE identificados no RNA-seq, escolhemos três genes regulados positivamente e quatro genes regulados negativamente, dentre os 10 primeiros GDE com ortólogos humanos identificados para teste em um ensaio qPCR.

Cerca de 20 cabeças de moscas do grupo controle (elav-Gal4 com 0-3 d.p.e. e 10 d.p.e.) e moscas do grupo *AD-like* (0-3 d.p.e. e 10 d.p.e.) tiveram seu RNA total extraído utilizando TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*), conforme as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do material era verificada, considerando principalmente a razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit de Transcriptase Reversa M-MLV (*Thermo Fisher Scientific*), com 1 µg de RNA total. O material foi avaliado por meio de PCR convencional para garantir a qualidade por meio da amplificação do controle endógeno. A RT-qPCR foi realizada usando SYBR-Green no sistema de PCR Real-Time 7300 (*Applied Biosystems*), avaliando sete *primers* e um controle endógeno, conforme descrito na Tabela 1.

A escolha dos genes avaliados foi por meio da classificação dos 10 melhores genes diferencialmente expressos que apresentavam ortólogos humanos mapeados conforme descrito no tópico anterior.

Tabela 1- *Primers* utilizados para validação da expressão gênica do modelo de Alzheimer e moscas controle em duas fases temporais.

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos		Ref
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
<i>desat1</i> CG5887	GGACGTGTGCTTTCGCCACT	CTGCGATCAGTGAGTCTGAGAT	HOUOT; BOUSQUET e FERVEUR (2010)
<i>tobi</i> CG11909	TGCAGGCGGTGGGCGACTAC	GCAGGGCGGGCATAAAGACG	(CASTILLO; CREASY; KUMARI; SHETTY et al., 2015)
<i>PGRP-SB1</i> CG9681	TGTGGCCGCTTTAGTGCTT	TCAATCTGCAGGGCATTGG	TAI; MCGRAW; AMMAR; DIETZGEN et al. (2008)
CG17754	GATACCTGGACTCTGATCTG	TATGACATTCGGAATCGCC	
<i>tn</i> CG15105	GATACCCTACAATGGCGTC	CATAATTGACCTGATGTGGG	
<i>mlc2</i> CG2184	CTTCGTCTTCATCGTTGGCA	GCTTCTCTGTGTTCTCCCA	
<i>kkv</i> CG2666	TCGACAATGATCCCGTGGAG	AACACCAATCCGATGGGCTC	IRION (2012)
<i>α-tubulin</i>	ACTACCAGCCACCCACCGT	CCCTCCTCCATACCCTCACC	

3.9. Avaliação do silenciamento de três genes diferencialmente expressos no modelo amilóide

O silenciamento gênico é uma excelente ferramenta na compreensão do papel da expressão de dado gene. Portanto, para avaliar o efeito do silenciamento dos genes: *thin*, *CG11753* e *mlc2*, foram realizados cruzamentos dirigidos a região do olho, por meio da linhagem GMR-Gal4. O controle foi feito por meio do cruzamento da linhagem GMR-Gal4 e *w*¹¹¹⁸. As imagens dos olhos foram obtidas por meio do registro com câmera acoplada ao microscópio estereoscópico (Nikon SMZ 800) e software IC Capture v2.4.

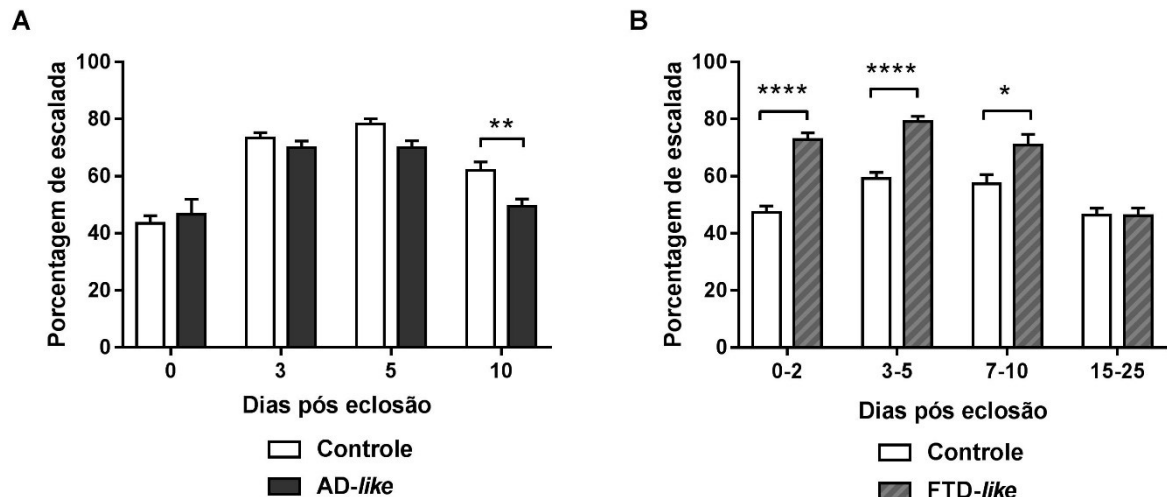
4. RESULTADOS

4.1. Avaliação locomotora

O modelo similar a doença de Alzheimer foi baseado na expressão de BACE e APP humana dirigida ao cérebro das moscas. Enquanto que o direcionamento das 108 repetições do hexanucleotídeo GGGGCC aos corpos de cogumelo em *D. melanogaster* foi utilizado para verificar o potencial do modelo no estudo da Demência Frontotemporal.

A atividade locomotora das moscas de ambos modelos, juntamente com seus respectivos controles foi avaliada, a fim de identificar alterações a nível comportamental gerados devido a progressão temporal de cada uma das neuropatologias. Na Figura 8, temos a porcentagem da atividade locomotora de ambos modelos em diferentes tempos de avaliação.

Figura 8- Avaliação da taxa de escalada dos modelos estudados em diferentes dias após eclosão. (A) Porcentagem de escalada do modelo amilóide humano (*AD-like*) comparadas ao grupo controle (elav-Gal4, UAS-GFP). Na imagem são ilustradas como barras pretas e brancas, respectivamente. (B) Porcentagem de escalada do grupo *FTD-like* comparadas ao grupo controle (Mef2-Gal4). Na imagem são ilustradas como barras cinza com listras e barras brancas, respectivamente. As barras representam a média \pm desvio padrão do erro, *: *P-value* < 0,05; **: *P-value* < 0,01; ****: *P-value* < 0,0001 (Two way ANOVA e pós teste de *Bonferroni*). Para manter a clareza dos dados representados nos gráficos, apresentamos somente as diferenças significativas entre modelo e seu respectivo grupo controle em diferentes idades. Outras diferenças significativas são descritas no decorrer do texto.



O modelo *AD-like* é ilustrado na Figura 8A. A comparação da taxa de escalada entre moscas do grupo controle e moscas *AD-like* recém eclodidas (0 d.p.e.) até 5° d.p.e não apresentou diferença significativa. No entanto, moscas do grupo *AD-like* de 10 d.p.e tiveram um declínio significativo na atividade motora avaliada quando comparadas ao grupo controle do

mesmo intervalo de tempo. Além disso, as moscas recém eclodidas de ambos grupos apresentaram uma baixa taxa de escalada. Esse resultado, portanto, não é relacionado a presença de amiloíde, dada a ausência de diferença significativa entre grupo controle e *AD-like*. Acreditamos que a baixa taxa de escalada das moscas recém eclodidas esteja relacionada as asas e corpo ainda úmidos, que necessitam de algumas horas para se tornarem aptas ao voo e escalada comparável as outras idades.

Assim, quando avaliamos o desempenho apenas das moscas do grupo controle comparado aos diferentes tempos, há uma diferença significativa entre as moscas recém eclodidas (P-value < 0,0001) e moscas controle de 3, 5 e 10 d.p.e.

Já as moscas do grupo *AD-like* recém eclodidas, quando comparadas a moscas do mesmo modelo em diferentes dias pós eclosão apresentaram diferença significativa nos tempos 3 e 5 dias pós eclosão (P-value < 0,0001). No entanto, não houve diferença significativa quando comparamos o grupo recém eclodido (0 d.p.e) com moscas de 10 d.p.e. Nesse último caso, a taxa de escalada das moscas de 10 dias pós eclosão foi debilitada, possivelmente, devido ao modelo amiloíde. Uma vez que conforme apresentamos anteriormente, as moscas controle de 10 d.p.e. obtiveram uma taxa de escalada superior e significante as do modelo no mesmo intervalo de tempo.

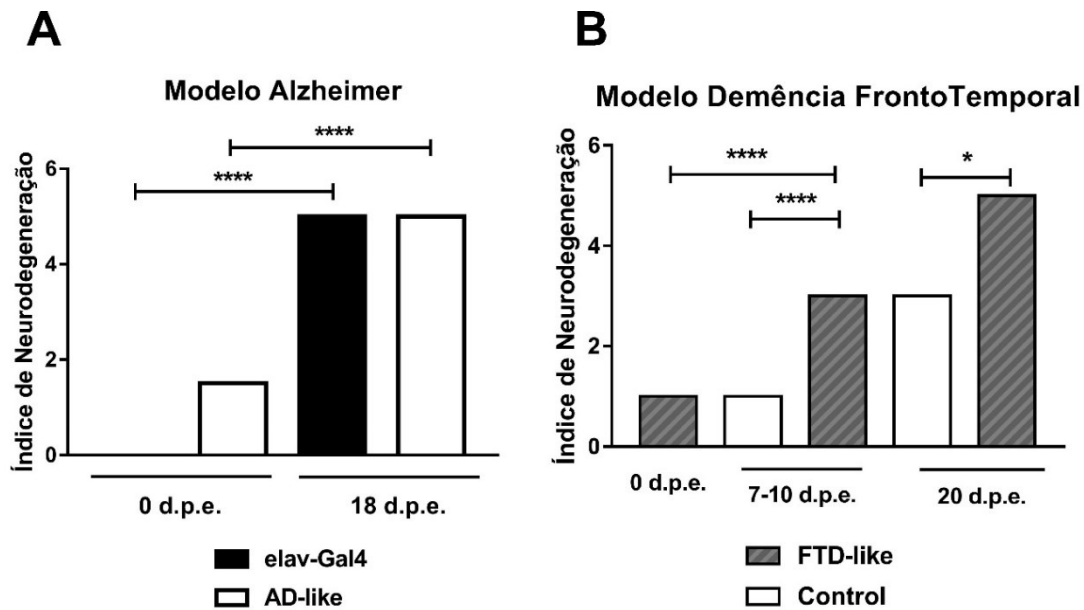
Na Figura 8B, referente ao modelo similar a Demência Frontotemporal, verificamos um aumento significativo a nos intervalos de 0-2 d.p.e., 3-5 d.p.e. e 7-10 d.p.e. entre as moscas do grupo *FTD-like* quando comparadas ao grupo controle. No entanto, a partir do intervalo de 15-25 dias pós eclosão, a escalada de ambos grupos não apresentou mais diferença significativa. Tendo diferença apenas quando comparado o grupo *FTD-like* de 7-10 d.p.e com o grupo *FTD-like* de 15-25 d.p.e.

4.2. Índice de Neurodegeneração

Os danos gerados tanto pelo acúmulo, direcionado ao cérebro, de peptídeos β -amiloíde para o modelo *AD-like*, quanto pela presença do hexanucleotídeo com 108 repetições no corpo de cogumelo, no modelo *FTD-like* foram quantificados por meio de cortes histológicos. Na Figura 9A, temos a representação dos índices durante 0-2 d.p.e moscas do grupo *AD-like* apresentaram um aumento significativo no dano tecidual medido pelo índice de neurodegeneração (P < 0,001) quando comparado ao grupo com 15-18 d.p.e.

Além disso, houve também um aumento significativo no score de neurodegeneração para o grupo controle (Figura 9A), fato que despertou no grupo uma atenção quanto a expressão de GFP no cérebro das Drosophilas.

Figura 9- Índice de neurodegeneração com diferentes dias de eclosão. (A) Moscas AD-like e o controle (elav-Gal4) comparando diferentes idades. (B) Moscas FTD-like e grupo controle (Mef2Gal4). As barras representam a mediana \pm desvio padrão do erro, *: P-value < 0,05; **: P-value < 0,01; ****: P-value < 0,0001 (Two way ANOVA e pós teste Tukey).

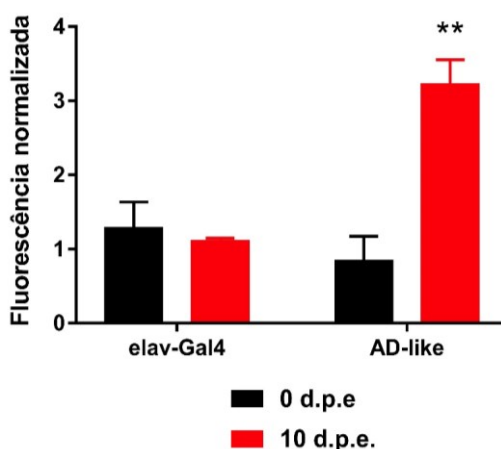


Na figura 9B, verificamos que apesar do grupo 7-10 d.p.e não apresentar diferenças na escalada, há uma diferença significativa quanto a neurodegeneração, num grau severo que vista também no 20° dia. É importante ressaltar que o envelhecimento realmente ocasiona em danos neurais, uma vez que o grupo controle em 20 d.p.e apresenta um índice de neurodegeneração maior que o grupo controle de 7-10 d.p.e.

4.3. Quantificação de beta amiloíde

A presença de beta amiloíde humano foi confirmada por meio da quantificação, verificando assim seu direcionamento ao cérebro da mosca, conforme ilustrado na Figura 10. Percebemos que com o intervalo de 10 dias pós eclosão as moscas do grupo modelo amiloide apresentam uma diferença significativa referente a presença de amiloide nas amostras quantificadas.

Figura 10- Quantificação de amiloide por tioflavina T, normalizada conforme fluorescência. As barras representam a média \pm desvio padrão do erro, **: P-value.



4.4. Análise transcricional por RNA-seq do modelo amilóide

A quantificação da expressão dos genes é amplamente utilizada na avaliação de diferentes perfis e comparação de amostras, incluindo o envelhecimento (CANNON; ZAMBON; CAMMARATO; ZHANG et al., 2017; OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010). O uso do RNA-seq auxilia nessa obtenção de genes diferencialmente expressos, com a grande vantagem de conseguir detectar a expressão até mesmo de genes não caracterizados auxiliando numa caracterização ampla dos mecanismos (SONESON; DELORENZI, 2013).

A construção da biblioteca de cDNA foi realizada com grupos pertencentes aos tempos 0-3 d.p.e. e 10 d.p.e. com duplicatas de cada biblioteca. A escolha desses grupos se deve, ao fato dos grupos avaliados durante 0-3 d.p.e. não apresentarem diferenças significativas quanto a avaliação comportamental, enquanto que, no 10º d.p.e houve uma redução significativa na escalada e diferença estatística entre os dois grupos avaliados. Assim, nesse curto intervalo de tempo foi possível avaliar o perfil de expressão de genes relacionados aos efeitos do envelhecimento, tanto do grupo controle quanto D.A., além de verificar o perfil de transcritos durante a progressão inicial da D.A.

Foram analisados 4 grupos considerando a quantidade de *reads* brutas obtidas para cada biblioteca, o processamento destes dados por meio da trimagem e mapeamento com o genoma de referência da *D. melanogaster*, com relação as *reads* únicas mapeadas são descritos na Tabela 2.

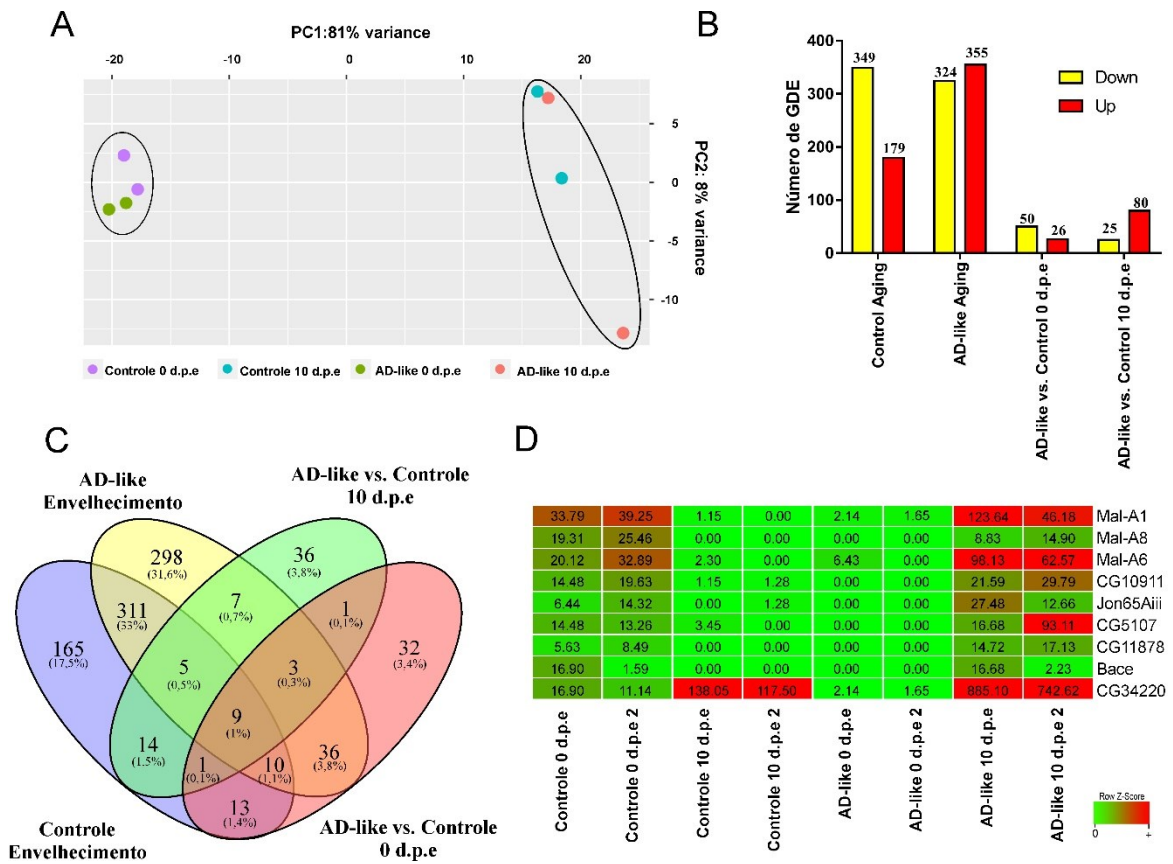
Tabela 2- Análise estatística dos dados obtidos pelo RNA-seq. Cada um dos quatro grupos apresenta uma duplicata indicada como repetição biológica. As *reads* brutas representam o valor total obtido pelo RNA-seq sem nenhum tipo de processamento. Destas *reads* uma porcentagem é utilizada na análise após a trimagem e mapeadas.

	Repetições Biológicas	Reads brutas	Reads Trimadas (%)	% reads únicas mapeadas
Controle 0 d.p.e.	1	2143495,0	1738351 (81.1%)	866351 (49.84%)
	2	1315677,0	1119797 (85.1%)	558691 (49.89%)
Controle 10 d.p.e.	1	1258047,0	827025 (65.7%)	350619 (42.40%)
	2	1134127,0	755748 (66.6%)	374881 (49.60%)
AD-like 0 d.p.e.	1	2280420,0	1304751 (57.2%)	558813 (42.83%)
	2	1143741,0	605179 (52.9%)	218387 (36.09%)
AD-like 10 d.p.e.	1	2142506,0	1739744 (81.2%)	637454 (36.64%)
	2	1167141,0	826986 (70.9%)	453685 (54.86%)

Por meio da análise de componentes principais (PCA) é possível identificar a separação das amostras biológicas por duas demarcações, conforme visualizado na Figura 11. A demarcação da esquerda refere-se à proximidade das bibliotecas do controle 0 d.p.e. e *AD-like* 0 d.p.e. Já a segunda demarcação é referente as bibliotecas do grupo controle 10 d.p.e. e *AD-like* 10 d.p.e que apresentaram uma maior proximidade quando comparadas com todas bibliotecas.

O eixo PC1 indica 81% da variância na expressão gênica relativa a essas duas demarcações, referente a diferença de idade das amostras destas bibliotecas, podendo considerar a ação do envelhecimento nesse período avaliado. Já o eixo PC2 indica 8% da variância, relacionada a localização vertical das bibliotecas do grupo controle e *AD-like* no gráfico. Portanto, a variância de PC2 foi possivelmente devido as diferenças de expressão do modelo de Alzheimer (Figura 11A).

Figura 11- Análise dos genes diferencialmente expressos (GDE) dos grupos controle e modelo amilóide (AD-like). (A) Análise de componentes principais mostrando a proximidade dos grupos de 0 d.p.e, demarcados num círculo, e os grupos de 10 d.p.e. (B) Número de genes diferencialmente expressos nos grupos analisados (aumento na expressão: vermelho; redução: amarelo). (C) Diagrama de Venn com o número de genes diferencialmente expressos dentro dos 4 grupos de comparação avaliados. (D) *Heatmap* com os valores das *reads* sobrepostas (*counts*) para cada um dos 9 genes em comuns expressos nos 4 grupos analisados. A faixa de cor vai de verde (para valores próximos a zero) a vermelho (valores mais altos dentro do *heatmap*).



Com os dados obtidos conforme Tabela 2, utilizamos as seguintes comparações: o controle de 10 d.p.e. comparado ao grupo controle de 0 d.p.e, referente ao envelhecimento do controle; o grupo AD-like 10 d.p.e comparado ao AD-like 0 d.p.e, referente a progressão ou envelhecimento do modelo de amilóide; o grupo AD-like comparado ao controle, ambos com 0 d.p.e; e por fim, o grupo AD-like comparado ao controle, ambos com 10 d.p.e.

A Figura 11B representa o número de genes diferencialmente expressos em cada uma das comparações, além de definir a quantidade de genes com a regulação aumentada (*up-regulated*) ou reduzida (*down-regulated*) para cada um deles. Os grupos com maior número de genes diferencialmente expressos, de modo geral, são os grupos com comparações relacionadas ao envelhecimento, seja referente ao Alzheimer ou Controle. As comparações num mesmo

período de tempo, seja 0 d.p.e ou 10 d.p.e., entre o grupo *AD-like* e controle apresentam uma menor quantidade de genes diferencialmente expressos, algo já esperado quando visualizamos a análise de componentes principais, visto que a distância destes grupos é menor.

A lista de GDE de cada grupo foi usada para construir um diagrama de *Venn* identificando o número de GDE compartilhados e específicos em cada grupo (Figura 11C). Destes 9 genes eram em comum com os 4 grupos avaliados: *mal-A1*, *mal-A6*, *mal-A8*, *jon65Aiii*, *CG10911*, *CG5107*, *CG11878*, *CG34220* e *bace*. Um *heatmap* com o perfil de expressão desses 9 genes em comum foi ilustrado na Figura 11D, com os valores *counts* de cada replicata das bibliotecas montadas.

4.4.1. Envelhecimento (10 d.p.e. versus 0 d.p.e.) do grupo controle e *AD-like*

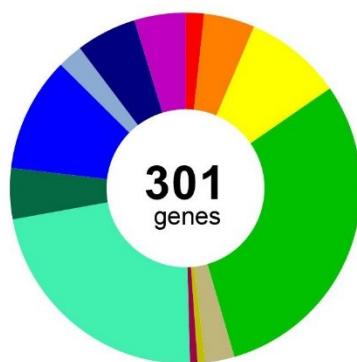
Na Figura 12 são apresentados os processos biológicos dos grupos: envelhecimento controle e progressão do modelo *AD-like*; identificados no PANTHER. Estes dados são ilustrados de forma panorâmica, a fim de compreender as diferenças entre o modelo e o grupo controle, principalmente quanto a regulação (*up* ou *down*).

Ao compararmos os processos biológicos mapeados nos genes diferencialmente expressos com regulação reduzida (*down-regulated*) percebemos que no modelo amilóide não há o processo do sistema imunológico. Os genes mapeados nesse processo, são: *spz3* (CG7104) e *spz5* (CG9972), presentes no grupo controle *down-regulated*.

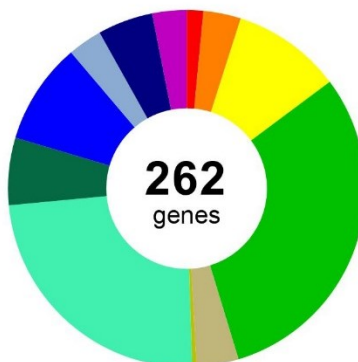
Figura 12- Processos biológicos mapeados no PANTHER *Gene Ontology slim* dos grupos: envelhecimento controle e AD-like, segregados conforme a regulação. Gráfico em forma de pizza, dos processos biológicos mapeados nos grupos de envelhecimento (Controle e AD-like) *up* e *down regulated*. O número apresentado no centro do gráfico, refere-se ao total de genes encontrados para cada processo biológico. Ressaltamos que nessa análise um mesmo gene diferencialmente expresso pode participar de diferentes processos biológicos e será contabilizado novamente. Ao lado a legenda de cada processo biológico mapeado nas condições.

ENVELHECIMENTO

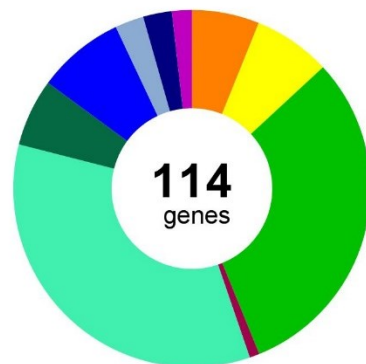
Controle - Down Regulated



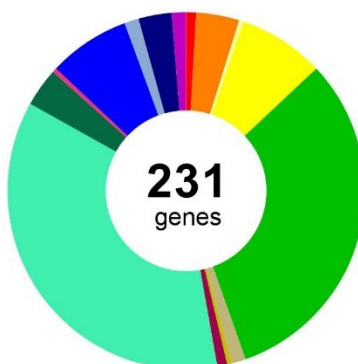
AD-like - Down Regulated



Controle - Up Regulated



AD-like - Up Regulated



- adesão biológica
- localização
- locomoção
- organização de componentes celulares ou biogênese
- processo celular
- processo de desenvolvimento
- processo de multi-organismos
- processo do sistema imune
- processo metabólico
- processo organizacional multicelular
- processo reprodutivo
- regulação biológica
- reprodução
- resposta ao estímulo
- sinalização

Com relação aos processos biológicos similares, mapeados dos GDE é importante reforçar que não necessariamente são os mesmos genes presentes em cada grupo, uma vez que genes distintos podem contribuir num mesmo processo. Além disso, um gene pode participar de mais de um processo biológico, sendo contabilizado novamente.

Na comparação entre os grupos com os genes *up-regulated*, todos processos biológicos presentes no grupo controle são encontrados no modelo amilóide. No entanto, além destes foram mapeados no modelo amilóide outros cinco processos com regulação aumentada, são eles: adesão biológica, locomoção, processo de desenvolvimento, de multi-organismos e reprodutivo.

Os genes mapeados são exclusivos do grupo de progressão *AD-like up-regulated*, no entanto, como já descrito tais genes podem contribuir também em outros processos. É o caso do gene *itgbn* (CG1762) presente no processo de locomoção e adesão. Além deste, o gene CG30046 também foi mapeado referente a adesão biológica. Já os GDE com regulação aumentada e exclusivos no processo de desenvolvimento foram: *so* (CG11121), *sidpn* (CG10446), *zasp67* (CG14168). Por fim, os genes *rad50* (CG6339) e *sting* (CG1667) se referem respectivamente aos processos: reprodutivo e de multi-organismos.

Além dos processos biológicos, mapeamos pelo PANTHER as vias de cada grupo. Na Tabela 3, temos a quantidade de vias identificadas em ambos grupos de envelhecimento (Controle e *AD-like*), segregadas conforme a regulação dos GDE.

Tabela 3- Número de vias identificadas e vias exclusivas de cada grupo, mapeadas no PANTHER Pathway. Os grupos: envelhecimento controle e *AD-like* foram separados em subgrupos, conforme a regulação dos genes diferencialmente expressos.

Grupos	Regulação	Nº de vias mapeadas	Vias Exclusivas de cada grupo
Controle	<i>down</i>	35	6
	<i>up</i>	17	2
<i>AD-like</i>	<i>down</i>	26	2
	<i>up</i>	38	14

O número de vias mapeadas no PANTHER, relacionadas a redução dos GDE para o grupo controle foram 35, enquanto que no grupo *AD-like* foram mapeadas 26 vias. Já o número de vias mapeadas por meio dos GDE com regulação aumentada no grupo controle foi de 17 vias, enquanto que no grupo do modelo amilóide esse número foi de 38 vias. Além disso

verificamos as vias específicas de cada grupo conforme a regulação. Estas vias foram detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4- Vias exclusivas dos grupos envelhecimento controle e AD-like, separadas pela regulação dos GDE. O mapeamento destas vias foi realizado no PANTHER *Pathway* que identifica se o GDE está envolvido em alguma via do banco *Gene Ontology*.

	Controle	AD-like
DOWN	Metabolismo do piruvato Ativação de células T Ativação de células B Síntese de ATP Sinalização de apoptose Sinalização de <i>Notch</i>	Regulação geral da transcrição Conversão de glutamato em glutamina
UP	Via Insulina/IGF - cascata MAP quinase Metabolismo de pirimidina	Replicação do DNA Ciclo de Krebs (ácidos tricarboxílicos) Transcrição geral por RNA polimerase I Recuperação de xantina e guanina Recuperação de adenina e hipoxantina Recuperação de piridoxal fosfato Recuperação de ribonucleotídeos de pirimidina Biossíntese de ribonucleotídeos de pirimidina <i>de novo</i> Biossíntese de desoxirribonucleotídeo de pirimidina <i>de novo</i> Metabolismo da vitamina B6 Biossíntese de isoleucina Degradação de ornitina p53 com <i>feedback loops</i> Sinalização heterotrimérica da proteína G - via mediada por Gq alfa e Go alfa

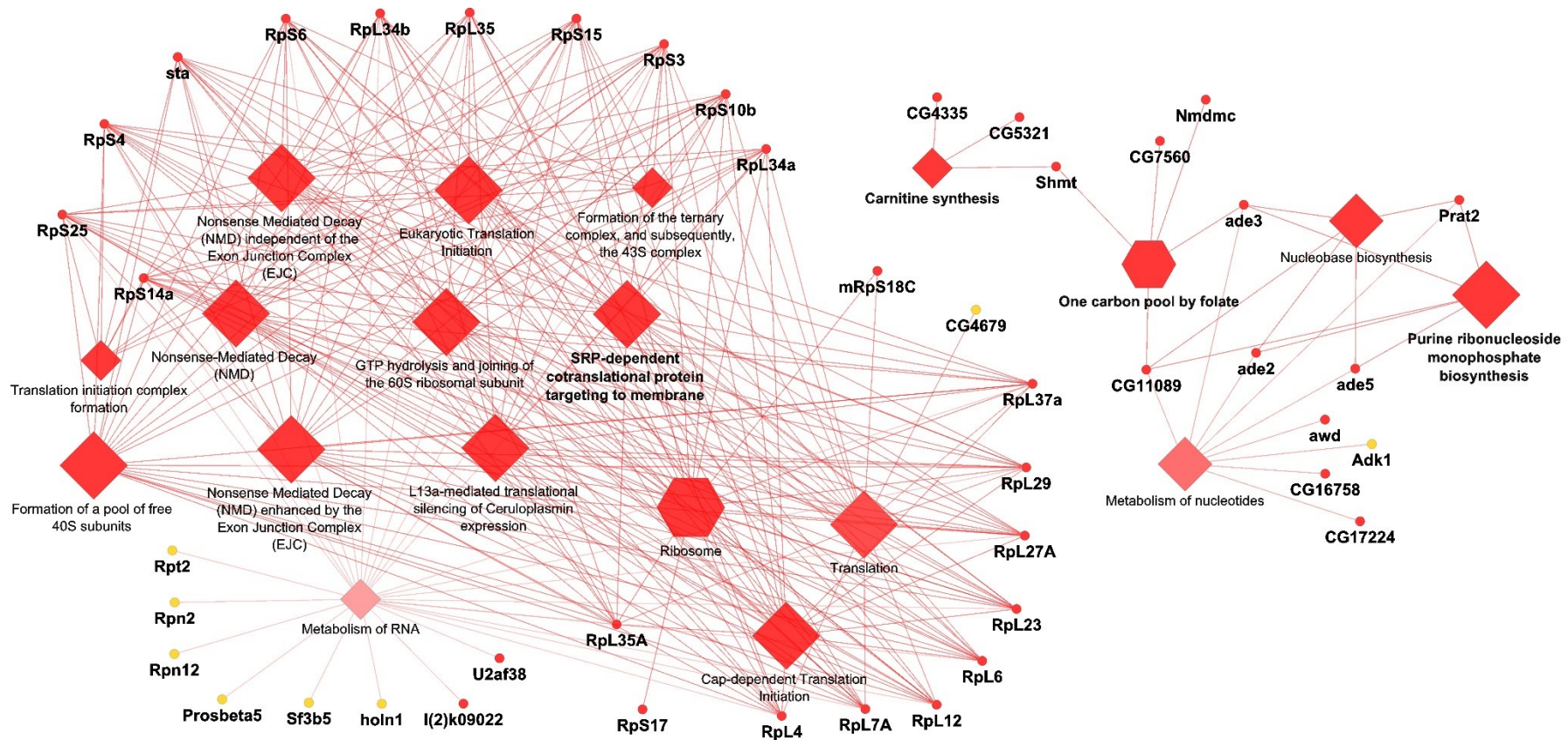
Não necessariamente se um gene teve uma regulação negativa, haverá uma regulação negativa na via que ela participa, uma vez que há interações com outros genes e vias. Para entender o papel da interação do grupo de genes foi realizada a análise no *Cytoscape* utilizando o aplicativo *ClueGO* e *CluePedia*. De forma geral, há um número maior de vias identificadas *down-regulated* no grupo controle, enquanto que no grupo *AD-like* há mais vias envolvidas com GDE de regulação aumentada.

Ao analisarmos os GDE no ClueGO como banco de dados o KEGG, temos diferenças importantes entres as vias mapeadas dos grupos de envelhecimento do Controle e AD (Anexos 2 e 3, respectivamente). Alguns exemplos são: biossíntese de folato, metabolismo de glicerofosfolipídeos, metabolismo de drogas e metabolismo de xenobióticos por citocromo p450. Todas as vias citadas apresentam uma regulação negativa no grupo controle, quanto que no grupo *AD-like* a regulação é positiva, alterando assim totalmente seu comportamento. Outro

aspecto relevante é referente a via de sinalização Toll e Imd. No grupo controle, temos os seguintes genes *up-regulated*: *dptA*, *drs* e *pgrp-sd*, enquanto que no grupo de envelhecimento *AD-like*, além dos genes presentes no grupo controle, temos os genes *im1*, *im2* e *im4*, com regulação positiva.

Devido ao alto número de vias e transcritos identificados por essa análise, principalmente quando consideramos as interações geradas no ClueGO, utilizamos apenas os GDE específicos dos grupos de envelhecimento, separados conforme sua regulação, a fim de entender as interações possíveis. As vias identificadas no grupo *AD-like*, conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13- Vias identificadas no grupo AD-like com dos genes diferencialmente expressos específicos (*up-regulated* e *down-regulated*). A plataforma utilizada foi ClueGO, no *Cytoscape*, com o banco de dados do KEGG (formato de hexágono) e *Reactome* (formato de losango). Os GDE são ilustrados como círculos e sua coloração é dada conforme sua regulação (amarelo para genes com regulação reduzida e vermelho para genes com regulação aumentada). As linhas são as interações das vias identificadas aos seus respectivos genes ou grupo de genes. Os resultados da imagem foram mantidos em inglês, com intuito de manter fidedigno aos nomes dos bancos de dados.



Um número maior de vias foi identificado pelo banco de dados do *Reactome* (ilustrado na Figura 13, como losango). Muitos dos GDE interagem com mais de uma via, há também alguns genes com regulação reduzida (em amarelo), no entanto, sua participação considerando a interação com outros genes (*up-regulated*) não é suficiente para preservar um equilíbrio, que seria visualizado na imagem pela cor cinza na via.

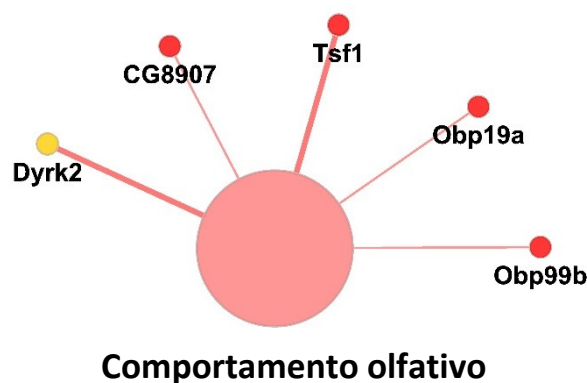
Algumas das vias identificadas no modelo amilóide foram: Biossíntese de folato (*One carbon pool by folate*), Biossíntese de carnitina (*Carnitine synthesis*) e Metabolismo de nucleotídeos (Metabolism of nucleotides). Todas elas são reguladas de forma positiva quando comparadas ao controle, elevando assim, possivelmente, a produção de nucleotídeos.

Já no grupo controle, a principal identificada foi a via de polaridade celular planar, denominada de PCP/CE, com mais de 50 subgrupos mapeados, todas com regulação reduzida. Houve participação nessas interações dos genes (*down-regulated*): *drice*, *myd88*, *prosalpha2*, *prosbeta1*, *prosbeta4*, *rpt1*, *rpt4*, *ubi-p5E* e *lic*.

4.4.1.1. Alteração no nível dos genes olfativos promovidos pelo modelo DA

A progressão do envelhecimento *AD-like* em *D. melanogaster* (genes exclusivos do envelhecimento AD) promoveu a regulação positiva dos genes *obp19a*, *tsf1*, *CG8907* e *obp99b* e a regulação negativa do gene *dyrk2*, conforme Figura 14.

Figura 14- Genes envolvidos no processo olfatório do grupo *AD-like* identificadas na plataforma ClueGO, no *Cytoscape*. A imagem ilustra o processo biológico mapeado pelo Gene Ontology (GO), os genes são indicados como círculos pequenos, com seus respectivos nomes. A cor amarela indica a regulação negativa e vermelha positiva.



4.4.2. Grupo AD-like versus Controle: 0 d.p.e e 10 d.p.e.

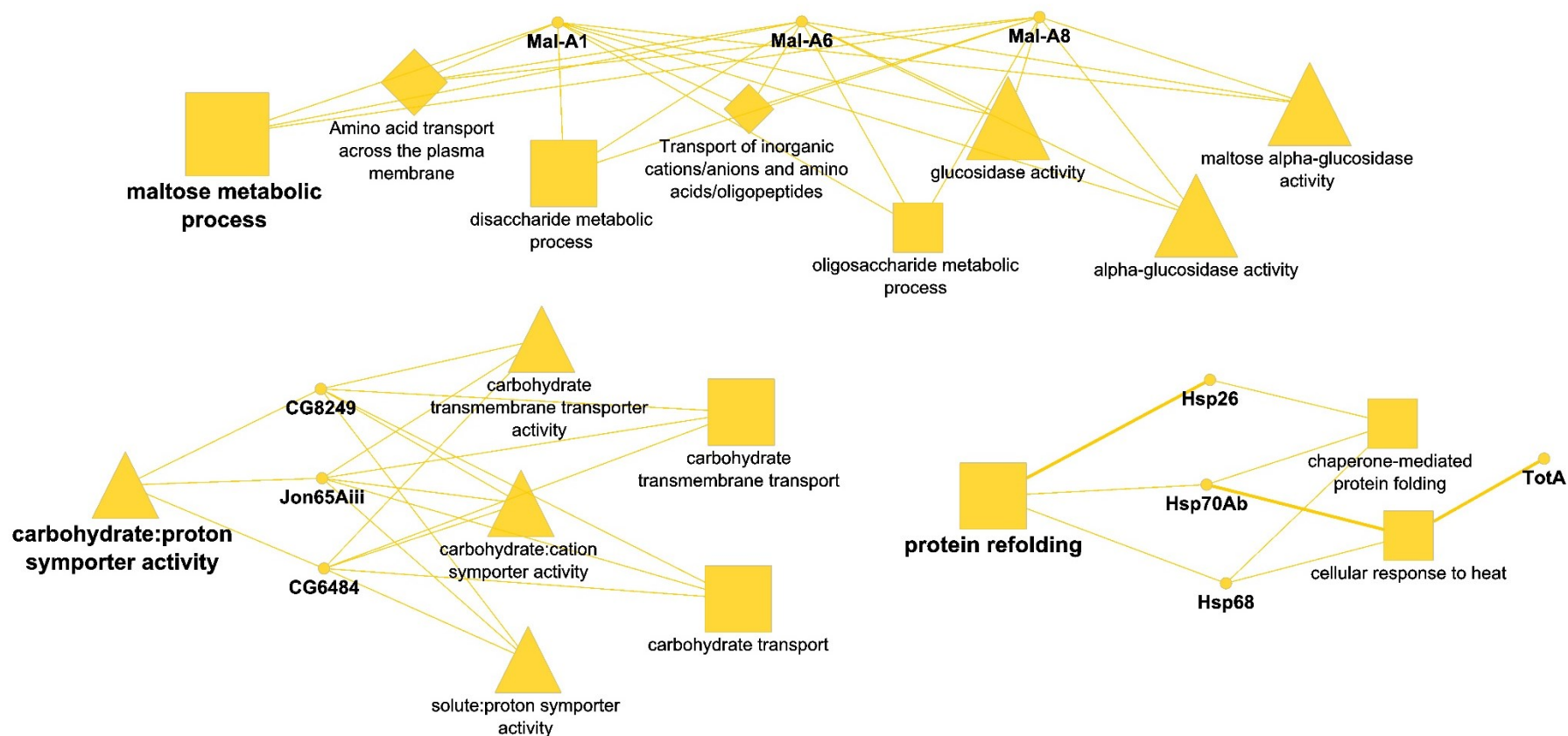
Por se tratar de um pequeno número de GDE analisamos todos eles considerando: os processos biológicos, função molecular e vias (KEGG e *Reactome*) pelo aplicativo *ClueGO*, Na Figura 15, temos a ilustração das interações resultantes desse processo no grupo AD-like versus Controle 0 d.p.e, detalhadas na Tabela 5.

Todas interações mapeadas neste grupo apresentam uma diferença significativa e sofreram uma regulação reduzida tanto no processo metabólico, quando no *refolding* das proteínas. Desta forma, quando comparamos os GDE identificados no grupo AD-like 0 d.p.e ao grupo Controle 0 d.p.e há uma redução na transcrição destes genes, que influenciam em tais processos e vias.

Tabela 5- Mapeamento via ClueGO dos GDE do grupo AD-like versus Controle 0 d.p.e. Em negrito os genes com redução do nível de expressão mapeados com interações nos processos/vias. *P ≤0,05. Teste estatístico de *Bonferroni step down*.

ANOTAÇÃO GO	GENES MAPEADOS	Valor de p*	
<i>Refolding</i> proteína	Hsp26, Hsp68, Hsp70Ab	0,0003	Processo Biológico
<i>Folding</i> de proteínas mediado por chaperonas	Hsp26, Hsp68, Hsp70Ab	0,0015	
Resposta ao calor	Hsp68, Hsp70Ab, TotA	0,0028	
Transporte de carboidratos	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0009	
Carboidratos: transporte transmembranar	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0003	
Processo metabólico de oligossacarídeo	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0019	
Processo metabólico de dissacarídeo	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0002	
Processo metabólico de maltose	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00001	Função Molecular
Atividade no transporte transmembranar de carboidratos	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0003	
Carboidratos: atividade transporte cátions	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0001	
Solutos: atividade transporte prótons	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0003	
Carboidratos: atividade transporte prótons	CG6484, CG8249, Jon65Aiii	0,0001	
Atividade de glucosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00005	
Atividade de alfa glucosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00002	
Atividade maltose alfa-glucosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00001	Vias
Transporte de aminoácidos através da membrana plasmática	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0003	
Transporte de cátions/ânions e aminoácidos e oligopeptídeos	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,005	

Figura 15- Interações dos GDE do grupo *AD-like versus Controle* 0 dias pós eclosão identificadas na plataforma ClueGO, no *Cytoscape*. A imagem ilustra vias e o mapeamento hierárquico pelo Gene Ontology (GO), assim os genes são indicados como círculos, com seu respectivo nome. Já o quadrado representa os processos biológicos resultantes, o triângulo refere-se à função molecular e por fim, o losango: as vias identificadas no banco *Reactome*. Os nomes em negrito dos processos e/ou vias indicam um nível acima na hierarquia, enquanto que a cor amarela indica a regulação negativa, uma vez que os genes que interagiram eram *down-regulated*. As linhas representam as interações das vias identificadas aos seus respectivos genes ou grupo de genes. Os resultados da imagem foram mantidos em inglês, com intuito de manter fidedigno aos nomes dos bancos de dados.



Já os dados resultantes da análise no aplicativo ClueGO, com os GDE do grupo *AD-like* versus Controle 10 d.p.e. são representados na Figura 16 e Tabela 6.

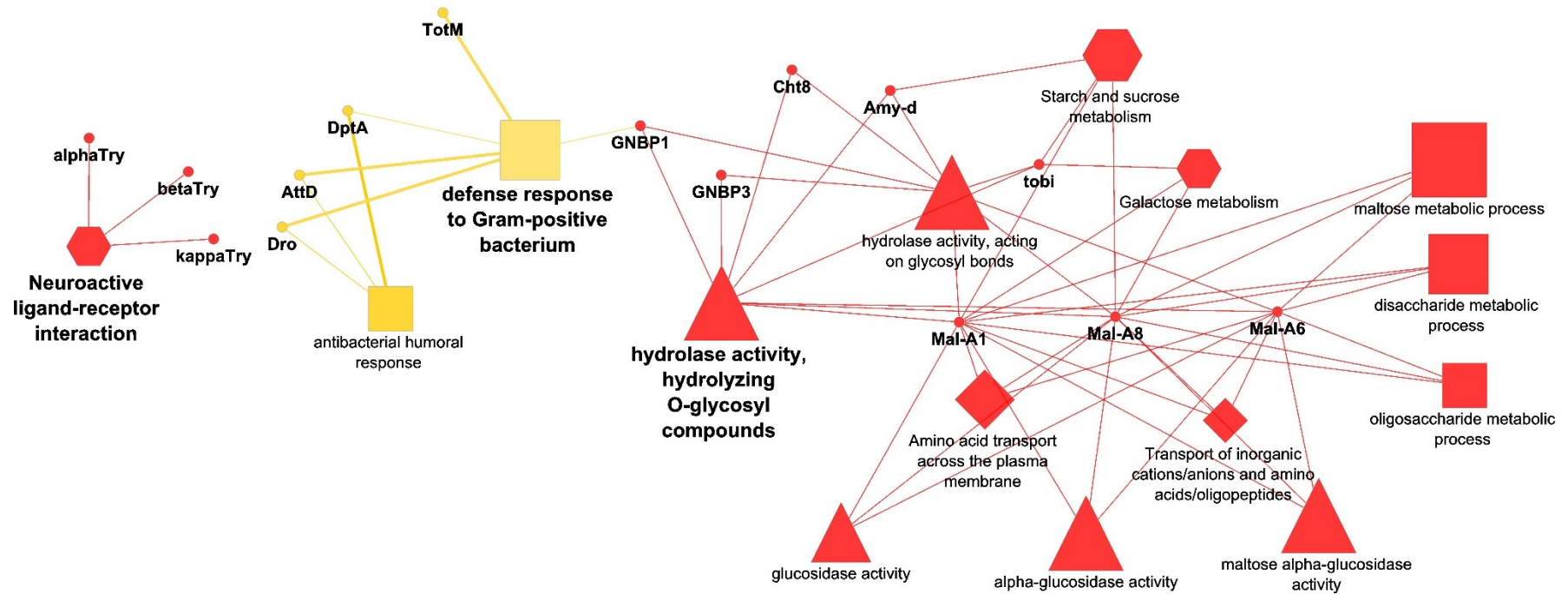
Tabela 6- Mapeamento via ClueGO dos GDE do grupo *AD-like* versus Controle 10 d.p.e. Os genes em negrito apresentam regulação reduzida (*attD*, *dpt*, *dro*, *totM*), enquanto os outros são GDE *upregulated*, todos apresentam valor de $P \leq 0,05$. Teste estatístico de Bonferroni *step down*.

Anotação GO	Genes mapeados	Valor de p*	
Resposta humoral antibacteriana	AttD, Dpt, Dro	0,0009	Processo Biológico
Defesa contra bactérias Gram-positivas	GNBP1, AttD, Dpt, Dro, TotM	0,00006	
Processo metabólico do oligossacarídeo	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,004	
Processo metabólico do dissacarídeo	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0005	
Processo metabólico da maltose	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00003	
Atividade hidrolase, papel em ligações glicosil	Amy-d, Cht8, GNBP1, GNBP3, Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8, tobi	0,000003	Função Molecular
Hidrolase, compostos O-glicosil	Amy-d, Cht8, GNBP1, GNBP3, Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8, tobi	0,000001	
Atividade glicosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0001	
Atividade alfa-glicosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00004	
Atividade maltose alfa-glicosidase	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,00003	
Interação ligante-receptor neuroativo	alphaTry, betaTry, kappaTry	0,006	Vias
Metabolismo da galactose	Mal-A1, Mal-A8, tobi	0,0018	
Metabolismo de amido e sacarose	Amy-d, Mal-A1, Mal-A8, tobi	0,00006	
Transporte de aminoácidos através da membrana plasmática	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0006	
Transporte de cátions/ânions e aminoácidos e oligopeptídeos	Mal-A1, Mal-A6, Mal-A8	0,0119	

Nesse resultado, observamos um aumento nos processos biológicos referentes ao metabolismo de amido, oligos e monossacarídeos. Juntamente com o aumento na função molecular voltada na atividade de glicosidases. No entanto, processos relacionados a resposta imune tiveram uma redução. Destacamos a regulação negativa dos transcritos de peptídeos antimicrobianos (*attD*, *dpt* e *dro*) que codificam proteínas relacionadas a via de defesa contra bactérias gram-positivas.

Além disso, foi identificado um aumento na via relacionada a interação de ligantes/receptores no cérebro da *Drosophila*, por meio dos genes: *alfatry*, *betatry* e *kappatry*.

Figura 16- Interações dos GDE do grupo AD-like versus Controle 10 dias pós eclosão identificadas na plataforma ClueGO, no *Cytoscape*. A imagem ilustra vias e o mapeamento hierárquico pelo Gene Ontology (GO), assim os genes são indicados como círculos, com seu respectivo nome. O quadrado se refere ao processo biológico, triângulo a função molecular, losango vias identificadas no banco *Reactome* e hexágono vias identificadas no KEGG. Os nomes em negrito dos processos e/ou vias indicam um nível acima na hierarquia, enquanto que a cor amarela indica a regulação negativa e a cor vermelha um aumento da regulação. As linhas representam as interações das vias identificadas aos seus respectivos genes ou grupo de genes. Os resultados da imagem foram mantidos em inglês, com intuito de manter fidedigno aos nomes dos bancos de dados.



4.5. Genes ortólogos

A identificação de GDE ortólogos aos humanos foi realizada pelo DIOPTS. Vale enfatizar que a partir de um gene da *D. melanogaster*, é possível encontrar mais de um gene ortólogo aos humanos, como mostra na Tabela 7.

Tabela 7- Número de genes com ortólogos identificados pela plataforma DRSC-DIOPTS, em cada grupo avaliado nesse estudo e número de GDE sem ortólogo para humano.

		Número de GDE	Número de genes Ortólogos em humanos	Número de genes sem ortólogos mapeados
Envelhecimento Controle	DOWN	349	746	123
	UP	179	308	70
Envelhecimento AD-like	DOWN	324	647	124
	UP	355	738	106
AD-like vs Controle 0 d.p.e.	DOWN	50	105	14
	UP	26	53	11
AD-like vs Controle 10 d.p.e.	DOWN	25	34	14
	UP	80	195	27

Ao mapearmos os ortólogos humanos de cada grupo no ClueGO visualizamos as interações significativas construídas por meio dos transcritos tanto *down* quanto *upregulated*. Esta análise possibilita verificar o quão possível e seguro seria extrapolar nossos dados para o organismo humano.

Considerando os genes ortólogos identificados no grupo de envelhecimento controle foram identificadas mais de 200 vias, sendo a maior parte com sua regulação reduzida. Algumas das que apresentaram maior número de genes envolvidos são: Metabolismo, sistema imune inato, transporte de pequenas moléculas, doenças relacionadas ao sinal de transdução e sinalização MAPK. As vias com a regulação aumentada no envelhecimento foram: sinalização por ácido retinóico, biossíntese do ácido retinóico, digestão de carboidratos obtidos na dieta, criação de ativadores C2 e C4 envolvidos na via do complemento e a via da lectina, também envolvida com ativação do sistema complemento.

No grupo da progressão do modelo amilóide, mais de 300 vias foram mapeadas, sendo a maioria com regulação aumentada. Algumas das vias com maior número de genes interagindo foram: metabolismo de proteínas, resposta celular ao estresse e ao estímulo externo. Já algumas das vias identificadas com regulação reduzida foram: transporte de pequenas moléculas e de solutos, desordem no transporte transmembranar, sinalização por WNT e contração muscular.

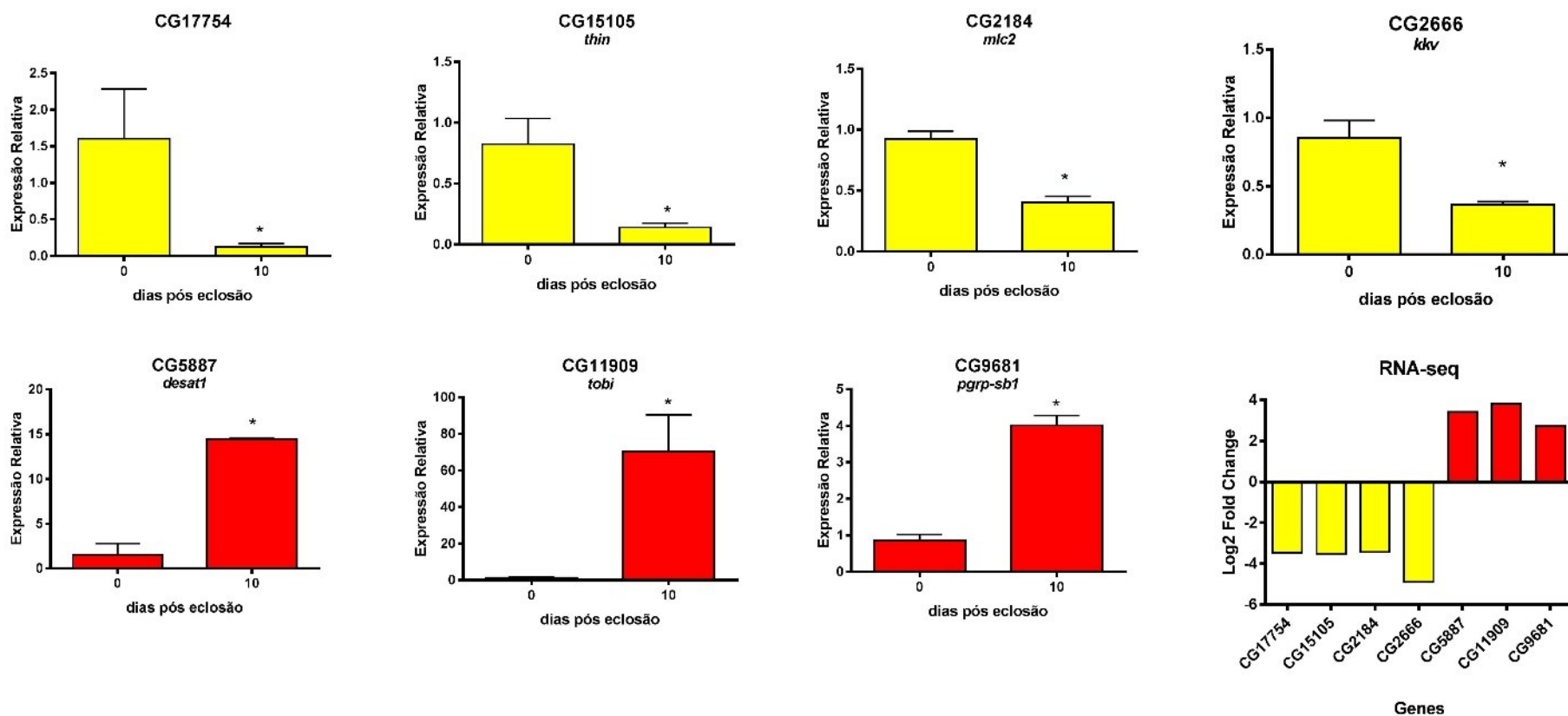
No grupo *AD-like vs* controle 0 d.p.e. algumas das vias identificadas com baixa regulação foram: transporte transmembranar de solutos, processamento de proteínas no reticulo endoplasmático, digestão e absorção de proteínas, resposta ao estresse/calor, apresentação e processamento de antígenos. Já as vias com transcritos *upregulated* foram: citocromo P450 - arranjo por tipo de substrato e funcionalização de compostos para que possam ser degradados. Com um menor número de transcritos interagindo temos as vias de transportadores de zinco, transportadores de íons metálicos (soluto).

Por fim no grupo *AD-like vs* controle 10 d.p.e. das mais de 50 vias mapeadas apenas uma não teve regulação aumentada (*Deactivation of the beta-catenin transactivating complex*). Algumas das vias *upregulated*: oxidações biológicas, biossíntese de hormônios esteroides, Metabolismo de drogas e do retinol, metabolismo de xenobioticos pelo citocromo p450, lisossomos e apoptose.

4.6. Validação de GDE por RTqPCR

Após análise *in silico*, o perfil de transcrição de sete GDEs encontrados no envelhecimento *AD-like* foi validado por RT-qPCR e apresentou o mesmo padrão do RNA-seq (Figura 17). Tal resultado aumentou a confiança dos nossos dados de RNA-seq comprovando a confiabilidade dos dados gerados e reprodutibilidade com outras técnicas.

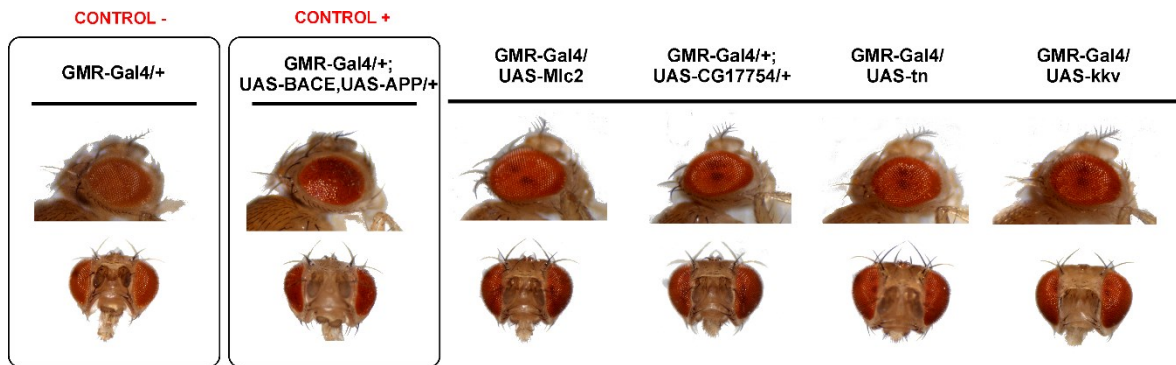
Figura 17- Validação RT-qPCR dos níveis de transcrição de sete genes. Todos os dados são apresentados como as médias \pm SD. O valor de p foi calculado pelo teste T de *Student*. *: Valor de P <0,05; **: valor de P <0,01; ****: valor de P <0,0001. O gráfico de RNA-seq mostrou a variação da log2 dos genes em relação a 10 d.p.e. vs. 0 d.p.e. (Envelhecimento AD-like). Os valores negativos de *log2 fold change* mostraram genes regulados negativamente em 10 d.p.e.



4.7. Silenciamento dos genes *mlc2*, *CG17754* e *tn* nos olhos de moscas

Para avaliar o efeito do *knockdown* dos genes diferencialmente expressos no RNA-*seq* e validados por RT-qPCR: *mlc2*, *tn* e *CG17754* foi realizado um cruzamento dirigindo o silenciamento da expressão no olho da mosca. O resultado obtido pela F1 destes cruzamentos é indicado na Figura 18.

Figura 18- Supressão gênica direcionada aos olhos da *D. melanogaster*. Visão lateral e frontal das cabeças das moscas. Em destaque, temos o grupo controle negativo com apenas uma cópia de GMR-Gal4 e o controle positivo com produção de BACE e APP humano nos olhos. A seguir, são ilustradas a supressão por meio do dsRNA dos genes *mlc2*, *CG17754* e *tn*, respectivamente.

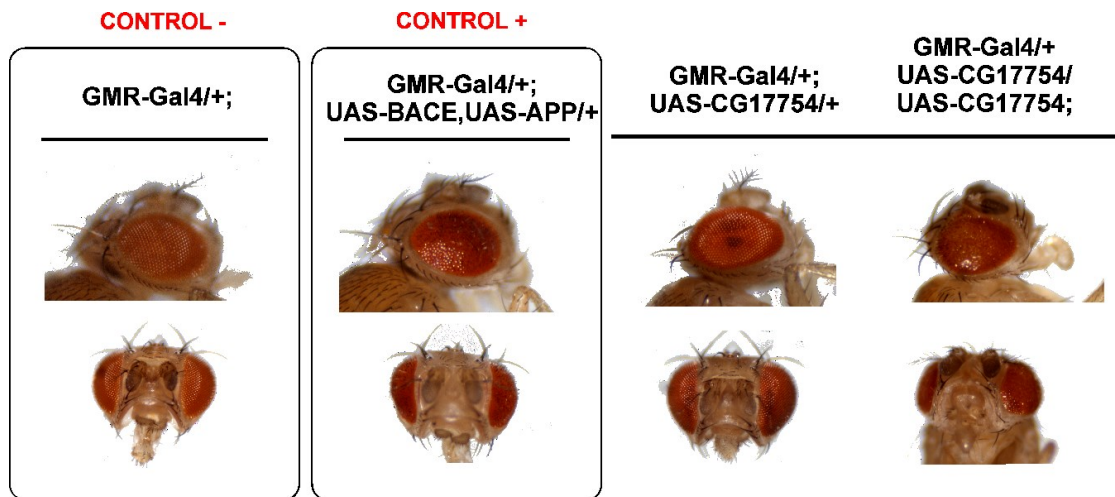


Os grupos controle negativo e positivo são utilizados na comparação ao avaliar os olhos dos cruzamentos de interesse. Não obtivemos nenhuma alteração quanto ao tamanho, estrutura externa ou rugosidade dos cruzamentos com silenciamento dos genes *mlc2*, *tn* e *CG17754* nos olhos das moscas avaliadas. Desta forma, o silenciamento por RNAi utilizando a expressão de uma cópia de *dsRNA* do gene de interesse não parece gerar visualmente nenhum tipo de alteração as moscas da F1.

Vale ressaltar avaliamos apenas o silenciamento dirigido aos olhos, não verificando possíveis alterações comportamentais caso houvesse um direcionamento ao cérebro como o modelo amilóide. Desta forma, não sabemos se tal cruzamento teria um declínio tanto na aprendizagem e memória, quanto na locomoção.

Sabendo que apenas uma cópia do *dsRNA* não levou a nenhuma alteração fenotípica nos olhos, realizamos novos cruzamentos de forma a ter o *dsRNA* em homozigose. O resultado é verificado na Figura 19.

Figura 19- Supressão do gene CG17754 direcionada aos olhos da *D. melanogaster*. Visão lateral e frontal das cabeças das moscas. Em destaque temos o grupo controle com apenas uma cópia de GMR-Gal4 e o grupo controle positivo com as alterações estruturas presentes nos olhos das moscas. O cruzamento mostra o resultado do dsRNA em heterozigose e homozigose, sendo que neste último é possível verificar alterações fenotípicas nos olhos, tais como rugosidade e alteração da coloração.



Desta forma, este tipo de avaliação demonstrou sucesso na verificação rápida dos genes envolvidos no grupo *AD-like*, no caso de genes *down-regulated*, por meio do silenciamento gênico. Além de direcionar nossos próximos estudos ao gene CG17754, uma vez que ele demonstrou alterações visíveis quando silenciado.

5. DISCUSSÃO

O uso da *D. melanogaster* para estudos de doenças neurodegenerativas é descrito na literatura e viável, uma vez que possui um cérebro com subestruturas funcionalmente especializadas e conservação de genes relacionados a tais patologias em humanos (BELFIORI-CARRASCO; MARCORA; BOCAI; CERIANI et al., 2017; MOLONEY; SATTELLE; LOMAS; CROWTHER, 2010). Nesse contexto, nosso trabalho avaliou dois modelos alternativos para compreensão das duas maiores doenças neurodegenerativas incidentes, no século XXI, em idosos a: Doença de Alzheimer e Demência Frontotemporal (GALLUCCI NETO; TAMELINI; FORLENZA, 2005). A compreensão dos mecanismos que desencadeiam tais patologias ainda é uma incógnita, principalmente devido à dificuldade de acesso do cérebro humano, sem riscos ao paciente. Assim, nossos resultados agregam no avanço da identificação de marcadores e/ou regiões para um diagnóstico rápido, sensível e preciso que apoiam o entendimento de tais demências (LOVE, 2005; WALTERS; MANION; NEELY, 2019; YOUNG; LAVAKUMAR; TAMPI; BALACHANDRAN et al., 2018).

Dada a relevância e preocupação quanto aos investimentos públicos relativos a conscientização, prevenção e melhoria de vida dos pacientes e familiares (GUTIERREZ; SILVA; GUIMARÃES; CAMPINO, 2014), realizamos a avaliação locomotora e de neurodegeneração de ambos modelos e prosseguimos o trabalho, dando enfoque apenas para a Doença de Alzheimer.

Para avaliação do modelo de Demência Frontotemporal utilizamos a linhagem do trabalho de FREIBAUM; LU; LOPEZ-GONZALEZ; KIM et al. (2015). Estudos indicam o potencial na geração de dano neurodegenerativo, por meio das repetições GGGGCC (MADABATTULA; STRAUTMAN; BYSICE; O'SULLIVAN et al., 2015). Nesse trabalho utilizamos uma linhagem com 108 repetições com direcionamento aos corpos de cogumelo. As moscas não apresentam a repetição desse hexanucleotídeo em seu genoma de forma natural, desta forma, a obtenção se torna possível graças a produção de moscas transgênicas.

Já no modelo β -amilóide utilizamos o modelo transgênico descrito por CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al. (2011), cuja vantagem em relação aos outros é que a presença de APP/BACE gerando os fragmentos $A\beta_{42}$ de forma natural e direcionada ao cérebro (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011). Uma vez que diferentes modelos de *D. melanogaster* apresentam diferentes fenótipos e citotoxicidade, um aspecto relevante levado em conta, foi a maior neurotoxicidade dos peptídeos do tipo $A\beta_{42}$ do que os $A\beta_{40}$ (JEON; LEE; SHIN; LEE et al., 2017).

Avaliações comportamentais são ferramentas na detecção dos danos gerados pelas doenças neurodegenerativas. O ensaio de escalada é um teste comportamental eficiente com metodologia simples, confiável e eficaz para alterações graves (MADABATTULA; STRAUTMAN; BYSICE; O'SULLIVAN et al., 2015; MOLONEY; SATTELLE; LOMAS; CROWTHER, 2010).

No modelo similar a FTD os efeitos do direcionamento das 108 repetições do hexanucleotídeo GGGGCC nos corpos de cogumelo, indicaram uma agitação e maior movimentação na escalada já nos primeiros dias pós eclosão. A partir do intervalo de 15-25 dias pós eclosão a taxa de escalada das moscas não apresenta diferença significativa. No entanto, com 20 dias pós eclosão há um processo de neurodegeneração severos no cérebro das moscas modelo, não apresentado no controle. Acreditamos que os resultados encontrados no modelo estejam relacionados ao fato da agitação que essa demência pode ocasionar, muitas vezes se relacionando inclusive com a esclerose lateral amiotrófica.

Em nosso estudo, também validamos o uso do *driver* elav-Gal4>UAS-mCD8-GFP, no modelo amilóide. Essa linhagem é habitualmente utilizada na análise de microscopia, mas ainda

não há dados na literatura sobre seu perfil e uso em ensaios de escalada. A princípio nosso intuito foi utilizar a mesma estratégia utilizada no modelo de Alzheimer, obter um modelo brando dessa doença neurodegenerativa.

Nossa análise mostrou eficiência do modelo similar aos resultados encontrados na literatura (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011) confirmando a eficiência e a reprodutibilidade do modelo aqui utilizado. Observamos uma diferença significativa no ensaio de escalada começando em 5 d.p.e. está presente também no ensaio com moscas de 10 d.p.e. Acreditamos que o uso do *driver* com GFP ocasione num leve retardo, quando comparado ao *driver* elav-Gal4 (linhagem c155), que apresenta diferenças significantes na escalada logo nos primeiros dias após a eclosão (CHAKRABORTY; VEPURI; MHATRE; PADDOCK et al., 2011). Esse atraso quanto aos efeitos comportamentais no modelo tipo AD podem ser uma alternativa no rastreamento de novas drogas. Comumente, os tratamentos ocorrem na fase de embrião ou durante o desenvolvimento até a vida adulta (embriogênese até a morte). No entanto, algumas drogas podem ser tóxicas durante a metamorfose e desenvolvimento. Portanto, o modelo tardio similar a Doença de Alzheimer, utilizando a mosca da fruta, permitirá o teste de drogas que são tóxicas durante a embriogênese ou metamorfose.

O cérebro é um órgão com alta quantidade de genes transcritos devido à especialização (GIRARDOT; LASBLEIZ; MONNIER; TRICOIRE, 2006; QIN; PAN; CAI; YAO et al., 2016). Aqui, escolhemos trabalhar com toda a cabeça proporcionando o mapeamento de genes relacionados também ao olfato e a região inicial do aparato digestório, ampliando nossa visão com relação aos efeitos gerados pela expressão dirigida de BACE e APP humano no cérebro.

Tal estratégia foi bem-sucedida, pois mapeamos mudanças no nível de transcrição no sistema olfativo (antenas). A regulação positiva ou negativa dos genes codificados pela proteína de ligação odorante pode modular a resposta do odor a alguns compostos, permitindo seu uso em modelos e avaliando a resposta rápida quanto análises de drogas. Recentemente, foi relatado que peptídeos β -amilóide em humanos podem diminuir a resposta olfatória, possibilitando seu uso como forma complementar de diagnóstico precoce e não invasivos da Doença de Alzheimer (KIM; RASHEED; YOO; KIM et al., 2018; SILVA; MERCER; WITT; PESSOA, 2018).

No grupo modelo amiloide (progressão), o gene *obp19a*, com regulação positiva é expresso exclusivamente nas antenas, reforçando o sucesso da estratégia do uso da cabeça inteira e não somente do cérebro dissecado ao realizar o RNA-seq. Além disso, na literatura há relatos de que a regulação reduzida do gene *dyrk2*, *down-regulated*, está relacionada não só a perda sensorial, como também a uma redução na atividade de fototransdução (visão) das moscas

(LUEBBERING; CHARLTON-PERKINS; KUMAR; ROLLMANN et al., 2013; YOSHIDA; YOSHIDA, 2019).

Os genes *mal-A1*, *mal-A6* e *mal-A8* referentes ao metabolismo de carboidratos, apresentam uma elevação no nível de transcrição no grupo *AD-like* e 10 d.p.e. demonstrando que a disfunção do metabolismo de carboidratos pode estar relacionada à progressão da DA. Os carboidratos são a fonte mais importante de energia para manter as células vivas, e o metabolismo desregulado da glicose está associado à disfunção sináptica (CHEN; ZHONG, 2013). No trabalho de NICCOLI; CABECINHA; TILLMANN; KERR et al. (2016), foi verificado que a superexpressão de *glut1* (transportador de glicose) em neurônios aumentou a vida útil e capacidade de escalada de moscas expressando Arctic-A β 42 (A β), e *knockdown* de *glut1* reduziu a captação de glicose pelos neurônios e agravou a toxicidade promovida por A β . Esses resultados sugerem que o metabolismo de carboidratos interfere na toxicidade de A β . Além disso, estudos em humanos sugerem que um déficit na utilização de glicose está envolvido em algumas formas de início tardio da doença de Alzheimer humana (LOAD), principalmente devido à função mitocondrial defeituosa e aumento do dano oxidativo causado pelo déficit de energia; essa observação também poderia explicar a possível variação da proteína ribossômica encontrada no modelo *AD-like* em *D. melanogaster* (LIN; BEAL, 2006; YIN; SANCHETI; PATIL; CADENAS, 2016).

Devido à diminuição do metabolismo da glicose neuronal, os mecanismos neuronais compensatórios são ativados para manter a homeostase energética, e as evidências sustentam que o metabolismo de aminoácidos pode compensar a diminuição da glicose. Em humanos, os níveis de alguns aminoácidos no plasma diminuem (GRIFFIN; BRADSHAW, 2017).

Para manter homeostase celular é necessário um equilíbrio refinado entre síntese, manutenção e degradação das proteínas. Em nosso trabalho, descobrimos que a via ribossômica foi regulada positivamente e proteassomas foram regulados negativamente. Durante a progressão da DA, há um declínio na quantidade de RNA ribossômico e uma elevação da oxidação do RNA no complexo ribossômico (DING; MARKESBERY; CECARINI; KELLER, 2006). O proteassoma é um sistema importante para a reciclagem de proteínas, e a disfunção nesse sistema tem sido associada à DA (WANG; SAUNDERS, 2014). A regulação positiva dos proteassomas promove a degradação da BACE e da γ -secretase, levando à diminuição da acumulação de β -amilóide (HONG; HUANG; JIANG, 2014).

O estresse oxidativo é um processo que promove danos nos tecidos durante o envelhecimento natural e é mais intensivo em doenças neurodegenerativas. O aumento do estresse oxidativo na DA é atribuído à diminuição dos níveis de glutathiona no cérebro

(SAHARAN; MANDAL, 2014). Curiosamente, o modelo de *D. melanogaster* utilizado aqui, mostrou regulação negativa no gene *gfzf*, exclusiva do grupo de progressão do modelo amiloide, relacionado as vias do processo metabólico da glutatona similares aquelas que ocorrem em humanos. Além disso, outros genes dessa via foram supra-regulados no envelhecimento de *D. melanogaster* modelo para DA.

As proteínas *heat shock* relacionadas a resposta ao calor, também apresentaram alterações no nível de transcrição (reduzido), nesse caso no grupo *AD-like vs controle 0 d.p.e.*, são juntamente com a *TotA*. Essas proteínas atuam na tolerância do organismo ao estresse auxiliando na sobrevivência das moscas, uma vez que moscas com superexpressão desse gene apresentam sobrevivência prolongada e maior resistência. Os autores MAHAPATRA e RAND (2012) comprovaram que moscas com alta expressão de *TotA* apresentam resistência ao mercúrio, o que não ocorre com moscas *knokdown*. Outro gene desse grupo com regulação reduzida foi o *cyp6g1*. Esse gene apresenta um gene ortólogo ao humanos TBXAS1, que em níveis reduzido apresenta ligação a esclerose amiotrófica lateral. O transcrito *Cyp6g1* corrobora com os dados encontrados referente aos transcritos do gene *TotA*, visto que ambos sofreram redução na expressão e estão envolvidos na resposta ao estresse, seja contra inseticidas, calor, choque mecânico dentre outros (MAHAPATRA; BOND; RAND; RAND, 2010).

O gene *cyp6a17A*, um gene da superfamília do citocromo P450, que ao ser silenciado nos corpos de cogumelo, ocasionou em falhas relacionadas as temperaturas de preferência das moscas (KANG; KIM; CHOI, 2011). Em nosso trabalho, esse gene aparece com nível de transcritos reduzido no grupo *AD-like vs controle 0 d.p.e.*, podendo ocasionar em falhas no mecanismo de decisão das moscas quanto a temperatura adequada, para que não morram (KANG; KIM; CHOI, 2011). Também existem estudos ligando seu papel a ação contra inseticidas, relacionado a uma das principais funções de proteínas Cyp: desintoxicação; logo sua depleção pode ocasionar perdas significativas ao organismo com DA (BATTILAY; LEBLANC; GREEN; GARUD et al., 2018; KANG; KIM; CHOI, 2011).

A ativação das vias Toll e Imd promovem a transcrição de genes envolvidos na resposta do sistema imunológico. Aqui, encontramos uma regulação negativa de peptídeos antimicrobianos (*AMP*) em cabeças de moscas *AD-like vs controle 10 d.p.e.* Em contraste, na progressão/envelhecimento do modelo amilóide há regulação positiva das vias Toll e Imd considerando alguns (*dptA, drs, im1, im2, im4, pgrp-sd*). Em *D. melanogaster*, a superexpressão de AMPs no sistema nervoso é relacionada como causa da neurodegeneração (CAO; CHTARBANOVA; PETERSEN; GANETZKY, 2013). Nossos resultados mostram uma

regulação similar tanto no grupo controle, quanto do grupo *AD-like*, não encontrando por meio das análises *in silico* resultados similares aos descritos na literatura.

A proteína Sec61alfa regula o transporte e a inserção de polipeptídeos de secreção e membranas no retículo endoplasmático (LUNDIN; JOHANSSON; JOHNSON; NÄSLUND et al., 2007). Seu transcrito *sec61alfa* apresentou um aumento no grupo de progressão/envelhecimento *AD-like*. Esse processo pode levar a uma transmissão deficiente entre as sinapses, provocando, assim, perda cognitiva e de memória. Além disso, o gene ortólogo em humanos, o *exoc*, já foi associado à DA por metanálise na população do leste asiático (WU; SUN; YAN; CHENG et al., 2017).

O uso do RNAi na validação *in vivo* por meio do silenciamento gênico proporciona o acompanhamento temporal e espacial dos efeitos gerados com eficiência devido o sistema UAS/Gal4 (YAMAMOTO-HINO; GOTO, 2013). Bibliotecas transgênicas *in vivo* estão disponíveis possibilitando expressar o dsRNA de forma dirigida ao local de interesse e avaliar assim o efeito desse silenciamento, tornando esse tipo de validação ainda mais rápida (HEIGWER; PORT; BOUTROS, 2018). Em nosso trabalho, mostramos que nenhum dos 3 genes com silenciamento dirigido aos olhos das moscas em heterozigose levou a danos anatômicos. Essa resposta de certa forma era esperada pelo grupo, uma vez que o modelo utilizado teve uma causa conhecida, a expressão de BACE e APP no cérebro gerando de forma natural os A β ₄₂. Assim os transcritos identificados não foram diretamente os causadores do nosso modelo, mas sim resposta do organismo diante da causa seguindo a hipótese amiloidogênica, tornando a causa conhecida e controlada. No entanto, em homozigose, o gene CG17754 ao ser silenciado gerou alterações anatômicas nos olhos. Recentemente, um estudo sugeriu que as linhagens TRiP apresentam uma mutação no gene *sevenless* (na posição 1107648 A>T), ligada ao X, que desencadeia na perda do fotorreceptor R7 presente nos omatídeos (ESCOBEDO; ZIRIN; WEAKE, 2019). Ao realizar o cruzamento das linhagens utilizamos fêmeas virgens GMR-Gal4 (#BL1104) e machos das linhagens com RNAi, reforçando que os dados encontrados são referentes ao silenciamento do gene CG17754 (homozigose).

Assim, nosso trabalho gerou uma quantidade de dados referentes a expressão gênica do modelo amiloide, em *Drosophila melanogaster*, possibilitando estudos de forma aprofundada nessa direção, bem como a compreensão e descrição detalhada de marcadores até então desconhecidos, relevantes na construção e compreensão da Doença de Alzheimer. Além de trazer a luz, um breve panorama referente a viabilidade do modelo de Demência Frontotemporal, gerando como perspectiva futura do grupo estudos que avaliem e validem de forma aprofundada esse modelo.

6. CONCLUSÃO

Com esse trabalho, confirmamos a eficiência da *D. melanogaster* como modelo biológico para o estudo das duas principais doenças neurodegenerativas: Doença de Alzheimer e Demência Frontotemporal. Tal alternativa foi satisfatória não só na obtenção dos modelos propostos e avaliação motora e de neurodegeneração, mas principalmente na elucidação de uma série de eventos moleculares, a nível transcricional do modelo amilóide. Parte dos genes diferencialmente expressos mapeados possuem ortólogos humanos, dos quais alguns já foram previamente relacionados na literatura com à Doença de Alzheimer ou processos dessa neuropatologia. O silenciamento do gene CG17754 dirigido aos olhos das *Drosophila*s é apenas o início dessa jornada, e nos reforça sobre a confiabilidade e relevância do nosso estudo. Além disso, uma série de genes que ainda não foram relacionados a progressão do Alzheimer foram identificados, dos quais possivelmente muitos são excelentes candidatos para futuros estudos na compreensão dessa patologia. Este importante passo na pesquisa, abre portas para a descoberta de potenciais marcadores e alvos na identificação e compreensão da Doença de Alzheimer, de maneira rápida, reprodutível e confiável.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A. et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- BATTLAY, P.; LEBLANC, P. B.; GREEN, L.; GARUD, N. R. et al. Structural Variants and Selective Sweep Foci Contribute to Insecticide Resistance in the *Drosophila* Genetic Reference Panel. **G3 (Bethesda)**, 8, n. 11, p. 3489-3497, Nov 6 2018. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200619>
- BELFIORI-CARRASCO, L. F.; MARCORA, M. S.; BOCAI, N. I.; CERIANI, M. F. et al. A Novel Genetic Screen Identifies Modifiers of Age-Dependent Amyloid beta Toxicity in the *Drosophila* Brain. **Front Aging Neurosci**, 9, p. 61, 2017. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00061>
- BRENMAN-SUTTNER, D. B.; YOST, R. T.; FRAME, A. K.; ROBINSON, J. W. et al. Social behavior and aging: A fly model. **Genes, Brain and Behavior**, 19, n. 2, p. e12598, 2020. <https://doi.org/10.1111/gbb.12598>
- BURK, K.; PASTERKAMP, R. J. Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta neuropathologica**, 137, n. 6, p. 859-877, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01964-7>
- CAIXETA, L. **Demências do tipo não Alzheimer: Demências focais frontotemporais**. Artmed Editora, 2009. 8536323590.
- CANNON, L.; ZAMBON, A. C.; CAMMARATO, A.; ZHANG, Z. et al. Expression patterns of cardiac aging in *Drosophila*. **Aging Cell**, 16, n. 1, p. 82-92, 01/16 <https://doi.org/10.1111/accel.12559>
- CAO, Y.; CHTARBANOVA, S.; PETERSEN, A. J.; GANETZKY, B. Dnr1 mutations cause neurodegeneration in *Drosophila* by activating the innate immune response in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 19, p. E1752-E1760, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306220110>
- CASTILLO, J. C.; CREASY, T.; KUMARI, P.; SHETTY, A. et al. *Drosophila* anti-nematode and antibacterial immune regulators revealed by RNA-Seq. **BMC Genomics**, 16, n. 1, p. 519, 2015/07/11 2015. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1690-2>
- CHAKRABORTY, R.; VEPURI, V.; MHATRE, S. D.; PADDOCK, B. E. et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model: Pharmacological Rescue of Cognitive Defects. **PLOS ONE**, 6, n. 6, p. e20799, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020799>

CHEN, Z.; ZHONG, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. **Prog Neurobiol**, 108, p. 21-43, Sep 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>

COSTA, M.; MANTON, J. D.; OSTROVSKY, A. D.; PROHASKA, S. et al. NBLAST: Rapid, sensitive comparison of neuronal structure and construction of neuron family databases. **bioRxiv**, p. 006346, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.012>

DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova**, 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

DEAL, S. L.; YAMAMOTO, S. Unraveling Novel Mechanisms of Neurodegeneration Through a Large-Scale Forward Genetic Screen in *Drosophila*. **Frontiers in Genetics**, 9, n. 700, 2019-January-14 2019. Review.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00700>

DEJESUS-HERNANDEZ, M.; MACKENZIE, I. R.; BOEVE, B. F.; BOXER, A. L. et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. **Neuron**, 72, n. 2, p. 245-256, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>

DING, Q.; MARKESBERY, W. R.; CECARINI, V.; KELLER, J. N. Decreased RNA, and Increased RNA Oxidation, in Ribosomes from Early Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research**, 31, n. 5, p. 705-710, 2006/05/01 2006.

<https://doi.org/10.1007/s11064-006-9071-5>

ESCOBEDO, S.; ZIRIN, J.; WEAKE, V. TRiP stocks contain a previously uncharacterized loss-of-function sevenless allele. **MicroPubl Biol**, 2019, Apr 4 2019.

<https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000097>

FALCO, A. D.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. **Química Nova**, 39, p. 63-80, 2016.

FINELLI, A.; KELKAR, A.; SONG, H.-J.; YANG, H. et al. A model for studying Alzheimer's A β 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 26, n. 3, p. 365-375, 2004/07/01/ 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.001>

FISCHER, J. A.; GINIGER, E.; MANIATIS, T.; PTASHNE, M. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. **Nature**, 332, n. 6167, p. 853-856, Apr 28 1988.

<https://doi.org/10.1038/332853a0>

FREIBAUM, B. D.; LU, Y.; LOPEZ-GONZALEZ, R.; KIM, N. C. et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. **Nature**, 525, n. 7567, p. 129-133, 2015.
<https://doi.org/10.1038/nature14974>

GALLUCCI NETO, J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico diferencial das demências. **Archives of Clinical Psychiatry** (São Paulo), 32, p. 119-130, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0101-60832005000300004>

GARGANO, J. W.; MARTIN, I.; BHANDARI, P.; GROTEWIEL, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, 40, n. 5, p. 386-395, 2005/05/01/ 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>

GIRARDOT, F.; LASBLEIZ, C.; MONNIER, V.; TRICOIRE, H. Specific age related signatures in *Drosophila* body parts transcriptome. **BMC Genomics**, 7, p. 69-69, 04/04
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-69>

GONÇALVES, C. A. X. **Ferramentas e métodos para estudo da evolução de processos biológicos e funções moleculares do *Homo sapiens***. Orientador: ORTEGA, J. M. 2016. 106 f. (Mestrado) - Pós-graduação em Bioinformática da UFMG, UFMG.

GOODMAN, L. D.; PRUDENCIO, M.; KRAMER, N. J.; MARTINEZ-RAMIREZ, L. F. et al. Toxic expanded GGGGCC repeat transcription is mediated by the PAF1 complex in C9orf72-associated FTD. **Nature Neuroscience**, 22, n. 6, p. 863-874, 2019/06/01 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0396-1>

GREEVE, I.; KRETZSCHMAR, D.; TSCHAPE, J. A.; BEYN, A. et al. Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. **J Neurosci**, 24, n. 16, p. 3899-3906, Apr 21 2004.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0283-04.2004>

GRIFFIN, J. W.; BRADSHAW, P. C. Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend or Foe? **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 5472792, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/5472792>

GUTIERREZ, B. A. O.; SILVA, H. S. D.; GUIMARÃES, C.; CAMPINO, A. C. Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? **Ciência & Saúde Coletiva**, 19, p. 4479-4486, 2014.
<https://doi.org/10.1590/1413-812320141911.03562013>

HALES, K. G.; KOREY, C. A.; LARRACUENTE, A. M.; ROBERTS, D. M. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. **Genetics**, 201, n. 3, p. 815-842, 11/11 2015.
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>

HEIGWER, F.; PORT, F.; BOUTROS, M. RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. **Genetics**, 208, n. 3, p. 853-874, 2018.

<https://doi.org/10.1534/genetics.117.300077>

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, 5, n. 1, p. 101-108, 2003.

HODGES, J. R.; PIGUET, O. Progress and Challenges in Frontotemporal Dementia Research: A 20-Year Review. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, 62, n. 3, p. 1467-1480, 2018.
<https://doi.org/10.3233/JAD-171087>

HONG, L.; HUANG, H. C.; JIANG, Z. F. Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. **Neurol Res**, 36, n. 3, p. 276-282, Mar 2014.
<https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000288>

HOUOT, B.; BOUSQUET, F.; FERVEUR, J.-F. The consequences of regulation of desat1 expression for pheromone emission and detection in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 185, n. 4, p. 1297-1309, 2010.
<https://doi.org/10.1534/genetics.110.117226>

IJIMA-ANDO, K.; IJIMA, K. Transgenic *Drosophila* models of Alzheimer's disease and tauopathies. **Brain structure & function**, 214, n. 2-3, p. 245-262, 12/05 2010.
<https://doi.org/10.1007/s00429-009-0234-4>

IRION, U. *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. **PLoS one**, 7, n. 3, p. e34248-e34248, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034248>

IYER, S.; SUBRAMANIAN, V.; ACHARYA, K. R. C9orf72, a protein associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a guanine nucleotide exchange factor. **PeerJ**, 6, p. e5815-e5815, 2018.
<https://doi.org/10.7717/peerj.5815>

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International journal of molecular sciences**, 10, n. 2, p. 407-440, 2009.
<https://doi.org/10.3390/ijms10020407>

JENNINGS, B. H. *Drosophila* - a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, 14, n. 5, p. 190-195, 2011/05/01/ 2011.
[https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4)

JEON, Y.; LEE, S.; SHIN, M.; LEE, J. H. et al. Phenotypic differences between *Drosophila* Alzheimer's disease models expressing human A β 42 in the developing eye and brain. **Animal Cells and Systems**, 21, n. 3, p. 160-168, 2017/05/17 2017.
<https://doi.org/10.1080/19768354.2017.1313777>

KANEHISA, M.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; MORISHIMA, K. et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, 47, n. D1, p. D590-D595, 2018.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky962>

KANG, J.; KIM, J.; CHOI, K.-W. Novel Cytochrome P450, cyp6a17, Is Required for Temperature Preference Behavior in *Drosophila*. **PLOS ONE**, 6, n. 12, p. e29800, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029800>

KATSUNO, M.; SAHASHI, K.; IGUCHI, Y.; HASHIZUME, A. Preclinical progression of neurodegenerative diseases. **Nagoya journal of medical science**, 80, n. 3, p. 289-298, 2018.

KAUFMAN, T. C. A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. **Genetics**, 206, n. 2, p. 665-689, 2017.

<https://doi.org/10.1534/genetics.117.199950>

KAYA-COPUR, A.; SCHNORRER, F. RNA Interference Screening for Genes Regulating *Drosophila* Muscle Morphogenesis. **Methods Mol Biol**, 1889, p. 331-348, 2019.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8897-6_20

KEPP, K. P. Ten Challenges of the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 55, n. 2, p. 447-457, 2017.

<https://doi.org/10.3233/JAD-160550>

KIM, J. Y.; RASHEED, A.; YOO, S. J.; KIM, S. Y. et al. Distinct amyloid precursor protein processing machineries of the olfactory system. **Biochem Biophys Res Commun**, 495, n. 1, p. 533-538, Jan 1 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.153>

KOON, A. C.; CHAN, H. Y. E. *Drosophila melanogaster* As a Model Organism to Study RNA Toxicity of Repeat Expansion-Associated Neurodegenerative and Neuromuscular Diseases. **Frontiers in cellular neuroscience**, 11, p. 70-70, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00070>

LAI, J. D.; ICHIDA, J. K. C9ORF72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, 713, p. 134523, 2019/11/20/ 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134523>

LAMBRECHTS, R.; FABER, A.; SIBON, O. Modelling in miniature: Using *Drosophila melanogaster* to study human neurodegeneration. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 25-26, p. 3-10, 2017/12/01/ 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.09.004>

LATTAO, R.; BONACCORSI, S.; GUAN, X.; WASSERMAN, S. A. et al. Tubby-tagged balancers for the *Drosophila* X and second chromosomes. **Fly**, 5, n. 4, p. 369-370, Oct-Dec 2011.

<https://doi.org/10.4161/fly.5.4.17283>

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, 443, n. 7113, p. 787-795, 2006/10/01 2006.

<https://doi.org/10.1038/nature05292>

LIU, M.-N.; LAU, C.-I.; LIN, C.-P. Precision Medicine for Frontotemporal Dementia. **Frontiers in Psychiatry**, 10, n. 75, 2019-February-21 2019. Review.

<https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00075>

LIU, P.-P.; XIE, Y.; MENG, X.-Y.; KANG, J.-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 4, n. 1, p. 29, 2019/08/23 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41392-019-0071-8>

LOVE, S. Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, 76, n. suppl 5, p. v8-v14, 2005.

<https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.080754>

LUEBBERING, N.; CHARLTON-PERKINS, M.; KUMAR, J. P.; ROLLMANN, S. M. et al. Drosophila Dyrk2 Plays a Role in the Development of the Visual System. **PLOS ONE**, 8, n. 10, p. e76775, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076775>

LUNDIN, C.; JOHANSSON, S.; JOHNSON, A. E.; NÄSLUND, J. et al. Stable insertion of Alzheimer A β peptide into the ER membrane strongly correlates with its length. **FEBS Letters**, 581, n. 20, p. 3809-3813, 2007/08/07/ 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.003>

MADABATTULA, S. T.; STRAUTMAN, J. C.; BYSICE, A. M.; O'SULLIVAN, J. A. et al. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 100, p. e52741-e52741, 2015.

<https://doi.org/10.3791/52741>

MADABATTULA, S. T.; STRAUTMAN, J. C.; BYSICE, A. M.; O'SULLIVAN, J. A. et al. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n. 100, p. 52741, 06/13 2015.

<https://doi.org/10.3791/52741>

MAHAPATRA, C. T.; BOND, J.; RAND, D. M.; RAND, M. D. Identification of methylmercury tolerance gene candidates in Drosophila. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, 116, n. 1, p. 225-238, 2010/07// 2010.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq097>

MAHAPATRA, C. T.; RAND, M. D. Methylmercury tolerance is associated with the humoral stress factor gene Turandot A. **Neurotoxicol Teratol**, 34, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.04.007>

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. **Genetics**, 201, n. 2, p. 377-402, Oct 2015.

<https://doi.org/10.1534/genetics.115.179457>

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; EBERT, D.; HUANG, X. et al. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 47, n. D1, p. D419-D426, 2018.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>

MOLONEY, A.; SATTELLE, D. B.; LOMAS, D. A.; CROWTHER, D. C. Alzheimer's disease: insights from Drosophila melanogaster models. **Trends in Biochemical Sciences**, 35, n. 4, p. 228-235, 2010/04/01/ 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.004>

MOREIRA, S.; DUARTE, S.; MOREIRA, I.; SANTOS, E. Variante comportamental da demência frontotemporal: relato de caso. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, 33, p. 155-161, 2017.

<https://doi.org/10.32385/rpmgf.v33i2.12044>

NICCOLI, T.; CABECINHA, M.; TILLMANN, A.; KERR, F. et al. Increased Glucose Transport into Neurons Rescues A β Toxicity in Drosophila. **Curr Biol**, 26, n. 17, p. 2291-2300, Sep 12 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.017>

OMS. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. 2019. Acesso em: 01/07/2019.

ORR, H. T. Toxic RNA as a driver of disease in a common form of ALS and dementia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 19, p. 7533-7534, 2013.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1305239110>

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, 11, n. 12, p. 220-220, 12/22 2010.

<https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-220>

PODTELEZHNIKOV, A. A.; TANIS, K. Q.; NEBOZHYN, M.; RAY, W. J. et al. Molecular insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease and its relationship to normal aging. **PLoS one**, 6, n. 12, p. e29610-e29610, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029610>

PONS, M.; PRIETO, S.; MIGUEL, L.; FREBOURG, T. et al. Identification of TCERG1 as a new genetic modulator of TDP-43 production in Drosophila. **Acta neuropathologica communications**, 6, n. 1, p. 138-138, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s40478-018-0639-5>

PRÜBING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, 8, p. 35-35, 11/22
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35>

QIN, Y.; PAN, J.; CAI, M.; YAO, L. et al. Pattern Genes Suggest Functional Connectivity of Organs. **Scientific reports**, 6, p. 26501, 2016.
<https://doi.org/10.1038/srep26501>

SAHARAN, S.; MANDAL, P. K. The emerging role of glutathione in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, 40, n. 3, p. 519-529, 2014.
<https://doi.org/10.3233/JAD-132483>

SARANTSEVA, S.; TIMOSHENKO, S.; BOLSHAKOVA, O.; KARASEVA, E. et al. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. **PLoS One**, 4, n. 12, p. e8191, Dec 07 2009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008191>

SHELL, B. C.; SCHMITT, R. E.; LEE, K. M.; JOHNSON, J. C. et al. Measurement of solid food intake in Drosophila via consumption-excretion of a dye tracer. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 11536, 2018/08/01 2018.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29813-9>

SILVA, M. D. M. E.; MERCER, P. B. S.; WITT, M. C. Z.; PESSOA, R. R. Olfactory dysfunction in Alzheimer s disease Systematic review and meta-analysis. **Dementia & Neuropsychologia**, 12, p. 123-132, 2018.
<https://doi.org/10.1590/1980-57642018dn12-020004>

SONESON, C.; DELORENZI, M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. **BMC Bioinformatics**, 14, p. 91-91, 03/09
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-91>

TEIXEIRA-JR, A. L.; SALGADO, J. V. Demência fronto-temporal: aspectos clínicos e terapêuticos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, 28, p. 69-76, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0101-81082006000100009>

TEIXEIRA, A.; ARAÚJO, F.; FERREIRA, M.; BARCELOS, L. et al. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life sciences**, 78, n. 14, p. 1637-1645, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.040>

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, 47, n. D1, p. D330-D338, 2018.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>

TSAI, C. W.; MCGRAW, E. A.; AMMAR, E. D.; DIETZGEN, R. G. et al. *Drosophila melanogaster* mounts a unique immune response to the Rhabdovirus sigma virus. **Applied and environmental microbiology**, 74, n. 10, p. 3251-3256, 2008.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02248-07>

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease models & mechanisms**, 9, n. 3, p. 235-244, 2016.

<https://doi.org/10.1242/dmm.023762>

VANDAL, S. E.; ZHENG, X.; AHMAD, S. T. Molecular Genetics of Frontotemporal Dementia Elucidated by *Drosophila* Models-Defects in Endosomal(-)Lysosomal Pathway. **Int J Mol Sci**, 19, n. 6, Jun 9 2018.

<https://doi.org/10.3390/ijms19061714>

WALTERS, R.; MANION, J.; NEELY, G. G. Dissecting Motor Neuron Disease With *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in Neuroscience**, 13, n. 331, 2019-April-12 2019. Review.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00331>

WANG, H.; SAUNDERS, A. J. The role of ubiquitin-proteasome in the metabolism of amyloid precursor protein (APP): implications for novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Discov Med**, 18, n. 97, p. 41-50, Jul-Aug 2014.

WANG, P.; DENG, J.; DONG, J.; LIU, J. et al. TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. **PLoS genetics**, 15, n. 5, p. e1007947-e1007947, 2019.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007947>

WENTZELL, J. S.; BOLKAN, B. J.; CARMINE-SIMMEN, K.; SWANSON, T. L. et al. Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. **Neurobiology of disease**, 46, n. 1, p. 78-87, 01/10 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.047>

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. A novel synbiotic delays Alzheimer's disease onset via combinatorial gut-brain-axis signaling in *Drosophila melanogaster*. **PLOS ONE**, 14, n. 4, p. e0214985, 2019.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214985>

WU, Q.-J.; SUN, S.-Y.; YAN, C.-J.; CHENG, Z.-C. et al. EXOC3L2 rs597668 variant contributes to Alzheimer's disease susceptibility in Asian population. **Oncotarget**, 8, n. 12, p. 20086-20091, 02/16

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15380>

XU, Z.; POIDEVIN, M.; LI, X.; LI, Y. et al. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 19, p. 7778-7783, 2013.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1219643110>

YAMAMOTO-HINO, M.; GOTO, S. In Vivo RNAi-Based Screens: Studies in Model Organisms. **Genes**, 4, n. 4, p. 646-665, 2013.

<https://doi.org/10.3390/genes4040646>

YIN, F.; SANCHETI, H.; PATIL, I.; CADENAS, E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, 100, p. 108-122, Nov 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200>

YOSHIDA, S.; YOSHIDA, K. Multiple functions of DYRK2 in cancer and tissue development. **FEBS Letters**, 593, n. 21, p. 2953-2965, 2019.

<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13601>

YOUNG, J. J.; LAVAKUMAR, M.; TAMPI, D.; BALACHANDRAN, S. et al. Frontotemporal dementia: latest evidence and clinical implications. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, 8, n. 1, p. 33-48, 2018.

<https://doi.org/10.1177/2045125317739818>

YUVA-AYDEMIR, Y.; ALMEIDA, S.; KRISHNAN, G.; GENDRON, T. F. et al. Transcription elongation factor AFF2/FMR2 regulates expression of expanded GGGGCC repeat-containing C9ORF72 allele in ALS/FTD. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 5466, 2019/11/29 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13477-8>

ZHANG, Q.; AN, Y.; CHEN, Z. S.; KOON, A. C. et al. A Peptidyl Inhibitor for Neutralizing (r)(GGGGCC)(exp)-Associated Neurodegeneration in C9ALS-FTD. Molecular therapy. **Nucleic acids**, 16, p. 172-185, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.015>

ZOLEZZI, J. M.; INESTROSA, N. C. Comprehensive Overview of Alzheimer's Disease Neurodegeneration, from Amyloid- β to Neuroinflammatory Modulation. In: **Mechanisms of Neuroinflammation: IntechOpen**, 2017.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.69463>

ANEXOS

Anexo 1 - Lista dos genes diferencialmente expressos identificados no RNA-seq do modelo amilóide.

CT DOWN	CT UP	AD DOWN	AD UP	0d DOWN	0d UP	10d DOWN	10d UP
FBgn0261673	FBgn0004240	FBgn0000409	FBgn0085249	FBgn0037688	FBgn0085246	FBgn0065053	FBgn0002563
FBgn0032587	FBgn0031701	FBgn0036101	FBgn0036203	FBgn0037917	FBgn0051715	FBgn0037606	FBgn0002570
FBgn0031879	FBgn0041579	FBgn0033816	FBgn0038914	FBgn0040942	FBgn0051860	FBgn0033830	FBgn0050360
FBgn0004117	FBgn0044812	FBgn0033802	FBgn0085353	FBgn0038524	FBgn0031559	FBgn0004240	FBgn0003358
FBgn0051189	FBgn0038914	FBgn0259749	FBgn0004045	FBgn0037416	FBgn0261362	FBgn0030678	FBgn0015714
FBgn0036553	FBgn0034407	FBgn0050344	FBgn0034871	FBgn0034045	FBgn0261015	FBgn0029128	FBgn0039342
FBgn0026619	FBgn0010388	FBgn0265998	FBgn0036022	FBgn0032507	FBgn0015714	FBgn0063385	FBgn0003863
FBgn0010217	FBgn0036232	FBgn0034265	FBgn0004047	FBgn0036248	FBgn0029573	FBgn0020277	FBgn0010357
FBgn0036094	FBgn0032505	FBgn0035402	FBgn0030773	FBgn0039312	FBgn0037569	FBgn0042630	FBgn0034295
FBgn0054056	FBgn0036203	FBgn0004915	FBgn0036232	FBgn0039172	FBgn0034511	FBgn0037942	FBgn0039310
FBgn0029155	FBgn0004045	FBgn0038890	FBgn0003863	FBgn0038381	FBgn0000492	FBgn0063378	FBgn0036024
FBgn0050345	FBgn0053926	FBgn0037565	FBgn0032505	FBgn0036022	FBgn0036619	FBgn0031422	FBgn0035665
FBgn0243486	FBgn0085353	FBgn0261794	FBgn0040502	FBgn0015000	FBgn0033761	FBgn0030944	FBgn0039471
FBgn0050440	FBgn0028396	FBgn0016930	FBgn0044812	FBgn0031974	FBgn0034157	FBgn0259878	FBgn0033774
FBgn0032683	FBgn0034871	FBgn0053519	FBgn0033774	FBgn0028396	FBgn0053644	FBgn0082943	FBgn0029639
FBgn0086039	FBgn0039298	FBgn0036665	FBgn0052523	FBgn0003863	FBgn0037255	FBgn0266405	FBgn0033297
FBgn0033075	FBgn0030773	FBgn0051100	FBgn0028396	FBgn0035867	FBgn0034439	FBgn0034137	FBgn0085249
FBgn0033188	FBgn0043578	FBgn0000567	FBgn0039342	FBgn0038716	FBgn0030787	FBgn0038530	FBgn0051205
FBgn0039897	FBgn0014865	FBgn0033872	FBgn0040060	FBgn0039764	FBgn0036062	FBgn0033110	FBgn0000078
FBgn0026315	FBgn0004047	FBgn0037301	FBgn0002570	FBgn0085249	FBgn0259716	FBgn0053635	FBgn0034662
FBgn0036715	FBgn0053307	FBgn0038679	FBgn0010357	FBgn0037714	FBgn0085771	FBgn0266671	FBgn0002565
FBgn0032685	FBgn0040502	FBgn0039130	FBgn0004240	FBgn0002593	FBgn0036300	FBgn0262794	FBgn0036833
FBgn0264695	FBgn0087002	FBgn0038294	FBgn0027584	FBgn0034033	FBgn0085813	FBgn0010388	FBgn0034663
FBgn0023214	FBgn0036262	FBgn0038017	FBgn0050360	FBgn0037017	FBgn0030018	FBgn0260002	FBgn0085195
FBgn0042174	FBgn0012042	FBgn0004569	FBgn0031305	FBgn0054040	FBgn0034407	FBgn0031701	FBgn0051104
FBgn0032143	FBgn0085249	FBgn0262679	FBgn0263748	FBgn0033926	FBgn0031061		FBgn0050467
FBgn0032727	FBgn0033366	FBgn0050345	FBgn0000078	FBgn0034330			FBgn0010222
FBgn0038720	FBgn0005391	FBgn0033188	FBgn0261575	FBgn0033925			FBgn0028853
FBgn0033639	FBgn0041581	FBgn0264462	FBgn0041579	FBgn0031109			FBgn0031633
FBgn0036585	FBgn0038074	FBgn0051715	FBgn0039703	FBgn0032049			FBgn0039487
FBgn0036893	FBgn0033820	FBgn0036107	FBgn0053926	FBgn0051198			FBgn0034664
FBgn0030617	FBgn0027584	FBgn0033268	FBgn0003358	FBgn0034247			FBgn0263748
FBgn0013348	FBgn0010403	FBgn0020907	FBgn0039678	FBgn0013276			FBgn0051219
FBgn0037565	FBgn0032285	FBgn0039078	FBgn0034295	FBgn0025454			FBgn0034580
FBgn0003149	FBgn0266455	FBgn0029659	FBgn0034247	FBgn0039310			FBgn0032049
FBgn0003292	FBgn0261362	FBgn0001098	FBgn0032472	FBgn0031305			FBgn0037684
FBgn0038983	FBgn0032638	FBgn0052091	FBgn0086687	FBgn0033733			FBgn0037563
FBgn0016762	FBgn0035434	FBgn0036191	FBgn0087002	FBgn0035453			FBgn0034229
FBgn0028622	FBgn0029167	FBgn0038079	FBgn0003965	FBgn0263471			FBgn0010241
FBgn0058469	FBgn0010381	FBgn0033951	FBgn0035434	FBgn0001230			FBgn0038631
FBgn0001230	FBgn0030944	FBgn0035695	FBgn0034407	FBgn0051233			FBgn0250815
FBgn0052816	FBgn0034638	FBgn0037092	FBgn0036024	FBgn0035665			FBgn0039678
FBgn0030348	FBgn0029810	FBgn0031195	FBgn0005391	FBgn0010357			FBgn0039670
FBgn0031959	FBgn0003965	FBgn0035143	FBgn0036835	FBgn0263467			FBgn0030929

FBgn0266811	FBgn0036022	FBgn0038959	FBgn0040503	FBgn0050360	FBgn0039685
FBgn0260008	FBgn0034717	FBgn0027790	FBgn0028519	FBgn0039342	FBgn0034871
FBgn0039312	FBgn0053120	FBgn0051719	FBgn0029990	FBgn0001225	FBgn0039754
FBgn0026371	FBgn0029990	FBgn0038285	FBgn0039471	FBgn0034295	FBgn0036995
FBgn0002789	FBgn0036015	FBgn0004783	FBgn0034717	FBgn0002570	FBgn0033581
FBgn0085408	FBgn0039703	FBgn0262538	FBgn0034290	FBgn0033297	FBgn0034247
FBgn0001075	FBgn0051664	FBgn0000527	FBgn0035665		FBgn0085353
FBgn0039709	FBgn0003137	FBgn0023540	FBgn0014865		FBgn0039085
FBgn0028685	FBgn0034276	FBgn0061469	FBgn0033593		FBgn0038257
FBgn0002733	FBgn0052523	FBgn0250843	FBgn0041581		FBgn0052191
FBgn0261564	FBgn0038834	FBgn0033438	FBgn0053307		FBgn0263321
FBgn0038679	FBgn0051075	FBgn0039644	FBgn0036995		FBgn0034296
FBgn0000409	FBgn0033067	FBgn0035159	FBgn0036833		FBgn0033788
FBgn0035980	FBgn0034290	FBgn0263400	FBgn0036262		FBgn0261575
FBgn0053199	FBgn0040503	FBgn0034439	FBgn0039310		FBgn0032726
FBgn0011710	FBgn0262563	FBgn0040534	FBgn0036831		FBgn0023094
FBgn0029820	FBgn0032472	FBgn0040358	FBgn0004552		FBgn0025335
FBgn0266356	FBgn0034475	FBgn0000299	FBgn0029507		FBgn0043471
FBgn0014135	FBgn0030966	FBgn0038686	FBgn0036015		FBgn0036486
FBgn0000527	FBgn0039203	FBgn0032683	FBgn0002563		FBgn0036667
FBgn0039167	FBgn0030895	FBgn0003997	FBgn0043578		FBgn0039316
FBgn0040601	FBgn0020385	FBgn0051781	FBgn0037563		FBgn0028648
FBgn0035427	FBgn0035806	FBgn0026380	FBgn0032285		FBgn0031682
FBgn0039483	FBgn0038398	FBgn0039774	FBgn0022355		FBgn0054040
FBgn0038341	FBgn0050083	FBgn0035539	FBgn0030040		FBgn0033075
FBgn0267428	FBgn0000500	FBgn0033760	FBgn0262563		FBgn0040060
FBgn0033734	FBgn0013763	FBgn0065053	FBgn0039073		FBgn0003996
FBgn0026404	FBgn0031925	FBgn0036150	FBgn0011281		FBgn0052027
FBgn0004782	FBgn0086687	FBgn0038799	FBgn0034638		FBgn0033337
FBgn0030326	FBgn0037396	FBgn0032684	FBgn0035348		FBgn0033968
FBgn0263006	FBgn0002626	FBgn0036597	FBgn0086670		FBgn0039656
FBgn0035631	FBgn0025643	FBgn0037913	FBgn0033067		FBgn0038079
FBgn0032193	FBgn0004429	FBgn0030617	FBgn0033366		FBgn0040323
FBgn0053978	FBgn0015288	FBgn0004169	FBgn0033297		FBgn0027584
FBgn0266666	FBgn0011281	FBgn0042174	FBgn0010222		FBgn0040321
FBgn0031692	FBgn0261524	FBgn0001321	FBgn0030616		FBgn0026315
FBgn0034443	FBgn0013949	FBgn0037895	FBgn0029762		
FBgn0029639	FBgn0036835	FBgn0011693	FBgn0039031		
FBgn0033474	FBgn0002940	FBgn0015282	FBgn0034580		
FBgn0035528	FBgn0259716	FBgn0028622	FBgn0010388		
FBgn0262029	FBgn0034511	FBgn0032250	FBgn0266455		
FBgn0035028	FBgn0000120	FBgn0034876	FBgn0010403		
FBgn0035049	FBgn0027348	FBgn0261396	FBgn0037396		
FBgn0038752	FBgn0015919	FBgn0262687	FBgn0033820		
FBgn0027932	FBgn0031176	FBgn0036417	FBgn0034662		
FBgn0036136	FBgn0261989	FBgn0038369	FBgn0053109		
FBgn0265998	FBgn0259682	FBgn0022770	FBgn0085195		
FBgn0032495	FBgn0019936	FBgn0034660	FBgn0029167		
FBgn0085246	FBgn0039040	FBgn0001083	FBgn0030929		
FBgn0025335	FBgn0085241	FBgn0033358	FBgn0261602		

FBgn0039482	FBgn0038948	FBgn0001977	FBgn0034328
FBgn0027569	FBgn0000592	FBgn0262178	FBgn0040398
FBgn0023001	FBgn0015010	FBgn0050440	FBgn0023507
FBgn0036368	FBgn0040733	FBgn0027932	FBgn0038930
FBgn0086558	FBgn0039800	FBgn0000097	FBgn0040732
FBgn0028686	FBgn0033830	FBgn0260743	FBgn0067905
FBgn0034660	FBgn0031800	FBgn0004066	FBgn0051075
FBgn0036742	FBgn0011296	FBgn0036196	FBgn0031109
FBgn0004514	FBgn0044810	FBgn0035968	FBgn0013763
FBgn0035968	FBgn0265298	FBgn0033639	FBgn0040734
FBgn0054040	FBgn0266405	FBgn0030394	FBgn0034229
FBgn0037683	FBgn0029897	FBgn0035631	FBgn0014031
FBgn0020370	FBgn0040060	FBgn0040496	FBgn0028543
FBgn0020372	FBgn0036862	FBgn0259878	FBgn0029766
FBgn0263471	FBgn0082943	FBgn0267495	FBgn0032773
FBgn0086134	FBgn0036831	FBgn0086067	FBgn0040582
FBgn0032684	FBgn0038343	FBgn0036601	FBgn0032382
FBgn0034030	FBgn0039678	FBgn0002939	FBgn0016726
FBgn0051363	FBgn0024509	FBgn0036839	FBgn0259229
FBgn0032214	FBgn0027550	FBgn0040601	FBgn0036766
FBgn0033268	FBgn0034761	FBgn0030183	FBgn0039040
FBgn0036880	FBgn0010412	FBgn0000658	FBgn0038865
FBgn0000299	FBgn0259715	FBgn0026404	FBgn0028983
FBgn0031630	FBgn0261402	FBgn0266356	FBgn0029831
FBgn0005626	FBgn0261602	FBgn0062978	FBgn0035806
FBgn0003011	FBgn0000078	FBgn0030435	FBgn0020416
FBgn0001321	FBgn0040398	FBgn0037580	FBgn0034663
FBgn0026380	FBgn0004867	FBgn0028688	FBgn0032322
FBgn0019972	FBgn0262794	FBgn0028693	FBgn0031489
FBgn0032216	FBgn0014024	FBgn0051997	FBgn0004429
FBgn0010590	FBgn0000406	FBgn0015035	FBgn0010381
FBgn0021856	FBgn0004552	FBgn0046875	FBgn0033926
FBgn0250843	FBgn0035969	FBgn0038819	FBgn0038074
FBgn0031327	FBgn0014033	FBgn0051105	FBgn0001149
FBgn0039342	FBgn0011272	FBgn0036985	FBgn0039800
FBgn0000564	FBgn0038530	FBgn0020372	FBgn0039670
FBgn0033402	FBgn0031389	FBgn0003089	FBgn0010412
FBgn0034471	FBgn0037351	FBgn0038720	FBgn0039487
FBgn0023549	FBgn0039801	FBgn0031535	FBgn0037328
FBgn0051100	FBgn0051548	FBgn0038761	FBgn0250815
FBgn0037538	FBgn0028543	FBgn0250732	FBgn0025583
FBgn0029948	FBgn0031811	FBgn0028684	FBgn0037146
FBgn0032049	FBgn0262366	FBgn0036590	FBgn0010246
FBgn0040074	FBgn0063496	FBgn0005626	FBgn0050083
FBgn0261714	FBgn0029762	FBgn0053126	FBgn0029176
FBgn0029002	FBgn0053109	FBgn0032493	FBgn0065099
FBgn0030329	FBgn0037255	FBgn0031313	FBgn0034276
FBgn0086711	FBgn0086450	FBgn0035103	FBgn0036713
FBgn0039008	FBgn0032136	FBgn0020369	FBgn0002940
FBgn0263660	FBgn0034186	FBgn0028686	FBgn0013307

FBgn0039027	FBgn0037146	FBgn0029134	FBgn0035393
FBgn0030593	FBgn0030878	FBgn0028695	FBgn0027611
FBgn0036665	FBgn0031801	FBgn0261111	FBgn0038756
FBgn0033564	FBgn0031693	FBgn0032405	FBgn0052726
FBgn0000567	FBgn0034743	FBgn0033886	FBgn0085241
FBgn0051198	FBgn0036876	FBgn0015240	FBgn0032726
FBgn0035199	FBgn0050466	FBgn0250871	FBgn0016687
FBgn0039807	FBgn0023507	FBgn0028692	FBgn0003460
FBgn0032405	FBgn0036301	FBgn0051357	FBgn0030041
FBgn0086079	FBgn0053635	FBgn0034030	FBgn0034475
FBgn0026319	FBgn0014031	FBgn0004028	FBgn0032775
FBgn0020908	FBgn0020416	FBgn0051189	FBgn0033101
FBgn0039310	FBgn0039359	FBgn0004117	FBgn0039094
FBgn0004569	FBgn0029507	FBgn0035173	FBgn0020385
FBgn0034709	FBgn0028526	FBgn0259740	FBgn0033170
FBgn0250862	FBgn0085244	FBgn0032192	FBgn0004404
FBgn0002931	FBgn0000376	FBgn0020370	FBgn0051104
FBgn0028687	FBgn0016122	FBgn0036094	FBgn0028853
FBgn0037913	FBgn0005593	FBgn0000046	FBgn0035076
FBgn0035103	FBgn0015527	FBgn0036603	FBgn0038088
FBgn0003089	FBgn0032322	FBgn0028690	FBgn0034200
FBgn0005612	FBgn0037248	FBgn0041711	FBgn0039241
FBgn0035665	FBgn0039215	FBgn0039915	FBgn0031560
FBgn0038959	FBgn0020415	FBgn0002787	FBgn0036046
FBgn0002563	FBgn0052726	FBgn0039896	FBgn0262782
FBgn0052091	FBgn0029176	FBgn0005612	FBgn0033788
FBgn0261396	FBgn0000287	FBgn0031629	FBgn0014455
FBgn0035767	FBgn0001994	FBgn0031692	FBgn0004867
FBgn0029837	FBgn0033367	FBgn0040343	FBgn0011674
FBgn0000658	FBgn0035076	FBgn0042627	FBgn0031428
FBgn0015035	FBgn0015522	FBgn0000497	FBgn0261606
FBgn0033733	FBgn0031422	FBgn0032727	FBgn0263241
FBgn0038632	FBgn0085813	FBgn0260006	FBgn0026415
FBgn0036846	FBgn0033912	FBgn0034497	FBgn0038257
FBgn0040972	FBgn0029765	FBgn0031695	FBgn0034664
FBgn0035555		FBgn0039788	FBgn0036198
FBgn0039686		FBgn0264562	FBgn0026576
FBgn0263467		FBgn0263132	FBgn0086357
FBgn0033817		FBgn0000044	FBgn0037973
FBgn0001225		FBgn0260942	FBgn0040653
FBgn0036196		FBgn0053978	FBgn0064237
FBgn0028694		FBgn0261714	FBgn0053493
FBgn0027341		FBgn0030593	FBgn0262881
FBgn0261243		FBgn0022709	FBgn0032049
FBgn0033760		FBgn0086711	FBgn0262481
FBgn0085483		FBgn0266666	FBgn0262656
FBgn0028468		FBgn0039131	FBgn0038524
FBgn0039896		FBgn0031161	FBgn0034728
FBgn0034542		FBgn0034624	FBgn0029897
FBgn0050344		FBgn0029002	FBgn0038924

FBgn0250871
FBgn0035539
FBgn0031695
FBgn0040699
FBgn0000046
FBgn0036985
FBgn0035379
FBgn0010423
FBgn0028690
FBgn0039078
FBgn0033520
FBgn0037895
FBgn0028689
FBgn0003162
FBgn0051028
FBgn0039131
FBgn0032192
FBgn0039719
FBgn0039360
FBgn0000542
FBgn0034075
FBgn0036463
FBgn0034724
FBgn0031926
FBgn0000044
FBgn0032467
FBgn0028684
FBgn0051973
FBgn0030955
FBgn0034903
FBgn0029573
FBgn0030562
FBgn0016697
FBgn0051233
FBgn0038879
FBgn0032803
FBgn0028695
FBgn0002787
FBgn0035544
FBgn0035510
FBgn0004066
FBgn0040832
FBgn0047095
FBgn0034295
FBgn0042094
FBgn0032433
FBgn0040496
FBgn0040383
FBgn0031542
FBgn0038079

FBgn0033728
FBgn0035555
FBgn0261243
FBgn0037538
FBgn0032445
FBgn0027341
FBgn0000542
FBgn0039297
FBgn0261269
FBgn0031464
FBgn0039483
FBgn0011327
FBgn0002564
FBgn0051028
FBgn0003162
FBgn0032467
FBgn0034460
FBgn0004782
FBgn0033869
FBgn0038511
FBgn0010288
FBgn0031700
FBgn0002772
FBgn0003149
FBgn0040359
FBgn0027586
FBgn0034542
FBgn0031926
FBgn0016697
FBgn0028689
FBgn0037487
FBgn0032707
FBgn0000564
FBgn0029948
FBgn0033761
FBgn0259247
FBgn0003141
FBgn0038632
FBgn0039027
FBgn0031097
FBgn0038652
FBgn0001075
FBgn0015283
FBgn0035510
FBgn0047095
FBgn0039804
FBgn0030763
FBgn0033668
FBgn0037933
FBgn0032495

FBgn0010241
FBgn0039564
FBgn0044810
FBgn0261402
FBgn0051956
FBgn0029785
FBgn0032864
FBgn0033465
FBgn0028648
FBgn0000406
FBgn0037684
FBgn0259715
FBgn0015522
FBgn0003279
FBgn0019936
FBgn0050026
FBgn0050418
FBgn0012042
FBgn0031051
FBgn0263083
FBgn0011509
FBgn0030607
FBgn0001208
FBgn0015010
FBgn0030261
FBgn0032295
FBgn0032741
FBgn0031176
FBgn0029942
FBgn0022985
FBgn0034968
FBgn0039801
FBgn0013773
FBgn0030151
FBgn0028490
FBgn0025643
FBgn0005593
FBgn0034329
FBgn0034140
FBgn0027348
FBgn0041182
FBgn0014857
FBgn0029868
FBgn0037935
FBgn0038056
FBgn0035090
FBgn0051472
FBgn0013949
FBgn0038834
FBgn0035842

FBgn0085201
FBgn0028688
FBgn0031939
FBgn0010288
FBgn0027790
FBgn0037487
FBgn0011327
FBgn0260006
FBgn0040359
FBgn0000497
FBgn0035546
FBgn0041711
FBgn0030763
FBgn0039161
FBgn0038820
FBgn0262717
FBgn0038629
FBgn0033667
FBgn0033869
FBgn0039788
FBgn0263132
FBgn0031629
FBgn0085356
FBgn0035144
FBgn0030394
FBgn0020369
FBgn0003141
FBgn0002772
FBgn0040942
FBgn0015283
FBgn0031161
FBgn0026077
FBgn0028691
FBgn0039728
FBgn0261269
FBgn0034460
FBgn0039297
FBgn0033443
FBgn0024897
FBgn0050360
FBgn0002564
FBgn0038819
FBgn0038652
FBgn0035612
FBgn0265356
FBgn0027600
FBgn0033730
FBgn0038511
FBgn0022770
FBgn0032596

FBgn0042201
FBgn0036585
FBgn0030562
FBgn0032216
FBgn0035144
FBgn0030955
FBgn0010423
FBgn0035544
FBgn0034075
FBgn0033667
FBgn0028694
FBgn0039728
FBgn0025456
FBgn0034903
FBgn0086348
FBgn0039686
FBgn0034974
FBgn0051973
FBgn0033730
FBgn0082582
FBgn0038130
FBgn0085356
FBgn0024897
FBgn0033443
FBgn0027600
FBgn0038629
FBgn0028691
FBgn0036600
FBgn0035546
FBgn0002773
FBgn0030114
FBgn0265356
FBgn0035612
FBgn0031542
FBgn0035280
FBgn0002440
FBgn0038405
FBgn0052499
FBgn0026077
FBgn0014454
FBgn0036589
FBgn0035425
FBgn0040794
FBgn0035844
FBgn0058198
FBgn0031251
FBgn0032803
FBgn0035398
FBgn0028938
FBgn0038879

FBgn0034512
FBgn0003517
FBgn0039827
FBgn0032075
FBgn0030575
FBgn0000592
FBgn0033453
FBgn0040349
FBgn0036237
FBgn0034440
FBgn0031538
FBgn0011296
FBgn0050052
FBgn0031675
FBgn0041712
FBgn0039628
FBgn0030425
FBgn0050467
FBgn0020618
FBgn0034296
FBgn0035793
FBgn0266369
FBgn0039085
FBgn0085359
FBgn0041194
FBgn0039152
FBgn0000079
FBgn0031689
FBgn0039685
FBgn0038466
FBgn0041180
FBgn0035392
FBgn0039406
FBgn0002565
FBgn0039022
FBgn0028509
FBgn0014026
FBgn0005533
FBgn0000053
FBgn0039298
FBgn0029823
FBgn0034138
FBgn0036044
FBgn0000150
FBgn0031561
FBgn0264776
FBgn0010078
FBgn0019940
FBgn0036806
FBgn0086451

FBgn0086348
FBgn0002440
FBgn0025456
FBgn0002773
FBgn0035844
FBgn0038130
FBgn0052499
FBgn0025835
FBgn0034391
FBgn0035280
FBgn0033297
FBgn0036600
FBgn0035425
FBgn0031097
FBgn0037933
FBgn0038405
FBgn0030114
FBgn0031251
FBgn0082582
FBgn0002570
FBgn0259247
FBgn0036589
FBgn0034974
FBgn0014454
FBgn0028938
FBgn0261341
FBgn0040794
FBgn0034253
FBgn0024989
FBgn0000092
FBgn0035398
FBgn0039481
FBgn0035022
FBgn0038180
FBgn0039480
FBgn0038126
FBgn0042201
FBgn0001311
FBgn0004577
FBgn0030829
FBgn0058198
FBgn0036881
FBgn0005664
FBgn0032538
FBgn0260653
FBgn0035281
FBgn0030830
FBgn0031940
FBgn0035553
FBgn0033308

FBgn0029573
FBgn0034391
FBgn0025835
FBgn0085246
FBgn0034253
FBgn0261341
FBgn0035022
FBgn0260653
FBgn0001311
FBgn0024989
FBgn0005664
FBgn0000092
FBgn0030829
FBgn0038126
FBgn0035281
FBgn0039480
FBgn0038180
FBgn0036881
FBgn0032538
FBgn0004577
FBgn0031942
FBgn0039805
FBgn0035553
FBgn0028544
FBgn0039481
FBgn0033308
FBgn0031940
FBgn0030357
FBgn0040637
FBgn0030830

FBgn0039857
FBgn0033696
FBgn0010395
FBgn0031432
FBgn0011701
FBgn0030237
FBgn0024293
FBgn0034191
FBgn0039765
FBgn0043471
FBgn0011272
FBgn0038398
FBgn0261593
FBgn0033936
FBgn0085244
FBgn0259918
FBgn0029810
FBgn0036157
FBgn0028988
FBgn0003137
FBgn0003687
FBgn0040733
FBgn0259818
FBgn0039789
FBgn0037686
FBgn0038877
FBgn0265048
FBgn0000052
FBgn0031459
FBgn0038897
FBgn0015288
FBgn0000500
FBgn0025595
FBgn0020513
FBgn0032846
FBgn0011284
FBgn0027590
FBgn0039024
FBgn0039114
FBgn0010516
FBgn0051548
FBgn0034331
FBgn0264494
FBgn0039529
FBgn0002622
FBgn0029689
FBgn0029768
FBgn0261592
FBgn0050046
FBgn0027571

FBgn0028544
FBgn0039805
FBgn0040637
FBgn0030357
FBgn0031942

FBgn0036030
FBgn0037351
FBgn0034398
FBgn0086472
FBgn0014469
FBgn0038795
FBgn0038020
FBgn0040606
FBgn0017457
FBgn0261532
FBgn0032422

Anexo 1 - Lista dos genes diferencialmente expressos identificados no RNA-seq do modelo amilóide.

Exclusivos			
CT DOWN	CT UP	AD DOWN	AD UP
FBgn0261673	FBgn0031701	FBgn0036101	FBgn0003863
FBgn0032587	FBgn0261362	FBgn0033816	FBgn0033774
FBgn0031879	FBgn0032638	FBgn0033802	FBgn0039342
FBgn0036553	FBgn0030944	FBgn0259749	FBgn0002570
FBgn0026619	FBgn0053120	FBgn0034265	FBgn0010357
FBgn0010217	FBgn0051664	FBgn0035402	FBgn0050360
FBgn0054056	FBgn0030966	FBgn0004915	FBgn0031305
FBgn0029155	FBgn0039203	FBgn0038890	FBgn0263748
FBgn0243486	FBgn0030895	FBgn0261794	FBgn0261575
FBgn0086039	FBgn0031925	FBgn0016930	FBgn0003358
FBgn0033075	FBgn0002626	FBgn0053519	FBgn0034295
FBgn0039897	FBgn0261524	FBgn0033872	FBgn0034247
FBgn0026315	FBgn0259716	FBgn0037301	FBgn0036024
FBgn0036715	FBgn0034511	FBgn0039130	FBgn0028519
FBgn0032685	FBgn0000120	FBgn0038294	FBgn0039471
FBgn0264695	FBgn0015919	FBgn0038017	FBgn0035665
FBgn0023214	FBgn0261989	FBgn0262679	FBgn0033593
FBgn0032143	FBgn0259682	FBgn0264462	FBgn0036995
FBgn0036893	FBgn0038948	FBgn0051715	FBgn0036833
FBgn0013348	FBgn0033830	FBgn0036107	FBgn0039310
FBgn0003292	FBgn0031800	FBgn0020907	FBgn0002563
FBgn0038983	FBgn0265298	FBgn0029659	FBgn0037563
FBgn0016762	FBgn0266405	FBgn0001098	FBgn0022355
FBgn0058469	FBgn0036862	FBgn0036191	FBgn0030040
FBgn0001230	FBgn0082943	FBgn0033951	FBgn0039073
FBgn0052816	FBgn0038343	FBgn0035695	FBgn0035348
FBgn0030348	FBgn0024509	FBgn0037092	FBgn0086670
FBgn0031959	FBgn0027550	FBgn0031195	FBgn0033297
FBgn0266811	FBgn0034761	FBgn0035143	FBgn0010222
FBgn0260008	FBgn0262794	FBgn0051719	FBgn0030616
FBgn0039312	FBgn0014024	FBgn0038285	FBgn0039031
FBgn0026371	FBgn0035969	FBgn0004783	FBgn0034580
FBgn0002789	FBgn0014033	FBgn0262538	FBgn0034662
FBgn0085408	FBgn0038530	FBgn0023540	FBgn0085195
FBgn0039709	FBgn0031389	FBgn0061469	FBgn0030929
FBgn0028685	FBgn0031811	FBgn0033438	FBgn0034328
FBgn0002733	FBgn0262366	FBgn0039644	FBgn0038930
FBgn0261564	FBgn0063496	FBgn0035159	FBgn0040732
FBgn0035980	FBgn0037255	FBgn0263400	FBgn0067905
FBgn0053199	FBgn0086450	FBgn0034439	FBgn0031109
FBgn0011710	FBgn0032136	FBgn0040534	FBgn0040734
FBgn0029820	FBgn0034186	FBgn0040358	FBgn0034229
FBgn0014135	FBgn0030878	FBgn0038686	FBgn0029766

FBgn0039167	FBgn0031801	FBgn0003997	FBgn0032773
FBgn0035427	FBgn0031693	FBgn0051781	FBgn0040582
FBgn0038341	FBgn0034743	FBgn0039774	FBgn0032382
FBgn0267428	FBgn0036876	FBgn0065053	FBgn0016726
FBgn0033734	FBgn0050466	FBgn0036150	FBgn0259229
FBgn0030326	FBgn0036301	FBgn0038799	FBgn0036766
FBgn0263006	FBgn0053635	FBgn0036597	FBgn0038865
FBgn0032193	FBgn0039359	FBgn0004169	FBgn0028983
FBgn0034443	FBgn0028526	FBgn0011693	FBgn0029831
FBgn0029639	FBgn0000376	FBgn0015282	FBgn0034663
FBgn0033474	FBgn0016122	FBgn0032250	FBgn0031489
FBgn0035528	FBgn0015527	FBgn0034876	FBgn0033926
FBgn0262029	FBgn0037248	FBgn0262687	FBgn0001149
FBgn0035028	FBgn0039215	FBgn0036417	FBgn0039670
FBgn0035049	FBgn0020415	FBgn0038369	FBgn0039487
FBgn0038752	FBgn0000287	FBgn0001083	FBgn0037328
FBgn0036136	FBgn0001994	FBgn0033358	FBgn0250815
FBgn0025335	FBgn0033367	FBgn0001977	FBgn0025583
FBgn0039482	FBgn0031422	FBgn0262178	FBgn0010246
FBgn0027569	FBgn0085813	FBgn0000097	FBgn0065099
FBgn0023001	FBgn0033912	FBgn0260743	FBgn0036713
FBgn0036368	FBgn0029765	FBgn0259878	FBgn0013307
FBgn0086558		FBgn0267495	FBgn0035393
FBgn0036742		FBgn0086067	FBgn0027611
FBgn0004514		FBgn0036601	FBgn0038756
FBgn0054040		FBgn0002939	FBgn0032726
FBgn0037683		FBgn0036839	FBgn0016687
FBgn0263471		FBgn0030183	FBgn0003460
FBgn0086134		FBgn0062978	FBgn0030041
FBgn0051363		FBgn0030435	FBgn0032775
FBgn0032214		FBgn0037580	FBgn0033101
FBgn0036880		FBgn0028693	FBgn0039094
FBgn0031630		FBgn0051997	FBgn0033170
FBgn0003011		FBgn0046875	FBgn0004404
FBgn0019972		FBgn0051105	FBgn0051104
FBgn0010590		FBgn0031535	FBgn0028853
FBgn0021856		FBgn0038761	FBgn0038088
FBgn0031327		FBgn0250732	FBgn0034200
FBgn0039342		FBgn0036590	FBgn0039241
FBgn0033402		FBgn0053126	FBgn0031560
FBgn0034471		FBgn0032493	FBgn0036046
FBgn0023549		FBgn0031313	FBgn0262782
FBgn0032049		FBgn0029134	FBgn0033788
FBgn0040074		FBgn0261111	FBgn0014455
FBgn0030329		FBgn0033886	FBgn0011674
FBgn0039008		FBgn0015240	FBgn0031428
FBgn0263660		FBgn0028692	FBgn0261606
FBgn0033564		FBgn0051357	FBgn0263241
FBgn0051198		FBgn0004028	FBgn0026415
FBgn0035199		FBgn0035173	FBgn0038257

FBgn0039807
FBgn0086079
FBgn0026319
FBgn0020908
FBgn0039310
FBgn0034709
FBgn0250862
FBgn0002931
FBgn0028687
FBgn0035665
FBgn0002563
FBgn0035767
FBgn0029837
FBgn0033733
FBgn0036846
FBgn0040972
FBgn0263467
FBgn0033817
FBgn0001225
FBgn0085483
FBgn0028468
FBgn0040699
FBgn0035379
FBgn0033520
FBgn0039719
FBgn0039360
FBgn0036463
FBgn0034724
FBgn0051233
FBgn0040832
FBgn0034295
FBgn0042094
FBgn0032433
FBgn0040383
FBgn0085201
FBgn0031939
FBgn0039161
FBgn0038820
FBgn0262717
FBgn0040942
FBgn0050360
FBgn0032596
FBgn0033297
FBgn0002570

FBgn0259740
FBgn0036603
FBgn0039915
FBgn0040343
FBgn0042627
FBgn0034497
FBgn0264562
FBgn0260942
FBgn0022709
FBgn0034624
FBgn0033728
FBgn0032445
FBgn0031464
FBgn0031700
FBgn0027586
FBgn0032707
FBgn0033761
FBgn0039804
FBgn0033668
FBgn0034664
FBgn0036198
FBgn0026576
FBgn0086357
FBgn0037973
FBgn0040653
FBgn0064237
FBgn0053493
FBgn0262881
FBgn0032049
FBgn0262481
FBgn0262656
FBgn0038524
FBgn0034728
FBgn0038924
FBgn0010241
FBgn0039564
FBgn0051956
FBgn0029785
FBgn0032864
FBgn0033465
FBgn0028648
FBgn0037684
FBgn0003279
FBgn0050026
FBgn0050418
FBgn0031051
FBgn0263083
FBgn0011509
FBgn0030607
FBgn0001208
FBgn0030261
FBgn0032295
FBgn0032741
FBgn0029942
FBgn0022985
FBgn0034968
FBgn0013773
FBgn0030151
FBgn0028490
FBgn0034329
FBgn0034140
FBgn0041182
FBgn0014857
FBgn0029868
FBgn0037935
FBgn0038056
FBgn0035090
FBgn0051472
FBgn0035842

FBgn0034512
FBgn0003517
FBgn0039827
FBgn0032075
FBgn0030575
FBgn0033453
FBgn0040349
FBgn0036237
FBgn0034440
FBgn0031538
FBgn0050052
FBgn0031675
FBgn0041712
FBgn0039628
FBgn0030425
FBgn0050467
FBgn0020618
FBgn0034296
FBgn0035793
FBgn0266369
FBgn0039085
FBgn0085359
FBgn0041194
FBgn0039152
FBgn0000079
FBgn0031689
FBgn0039685
FBgn0038466
FBgn0041180
FBgn0035392
FBgn0039406
FBgn0002565
FBgn0039022
FBgn0028509
FBgn0014026
FBgn0005533
FBgn0000053
FBgn0029823
FBgn0034138
FBgn0036044
FBgn0000150
FBgn0031561
FBgn0264776
FBgn0010078
FBgn0019940
FBgn0036806
FBgn0086451
FBgn0039857
FBgn0033696
FBgn0010395

FBgn0031432
FBgn0011701
FBgn0030237
FBgn0024293
FBgn0034191
FBgn0039765
FBgn0043471
FBgn0261593
FBgn0033936
FBgn0259918
FBgn0036157
FBgn0028988
FBgn0003687
FBgn0259818
FBgn0039789
FBgn0037686
FBgn0038877
FBgn0265048
FBgn0000052
FBgn0031459
FBgn0038897
FBgn0025595
FBgn0020513
FBgn0032846
FBgn0011284
FBgn0027590
FBgn0039024
FBgn0039114
FBgn0010516
FBgn0034331
FBgn0264494
FBgn0039529
FBgn0002622
FBgn0029689
FBgn0029768
FBgn0261592
FBgn0050046
FBgn0027571
FBgn0036030
FBgn0034398
FBgn0086472
FBgn0014469
FBgn0038795
FBgn0038020
FBgn0040606
FBgn0017457
FBgn0261532
FBgn0032422

Anexo 2 - Tabela das vias e genes mapeados, para envelhecimento do controle e *AD-like*, no ClueGO utilizando a base de dados do KEGG. Em vermelho as vias encontradas com os GDE *up-regulated* e em amarelo as vias mapeadas com GDE *down-regulated*.

KEGG GO - Envelhecimento CT	Genes mapeados
Metabolismo de Glicina, serina e treonina	[Gnmt, Sardh, Spat]
Lisossomos	[CG11459, CG4250, Npc2g, Npc2h, Tsp42Ed]
Ribossomo	[RpL13, RpL13A, RpL17, RpL22, RpL27, RpL32, RpL7, RpL8, RpS16, RpS19a, RpS2, RpS20, RpS23, RpS30]
Via de sinalização Toll e Imd	[DptA, Drs, PGRP-SD, lic]
Metabolismo <i>Amino sugar and nucleotide sugar</i>	[Cht5, Cht6, Cht7, Gfat1, kkv]
Apoptose	[Cyt-c-p, Drice, Dronc, Eip74EF, Traf4]
Metabolismo de drogas	[CG10178, GstE14, Ugt35a]
Biossíntese de folato	[Pu, ple, pr, se]
Metabolismo de glicerofosfolipideo	[CLS, Pld, Taz]
Via de sinalização Hippo	[Act57B, Act87E, d, ds, fj, ft]
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	[CG10178, GstE14, Ugt35a]
<i>Porphyrin and chlorophyll metabolism</i>	[CG10178, Ho, Ugt35a]
Proteassoma	[Prosalph2, Prosalph4, Prosalph5, Prosalph6, Prosbeta1, Prosbeta3, Prosbeta4, Rpn1, Rpn10, Rpn11, Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpt1, Rpt3, Rpt4, Rpt5, Rpt6, Rpt6R, Sem1]
Metabolismo de Retinol	[CG10178, CG15629, Ugt35a]

Anexo 3 - Tabela das vias e genes mapeados, para envelhecimento do controle e *AD-like*, no ClueGO utilizando a base de dados do KEGG. Em vermelho as vias encontradas com os GDE *up-regulated* e em amarelo as vias mapeadas com GDE *down-regulated*

KEGG - Envelhecimento AD-like	Genes mapeados
Metabolismo de arginina e prolina	[CG31075, CG7470, Odc1]
Metabolismo de cisteína e metionina	[Ahcy, CG10621, Mdh1]
Drug metabolismo de drogas	[CG17224, Est-6, GstD1, GstD9, GstE12, awd]
Biossíntese de ácidos graxos	[FASN1, IP3K2, hll]
Degradação de ácido graxos	[CG17544, CG31075, IP3K2, hll]
Biossíntese de folato	[CG12116, CG9436, Hn, Mocs1]
Metabolismo de galactose	[CG9436, Mal-A1, Mal-A8, Mal-B2, tobi]
Metabolismo de glutathiona	[GstD1, GstD9, GstE12, Odc1]
Metabolismo de glicerolipideo	[CG31075, CG9436, CG9886]
Metabolismo de glicerofosfolipideo	[CG4757, CG5991, sPLA2]
Metabolismo de glicina, serina e treonina	[CG10184, CG8129, CG9886, Gnmt, Sardh, Shmt, Spat]
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilatos	[CG9886, Mdh1, Shmt, Spat]
Degradação de lisina	[CG31075, CG4335, CG5321]
Lisossomos	[Bace, CG11459, CG4847, LManII, Npc2g, Npc2h, Tsp42Ed]
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	[GstD1, GstD9, GstE12]
<i>Neuroactive ligand-receptor interaction</i>	[AkhR, alphaTry, betaTry, kappaTry]
<i>One carbon pool by folate</i>	[CG11089, CG7560, Nmdmc, Shmt, ade3, pug]
Metabolismo de purina	[CG11089, CG16758, CG6767, Prat2, ade2, ade3, ade5, awd]
Ribossomo	[RpL12, RpL13, RpL13A, RpL17, RpL22, RpL23, RpL27A, RpL29, RpL34a, RpL34b, RpL35, RpL35A, RpL37a, RpL4, RpL6, RpL7, RpL7A, RpL8, RpS10b, RpS14b, RpS15, RpS17, RpS19a, RpS2, RpS20, RpS25, RpS3, RpS30, RpS4, RpS6, mRpS18C, sta]
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	[Amy-d, Amy-p, Mal-A1, Mal-A8, Mal-B2, tobi]
Via de sinalização Toll e Imd	[DptA, Drs, IM1, IM2, IM4, PGRP-SD]
Metabolismo <i>amino and nucleotide sugar</i>	[Cht5, Cht6, Cht7, Gat, Gfat1, kkv, mmy]
Apoptose	[Cyt-c-p, Dronc, Eip74EF, hid]
Biossíntese folato	[Pu, ple, pr, se]
Via de sinalização Hippo	[Act57B, Act87E, ds, fj, ft]
Via de sinalização MAPK	[Duox, aop, aos, hid]
Proteassoma	[Prosalph4, Prosalph5, Prosalph6, Prosbeta3, Prosbeta5, Rpn1, Rpn10, Rpn11, Rpn12, Rpn13, Rpn2, Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpt3, Rpt5, Rpt6, Rpt6R, Sem1]