



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

TESTE DE DROGAS DO METABOLISMO EM MODELO TRANSGÊNICO *DE*
Drosophila melanogaster PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

Aluno: Ms. Romualdo Morandi Filho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UBERLÂNDIA – MG

2019



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

TESTE DE DROGAS DO METABOLISMO EM MODELO TRANSGÊNICO DE
Drosophila melanogaster PARA DOENÇA DE ALZHEIMER

Aluno: Ms. Romualdo Morandi Filho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor 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).

F481 Filho, Romualdo Morandi, 1988-
2019 TESTE DE DROGAS DO METABOLISMO EM MODELO
TRANSGÊNICO DE *Drosophila melanogaster* PARA DOENÇA DE
ALZHEIMER [recurso eletrônico] / Romualdo Morandi Filho. - 2019.

Orientador: Carlos Ueira-Vieira.
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.2019.2193>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Ueira-Vieira, Carlos, 1981-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

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 11/2019 - PPGGB				
Data:	Dezessete de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:10
Matrícula do Discente:	11523GBI0018				
Nome do Discente:	Romualdo Morandi Filho				
Título do Trabalho:	Teste de drogas do metabolismo em modelo transgênico de <i>Drosophila melanogaster</i> para doença de Alzheimer.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	RNASEQ de cérebro de modelos biológicos de doença de Alzheimer e sua utilização na validação de peptídeo neuromoduladores.				

Aos dezessete dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 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. Flávio de Oliveira Francisco, Prof. Dr. Leonardo Bruno Figueiredo, Prof^a. Dr^a. Renata Graciele Zanon, Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva 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 o candidato: APROVADO. 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, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/07/2019, às 18:14, 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 **Murilo Vieira da Silva, Técnico(a) de Laboratório**, em 17/07/2019, às 18:14, 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 18:15, 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 18:16, 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 **LEONARDO BRUNO FIGUEIREDO, Usuário Externo**, em 17/07/2019, às 19:00, 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?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1367492** e o código CRC **14073991**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Levi, cuja simples existência tem me motivado e norteado meus caminhos. Para o qual espero que a curiosidade de um cientista nunca deixe seu espírito se acomodar, e que a busca pela verdade paute suas decisões no caminho que escolher trilhar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira, pelo qual tenho um profundo respeito e admiração como professor, pesquisador e antes de tudo, ser humano. Que me apoiou em duros momentos de crise durante esta trajetória em questões tanto acadêmicas como pessoais.

Agradeço também aos colegas e amigos de laboratório que foram cruciais nesta jornada. Para a Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti por todo carinho e aprendizado. Em especial para Jéssica Regina Da Costa Silva, pela paciência e presteza tanto no ensino quanto no auxílio da utilização de diversos métodos utilizados neste trabalho. Para Patricia Tiemi Fujimura, cuja experiência e capacidade técnica foram decisivas neste projeto. Para a Serena Mares Malta e para a Tamiris Sabrina Rodrigues, que me ajudaram em incontáveis momentos em que minha presença no laboratório não se fez possível. Para os colegas Marcos Paulo de Oliveira, Letícia Leandro Batista, Luiza Diniz Ferreira Borges, por todos os momentos de aprendizado e apoio compartilhados em laboratório, e por todas as risadas.

E para todos os outros colegas e amigos que auxiliaram de alguma forma a conclusão deste trabalho e que por um lapso eu não tenha aqui mencionado.

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva, e a forma mais comum de demência, e mesmo após mais de 100 anos do seu descobrimento, os mecanismos de início e progressão da doença ainda não foram totalmente elucidados. Estudos tem mostrado uma relação forte entre a doença de Alzheimer e o metabolismo da glicose, e que o uso de alguns fármacos de ação metabólica podem reduzir a progressão da doença, porém a forma com que estes fármacos levam a esse efeito benéfico ainda é matéria de discussão. Este trabalho teve como objetivo tentar avaliar uma linhagem transgênica de *D. melanogaster* como modelo para o estudo destas drogas, bem como propor possíveis vias de ação para o efeito destes farmacos. Demonstramos que não só a glimepirida, metformina e sinvastatina tiveram efeitos benéficos na progressão da doença, demonstrando que este é um bom modelo para o estudo desses fármacos, como mostramos que todos interagem na via da Akt/mTOR e Hsp70. Também descobrimos alterações na taxa de transcrição de RNA mitocondrial e novos micRNAs e lncRNAs com alvos relacionados com fenótipo semelhante a doença de Alzheimer deste modelo.

Palavras-chave: Genética. Doença de Alzheimer. Metabolismo da glicose. *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease, and the most common form of dementia, and even after more than 100 years of its discovery, the mechanisms of onset and progression of the disease have not yet been fully elucidated. Studies have shown a strong relationship between Alzheimer's disease and glucose metabolism, and that the use of some metabolic drugs may reduce the progression of the disease, but the way these drugs lead to this beneficial effect is still a matter of discussion. This work aimed to evaluate a transgenic lineage of *D. melanogaster* as a model for the study of these drugs, as well as to propose possible routes of action for the effect of these drugs. We demonstrated that not only did glimepiride, metformin and simvastatin have beneficial effects on disease progression, demonstrating that this is a good model for the study of these drugs, as we have shown that all interact in the Akt / mTOR and Hsp70 pathway. We also discovered changes in the transcription rate of mitochondrial RNA and new miRNAs and lncRNAs with targets related to phenotype similar to Alzheimer's disease of this model.

Keywords: Genetics. Alzheimer's disease. Glucose metabolism. *Drosophila melanogaster*.

Lista de abreviaturas

ABCA7	Proteína transportadora ABC A7
AdipoR1	Receptor de adiponectina 1
Akt	Serina/treonina quinase
ApoE	ApolipoproteínaE
APP	proteína precursora amilóide
A β	β -amilóide
BAD	Bcl-2 associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X protein
CLU	Clusterina
DA	Doença de Alzheimer
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FAD	Doença de Alzheimer Familiar
FDG	Fluorodesoxiglicose
HSF-1	Fator de choque térmico 1
Hsp70	proteína de choque térmico de 70kDa
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
lncRNA	Long non-coding RNA
LOAD	Late-onset Alzheimer Disease
miRNA	Micro RNA
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Complexo 1 do alvo de rapamicina em mamíferos
mTORC2	Complexo 2 do alvo de rapamicina em mamíferos
mtRNA	RNA mitocondrial
NFTs	Proteínas Tau hiperfosforiladas em emaranhados neurofibrilares
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PS1	Presenilina 1
Rheb	Homólogo RAS enriquecido no cérebro
TPC2	carreador de tiamina pirofosfato 2
TSC1	Complexo da esclerose tuberosa 1
TSC2	Complexo da esclerose tuberosa 2

Lista de figuras

Figura 1 - Efeito de diferentes dosagens do tratamento com glimepirida na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência das amostras. Com exceção da dose a 50 μ M ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

Figura 2: Medição do comportamento de subida do *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* não tratado e tratado com 25 μ M de glimepirida (Teste t não pareado, $P < 0,05$. $N = 30$ moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

Figura 3 : Comparação entre moscas Canton-S e *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* não tratados e tratados com 25 μ M glimepirida em relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

Figura 4 : Quantificação de glicose das cabeças de moscas de Canton S e *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* (sem tratamento e tratada com glimepirida). O teste ANOVA foi usado seguido por Bonferroni como pós-teste ($P < 0,001$). As linhas representam a média e o desvio padrão.

Figura 5 : Análise histopatológica da cabeça das moscas. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. A barra preta significa 25 μ m. A: tecido da mosca Canton-S. B: tecido de *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* não tratada e (C) tratada com 25 μ M de glimepirida. D: Comparação da porcentagem de área de vacúolos em relação à área total do cérebro de glimepirida *elav-Gal4* 25 μ M não tratada e tratada com moscas *UAS-APP,UAS-BACE* (Teste t não pareado, $n = 12$ moscas para o grupo tratado e $n = 10$ para não tratada).

Figura 6 : Quantificação de transcritos por qPCR comparando a expressão das moscas *elav-Gal4<UAS-APP,UAS-BACE* não tratadas e tratadas com 25 μ m de glimepirida. (A) akt e (B) genes hsp70. Os níveis

de transcrição foram normalizados para o controle endógeno *rpl32*. (Teste t não pareado, $P < 0,001$).

Figura 7: Efeito de diferentes dosagens do tratamento com glimepirida na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton-S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência das amostras. Com exceção das doses a 10 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

Figura 8: Medição do comportamento de subida do *elav-Gal4>UAS-APP, UAS-BACE* não tratado e tratado com 25mM de metformina (Teste t não pareado, $P < 0,05$. $N = 30$ moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

Figura 9: Comparação entre moscas Canton-S e *elav-Gal4>UAS-APP, UAS-BACE* não tratados e tratados com 25mM de metformina em relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

Figura 10: Quantificação de glicose da cabeça de moscas de Canton-S e *elav-Gal4>UAS-APP, UAS-BACE* (sem tratamento e tratada com 25 mM de metformina). Teste Anova One-Way ($P < 0,05$). As linhas representam a média e o desvio padrão.

Figura 11: Efeito de diferentes dosagens do tratamento com sinvastatina na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton-S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência das amostras. Com exceção da dose a 10 μM e 25 μM ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

Figura 12: Medição do comportamento de escalada do *elav-Gal4>UAS-APP, UAS-BACE* não tratado e tratado com 100 μM de sinvastatina (Teste t não pareado, $P < 0,05$. $N = 30$ moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

Figura 13: Comparação entre moscas Canton-S e *elav-Gal4>UAS-APP, UAS-BACE* não tratados e tratados com 100 μM de sinvastatina em

relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

Figura 14 : Quantificação de transcritos por qPCR comparando a expressão das moscas *elav-Gal4<UAS-APP,UAS-BACE* não tratadas e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de sinvastatina. (A) *akt* e (B) genes *hsp70*. Os níveis de transcrição foram normalizados para o controle endógeno *rpl32*. (Teste t, $P < 0,001$).

Figura 15 : Micrografia eletrônica de transmissão de cabeças de moscas. (A) Moscas controle parental (*ElavGal4*); (B) moscas modelo para doença de Alzheimer com setas indicando mitocôndrias, asteriscos indicando terminal sináptico e barra branca de escala equivalente a $1 \mu\text{m}$; (C) Gráfico indicando área em μm^2 das mitocôndrias entre controle e Alzheimer (Teste t, sem diferença estatística).

Figura 16 : Gráfico mostrando o escore médio de qualidade (Eixo Y) para cada posição de base nos reads (Eixo X). Onde o escore médio deve se manter preferencialmente na faixa amarela ou verde (≥ 20).

Figura 17 : Gráfico de escores de componentes principais entre as duplicatas dos 4 grupos, sendo que duplicatas do mesmo grupo encontram-se na mesma cor.

Figura 18 : Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do fold change ≥ 1.5 e $p\text{-value} \leq 0.05$) de expressão diferencial de mtRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

Figura 19: Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do fold change ≥ 1.5 e $p\text{-value} \leq 0.05$) de expressão diferencial de miRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

Figura 20: Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do

fold change ≥ 1.5 e p-value ≤ 0.05) de expressão diferencial de lncRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

Figura 21: Modelo proposto para a via afetada, a insulina se liga no receptor de insulina (IR), fazendo o domínio intracelular fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS), ativando a fosfatidilinositol 3-quinase, que ativa a Akt, a Akt fosforila o complexo da esclerose tuberosa (TSC2) inibindo o complexo TSC1/TSC2 de inibir o homólogo RAS enriquecido no cérebro (Rheb), que tem função de estímulo da mTORC1, que estimula a síntese proteica, inibe a autofagia mitocondrial, e estimula a proteína de resposta a choque térmico, tanto pelo aumento da síntese proteica quanto pela liberação do fator de choque térmico 1 (HSF-1). A HSP70 inibe a cascata de sinalização da apoptose mediada por citocromo c em quatro momentos. Ela inibe as proteínas reguladoras de morte celular Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) BAD (Bcl-2 associated death promoter) e a BAX (Bcl-2 associated X protein) de liberarem o citocromo c. Também inibe o citocromo c liberado pela Bad/Bax de complexar com a Caspase 9 ativando o promotor apoptótico Caspase 3 e inibe a função apoptótica da Caspase 3. O miRNA miR-4943 reduz a tradução dos transcritos da Akt e do PI3K reduzindo a atividade de toda a via. O miRNA miR-4958 reduz a tradução de Nipsnap diminuindo a mitofagia. E por fim, o miR-4940 reduz a tradução de carreador de tiamina pirofosfato 2 (TPC2) reduzindo o influxo mitocondrial de tiamina.

Lista de tabelas

Tabela 1: Estatísticas do sequenciamento de RNA contendo valores de reads totais (reads brutas), reads trimadas, reads mapeadas contra genoma mitocondrial (mtDNA), reads mapeadas contra biblioteca de microRNA (miRNA), e mapeadas contra biblioteca de long non-coding RNA (lncRNA) de *Drosophila melanogaster*. 48

Tabela 2: Nas duas primeiras colunas estão apresentados os FlyBase ID e Name dos microRNAs escolhidos, na terceira e quarta coluna os FlyBase ID e Name dos genes preditos, e por ultimo o miTG score da predição. 54

Sumário

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xiii
Sumário	xiv
1. Introdução.....	16
1.1. A doença de Alzheimer.....	16
1.2. A hipótese da cascata amilóide	18
1.3. Genes de risco para a Doença de Alzheimer	19
1.4. Alzheimer, metabolismo da glicose e o diabetes mellitus 2	20
1.5. Alzheimer e o metabolismo lipídico: ApoE, CLU, ABCA7 e Adiponectina	25
1.6. Alzheimer e a atividade mitocondrial	28
1.7. Drosophila melanogaster como um modelo transgênico para Doença de Alzheimer....	29
2. Objetivos gerais e específicos	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. Material e métodos	32
3.1. Estoque de moscas.....	32
3.2. Teste de longevidade	32
3.3. Teste de escalada	32
3.4. Teste de aversão	33
3.5. Análises histológicas.....	34
3.6. Medição de glicose da cabeça das moscas	34
3.7. PCR quantitativa (qPCR)	35
3.8. Microscopia eletrônica de transmissão de mitocôndrias	35
3.9. Sequenciamento de nova geração de moscas D. Alzheimer e Controle.....	35
3.10. Expressão diferencial de genoma mitocondrial	36
3.11. Expressão diferencial de miRNA e lncRNA	37
3.12. Predição de alvos para miRNA	37
3.13. Análises estatísticas.....	38
4. Resultados	39
4.1. Glimepirida	39
4.1.1. A ingestão de glimepirida pode modular a sobrevivência das moscas.....	39
4.1.2. Glimepirida melhora as moscas no teste de escalada	40
4.1.3. Aprendizagem e memória foram reforçadas por glimepirida.....	40
4.1.4. A concentração de glicose foi reduzida pelo tratamento com glimepirida.	41

4.1.5.	A glimepirida reduz a área de vacúolos no cérebro com Alzheimer.....	42
4.1.6.	Redução do níveis de mRNA dos genes <i>akt</i> e <i>hsp70</i> pelo uso da glimepirida.	43
4.2.	Metformina	44
4.2.1.	O tratamento com metformina aumentou a longevidade	44
4.2.2.	O teste de escalada não mostrou melhora com a metformina.	45
4.2.3.	Melhor desempenho de aprendizado e memória com metformina.	46
4.2.4.	Tratamento com metformina 25mM reduziu a glicose total.....	47
4.3.	Sinvastatina	48
4.3.1.	Maior longevidade no tratamento com sinvastatina.....	48
4.3.2.	Melhora no teste de escalada pelo uso de sinvastatina	49
4.3.3.	Tratamento com sinvastatina possibilitou melhor aprendizado e memória.	50
4.3.4.	Menor expressão dos genes <i>akt</i> <i>hsp70</i> com tratamento por sinvastatina.....	51
4.4.	Micrografia eletrônica de transmissão e tamanhos de mitocôndria.	52
4.5.	Expressão diferencial de genoma mitocondrial, miRNA e lncRNA.....	53
4.6.	Alvos preditos para miRNA.....	59
5.	Discussão	60
6.	Conclusão	71
7.	Referências	72

1. Introdução

1.1. A doença de Alzheimer.

Em 1901 a doença que viria a ser conhecida pelo nome de seu descobridor é descrita pela primeira vez pelo médico alemão Dr. Alois Alzheimer em seu paciente Auguste Deter. O paciente experimentou perda de memória, paranoia e alterações psicológicas. Dr. Alzheimer observou na autópsia que havia encolhimento dentro e ao redor das células nervosas em seu cérebro, e na análise microscópica revelou-se a presença do que hoje chamamos de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 1998; MOLLER; GRAEBER, 1998).

Dr. Alzheimer mudou-se em 1906, passando para uma posição de pesquisa no Hospital de Munique, sob a liderança do Dr. Emil Kraepelin, um dos psiquiatras mais influentes de sua época. Poucos anos depois, Dr. Alzheimer publicou suas descrições de vários pacientes semelhantes em 1909, e Kraepelin incluiu o caso de Deter na edição de 1910 de seu respeitado livro de psiquiatria. Foi Kraepelin quem nomeou essa demência em homenagem ao seu novo colaborador (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 1998; MOLLER; GRAEBER, 1998).

Auguste Deter não era uma mulher idosa no início de sua doença, e a doença de Alzheimer era, portanto, considerada uma “demência pré-senil” para distingui-la da já conhecida “demência senil” que se pensava resultar de doença vascular relacionada ao envelhecimento. Investigações posteriores, no entanto, mostraram que placas e emaranhados estavam presentes nos cérebros da maioria dos adultos mais velhos com sintomas de demência (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 1998; MOLLER; GRAEBER, 1998).

No ano de 1931 o microscópio eletrônico é inventado por Max Knoll e Ernst Ruska, permitindo ampliação de até 1 milhão de vezes. Esta invenção permitiu aos cientistas estudar as células cerebrais com maior detalhe, o que levou os psiquiatras britânicos Tomlinson e Roth no final da década de 1960 descreverem a importância das placas amiloides em adultos mais velhos e, em 1970, o Dr. Roth questionou a importância do critério de idade que distinguia a Doença de Alzheimer de "demência senil do tipo Alzheimer" (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 1998).

Em outubro de 1974 se institui o Instituto Nacional do Envelhecimento (NIA). Desde então, a NIA apóia a pesquisa de Alzheimer.

O neurologista norte-americano Robert Katzman sugeriu, em 1976, abolir a distinção de idade que separava a demência pré-senil da demência senil do tipo Alzheimer e, no início dos anos 80, a Doença de Alzheimer era amplamente reconhecida como a causa mais comum de demência em idosos.

E atualmente (2019), mesmo 118 anos após a descoberta da Doença de Alzheimer (DA), não há cura ou tratamento totalmente eficaz para esta doença.

A doença de Alzheimer é um distúrbio neurodegenerativo progressivo e é a forma mais comum de demência que ocorre em mais de 35% dos indivíduos com 85 anos ou mais. As marcas clínicas da DA são perda de memória lentamente progressiva e alterações de maior função intelectual e habilidades cognitivas. Patologicamente, a DA é caracterizada no cérebro por emaranhados neurofibrilares nos neurônios do córtex cerebral e hipocampo, e a deposição de amiloide em placas senis e vasos sanguíneos cerebrais. Um diagnóstico definitivo da Doença de Alzheimer só pode ocorrer após a morte, com exame direto do cérebro (WILSON et al., 2013).

Testes clínicos e neuropsicológicos em clínicas de atendimento terciário resultam em um diagnóstico correto aproximadamente 90% das vezes (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

Medicamentos apenas marginalmente e temporariamente afetam a gravidade da doença e progressão. Nos estágios intermediário e final, indivíduos com Doença de Alzheimer necessitam de cuidados completos, estendendo a carga social e financeira aos cuidadores e familiares. Esse ônus aumentará à medida que se estima que a prevalência de DA triplicará até 2050, com um custo resultante de mais US\$ 50 bilhões por ano. A previsão pré-sintomática da doença não é possível e medidas preventivas só estarão disponíveis quando a fisiopatologia subjacente à DA for melhor compreendida (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

Os sintomas da doença de Alzheimer variam entre os indivíduos. O sintoma inicial mais comum é uma piora gradual e continua para lembrar de novas informações. Esse declínio de memória ocorre porque os primeiros neurônios a perderem função e morrerem geralmente são neurônios das regiões cerebrais envolvidas na formação de novas memórias e recordações. Conforme os neurônios

em outras partes do cérebro começam a degenerar, os indivíduos experimentam outras dificuldades. A seguir estão os sintomas mais comuns de Alzheimer:

- Perda de memória gradual.
- Diminuição da capacidade de planejamento ou solução de problemas.
- Dificuldade em completar tarefas comuns em casa, no trabalho ou no lazer.
- Confusão com o tempo ou lugar.
- Problemas para entender imagens visuais e relações espaciais.
- Dislexia na fala ou escrita.
- Decréscimo ou falta de julgamento.
- Mudanças de humor e personalidade, incluindo apatia e depressão.

(ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

1.2. A hipótese da cascata amilóide

Indivíduos com síndrome de Down podem muitas vezes sofrer alterações neurológicas e perda de memória mais tarde na vida. Isso inclui a formação de placas semelhantes às observadas em pacientes com DA. Em 1984, Glenner e Wong isolaram um peptídeo de 42 kDa chamado β -amilóide ($A\beta$) das placas de ambos os cérebros com DA e com síndrome de Down (GLENNER; WONG, 1984). Eles propuseram isso porque AD e Placas de síndrome de Down, ambas contêm $A\beta$, as condições compartilham um processo patogênico comum. Além disso, eles afirmaram que, como o $A\beta$ é codificado no cromossomo 21 e a síndrome de Down é resultado da trissomia do cromossomo 21, os genes no cromossomo 21 são responsáveis pela patologia da DA. Isso levou à hipótese da amilóide (também conhecida como hipótese β -amilóide ou hipótese da cascata amilóide), que afirma que a agregação $A\beta$ desencadeia a cascata de eventos que levam à patologia e sintomas da DA. Esta cascata de eventos inclui a agregação de proteínas Tau hiperfosforiladas em emaranhados neurofibrilares (NFTs), bem como inflamação e estresse oxidativo causando disfunção e morte neuronal (GLENNER; WONG, 1984).

Nessa época, havia numerosas teorias complexas e conflitantes em relação à patogênese da Doença de Alzheimer. O vínculo da síndrome de Down era convincente e a hipótese amilóide era relativamente simples e fornecia aos

pesquisadores um alvo terapêutico. Isso fez com que esta teoria fosse o foco de uma extensa pesquisa nas próximas décadas (MORRIS; CLARK; VISSEL, 2014).

1.3. Genes de risco para a Doença de Alzheimer

Uma pequena porcentagem dos casos de Alzheimer (estimados em 1% ou menos) se desenvolve como resultado de mutações em qualquer um dentre três genes específicos. Essas mutações envolvem o gene da proteína precursora amilóide (APP) e os genes das proteínas presenilina 1 e presenilina 2. Aqueles que herdam uma mutação para o gene APP ou presenilina 1 irão, invariavelmente, desenvolver a Doença de Alzheimer (BEKRIS et al., 2010). Aqueles que herdam uma mutação no gene da presenilina 2 têm uma chance de 95% de desenvolver a doença. Indivíduos com mutações em qualquer um desses três genes tendem a desenvolver os sintomas de Alzheimer antes dos 65 anos, às vezes até na faixa dos 30 anos, enquanto a grande maioria dos indivíduos com Alzheimer tem doença tardia, ocorrendo aos 65 anos ou mais (GOLDMAN et al., 2011).

Por isso, esse tipo de Doença de Alzheimer que ocorre de forma prematura é conhecida por “Early-onset Familiar Alzheimer Disease” (EOFAD) ou, devido a sua natureza hereditária, simplesmente “Familiar Alzheimer Disease” (FAD). Em contrapartida o tipo mais comum e tardio da doença é conhecido como “Later-onset Alzheimer Disease” (LOAD).

Apesar de na LOAD não haver genes totalmente determinantes para o surgimento da doença, trabalhos tem mostrado vários polimorfismos que geram maior incidência de manifestação da doença.

Dentre os genes que estão relacionados ao surgimento da Doença de Alzheimer tardia, estão os de metabolismo do colesterol, APOE, CLU, ABCA7, SORL1 (Sendo a variante APOE4 o gene com maior relação positiva ao risco de LOAD) (CASTELLANO et al., 2011; HAROLD et al., 2009; HOLLINGWORTH et al., 2011; KIM; BASAK; HOLTZMAN, 2009; LAMBERT et al., 2009; LEE et al., 2008; ROGAEVA et al., 2007). Os relacionados a resposta imunológica, CR1, CD33, MS4A, CLU, ABCA7, e EPHA1 (HOLLINGWORTH et al., 2011; LAMBERT et al., 2009; VACINOVA et al., 2017). Os relacionados a processo de endocitose BIN1,

PICALM, CD2AP (HAROLD et al., 2009; HOLLINGWORTH et al., 2011; VACINOVA et al., 2017).

Além destes, dois genes tem mostrado variantes com alto índice de risco para o desenvolvimento da LOAD, sendo eles o PLD3 e o TREM2 (CRUCHAGA et al., 2014; GUERREIRO et al., 2013).

Também a outros genes com menor prevalência e índice de risco, mas que ajudam a entender as vias que são alteradas na Doença de Alzheimer tardia, sendo alguns: CELF1, DSG2, FERMT2, CASS4, HLA, DBR1, DRB5, INPP5D, MEF2C, RIN3, ZCWPW1, NME8, PTK2B, SLC24H4 (LAMBERT et al., 2013), sendo alguns destes relacionados ao metabolismo da glicose e a cascata de sinalização da insulina.

1.4. Alzheimer, metabolismo da glicose e o diabetes mellitus 2.

Recentemente, distúrbios do metabolismo entraram em cena como um fator de risco potencial para demência e DA (JANSON et al., 2004). O diabetes tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado pela resistência à insulina periférica e pela secreção deficiente de insulina pelas células beta pancreáticas. A responsividade reduzida à insulina em tecidos periféricos sensíveis à insulina, como músculo esquelético, adipócitos e fígado, é definida como resistência à insulina (CAVAGHAN; EHRMANN; POLONSKY, 2000).

Assim, a resistência à insulina leva ao aumento dos ácidos graxos livres circulantes, ao aumento da glicose estimulada pela insulina e à gliconeogênese elevada. Em indivíduos normais tolerantes à glicose, a resistência à insulina é superada pelo aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas para manter a normoglicemia (CAVAGHAN; EHRMANN; POLONSKY, 2000). Essa compensação das células beta é mediada pela expansão da massa celular beta, pelo aumento da biossíntese de insulina e pelo aumento dos processos de acoplamento da secreção de nutrientes com maior sensibilidade aos estímulos. A compensação falha se existem fatores genéticos ou adquiridos que tornam as células beta suscetíveis, causando deterioração da função das células beta com perda de massa de células beta por apoptose (PRENTKI; NOLAN, 2006).

Estudos clínicos e epidemiológicos mostraram que o risco de desenvolver DA quase dobra em pacientes com DM2 (OTT et al., 1999). A tolerância à glicose ou tolerância diminuída à glicose também é prevalente em pacientes com DA (TURNER; CRAFT; AISEN, 2013). A hiperglicemia e a hiperinsulinemia correlacionam-se positivamente com a patologia da DA. A hiperglicemia, mesmo sem o desenvolvimento de diabetes, representa um fator de risco para declínio da memória e DA (CRANE et al., 2013).

Além disso, a administração de insulina também resultou em uma redução do acúmulo de amiloide e melhora no desempenho cognitivo em pacientes afetados pela DA (CRAFT et al., 2012). O modelo de camundongo transgênico APP/Presilina 1 alimentado com dieta hiperlipídica (DH) apresentou maior suscetibilidade ao comprometimento metabólico caracterizado pela alta glicemia de jejum, intolerância à glicose periférica e ganho de peso corporal induzido pela dieta quando comparado a controles não-transgênicos em DH (RUIZ et al., 2016).

O polipeptídeo amiloide das ilhotas (IAPP, ou amilina) é um dos principais produtos secretórios das células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans. Alguns estudos sugerem que a deposição cerebral da amiloide da amilina ocorre independentemente do β -amilóide em pacientes com DA (JACKSON et al., 2013). O amiloide derivado da amilina é uma característica marcante de pacientes com DM2 e foi implicado na morte de células beta pancreáticas. A amilina é co-secretada com insulina e regula o esvaziamento gástrico. Interessantemente, a inoculação de agregados pancreáticos de amilina nos cérebros de camundongos transgênicos da APP resultou em patologia da DA mais grave e prejuízos de memória significativamente maiores do que os animais não tratados. Ratos que expressam amilina humana (hIAPP) também mostraram redução do drive exploratório, prejuízo na memória de reconhecimento e nenhuma capacidade de melhorar o desempenho no rotarod (SRODULSKI et al., 2014). Depósitos extensivos de amilina e marcadores inflamatórios foram observados no cérebro do modelo de ratos transgênicos em comparação aos controles. A ausência de transcrição de amilina no cérebro humano sugere que a acumulação é promovida pelos oligômeros amilina que circulam no sangue derivado do pâncreas (JACKSON et al., 2013). A oligomerização do amilina pode ferir os neurônios formando oligômeros permeáveis à membrana e investigações prévias demonstraram que os

oligômeros amilina induzem substâncias reativas de oxigênio e alteram Ca^{2+} , homeostase e viabilidade de astrócitos e neurônios cultivados (MATTSON; GOODMAN, 1995). O tratamento com amilina de neurônios corticais de rato mostrou morte apoptótica generalizada com indução dependente do tempo e da concentração de genes de stress oxidativo e genes de apoptose, sugerindo que a morte neuronal induzida por amilina é geneticamente similar àquela observada para oligômeros de β -amilóide e, portanto, compartilham mecanismos neurotóxicos comuns (TUCKER et al., 1998).

Estudos que utilizaram imagens de tomografia por emissão de pósitrons (PET) com fluorodesoxiglicose (FDG) foram interpretados como indicativos de anormalidades no metabolismo da glicose e/ou perda de sinapses, em pacientes com risco de DA, bem antes do início dos sintomas. Esta modalidade de neuroimagem FDG-PET indicou que o metabolismo da glicose cerebral pode ser prejudicado no início da vida adulta de pessoas com risco genético de desenvolver AD. Embora os mecanismos exatos subjacentes a este fenômeno sejam atualmente desconhecidos, déficits na captação do FDG-PET iniciam décadas antes do início clínico dos sintomas e - talvez mais importante - bem antes da faixa etária onde abundantes placas e emaranhados são observados.

Foi descoberto que havia uma modesta redução relacionada à idade no metabolismo da glicose cerebral, e a presença de pelo menos um alelo APOE $\epsilon 4$ foi associada com menor metabolismo de glicose medido nas regiões posterior do cíngulo, precuneus e/ou parietal lateral (KNOPMAN et al., 2014).

As proteínas APP, β -amilóide e Tau também foram detectadas na periferia, por exemplo, no pâncreas, fígado, músculo esquelético, coração, pulmão ou testículos. O β -amilóide Periférico pode se ligar a seus receptores e / ou competir com insulina por receptores de insulina (IR) (JAROSZ-GRIFFITHS et al., 2016). Isso poderia mediar a disfunção e perda de células β -pancreáticas relacionadas com o β -amilóide, resistência periférica à insulina e dismetabolismo da glicose. Isso pode exacerbar a deposição de β -amilóide, criando um ciclo vicioso que diminui a sinalização de insulina cerebral, promove estresse oxidativo e neuroinflamação, culminando em deposição de β -amilóide e proteína Tau e déficits cognitivos (BHARADWAJ et al., 2017). Em consonância com os efeitos deletérios periféricos do β -amilóide, camundongos deficientes em BACE1 são magros, resistentes à

obesidade induzida por dieta e periféricamente sensíveis à insulina (MEAKIN et al., 2012).

Além disso, o AC hipotalâmico em pacientes com DA pode contribuir para outros distúrbios metabólicos (como DM2 ou obesidade) e déficits neuronais relacionados. Da mesma forma, a superexpressão da proteína Tau atenuou a secreção de insulina nas células RIN-5F (MAJ et al., 2016). Isso pode ser devido à ruptura da ligação Tau, desestabilização dos microtúbulos que atenua o tráfico de grânulos de insulina e sua secreção pelas células β -pancreáticas. Como consequência, a remodelação da actina induzida pela insulina na rede de microtúbulos foi inibida (LIU et al., 2013b), prejudicando ainda mais o transporte de vesículas contendo a isoforma transportadora de glicose-4 (GLUT4, uma das principais isoformas sensíveis à insulina) em direção à membrana plasmática e, finalmente, reduzir a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo (EMOTO; LANGILLE; CZECH, 2001). No entanto, a desestabilização dos microtúbulos induzida pela Tau também exacerbou a ancoragem dos grânulos de insulina e a secreção de insulina induzida pela glicose (ZHU et al., 2015).

O alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina / treonina quinase que pode se reunir em dois complexos multiproteicos, mTORC1 composto pelo mTOR em associação com a proteína regulatória-associada ao mTOR (RAPTOR), e mTORC2 composto pelo mTOR em associação com a proteína ligante do mTOR insensível a rapamicina (RICTOR), ambos associando-se com a proteína mLST8. A função principal do mTORC1 é o controle do crescimento celular e o mTORC2 controla principalmente a sobrevivência e a proliferação celular. As principais funções do mTORC1 são através da ativação de S6K e ATF4 e inibição de 4EBP (BEN-SAHRA et al., 2016), enquanto mTORC2 atua através da ativação de SGK, PKC e Akt/PKB (HRESKO; MUECKLER, 2005).

No cérebro, mTOR é fundamental para o desenvolvimento do telencéfalo e sua ativação incorreta pode levar à microcefalia ou hipertrofia cortical e neurodegeneração, dependendo da janela de desenvolvimento da ativação (KASSAI et al., 2014). Além da formação do cérebro, a atividade da mTOR também foi ligada à aprendizagem e à memória quando a rapamicina demonstrou bloquear a facilitação sináptica a longo prazo e a potenciação de longa duração (LTP, que é uma melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios que resulta

do estímulo de ambos de forma síncrona) de fase tardia (TANG et al., 2002). A inibição da sinalização mTOR também inibe a LTD dependente de receptores metabotrópicos, possivelmente via S6K1/2 (HOU; KLANN, 2004).

Uma vez que ambas as formas de plasticidade sináptica são dependentes da tradução do RNA local, é plausível supor que o impacto da mTOR nesses processos é devido à desregulação da tradução local (LIPTON; SAHIN, 2014).

A ativação mTOR/S6K1 foi correlacionada com a fosforilação inibitória do substrato do receptor de insulina (IRS-1) na Serina 307, desacoplando a interação do IRS-1 com o receptor de insulina (LIPTON; SAHIN, 2014). Curiosamente, o IRS-1pSer307 foi relatado como sendo aumentado em neurônios cultivados expostos a oligômeros de β -amilóide (BOMFIM et al., 2012). Além disso, o aumento da ativação da via mTOR/S6K1 e a fosforilação inibitória do IRS-1 foram demonstrados em diferentes modelos de resistência à insulina (UM et al., 2004).

Esses dados estabelecem papéis para mTOR tanto na resistência à insulina quanto na cognição, ambas características também presentes na DA. A inibição farmacológica da sinalização mTOR, com rapamicina, resgata déficits cognitivos e aumenta a autofagia, melhorando a patologia β -amilóide e Tau, em modelo de camundongo da DA (SPILMAN et al., 2010). Tem sido demonstrado que a via PI3K-Akt-mTOR está envolvida na indução de eventos do ciclo celular (CCE) por oligômeros de β -amilóide. Um recente estudo mostra que os oligômeros de β -amilóide induzem o CCE através da ativação de mTORC1 localizada na membrana plasmática e fosforilação da Tau dependente de mTORC1. Além disso, o grupo mostrou que esta indução de CCE pode ser prevenida pela inativação de mTORC1 lisossomal pela insulina, indicando que a diminuição da sinalização de insulina induzida por oligômeros de β -amilóide causa reentrada no ciclo celular neuronal (NORAMBUENA et al., 2017).

Todos estes trabalhos e dados levantados colocam o mTOR e suas vias correlatas em um local de destaque no estudo da Doença de Alzheimer tardia, principalmente no que tange a relação desta doença com a resistência insulínica. E, portanto, tornando-o também um alvo no estudo de novas terapias, baseado em drogas que possam alterar sua concentração, atividade e vias de ação.

1.5. Alzheimer e o metabolismo lipídico: ApoE, CLU, ABCA7 e Adiponectina

A proteína Apolipoproteína-E (ApoE) humana é uma glicoproteína de 299 aminoácidos com níveis variáveis de sialilação pós-traducional através de glicosilação no resíduo de treonina 194. A apoE é produzida em vários órgãos com a expressão mais alta no fígado e cérebro. Células não neuronais, principalmente astrócitos e microglia, são os principais tipos celulares que expressam apoE no cérebro, no entanto, os neurônios também podem produzir apoE sob certas condições, embora em níveis muito mais baixos do que os astrócitos (XU et al., 2006). A apoE funciona como um ligante na endocitose de lipoproteína. No plasma, as proteínas apoE estão presentes nas lipoproteínas em associação com outras apolipoproteínas, enquanto que no apoE cerebral e outras 2 apolipoproteínas, apoJ e apoA-1, estão predominantemente presentes em partículas distintas de lipoproteínas de alta densidade (FAGAN et al., 1999). Ao contrário do HDL plasmático que contém apoA-1 como sua principal apolipoproteína, a apolipoproteína predominante de HDL no sistema nervoso central (SNC) é apoE. Embora as lipoproteínas do tipo HDL sejam as únicas lipoproteínas do sistema nervoso central (SNC), seu papel na homeostase do colesterol e do colesterol do SNC não está claramente definido. Após endocitose mediada por receptor de partículas de lipoproteína contendo apoE por membros da família de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a apoE pode ser degradada ou reciclada de volta à superfície celular (RENSEN et al., 2000). O colesterol liberado das partículas de lipoproteínas contendo apoE é usado para apoiar a sinaptogênese e a manutenção das conexões sinápticas (PFRIEGER, 2003).

O gene da apoE humana contém vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) distribuídos pelo gene. Os três SNPs mais comuns levam a alterações na sequência de codificação e resultam nas três isoformas comuns de apoE: apoE2, apoE3 e apoE4. Embora as três isoformas comuns diferem em apenas um ou dois aminoácidos no resíduo 112 ou 158, essas diferenças alteram profundamente a estrutura e função da apoE (MAHLEY; WEISGRABER; HUANG, 2006). Após a imunorreatividade da apoE em placas amilóides ter sido relatada, o alelo 4 do gene ApoE foi descoberto como um forte fator de risco genético para AD (CORDER et al., 1993).

Clusterina (CLU) é uma apolipoproteína. A clusterina é uma proteína chaperona ativada por estresse que funciona na apoptose, regulação do complemento, transporte lipídico, proteção de membrana e interações célula-célula (JONES; JOMARY, 2002).

A CLU está localizada no cromossomo 8 e codifica 3 transcrições alternativas (RIZZI et al., 2009). Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram identificados na CLU que conferem proteção contra LOAD (LAMBERT et al., 2009). Um polimorfismo SNP foi relatado ter associação com LOAD em 74.046 indivíduos (LAMBERT et al., 2013). O impacto funcional desses polimorfismos é pouco compreendido. Níveis plasmáticos elevados de clusterina também estão associados à atrofia cerebral, gravidade da doença e progressão da doença (SCHRIJVERS et al., 2011).

Antes da identificação dos alelos de risco na LOAD, a clusterina estava implicada na patogênese da Doença de Alzheimer. A expressão de RNAm de clusterina é elevada em cérebros com LOAD e é detectada em placas amilóides (MAY et al., 1990). A clusterina purificada interage com A β e influencia a formação de fibrilas in vitro (MATSUBARA; FRANGIONE; GHISO, 1995). Assim, a clusterina provavelmente influencia a depuração de A β , deposição de amiloide e toxicidade neurítica. Camundongos transgênicos com APOE e Clusterin deficientes em APP exibem deposição de A β mais precoce e mais extensa do que em camundongos controle (DEMATTO et al., 2004).

A clusterina também está associado ao sistema do complemento. A clusterina modula o complexo de ataque à membrana, onde inibe a resposta inflamatória associada à ativação do complemento (JONES; JOMARY, 2002). Como a neuroinflamação é uma característica da Doença de Alzheimer, os SNPs que alteram a expressão da clusterina ou suas funções como um agente de resposta amiloide podem afetar a patogênese da Doença de Alzheimer.

A proteína transportadora ABC A7 (ABCA7) é um membro da superfamília de transportadores ABC (ATP-binding cassette), que tem função de fazer transporte de substratos transmembrana. O ABCA7 está localizado no cromossomo 19 e pode sofrer splicing alternativo para gerar dois transcritos, ambos expressos no cérebro (IKEDA et al., 2003).

Foram identificados vários SNPs próximos a ABCA7 como alelos de risco para a Doença de Alzheimer de início tardio. Polimorfismos nesta região aumentam o risco de LOAD (LAMBERT et al., 2009). No entanto, o impacto desses polimorfismos na função do ABCA7 e na DA é pouco compreendido.

A expressão do mRNA ABCA7 no tecido cerebral de autópsia também está associada ao declínio cognitivo avançado (KARCH et al., 2012).

O ABCA7 funciona no efluxo de lípidos das células em partículas de lipoproteínas. Camundongos com deficiência de ABCA7 exibem apenas efeitos modestos na homeostase lipídica em comparação com camundongos deficientes em ABCA1, sugerindo que o ABCA7 não é essencial (KIM et al., 2013). In vitro, o ABCA7 estimula o efluxo de colesterol e inibe a secreção de A β (CHAN et al., 2008). O aumento da expressão de ABCA7 também aumenta a fagocitose microglial de células apoptóticas, substratos sintéticos e A β . Camundongos transgênicos da APP que são deficientes em ABCA7 têm maior deposição de A β em comparação com os animais transgênicos isolados (KIM et al., 2013).

Assim, o ABCA7 pode influenciar o risco de doença de Alzheimer através da transferência de colesterol para APOE ou pela limpeza de agregados A β (CHAN et al., 2008; KIM et al., 2013).

Outro hormônio de origem adipocitária significativo é a adiponectina. A adiponectina, que exerce efeitos benéficos múltiplos a partir da regulação do peso corporal, modula a função endotelial, sensibiliza a insulina e regula a ação anti-aterogênica e antiinflamatória (WHITEHEAD et al., 2006). Ela pode ativar muitas moléculas de sinalização para exercer esses efeitos, incluindo a adenosina monofosfatase ativada (AMPK), p38-MAPK, JNK, fator de transcrição PPAR α e NF- κ B em múltiplos tecidos (YAMAUCHI et al., 2003).

Recentemente, estudos sobre doenças neurodegenerativas atentam para a disfunção do metabolismo energético do SNC e das proteinopatias. Embora uma miríade de evidências mostre que a adiponectina tem propriedades neuroprotetoras, mas o papel potencial dos receptores de adiponectina ainda precisa ser revelado. Usando a terapia de supressão de genes por shRNA, os pesquisadores descobriram que suprimir o receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) pode causar neurodegeneração e disfunção no metabolismo. Além disso, suprimem o sintoma neurodegenerativo induzido por AdipoR1, aumentam o

número de células caspase3 e diminuem a expressão do marcador neuronal NeuN. Ainda mais, os grupos knockdown de AdipoR1 mostraram alta expressão de patologias relacionadas à doença de Alzheimer, como agregação anormal de proteínas, disfunção de sinalização de insulina e respostas neuroinflamatórias. Juntos, esses resultados mostraram que a sinalização de AdipoR1 tem o potencial de aliviar doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer (KIM et al., 2017).

1.6. Alzheimer e a atividade mitocondrial.

A captação de glicose é reduzida nos neurônios dos pacientes com DA. A morfologia alterada das mitocôndrias, como tamanho alterado, ruptura de cristas e acúmulo intra-mitocondrial de materiais osmiofílicos, concomitante com dano oxidativo aumentado e mudanças na massa mitocondrial, enzimas e DNA, também foram encontradas nos cérebros de pacientes com DA (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014). Algumas dessas disfunções mitocondriais ocorrem antes do aparecimento de placas A β e NFTs. A hipótese da cascata mitocondrial ainda propõe que a disfunção mitocondrial é um gatilho para a patologia da DA, incluindo o acúmulo de A β , a formação de NFTs e a neurodegeneração (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014).

A disfunção mitocondrial suprime a atividade da α -secretase, enquanto aumenta os níveis de β -secretase e PS1, uma proteína central no complexo γ -secretase, aumentando assim a produção de A β (ZHAO; ZHAO, 2013). A disfunção mitocondrial também aumenta a fosforilação da tau, tornando as células mais suscetíveis à toxicidade induzida pela A β ou pela tau. Um dos mecanismos subjacentes aos efeitos acima da disfunção mitocondrial é o estresse oxidativo, que é induzido por mitocôndrias danificadas. O estresse oxidativo extenso é uma manifestação precoce da DA (ZHAO; ZHAO, 2013). Os níveis de marcadores oxidativos estão diretamente correlacionados com a gravidade do comprometimento cognitivo, assim como a progressão sintomática do comprometimento cognitivo leve para DA (ANSARI; SCHEFF, 2010). O estresse oxidativo extenso causa a modificação oxidativa de proteínas e lipídios, levando à disfunção neuronal. Além disso, o estresse oxidativo pode regular os níveis de

BACE1 e PS1, a principal enzima/proteína para geração de A β . O estresse oxidativo também está envolvido na toxicidade induzida por A β ou tau (ZHAO; ZHAO, 2013).

Um dado também importante apresentado em um trabalho, indica que as duas características patológicas, oligômeros de A β e Tau hiperfosforilada, também causam danos mitocondriais. A β é translocado para as mitocôndrias, onde interage com várias proteínas para modular as funções mitocondriais (SCHMIDT et al., 2008). A β regula a transição de permeabilidade mitocondrial interagindo com translocase de nucleotídeos de adenina, o canal de ânion dependente de voltagem, e a ciclofilina-D. β -amilóide modula a geração de ATP via ligação à subunidade α da sintase de ATP (SCHMIDT et al., 2008). A β -amilóide intracelular, em vez de β -amilóide extracelular, aumenta a produção de óxido nítrico, reduzindo a atividade mitocondrial (KEIL et al., 2004). A produção de óxido nítrico aumentada por β -amilóide promove a S-nitrosilação de Drp1, uma proteína semelhante à dinamina que desempenha um papel na fissão mitocondrial. O bloqueio da nitrosilação de Drp1 pela mutação da cisteína anula a disfunção mitocondrial induzida por β -amilóide e suprime a plasticidade sináptica (CHO et al., 2009).

As mitocôndrias danificadas são principalmente degradadas pela autofagia, um processo conhecido como mitofagia. A mitofagia está prejudicada na DA, e um dos mecanismos subjacentes a esse comprometimento é a disfunção lisossômica. Mutações no PS1 reduzem a atividade da hidrolase lisossomal (LEE et al., 2010). O acúmulo intracelular de tau do tipo selvagem também induz um déficit de mitofagia pela alocação da proteína tau às mitocôndrias. Além disso, a regulação negativa de fatores de autofagia, como Beclin1 e SIRT1, também contribui para a diminuição da mitofagia em cérebros com DA (FANG et al., 2016). Consistentemente, melhorar a mitofagia pela supressão de mTOR ou por mTOR-independente significa melhorar a patologia semelhante à AD, como as de β -amilóide e tau e os déficits cognitivos em modelos de camundongos da DA (CACCAMO et al., 2013).

1.7. *Drosophila melanogaster* como um modelo transgênico para Doença de Alzheimer

O uso de modelo animal para estudar aspectos moleculares de várias patologias humanas é muito útil principalmente para desordens neurodegenerativas. Como a biópsia no cérebro é uma tecnologia muito invasiva e deve ser evitada devido ao potencial dano tecidual, bem como esta, e outras técnicas serem limitadas pelo risco à vida do paciente, os modelos de doença são uma boa alternativa.

A *Drosophila melanogaster* tem mais de cem anos de história em pesquisa genética. É usado como organismo modelo principal para estudos experimentais de biologia eucariótica multicelular e combina vantagens genéticas, anatômicas, comportamentais, metódicas e até econômicas. É um dos primeiros organismos com um genoma totalmente sequenciado. Aproximadamente 13.600 genes codificadores de proteínas estão localizados em apenas quatro cromossomos (ADAMS et al., 2000). A anatomia da mosca é bem estudada, seu cérebro e sistema nervoso são bastante complexos. Suas características anatômicas como o olho composto permitem fácil acesso para caracterização fenotípica. O comportamento da mosca varia de simples evitação a aprendizagem e memória (NICHOLS, 2006).

Devido à sua longa história como modelo animal em pesquisa, uma grande variedade de ferramentas de genética molecular bem estabelecidas estão disponíveis. Modelos transgênicos de *Drosophila melanogaster* já provaram ser eficientes para o estudo de doenças neurodegenerativas, bem como para o teste de novas drogas potenciais para essas doenças (ALI et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2011).

O modelo utilizado neste estudo imita a formação de placas β -amilóide nas células cerebrais de *D. melanogaster*, expressando em excesso os genes humanos APP e BACE. Para isso, utilizamos um sistema GAL4/UAS que consiste em um gene que codifica um ativador transcricional (Gal4) e uma quantidade de gene ou potenciador que é uma sequência específica a ser ativada (UAS) (YAO; WHITE, 1994). Neste modelo usamos especificamente uma sequência promotora que direciona a expressão proteica para o pan-neural (elav) no Gal4 (o controlador pan-neural elav-Gal4) e um driver para a APP (UAS-APP) e BACE (UAS-BACE) genes humanos. Assim, após o direcionamento / resposta cruzada, os arquivos F1 expressam ambos os genes no sistema nervoso central (CHAKRABORTY et al., 2011).

2. Objetivos gerais e específicos

2.1. Objetivo Geral

Elucidar quais potenciais vias metabólicas estão alteradas no modelo transgênico de *Drosophila melanogaster* para acúmulo neuronal de β -Amiloide.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar através do uso de fármacos que agem no metabolismo da glicose e dos lipídeos possíveis melhoras nos sintomas da doença de Alzheimer neste modelo animal.

Bem como trazer mais informações sobre como as vias do metabolismo se alteram neste modelo, inclusive a relação mitocondrial na alteração destas vias.

Também avaliar neste modelo possíveis alterações de expressão de genes mitocondriais, de miRNAs e lncRNAs.

3. Material e métodos

3.1. Estoque de moscas

A linhagem de tipo selvagem Canton-S foi usada como controle. O *driver* pan-neural elav-Gal4, UAS-GFP e o *responder* UAS-APP, UAS-BACE / TM6, foram adquiridos do Bloomington Drosophila Stock Centre (números de estoque 5146 e 33793). As moscas elav-Gal4,UAS-GFP>UAS-BACE,UAS-APP foram obtidas a partir do cruzamento de machos da linhagem UAS-BACE / TM6 com fêmeas virgens do elav-Gal4.

Todas as moscas foram mantidas a 25°C num ciclo de 12 horas de claridade e 12 horas de escuro, sob uma humidade constante de 60%. O meio de cultura consiste em 1g de meio (75% de purê de batata em pó, 15% de extrato de levedura, 9,3% de glicose e 0,7% de metil parabeno) e 4 mL de água.

3.2. Teste de longevidade

Para selecionar a dosagem que levou a uma maior taxa de ação, mas sem os possíveis efeitos tóxicos que tornariam o tratamento mais prejudicial do que benéfico, foi avaliado a variação de sobrevivência para cada dose da droga. Um total de oito dosagens foram testadas, 10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 10mM, 25mM, 100mM e 1M, totalizando assim 8 grupos teste e um grupo controle (sem fármaco).

Para este teste foram coletadas 150 moscas Canton S por grupo nas primeiras 24 horas após a eclosão e divididas em 5 frascos com 30 moscas cada. A cada 3 dias os frascos com a respectiva dosagem do fármaco diluído em meio alimentar fresco foram trocados e o número de moscas mortas foi contabilizado. Moscas que morreram devido ao manuseio não foram contadas.

Ao final de 61 dias, a curva de sobrevida foi analisada pelo teste Logrank para as tendências. A dosagem que obteve os melhores resultados de sobrevida foi selecionada para os próximos testes.

3.3. Teste de escalada

O comportamento reflexo motor de *D. melanogaster* foi analisado pelo teste de escalada. Este teste leva em conta a característica inata das moscas de geotaxia negativa, no qual, caso estejam saudáveis, elas tendem a se manter na parte superior do recipiente na qual estejam acondicionadas. Para cada grupo, 3 tubos (25 x 95mm) contendo 10 moscas cada ($n = 30$ por grupo) foram colocados lado a lado em um suporte (Figura 1), comparando sempre cada droga a um grupo controle no mesmo teste. Após a aclimatização de 20 minutos, o suporte foi batido em uma seção semi-rígida para que todas as moscas caíssem no fundo do tubo, a partir de 4 segundos foram gravados com câmera de vídeo, e o número de moscas que estavam na metade dos tubos foi contado. A comparação entre os grupos tratado e controle foi analisada pelo teste t.

3.4. Teste de aversão

A capacidade de aprendizagem e memória das moscas foi determinada utilizando o teste de fototaxia de supressão por aversão, que consiste em usar um elemento aversivo (citronela) para ensinar *D. melanogaster* a não seguir um instinto natural de seguir para o ambiente com maior luminosidade (fototaxia positiva).

Para este teste, usamos um sistema adaptado de um trabalho de 2017 de Ali et al. que consiste em um suporte para fixação de dois tubos com uma porta, isso permite abrir ou fechar o acesso de um tubo ao outro. Um tubo é totalmente isolado da luz (câmara escura) e o outro contém um feixe de luz na ponta (câmara de luz).

Anteriormente, vinte *D. melanogaster* com fototropismo positivo foram selecionados por grupo (esta seleção tem como intuito evitar que moscas com algum tipo de deficiência, como má formação congênita dos olhos, levasse a um viés no teste) e, em seguida, uma por uma as moscas foram treinadas. O treinamento consiste em colocar uma mosca na câmara escura por 30 segundos para aclimação e, em seguida, abrir lentamente a porta do sistema, permitindo que ele se mova para a câmara de luz, onde há um filtro de papel embebido em citronela. Depois de um minuto nós colocamos o aparato na posição vertical com a câmara escura voltada para a parte inferior, então batemos o aparato em uma superfície semi-rígida para que a mosca volte para a câmara escura e fechamos a

porta, este procedimento é feito 10 vezes por mosca para que ela aprenda que na câmara clara esta presente o elemento repelente.

Imediatamente após o treinamento de cada mosca, realizamos o teste de aprendizado. Para isso, a porta foi aberta e contados 10 segundos para a mosca passar para a câmara de luz, nos casos em que a mosca não passa para a câmara clara neste tempo, consideramos que a mosca aprendeu.

Para o teste de memória, selecionamos as moscas que passaram no teste de aprendizado e as deixamos por 6 horas em um tubo contendo meio de alimentação. Após 6 horas, repetimos o teste de aversão deixando-as 30 segundos na câmara escura para aclimação e, então, abrimos a porta que dá acesso a câmara clara, se a mosca não caminhar para a luz, isso significa que se lembrou da aprendizagem.

3.5. Análises histológicas

Para os testes morfológicos, 10 cabeças de moscas por grupo foram fixadas em Carnoy (60% de álcool etílico, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético), processadas para parafina, seccionadas em micrótomos de 5µm de espessura e colocadas em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e fotografadas sob microscopia de luz. A porcentagem de áreas de vacúolos em relação à área total de cada cérebro foi medida usando o software ImageJ. Quinze imagens de cérebros do grupo controle foram analisadas, 14 imagens do grupo tratado. As porcentagens finais foram comparadas usando ANOVA.

3.6. Medição de glicose da cabeça das moscas

Para quantificação da glicose foi utilizado todo o corpo de *D. melanogaster*. As cabeças das moscas foram maceradas individualmente com 5,0 µL de água ultrapura. Esses materiais foram centrifugados em microcentrífuga e 4,0 µL do sobrenadante foram coletados para a medição de glicose no Sistema de Monitoramento de Glicose Contínua no Soro TS (Bayer). A faixa de medição deste equipamento é de 0,6 a 33,3 mmol/L (10,81 mg/dL a 600 mg/dL).

3.7. PCR quantitativa (qPCR)

Para o teste de qPCR, cerca de 15 cabeças por *pool*/ mínimo de 3 *pool* por grupo amostral. As cabeças dissecadas foram rapidamente transferidas para a solução de Trizol (Invitrogen) e moídas para a preparação de RNA. O RNA foi extraído seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado e o qPCR foi realizado utilizando a mistura principal de PCR SYBR (TaKaRa).

Analizamos a expressão dos genes da proteína de choque térmico de 70kDa (hsp70) e da Serina/treonina quinase (Akt) e os níveis mRNA foram calculados pelo fold change em relação ao controle endógeno mRNA rpl32. O método do limiar do ciclo comparativo (Ct) foi aplicado para estimar os níveis de mRNA. Os produtos de PCR foram analisados no Applied Biosystems® 7300 Real-Time PCR.

Foram utilizados os seguintes primers: Akt, For-5'-TTCGTTCCGTCCTCTGGTGT-3' e Rev-5'-GCGTGTGTTGTTGTTGCTGC-3'; Hsp70 Para-5'-CGGAGACACACACTTGGGCG-3' e Rev-5'-GCTGCTGTTCTGAGGCGTCG-3' e Rpl32 Para-5'-GACCATCCGCCCAGCATAC-3 e Rev-5'-AACAGAGTGCGTCGCCG-3.

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão de mitocôndrias

Para avaliar alterações mitocondriais entre o grupo parental e o grupo modelo para doença de Alzheimer, cabeças de moscas com 10 dias de idade forma incluídas com glutaraldeído e cortadas para microscopia eletrônica de transmissão, para avaliar a área quadrada das mitocôndrias foi utilizado o software Image J.

3.9. Sequenciamento de nova geração de moscas D. Alzheimer e Controle

Para análise foi preparado quatro grupos dois grupos controle parental (elav-Gal4 com 0 dias e 10 dias de vida) e dois grupos modelo para Doença Alzheimer (0 dias e 10 dias). Foram removidas 50 cabeças de moscas por grupo, e imediatamente inseridas em um microtubo com azoto líquido e armazenadas a -80°C até utilização. O kit Dynabeads mRNA Direct (Life Technologies) foi usado

para o isolamento do mRNA de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de ácido nucleico foi feita usando um Qubit (Thermo Fisher). Cada amostra foi processada em duplicata e as bibliotecas foram preparadas utilizando o kit de Ion Total ARN-seq v2 (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado com um chip Ion PI (Life Technologies) com o kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 em um sistema automatizado Ion Chef (Life Technologies) que embarca um sequenciador Ion Proton (Life Technologies).

As bibliotecas de *reads* geradas pelo IonTorrent foram, então, *trimmadas*. Essa “lapidação” digital das *reads* tem função de manter todas as bibliotecas com um padrão de qualidade e de características mínimo, e também remover restos de adaptadores que podem não ter sido removidos corretamente pelo programa do próprio equipamento. Para isso foram utilizadas as ferramentas Cutadapt (MARTIN, 2013) para a remoção de adaptadores resquiciais, e o FASTQ Quality Trimmer (BLANKENBERG et al., 2010) para manter todas as *reads* com um escore de qualidade Phred maior 20, e um tamanho mínimo de 40 bases. Este escore de qualidade Phred é a probabilidade logarítmica dada a cada nucleotídeo sequenciado de que este tenha sido sequenciado de forma errônea, portanto um phred de 20 significa que o read tem 1 chance em 100 de ter sido sequenciado erroneamente (portanto 99% de acurácia). Já o tamanho mínimo de 40 nucleotídeos evita que os *reads* sejam demasiadamente curtos, o que tornaria seu alinhamento menos específico nos testes a serem feitos.

Após a trimagem, o controle de qualidade das bibliotecas foi aferido utilizando o software FastQC (ANDREWS, 2005), que indica a qualidade geral e por tamanho de *reads*, quantidade conteúdo GC por sequência, número de bases não sequenciadas (N), distribuição dos *reads* por tamanho, presença de adaptadores, número de reads duplicados, entre outras verificações de qualidade.

3.10. Expressão diferencial de genoma mitocondrial

As bibliotecas já trimadas foram mapeadas contra o genoma mitocondrial de *D. melanogaster*, a partir da versão de genoma *Release 6 plus ISO1 mitochondrial genome* (NCBI BioProject: PRJNA13812, executado pelo grupo: The FlyBase Consortium/Berkeley Drosophila Genome Project/Celera Genomics), afim de se

obter a quantidade de reads alinhados em cada gene (Count), bem como sua contagem normalizada em transcritos por milhão (TPM), e a cobertura de reads para cada gene (Lenght). Para isso foi utilizado o software Salmon (PATRO et al., 2016).

Para se obter a expressão diferencial entre os genes mitocondriais de cada grupo, os *counts* gerados pelo Salmon foram, então, utilizados no aplicativo DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Este aplicativo estima a variância média dos *counts* e testa para expressão diferencial baseado em um modelo que utiliza distribuição binomial negativa, utilizando uma normalização a partir de redução das estimativas de dispersão de cada gene e fold change.

3.11. Expressão diferencial de miRNA e lncRNA

Para avaliar a expressão diferencial entre os miRNAs (microRNAs) e os lncRNA (long non-coding RNA) das moscas modelo para acúmulo neuronal de β -amilóide em comparação as não modelo, utilizamos as bibliotecas já trimadas que foram utilizadas para o mapeamento para expressão diferencial de genoma mitocondrial.

Contudo, para o mapeamento dos reads e subsequente geração dos valores de TPM, Count e Lenght pelo programa Salmon (PATRO et al., 2016), foram utilizados os bancos de dados de miRNA e lncRNA de *Drosophila melanogaster* fornecidos pelo projeto Flymine (LYNE et al., 2007) no qual estão presentes os miRNAs e lncRNAs descritos ou previamente preditos, e o banco de dados Rfam versão 13 (KALVARI et al., 2018) que trata de ncRNAs (non-coding RNAs) de inúmeras espécies. O uso deste segundo banco de dados teve o intuito de cobrir possíveis ncRNAs não presentes nos dois bancos de dados do Flymine.

Para se obter a expressão diferencial entre os ncRNAs de cada grupo, os *counts* gerados pelo Salmon foram, então, utilizados no aplicativo DESeq2.

3.12. Predição de alvos para miRNA

Para a predição de alvos dos três miRNA de nosso interesse, com anotação tanto em 3' quanto 5' foi utilizado o software microT-CDS (PARASKEVOPOULOU et al., 2013) da plataforma DIANA Web Service v5.0.

3.13. Análises estatísticas

Todos os testes estatísticos sobre as diferentes metodologias foram realizados no software GraphPad Prism 6.01 da GraphPad Software.

4. Resultados

4.1. Glimepirida

4.1.1. A ingestão de glimepirida pode modular a sobrevivência das moscas.

Observaram-se efeitos significativos dose-dependentes nas moscas tratadas com glimepirida. O aumento na sobrevida das moscas foi observado até 25 μ M, seguido pela redução nas taxas de sobrevivência em doses mais elevadas. Este perfil é provavelmente devido à relação entre o efeito benéfico e a toxicidade das drogas testadas (Figura 1). Das 8 concentrações de glimepirida testadas, a maior taxa de sobrevivência foi de 25 μ M, que promove aumento de 106,74% na sobrevida de moscas não tratadas. Portanto, esta concentração foi escolhida para realizar os outros testes.

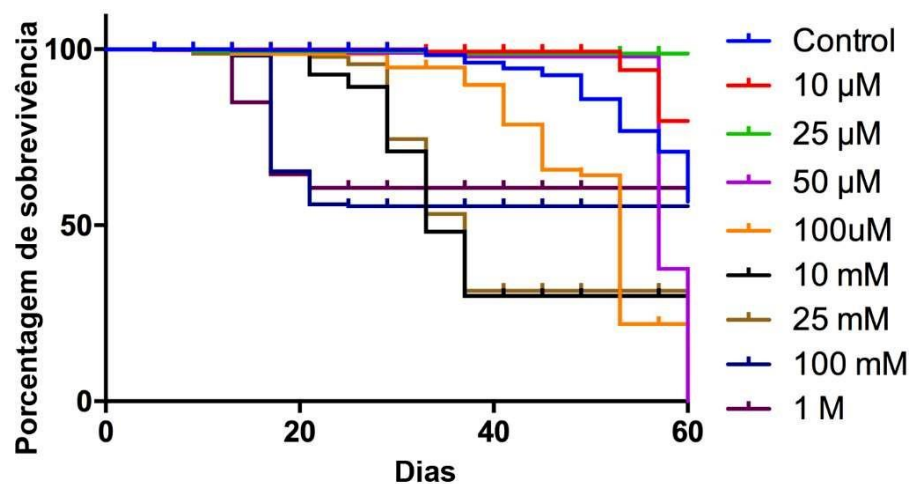


Figura 1: Efeito de diferentes dosagens do tratamento com glimepirida na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevida das amostras. Com exceção da dose a 50 μ M ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

4.1.2. Glimepirida melhora as moscas no teste de escalada

O teste de escalada mostrou uma melhora significativa ($P < 0,05$) no comportamento reflexo motor para os grupos tratados com glimepirida em relação ao grupo não tratado (Figura 2).

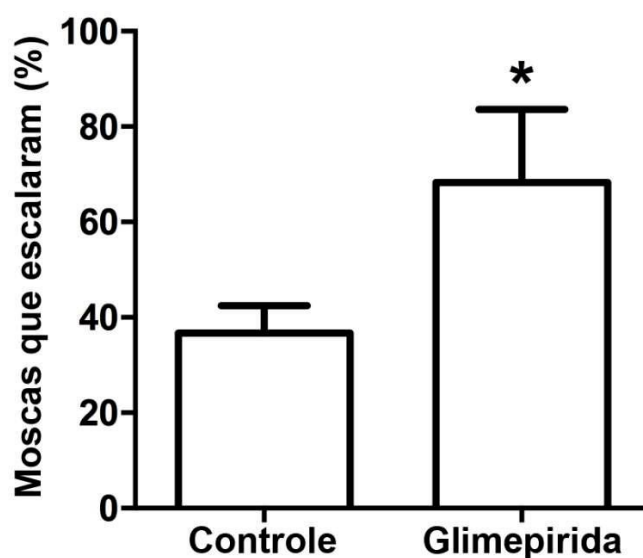


Figura 2: Medição do comportamento de subida do *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* não tratado e tratado com 25 μ m de glimepirida (Teste t não pareado, $P < 0,05$. N = 30 moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

4.1.3. Aprendizagem e memória foram reforçadas por glimepirida

O teste de supressão de fototaxia por aversão mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos. A diferença entre o grupo Alzheimer não tratado e o grupo selvagem foi tomada como o fator de verificação para a eficiência do teste. O grupo tratado com glimepirida apresentou melhora estatisticamente perceptível quando comparado ao grupo não tratado (Figura 3).

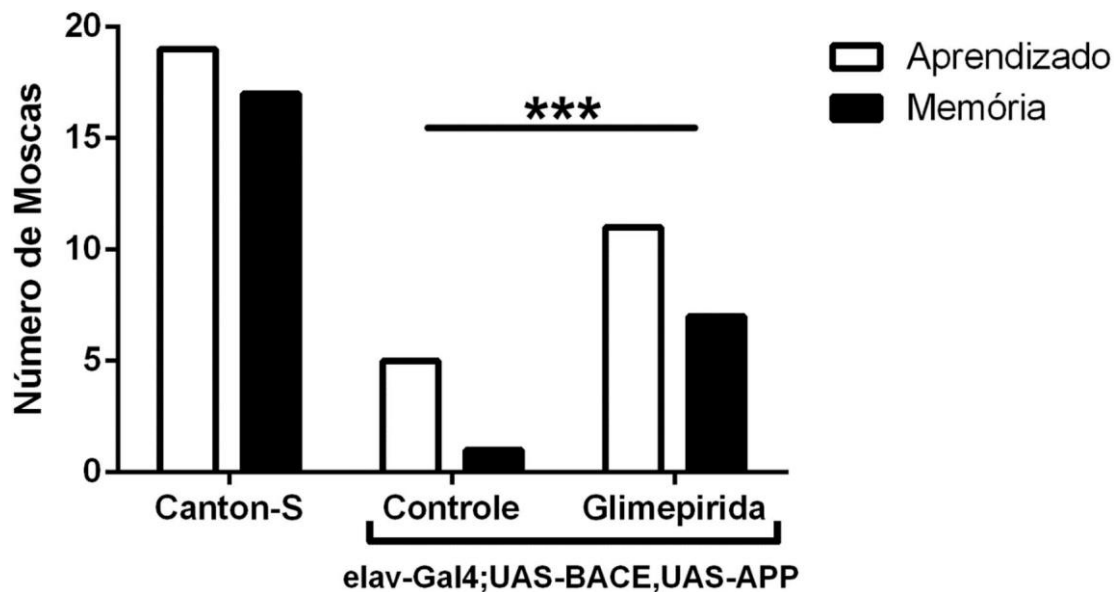


Figura 3 : Comparação entre moscas Canton-S e elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE não tratados e tratados com 25µM glimepirida em relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

4.1.4. A concentração de glicose foi reduzida pelo tratamento com glimepirida.

Para confirmar se o tratamento com glimepirida foi capaz de diminuir a glicose nas moscas, como nos mamíferos, e devido à dificuldade de coletar a hemolinfa nas moscas adultas, a glicose foi quantificada a partir do corpo inteiro (Figura 4). Não há diferenças entre o tipo selvagem Canton-S (média $83,11 \pm 5,07$ SD) e o elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE (média $84,11 \pm 57,71$ SD) ($P > 0,05$). No entanto, o tratamento com glimepirida foi capaz de diminuir significativamente o título de glicose em moscas tratadas (média de $76,11 \pm 4,82$ SD) comparado para não tratado ($P < 0,001$). Todos os valores de glicose são expressos em mg/dL.

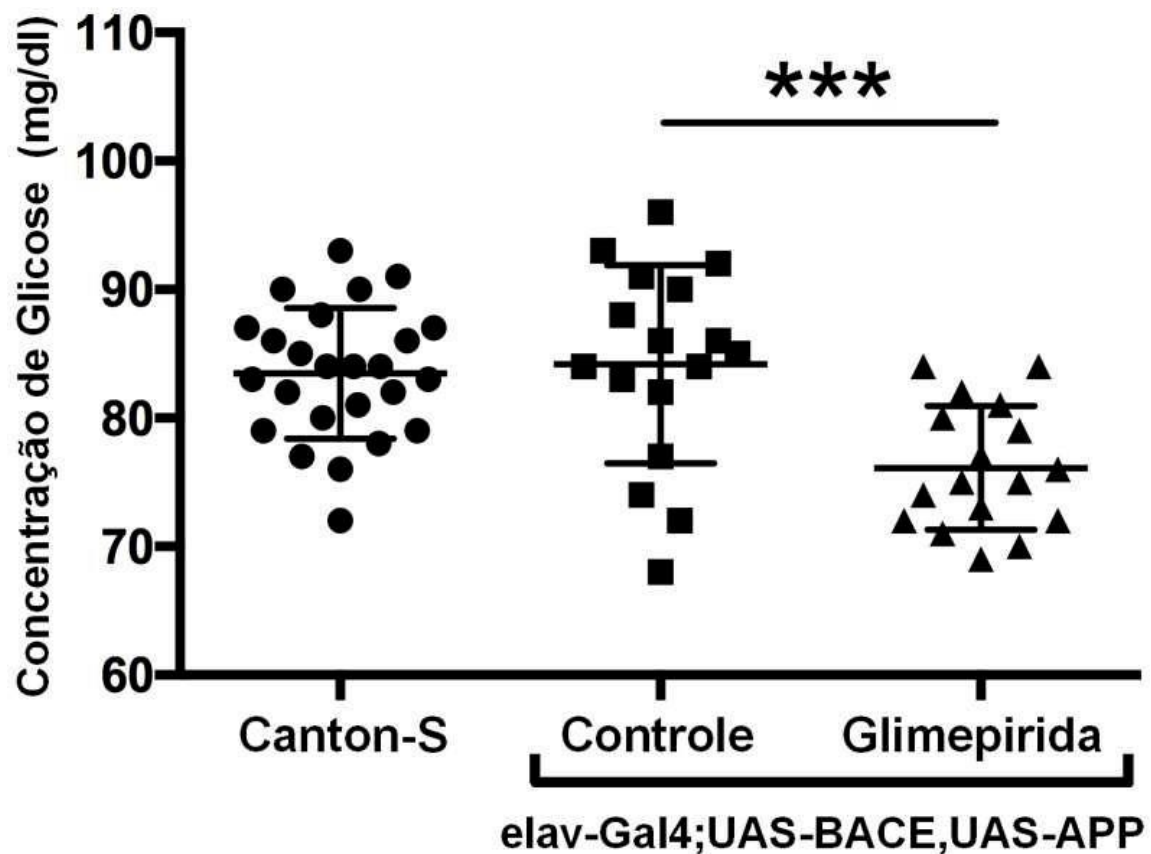


Figura 4 : Quantificação de glicose das cabeças de moscas de Canton S e ~~da~~ Gal4>UAS-APP,UAS-BACE (sem tratamento e tratada com glimepirida). O teste ANOVA foi usado seguido por Bonferroni como pós-teste ($P < 0,001$). As linhas representa a media e o desvio padrão.

4.1.5. A glimepirida reduz a área de vacúolos no cérebro com Alzheimer.

A porcentagem da área ocupada pelos vacúolos em relação à área total dos cérebros das moscas do grupo controle (Alzheimer não tratada) foi de 8,13%. O tratamento com glimepirida promoveu melhora significativa na redução da área relativa de vacúolos em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 5).

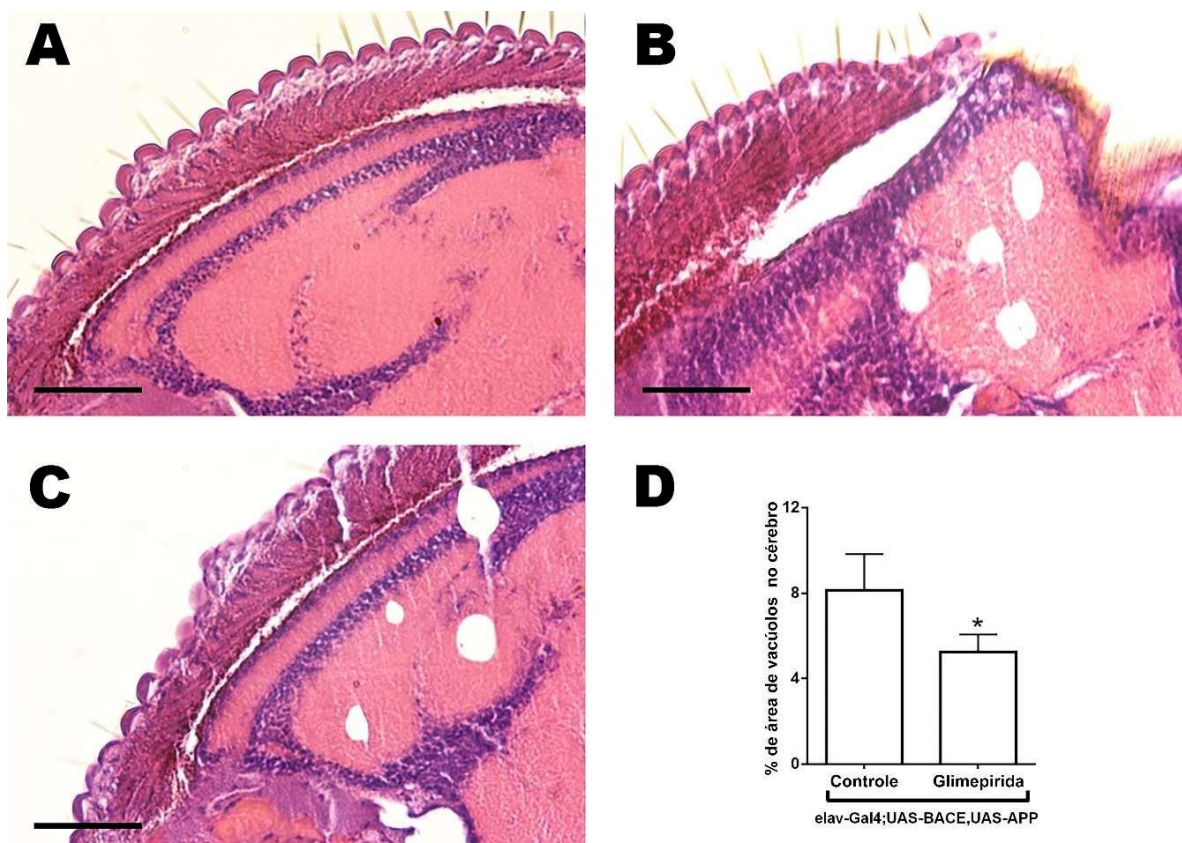


Figura 5 : Análise histopatológica da cabeça das moscas. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. A barra preta significa 25 µm. A: tecido da mosca Canton-S. B: tecido de elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE não tratada e (C) tratada com 25µM de glimepirida. D: Comparação da porcentagem de área de vacúolos em relação à área total do cérebro de glimepirida elav-Gal4 25µM não tratada e tratada com moscas UAS-APP,UAS-BACE (Teste t não pareado, n = 12 moscas para o grupo tratado e n = 10 para não tratada).

4.1.6. Redução dos níveis de mRNA dos genes *akt* e *hsp70* pelo uso da glimepirida.

Para verificar os efeitos da ingestão de glimepirida pelas moscas nas vias bioquímicas, os genes *akt* e *hsp70* foram escolhidos para quantificar os níveis de mRNA por qPCR.

Os transcritos dos genes *akt* (Figura 6, A) e *hsp70* (Figura 6, B) no grupo tratado com glimepirida foram significativamente menores ($P < 0,05$) do que no grupo não tratado (Figura 6).

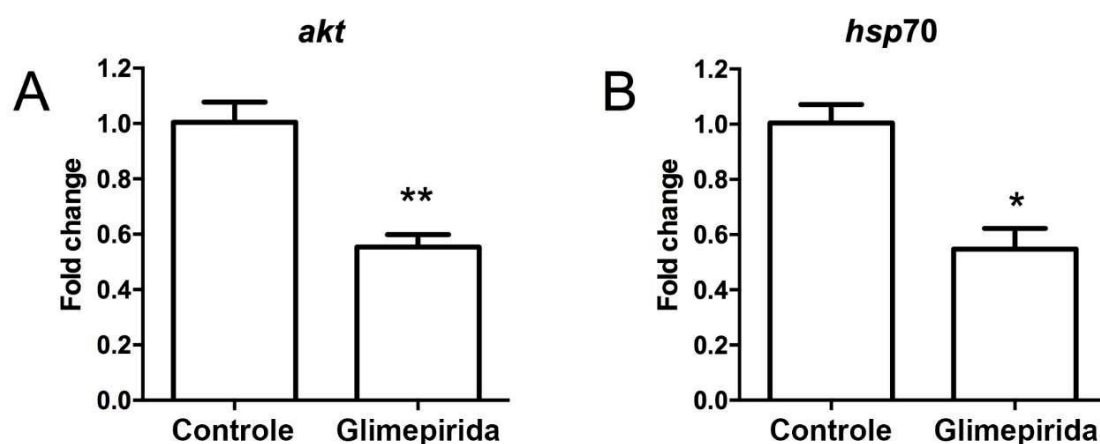


Figura 6 : Quantificação de transcritos por qPCR comparando a expressão de moscas *elav-Gal4<UAS-APP,UAS-BACE* não tratadas e tratadas com 25 μ m de glimepirida. (A) *akt* e (B) genes *hsp70*. Os níveis de transcrição foram normalizados para o controle endógeno *rpl32*. (Teste t não pareado, $P < 0,001$).

4.2. Metformina

4.2.1. O tratamento com metformina aumentou a longevidade.

Com o tratamento de metformina as moscas tiveram maior longevidade mesmo em dosagens baixas (estatisticamente significativo a partir de 10mM). Entretanto, nas dosagens mais altas (1M e 100mM) observou-se uma redução na taxa de sobrevivência, que provavelmente causaram algum efeito tóxico. De todas as 8 concentrações de metformina testadas, a com melhor taxa de sobrevivência foi de 25mM (Figura 7). Esta dosagem foi, então, escolhida para ser utilizada nos demais testes.

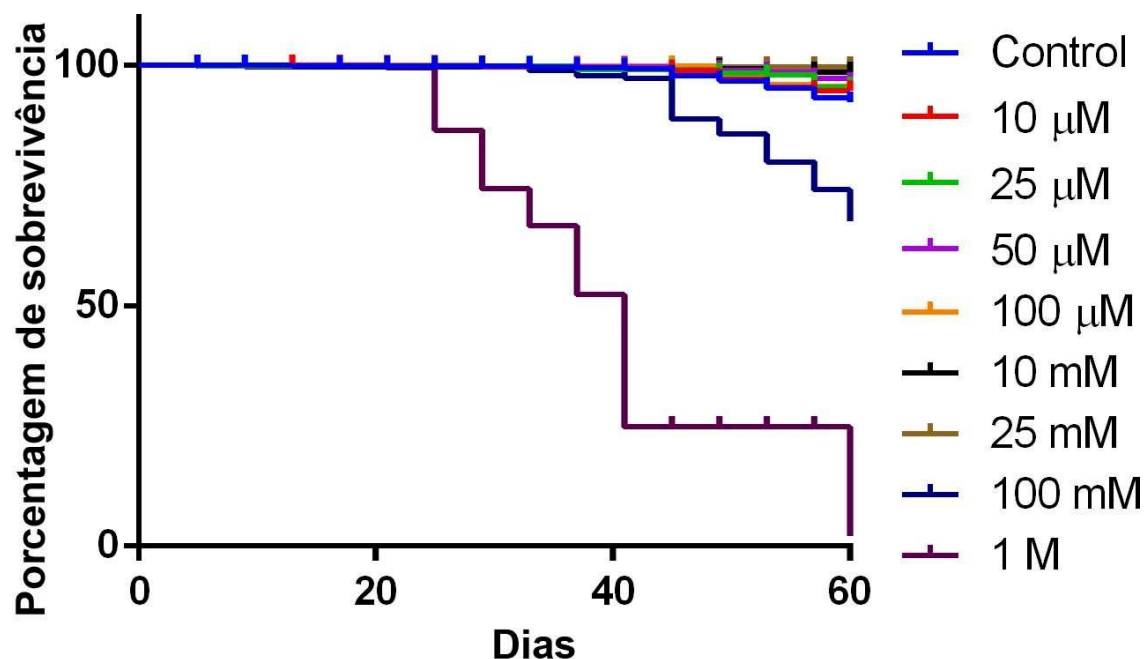


Figura 7 : Efeito de diferentes dosagens do tratamento com glimepirida na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton-S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência das amostras. Com exceção das doses a 10 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

4.2.2. O teste de escalada não mostrou melhora com a metformina.

O teste de escalada comparativo entre moscas *elav-Gal4>UAS-APP* tratadas e não tratadas com metformina não levou a diferença significativa ($P < 0,05$) (Figura 8).

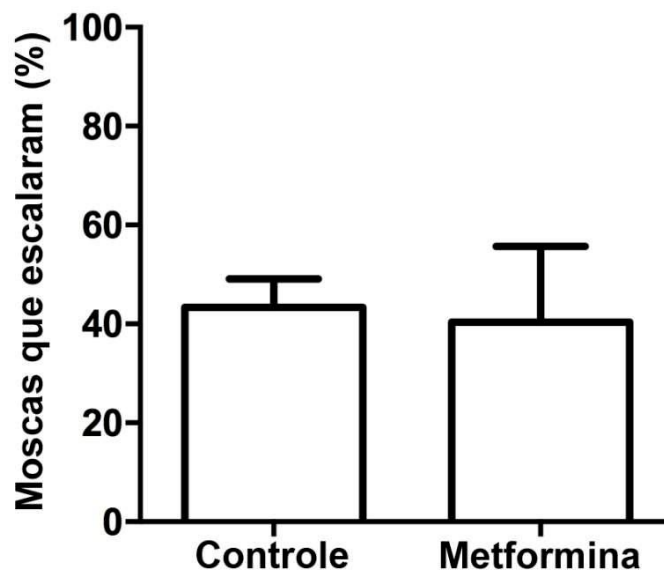


Figura 8 : Medição do comportamento de subida do *elav-Gal4>UAS-APP,UAS- BACE* não tratado e tratado com 25mM de metformina (Teste t não pareado, $P < 0,05$. N = 30 moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

4.2.3. Melhor desempenho de aprendizado e memória com metformina.

O teste de memória e aprendizado por supressão de fototaxia através de elemento aversivo resultou em diferença significativa entre os grupos selvagem, e Alzheimer tratado e não tratado. A diferença entre o grupo Alzheimer não tratado e o grupo selvagem foi tomada como o fator de verificação para a eficiência do teste. O grupo tratado com 25mM de metformina apresentou resposta significativa quando comparado ao grupo não tratado (Figura 9).

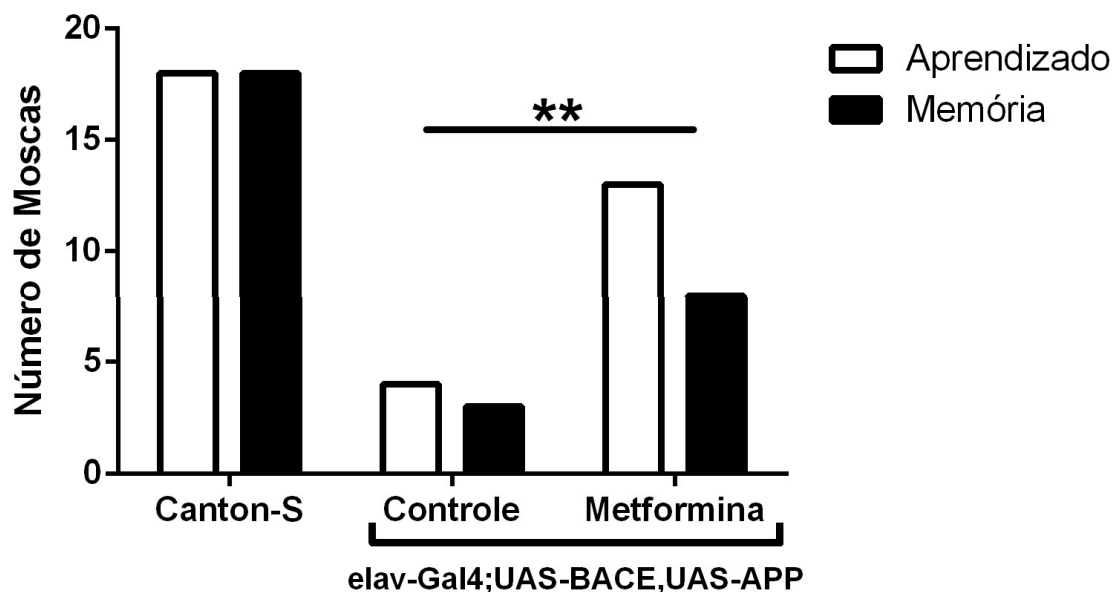


Figura 9: Comparação entre moscas Canton-S e elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE não tratados e tratados com 25mM de metformina em relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

4.2.4. Tratamento com metformina 25mM reduziu a glicose total.

A partir da dosagem de glicose feita com macerado de corpo inteiro de cada mosca, nós avaliamos a capacidade de redução de concentração de glicose nas moscas do tratamento com 25mM de metformina (Figura 10). Não há diferenças entre o tipo selvagem Canton-S e o elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE ($P > 0,05$). Porém, o tratamento com metformina foi capaz de diminuir significativamente o título de glicose em moscas tratadas comparado para não tratado ($P < 0,05$). Todos os valores de glicose são expressos em mg/dL.

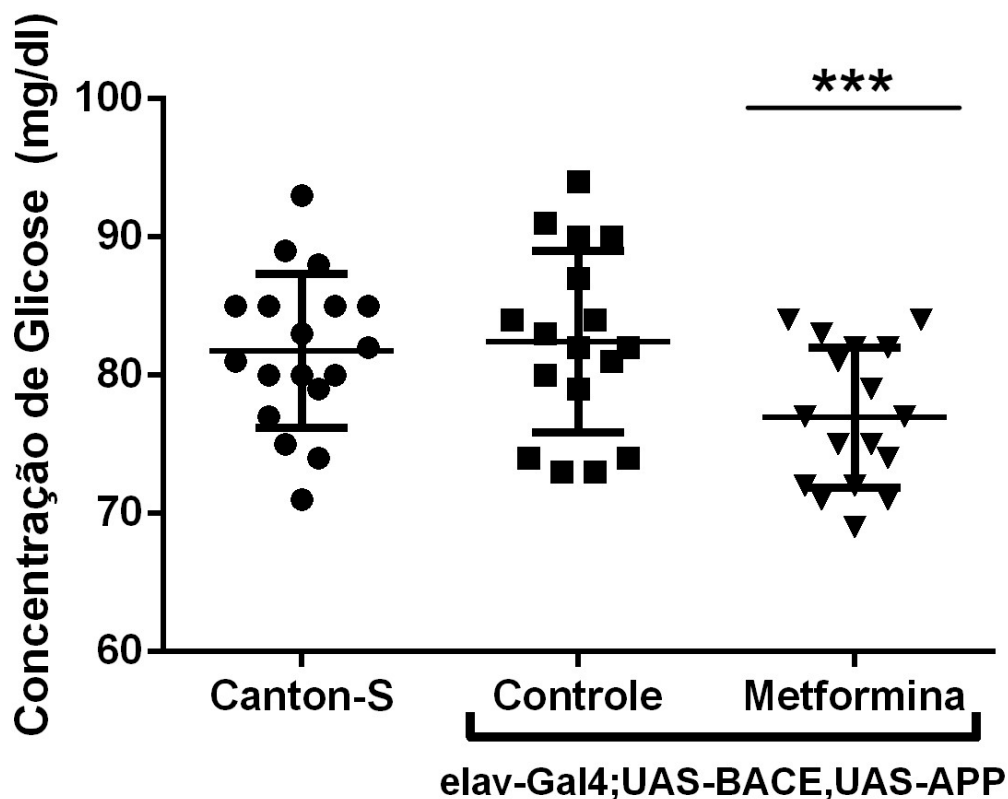


Figura 10: Quantificação de glicose da cabeça de moscas de Canton-S e *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* (sem tratamento e tratada com 25 mM de metformina). Teste Anova One-Way ($P < 0,05$). As linhas representam a média e o desvio padrão.

4.3. Sinvastatina

4.3.1. Maior longevidade no tratamento com sinvastatina.

A sinvastatina levou a um aumento na sobrevivência de forma dose-dependente. Com exceção das concentrações 10 μM e 25 μM , todas as outras concentrações foram estatisticamente significativas. Entretanto apenas as dosagens 50 μM e 100 μM tiveram efeito benéfico aumentando a longevidade. Nas dosagens mais altas foi observado o efeito contrário, um aumento da mortalidade nas moscas, provavelmente por algum efeito tóxico causado pelo tratamento. De todas as 8 concentrações de sinvastatina testadas, a com melhor taxa de sobrevivência foi de 100 μM (Figura 11). Esta dosagem foi, então, escolhida para ser utilizada nos demais testes.

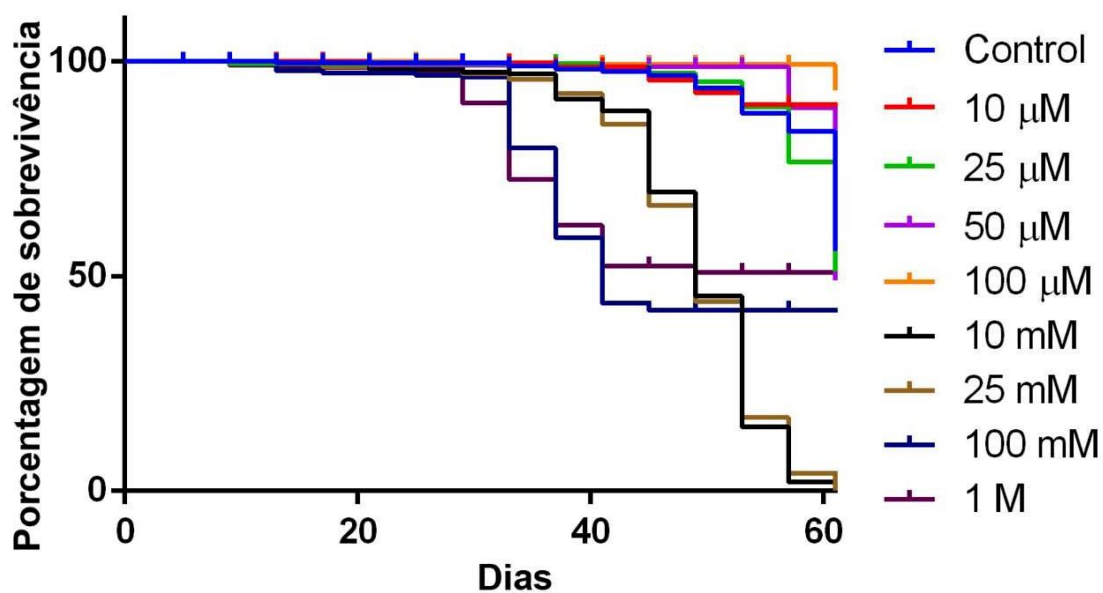


Figura 11: Efeito de diferentes dosagens do tratamento com sinvastatina na sobrevivência da linhagem *Drosophila melanogaster* Canton-S. O estimador de Kaplan-Meier e o teste log-rank foram utilizados para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência das amostras. Com exceção da dose a 10 µM e 25 µM ($P > 0,05$), todos os concentrados testados foram significativos em comparação ao não tratado ($P < 0,01$).

4.3.2. Melhora no teste de escalada pelo uso de sinvastatina.

Com intuito de avaliar uma possível melhora na capacidade inata de geotaxia negativa das moscas tratadas em comparação as não tratadas, o teste de escalada foi executado, e mostrou uma melhora significativa ($P < 0,05$) no comportamento reflexo motor para os grupos tratados com sinvastatina 100 µM em relação ao grupo não tratado (Figura 12).

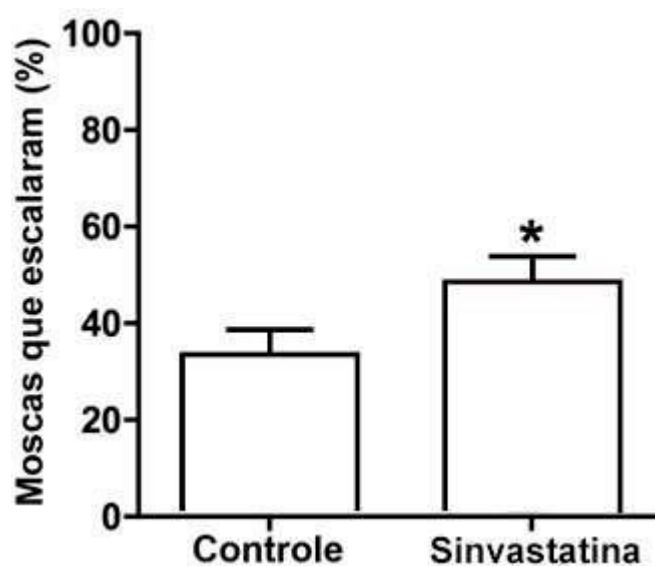


Figura 12: Medição do comportamento de escalada do *elav-Gal4>UAS-APP,UAS-BACE* não tratado e tratado com 100 μ M de sinvastatina (Teste t não pareado, $P < 0,05$. N = 30 moscas para cada grupo). Barra de erro representa o desvio padrão.

4.3.3. Tratamento com sinvastatina possibilitou melhor aprendizado e memória.

O teste de condicionamento aversivo mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos. Sendo a diferença entre o grupo Alzheimer não tratado e o grupo selvagem utilizada como o fator de verificação para a eficiência do teste. O grupo tratado com sinvastatina apresentou melhora significativa quando comparado ao grupo não tratado (Figura 13).

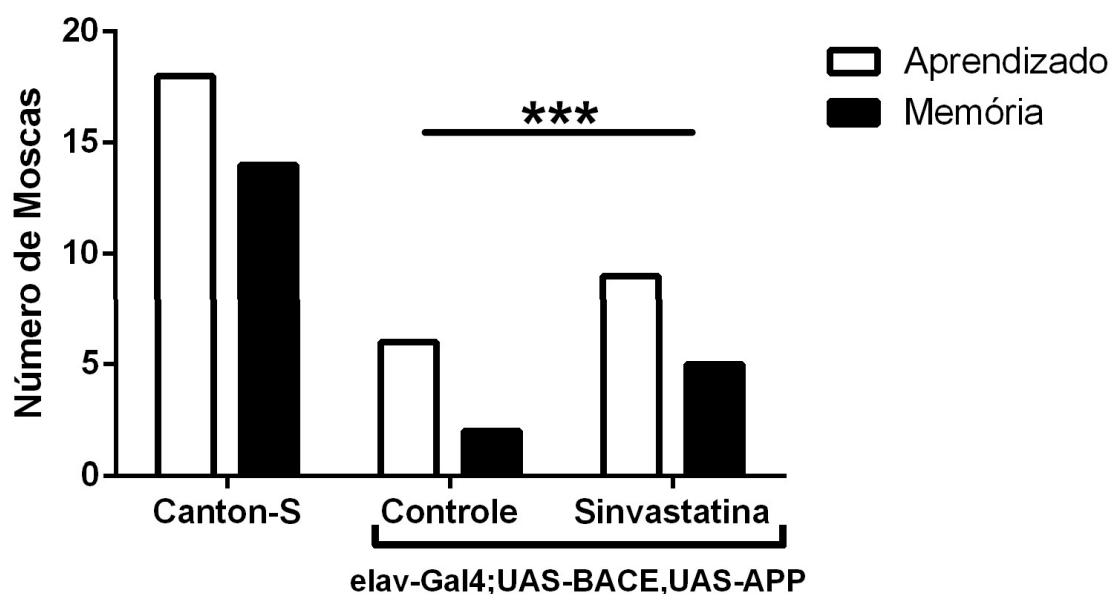


Figura 13 : Comparação entre moscas Canton-S e elav-Gal4>UAS-APP,UAS- BACE não tratados e tratados com 100 μ M de sinvastatina em relação à capacidade de aprendizagem e memória (ANOVA, Bonferroni post-test, $P < 0,05$, $n = 20$ moscas para cada grupo).

4.3.4. Menor expressão dos genes akt hsp70 com tratamento por sinvastatina.

A expressão dos genes akt (Figura 14, A) e hsp70 (Figura 14, B) no grupo tratado com 100 μ M de sinvastatina foram significativamente menores ($P < 0,05$) do que no grupo não tratado.

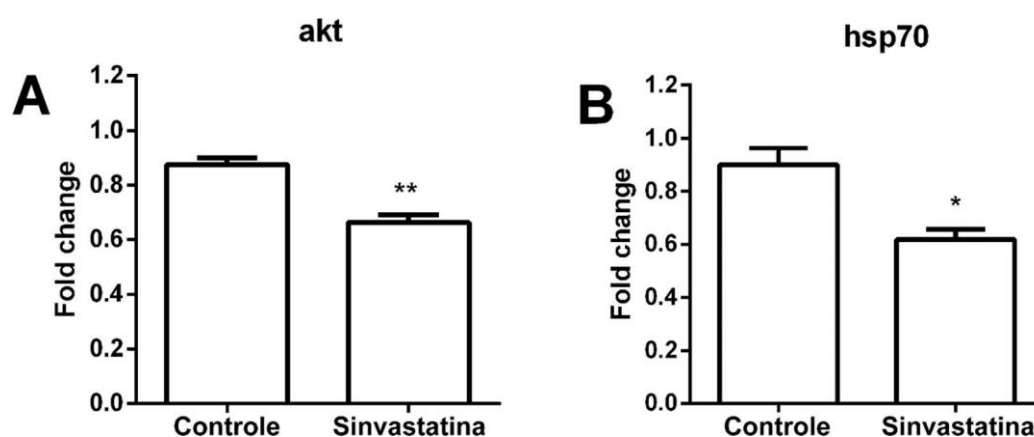


Figura 14 : Quantificação de transcritos por qPCR comparando a expressão de moscas *elav-Gal4<UAS-APP,UAS-BACE* não tratadas e tratadas com 100 μ M de sinvastatina. (A) *akt* e (B) genes *hsp70*. Os níveis de transcrição foram normalizados para o controle endógeno *rpl32*. (Teste t, $P < 0,001$).

4.4. Micrografia eletrônica de transmissão e tamanhos de mitocôndria.

A partir da micrografia gerada pela microscopia eletrônica de transmissão, foi avaliado a área quadrada de 25 mitocôndrias por grupo pelo aplicativo ImageJ. Não houve diferença do tamanho da área das mitocôndrias do grupo modelo para Alzheimer em relação ao grupo controle parental (figura 15).

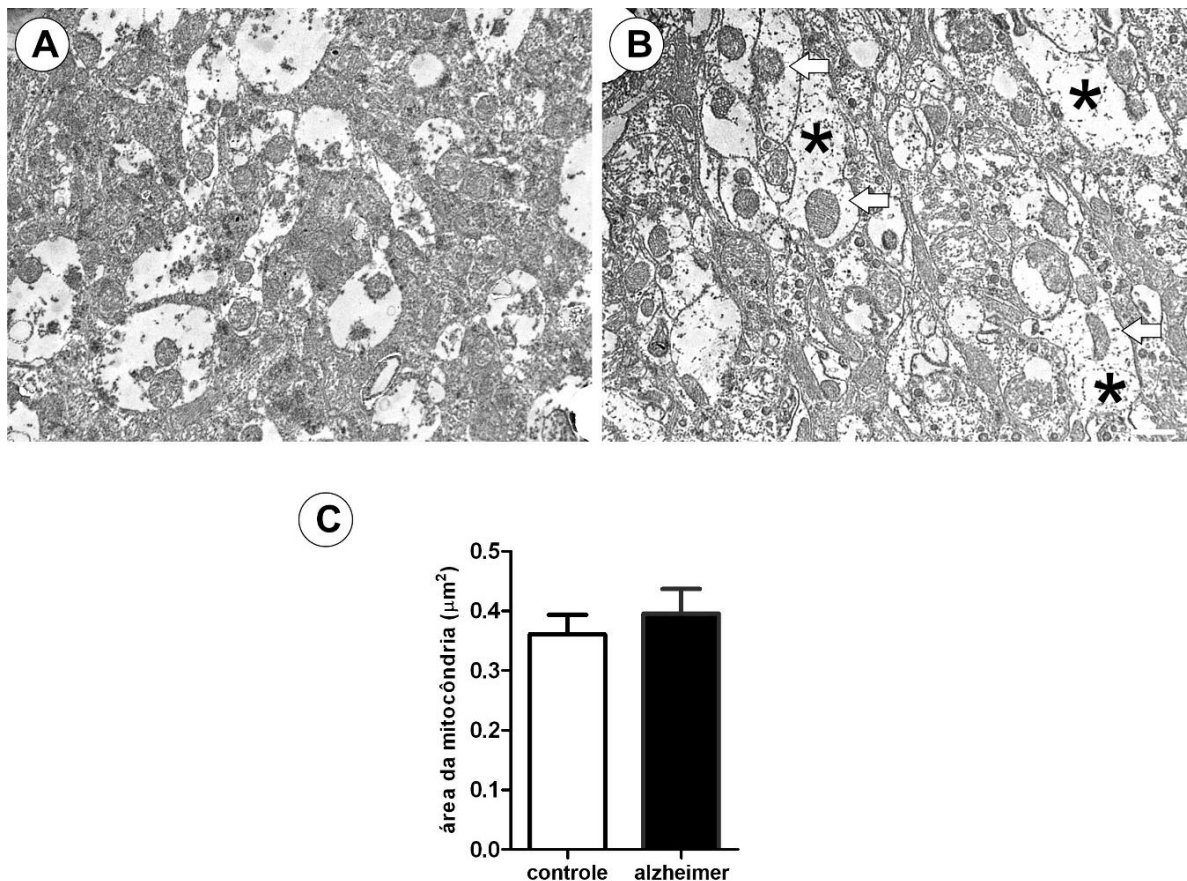


Figura 15 : Micrografia eletrônica de transmissão de cabeças de moscas. (A) Moscas controle parental (*ElavGal4*); (B) moscas modelo para doença de Alzheimer com setas indicando mitocôndrias, asteriscos indicando terminal sináptico e barra

branca de escala equivalente a 1 μ m; (C) Gráfico indicando área em μ m² das mitocôndrias entre controle e Alzheimer (Teste t, sem diferença estatística).

4.5. Expressão diferencial de genoma mitocondrial, miRNA e lncRNA

Para avaliar expressão diferencial de DNA mitocondrial (mtDNA), micro RNA (miRNA) e RNA longo não-codificante (lncRNA) entre moscas modelo para doença de Alzheimer e moscas normais, bem como se essa expressão se altera após 10 dias no mesmo grupo, utilizamos quatro grupos em duplicata, grupos Controle 0 dias e Controle 10 dias, e grupos Alzheimer 0 dias e 10 dias.

Após o sequenciamento pelo IonTorrent obtemos a quantidade de reads brutos de cada duplicata, assim como a quantidade de reads *trimmados* pelo FastQ Quality Trimmer, e a subsequente quantidade de reads mapeados contra o genoma mitocondrial e bibliotecas de microRNA e long non-coding RNA, estes dados estão apresentados na Tabela 1.

	<i>Duplicata</i>	<i>Reads Totais</i>	<i>Reads Trimadas</i>	<i>mtDNA</i>	<i>miRNA</i>	<i>lncRNA</i>
<i>Controle 0 Dias</i>	1	2.143.495	1.738.351	92.821	24	1366
	2	1.315.677	1.119.797	151.971	43	4318
<i>Controle 10 Dias</i>	1	1.258.047	827.025	55.361	49	3101
	2	1.134.127	755.748	59.151	53	2101
<i>Alzheimer 0 Dias</i>	1	2.280.420	1.304.751	41.727	25	4259
	2	1.143.741	605.179	106.475	45	6176
<i>Alzheimer 10 Dias</i>	1	2.142.506	1.739.744	26.197	132	12872
	2	1.167.141	826.986	135.136	15	5573

Tabela 1: Estatísticas do sequenciamento de RNA contendo valores de reads totais (reads brutas), reads trimadas, reads mapeadas contra genoma mitocondrial (mtDNA), reads mapeadas contra biblioteca de microRNA (miRNA), e mapeadas contra biblioteca de long non-coding RNA (lncRNA) de *Drosophila melanogaster*.

Para avaliar se as bibliotecas de reads estavam com qualidade aceitável para um mapeamento mais preciso e fidedigno após a trimagem pelo Cutadapt e FastQ Quality Trimmer, foi utilizado o aplicativo FastQC, que mostrou que todas as bibliotecas estavam dentro dos padrões ótimos, incluindo o escore de qualidade médio para cada posição de base dentro dos reads (Figura 16).

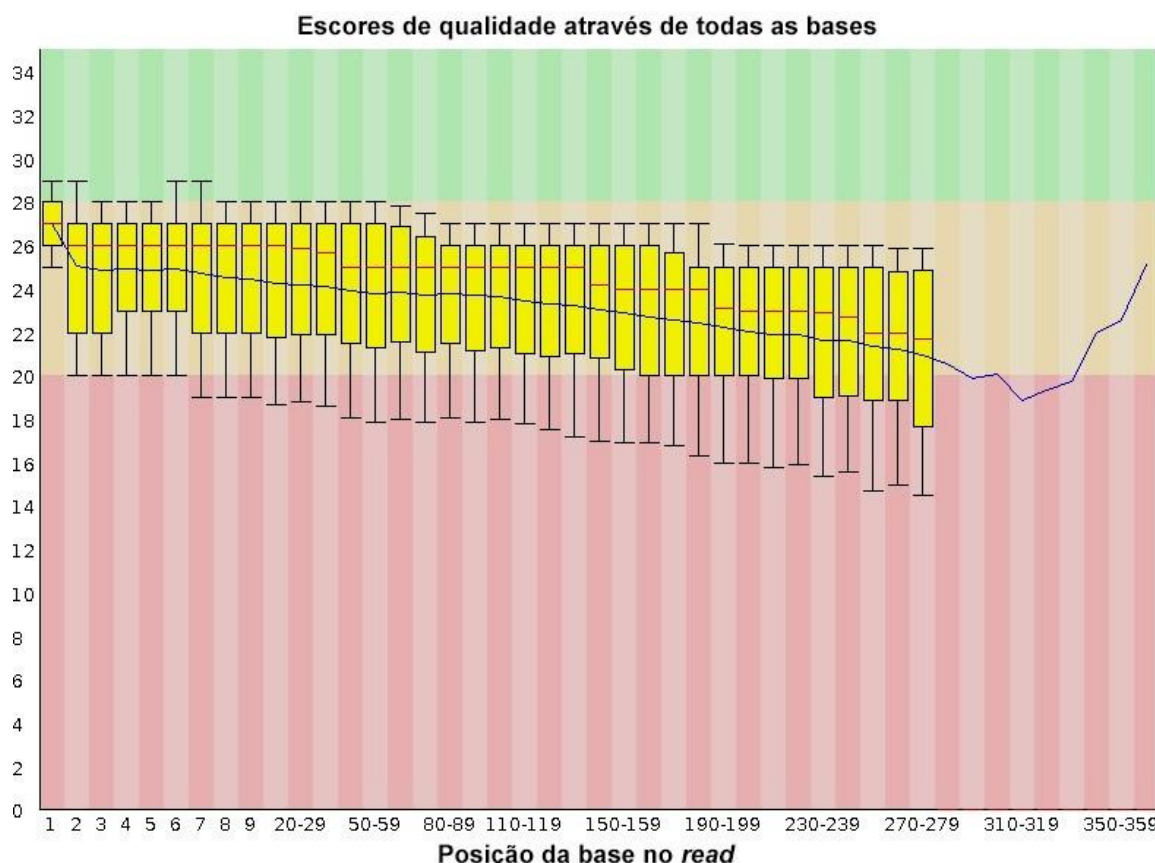


Figura 16 : Gráfico mostrando o escore médio de qualidade (Eixo Y) para cada posição de base nos reads (Eixo X). Onde o escore médio deve se manter preferencialmente na faixa amarela ou verde (≥ 20).

Após o mapeamento foi executada a expressão diferencial utilizando o software DESeq2. A partir dos reads normalizados foi gerado um gráfico de escores de componentes principais (Figura 17), devido a quantidade de objetos de dado (2 por grupo) não é possível descrever tendência geral para montar gráfico scree sobreposto, ou indicar *outliers*, porém é possível detectar formação de agrupamentos (4 agrupamentos) que estão em consonância com os grupos analisados.

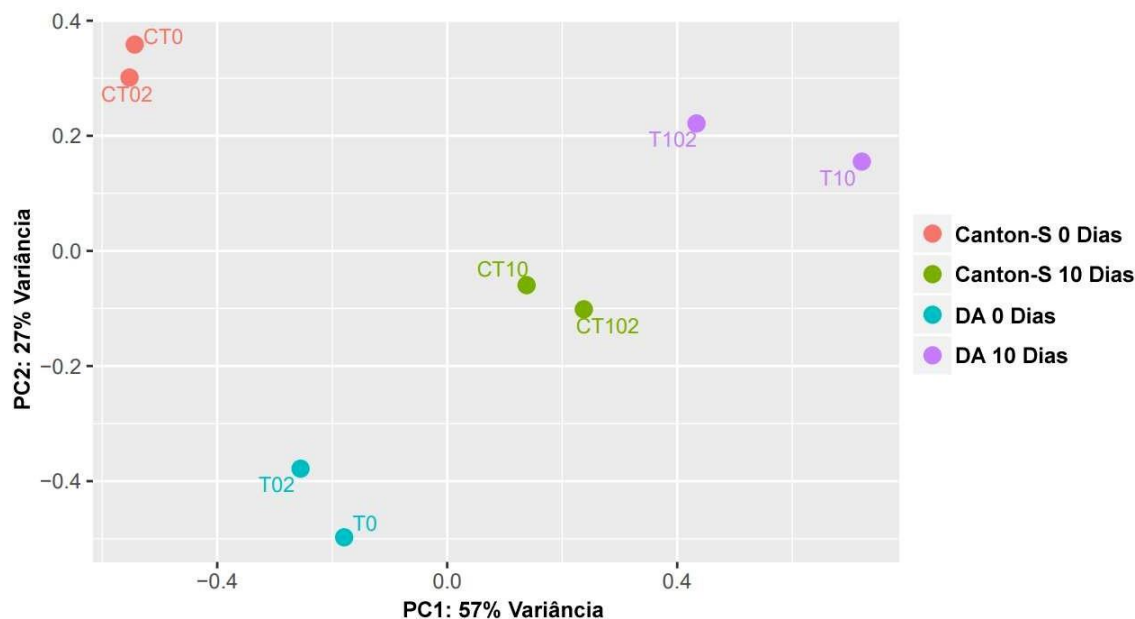


Figura 17 : Gráfico de escores de componentes principais entre as 8 duplicatas de 4 grupos, sendo que duplicatas do mesmo grupo encontram-se na mesma cor.

Com o resultado da expressão diferencial, selecionamos os genes com logaritmo (de base 2) para fold change de ≥ 1.5 ou ≤ -1.5 e com p-value < 0.05 .

Para RNA mitocondrial e lncRNA foram encontrados genes diferencialmente expressos nestas condições na comparação entre todos os grupos, intra e inter fator principal (presença ou não de fenótipo para doença de Alzheimer). Exceto intra fator principal no grupo controle (controle 10 dias comparado a controle 0 dias) para o RNA mitocondrial. Já para microRNA foram encontrados genes diferencialmente expressos selecionados (logaritmo (de base 2) para fold change de ≥ 1.5 ou ≤ -1.5 e com p-value < 0.05) para as comparações Alzheimer 10 dias contra Alzheimer 0 dias, Alzheimer 0 dias contra Controle 10 dias e Alzheimer 0 dias contra Controle 0 dias.

A expressão dos genes selecionados entre os grupos estão apresentados nos mapas de calor (*heatmap*) escalonados por linha abaixo para mtDNA (Figura 18), miRNA (Figura 19) e lncRNA (Figura 20).

Os genes mitocondriais *trnY*, *trnS2* e *trnF* tiveram maior expressão no modelo para doença de Alzheimer 10 dias em relação aos outros grupos, já o gene *trnQ* teve maior transcrição no grupo doença de Alzheimer 0 dias após eclosão e uma queda no grupo 10 dias após eclosão.

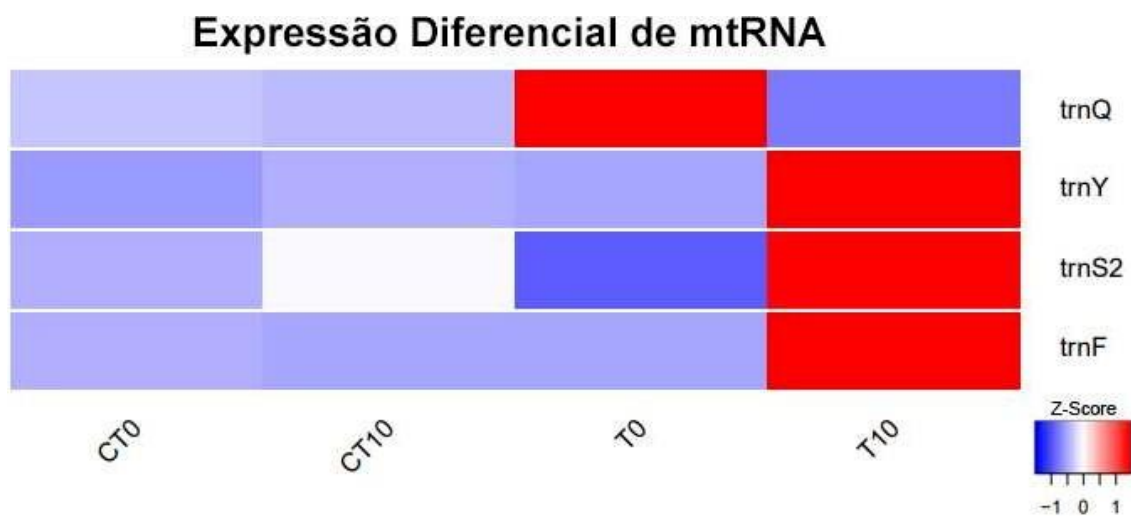


Figura 18 : Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do fold change ≥ 1.5 e p-value ≤ 0.05) de expressão diferencial de mtRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

Os miRNAs FBgn0263555 (miR-4943) e FBgn0263516 (miR-4958) não tiveram diferença de expressão entre os grupos controle e o grupo modelo para Alzheimer 10 dias, mas houve grande taxa de transcrição em modelo para Alzheimer 0 dias. Já o miRNA FBgn0263556 (miR-4940) mostrou redução na taxa de transcrição ao longo do tempo tanto para o grupo controle quanto para o grupo modelo de Alzheimer, porém com o menor nível para Alzheimer 10 dias (Figura 19).

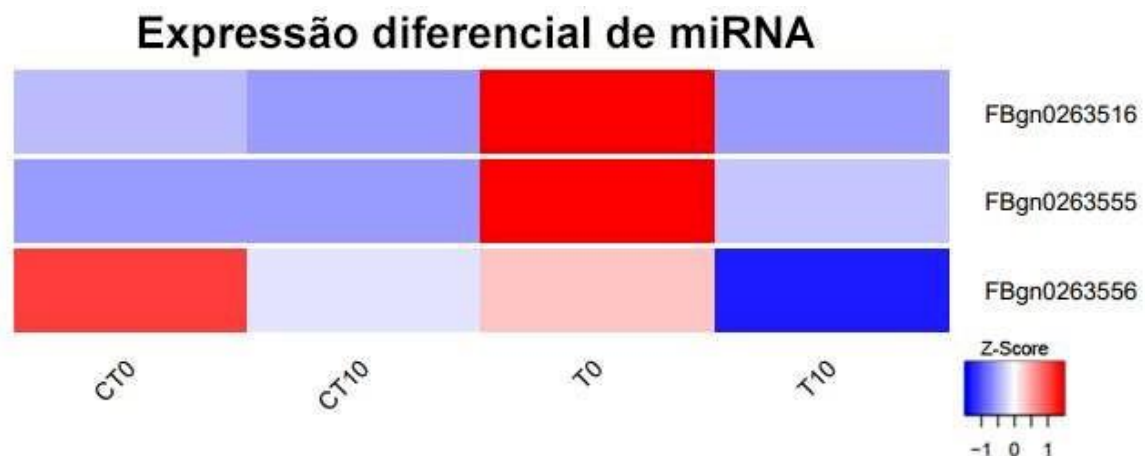


Figura 19: Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do fold change ≥ 1.5 e p-value ≤ 0.05) de expressão diferencial de miRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

Dos lnc-RNA apenas o FBgn0000003 teve, até o momento, uma anotação prévia presente no Flybase (a partir do banco de dados de anotação Gene Ontology), se tratando de uma Proteína cotranslacional dependente de SRP (*signal recognition particle*) com alvo para a membrana (GO:0006614).

Quatro lnc-RNA foram classificados como *small non-messenger RNA* (snmRNA), sendo eles FBgn0065104 (snmRNA-128), FBgn0065094 (snmRNA-158), FBgn0065081 (snmRNA-419) e FBgn0085364 (snmRNA-838). E 49 foram classificados como antisense RNA.

Expressão diferencial de lncRNA

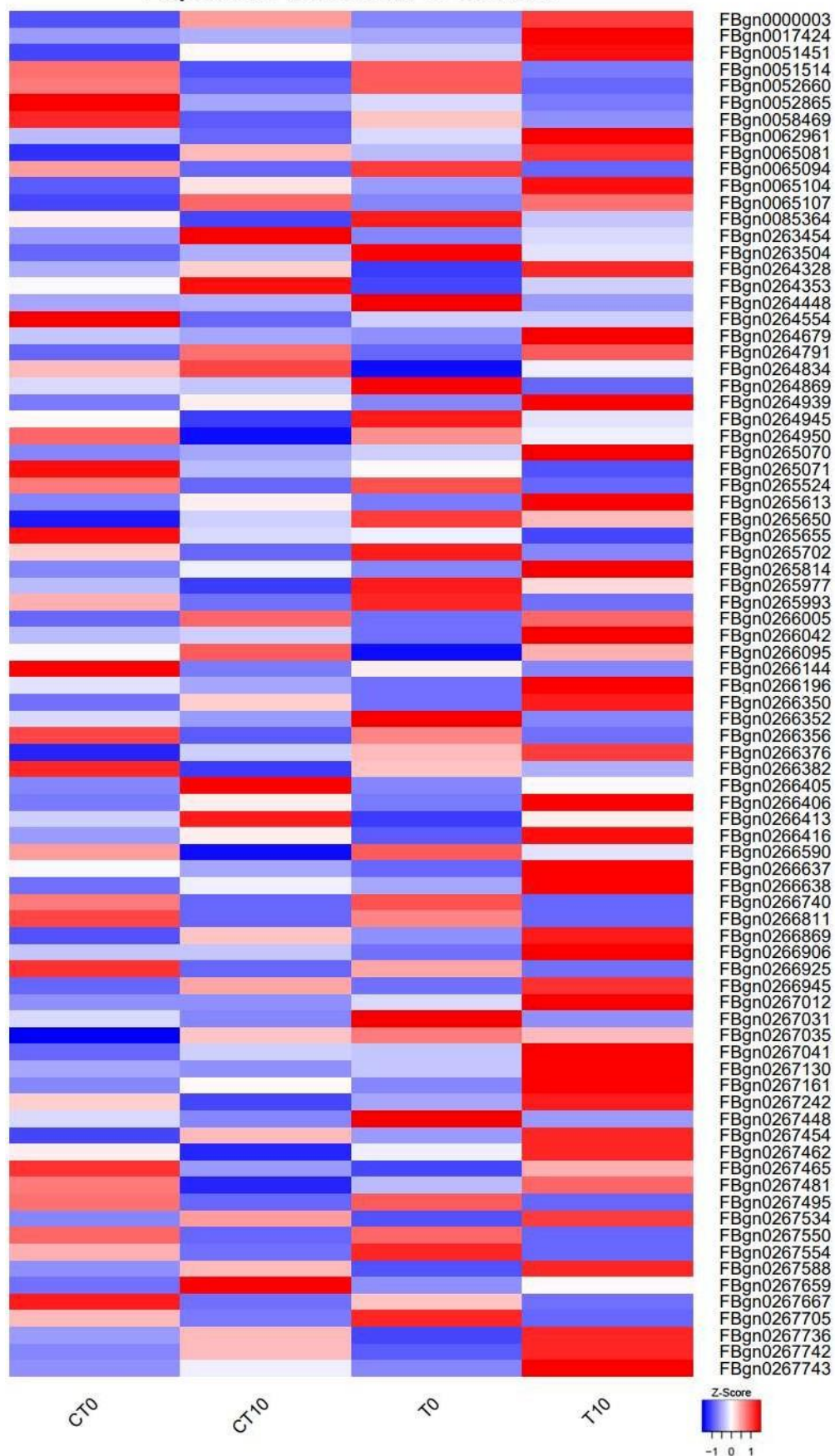


Figura 20: Mapa de calor escalonado por linha da expressão média das duplicatas dos genes diferencialmente expressos selecionados (\log_2 do fold change ≥ 1.5 e p-value ≤ 0.05) de expressão diferencial de lncRNA. Onde quanto menos expresso o gene mais forte a tonalidade azul, e quanto mais expresso maior a tonalidade em vermelho, sendo a cor branca o intermediário de expressão.

4.6. Alvos preditos para miRNA.

Para os microRNAs que foram diferencialmente expressos foi feita a predição de alvos anotados, da lista de possíveis alvos foram escolhidos os alvos com maior miTG score (microRNA target gene score), este escore indica a porcentagem de chance de um gene ser o possível alvo *in vivo*, respeitando um valor mínimo de miTG 90. A tabela abaixo mostra os resultados encontrados.

<i>miRNA</i> <i>FlyBase ID</i>	<i>miRNA</i> <i>Name</i>	<i>Target</i> <i>Flybase ID</i>	<i>Target</i> <i>Name</i>	<i>miTG score</i>
<i>FBgn0263555</i>	miR-4943-3'	FBgn0015279	PI3K92E	0.997810351629389
	miR-4943-5'	FBgn0010379	Akt	0.999995635734167
<i>FBgn0263516</i>	miR-4958-3'	FBgn0262473	Toll1	0.905348327287818
	miR-4958-5'	FBgn0030724	Nipsnap	0.959557948764993
<i>FBgn0263556</i>	miR-4940-3'	FBgn0024236	Foi	0.97072419942479
		FBgn0034720	Liprin- gamma	0.995864077894439
	miR-4940-5'	FBgn0035078	TPC2	0.980336577217859
		FBgn0033807	Aquaporina	0.992269625546876

Tabela 2: Nas duas primeiras colunas estão apresentados os FlyBase ID e Name dos microRNAs escolhidos, na terceira e quarta coluna os FlyBase ID e Name dos genes preditos, e por último o miTG score da predição.

5. Discussão

A relação entre o metabolismo da glicose e a progressão da doença de Alzheimer já foi evidenciada em outros estudos (CRAFT et al., 2012; CRANE et al., 2013; JANSON et al., 2004; OTT et al., 1999; RUIZ et al., 2016; SRODULSKI et al., 2014; TURNER; CRAFT; AISEN, 2013). As áreas mais afetadas pela doença de Alzheimer apresentam acentuada redução nos níveis do metabolismo da glicose, e essa redução tem maior linearidade com a evolução dos sintomas do que a deposição das placas A β (SHAH; DESILVA; ABBRUSCATO, 2012).

Para entender melhor a relação entre o metabolismo da glicose e a progressão da doença de Alzheimer, usamos aqui *D. melanogaster* como modelo experimental da doença de Alzheimer para investigar os efeitos do tratamento oral de agentes hipoglicemiantes como a glimepirida, metformina e sinvastatina.

A glimepirida é uma sulfonilureia de terceira geração. Em mamíferos, possui função de secretagogo de insulina através da sua ligação ao receptor SUR1 sulfonilureia nas células β do pâncreas. Além disso, a glimepirida também parece agir aumentando a captação de glicose ativando o PPAR γ (FUKUEN et al., 2005). A ativação do PPAR γ tem mostrado reduzir os níveis de β -amilóide, o tamanho das placas senis e melhorar as funções cognitivas dos pacientes com doença de Alzheimer (CAMACHO et al., 2004; SATO et al., 2011).

A metformina é um farmaco da família das biguanidas, hipoglicemiantes que não alteram a liberação de insulina. A metformina inibe a produção de glicose no fígado e aumenta a captação de glicose nos tecidos periféricos, diminuindo assim os níveis de glicose no sangue (VIOLLET et al., 2012). Também é aceito que a metformina diminui a respiração mitocondrial através de sua ação direta no complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria (VIOLLET et al., 2012).

A metformina também atua ativando a AMPK, cujo um dos efeitos é a inibição das via do Akt e mTOR (ROTERMUND; MACHETANZ; FITZGERALD, 2018). Estudos tem mostrado que o tratamento com metformina diminui a incidência de Doença de Alzheimer (CHENG et al., 2014; ORKABY et al., 2017).

Sinvastatina é um fármaco pertencente do grupo das estatinas, que atua inibindo a hidroximetilglutaril coenzima A redutase. Indicada para o tratamento de dislipidemias, tendo como objetivo a redução dos níveis de colesterol LDL e

triglicerídeos e aumento do colesterol HDL no sangue (TALREJA; CASSAGNOL, 2019). Além disso a sinvastatina demonstrou melhorar a redução cognitiva pela inibição da apoptose induzida por estresse oxidativo no hipocampo pelo inibição da Akt (LIU et al., 2018).

O primeiro passo no trabalho com estas drogas no modelo experimental com moscas foi identificar uma dosagem que não reduzisse a expectativa de vida das moscas. O teste de sobrevivência mostrou que o tratamento com glimepirida 25µM, aumenta a longevidade em relação ao grupo não tratado. Encontramos apenas um estudo que tratou larvas de *D. melanogaster* com glimepirida para avaliação genotóxica pelo teste *Wing Spot* (SMART), no entanto, não há menção sobre o teste de sobrevivência (GURBUZEL et al., 2014) e não é possível comparar nossos dados com eles. Em embriões de peixe-zebra este composto promove alteração morfológica na concentração acima de 25µM (NAM et al., 2017).

Para metformina, o teste de sobrevivência mostrou que a longevidade foi aumentada com o tratamento na dose de 25 mM. Comparativamente foi demonstrado em um estudo com moscas, que doses de 1mM à 50mM de metformina não alteravam a longevidade em moscas macho em relação as não tratadas, e que a dose de 100mM era tóxica reduzindo a longevidade, já nas fêmeas as dosagens até 10mM não alteravam a longevidade, e a dose de 25mM ou maior reduzia o tempo de vida das moscas (SLACK; FOLEY; PARTRIDGE, 2012). Porém a linhagem utilizada neste teste comparativo foi Dahomey, enquanto nós utilizamos Canton-S, além disso a dieta a partir da composição do meio são diferentes.

O teste de sobrevivência para tratamento com sinvastatina mostrou que a melhor longevidade foi obtida com a dose de 100 µM. Um trabalho cujo objetivo foi avaliar a longevidade por uso de sinvastatina em moscas obteve que a dose mais benéfica foi de 240 µM (comparativamente com 24 µM, 2,4 mM e 12 mM) (SPINDLER et al., 2012). Essa diferença provavelmente se dá porque no trabalho citado há o uso de concentrações muito distantes entre si, além da utilização de linhagem diferente (Oregon-R)

O primeiro teste para avaliar se os tratamentos (glimepirida, sinvastatina e metformina) causam alguma alteração na evolução da neurodegeneração nas moscas foi o teste de escalada, este teste tem se mostrado uma ferramenta eficaz de avaliação de habilidades motoras de modelos de *D. melanogaster* para doença

de Alzheimer (CHAKRABORTY et al., 2011). Um segundo teste comportamental já utilizado em outros estudos para confirmar as alterações nos sintomas das moscas tratadas foi o teste de supressão de fototaxia (ZHANG et al., 2016), que também trouxe resultados demonstrando uma melhora na DA das moscas tratadas em comparação a aquelas que não receberam glimepirida. Estes dois testes demonstraram que a glimepirida e a sinvastatina não só melhoraram a capacidade motora, mas também os processos de aprendizagem e memória das moscas tratadas. A metformina por reduzir a captação de glicose desacelera o metabolismo das moscas, deixando-as mais lentas, isso pode ter influenciado o resultado do teste de escalada, o teste de fototaxia demonstrou uma melhora na capacidade cognitiva e de memória das moscas tratadas com metformina. Contudo, o tratamento por metformina teve efeito benéfico no teste de aprendizado e memória.

O teste de dosagem de glicose das cabeças das moscas indicou que o tratamento na dosagem escolhida de glimepirida e a metformina teve a ação hipoglicemiante esperada na *Drosophila melanogaster*, demonstrando que este é um modelo válido para análise destas famílias de drogas no tangente a capacidade hipoglicemiante.

Para verificar se essa redução de sintomas causada pelo tratamento foi realmente devido a uma menor taxa de neurodegeneração, prosseguimos com mais testes. A evolução da doença de Alzheimer leva à perda de massa cerebral formando vacúolos nos cérebros das moscas, através da histologia medimos a área total desses vacúolos em relação à área total do cérebro e encontramos uma redução significativa de vacúolos neurais em moscas tratadas com glimepirida, demonstrando que a glimepirida não apenas melhorou os sintomas comportamentais, mas também reduziu a degeneração tecidual, corroborando com dados encontrados em diferentes estudos feitos com cultura de células neuronais que mostram que a glimepirida reduz a expressão de BACE1 (LIU et al., 2013a; OSBORNE et al., 2016).

Sabe-se que diversas vias metabólicas podem agir no processo de envelhecimento. No caso da metformina, a mais conhecida é através da via AMPK que mimetiza o processo de jejum e sabidamente reduz o envelhecimento (SLACK; FOLEY; PARTRIDGE, 2012). Porém outra via que tem se mostrado interessante é a do Akt/mTOR e a ativação do Hsp70. A Akt, que fisiologicamente é regulada pela

fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) que esta ligada a sinalização por insulina nos receptores de insulina (IRs), fosforila o *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2) que inibe a formação do complexo *Tuberous Sclerosis Complex 1/2* (TSC1/TSC2), este complexo inibe a *Ras homolog enriched in Brain* (RHEB) que é um ativador de mTORC1, o que significa que, uma redução na Akt leva a uma redução da mTORC1 (PARMAR; TAMANOI, 2010). O mTOR (*mamalian target of rapamycin*) inibe o processo de autofagia (incluindo mitofagia), o que leva a um acúmulo de mitocôndrias defeituosas, geradas principalmente por estresse oxidativo, que segundo a teoria da cascata mitocondrial seria o gatilho para a doença de Alzheimer (ANSARI; SCHEFF, 2010; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014; ZHAO; ZHAO, 2013). O Hsp70, uma chaperona de resposta a estresse, parece influenciar a via Akt/mTOR e ser influenciada por ela, o hsp70 demonstrou ser necessário para a montagem do complexo mTORC2, que fosforila a Akt na serina 473 levando a uma ativação completa da Akt (SARBASSOV et al., 2005), funcionando como uma retroalimentação positiva, visto que o Akt então irá estimular um aumento da produção de mTOR. O Hsp70 é estimulado pelo mTORC1 tanto indiretamente pelo aumento da proteogênese quanto diretamente pela liberação do HSF-1 (*Heat shock factor 1*) ligado ao mTORC1 que estimula os HSPs. O Hsp70 tem efeito protetor também pela inibição dos membros pro apoptóticos da família das proteínas reguladoras de morte celular Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) a BAD (Bcl-2 associated death promoter) e a BAX (Bcl-2 associated X protein) de liberarem o citocromo c. Também inibe o citocromo c liberado pela Bad/Bax de complexar com a Caspase 9 ativando o promotor apoptótico Caspase 3. E por fim, inibe a função apoptótica da Caspase 3 (FUNG; KONG, 2017).

a quantificação de transcritos do gene *akt* nas moscas tratadas com glimepirida e sinvastatina mostraram uma redução na expressão desse gene, essa redução na expressão do eixo Akt/mTOR foi o que provavelmente levou a uma redução da progressão da doença em relação ao grupo não tratado, corroborando com a literatura vigente (CACCAMO et al., 2013; NORAMBUENA et al., 2017; SPILMAN et al., 2010).

Apesar de alguns trabalhos destacarem uma função protetora do Hsp70 na doença de Alzheimer (BROER et al., 2011; HOSHINO et al., 2011; JINWAL et al., 2009; MAGRANE et al., 2004; MAILHOS; HOWARD; LATCHMAN, 1994),

encontramos valores reduzidos dos níveis de transcrito do gene *hsp70* nas moscas tratadas com glimepirida e sinvastatina em relação as não tratadas. Isso se dá provavelmente porque uma redução da produção de proteínas com falhas estruturais, um achado comum na superexpressão de mTOR (CONN; QIAN, 2011), reduz a transcrição de genes de chaperonas, cuja principal família é as das proteínas de choque térmico, incluindo o Hsp70. Também é sabido que uma redução do mTORC1 leva a uma redução da expressão de *heat shock transcription factor 1*, o que leva a uma redução da expressão do Hsp70 (CHOU et al., 2012). O que leva a crer que o efeito protetor da glimepirida e sinvastatina foi pelo eixo do mTOR na via da Akt, e não pelo efeito protetor da Hsp70.

Sobre a sinvastatina, apesar de alguns trabalhos indicarem seus efeitos benéficos pela sua ação no metabolismo do colesterol e Apolipoproteína E (GEIFMAN et al., 2017; HAAG et al., 2009; JICK et al., 2000; ROCKWOOD et al., 2002), e que alguns trabalhos atribuem a modulação do metabolismo do colesterol a uma redução da agregação amilóide (JARVIK et al., 1995; PETANCESKA et al., 2002; REFOLO et al., 2001), estes trabalhos não avaliam outras possíveis vias. Além disso, há indícios de que seu efeito benéfico na progressão da doença de Alzheimer aconteça mesmo sem alteração dos níveis de β -amilóide (CARLSSON et al., 2008). Também é possível que a sinvastatina possa agir na doença de Alzheimer devido a sua capacidade aumentar a concentração de Adiponectina (CHRUSCIEL et al., 2016), cuja qual, quando reduzida, promove sintomas parecidos a doença de Alzheimer (KIM et al., 2017). Também pela alteração de níveis de ABCA7 que alteram o influxo de colesterol mediado pela apoE (CHAN et al., 2008; KIM et al., 2013). Outra possível forma de ação é devido a já conhecida capacidade da sinvastatina de supressão da Clusterina (PAJAK et al., 2019), que já foi demonstrada ter relação direta entre o aumento de sua concentração e a severidade e prevalência da doença de Alzheimer (SCHRIJVERS et al., 2011). Nossos dados indicam que a sinvastatina age também por alteração do eixo Akt, e, o que indica que a droga pode ser benéfica independentemente da presença de dislipidemia ou polimorfismo da apoE.

Visto que a alteração da via da Akt leva a uma cascata de processos que incluem uma menor mitofagia por inibição pelo mTOR e portanto um acúmulo de mitocôndrias alteradas, o próximo passo foram análises para avaliar *em Drosophila*

melanogaster como estariam as mitocôndrias em modelo para doença de Alzheimer em relação ao controle.

A microscopia eletrônica de transmissão não indicou diferença significativa entre os tamanhos de mitocôndria entre o grupo controle e o modelo para Alzheimer, porém isso possivelmente se deve ao número amostral reduzido que foi conseguido devido a dificuldade de processamento deste tipo de material.

Analizamos então a diferença nas taxas de transcrição de RNA mitocondrial entre grupo controle e grupo modelo para Alzheimer. Devemos atentar ao fato de que foram analisados genes de origem de genoma mitocondrial, não incluindo genes nucleares com endereçamento para mitocôndria. Pelo menos dois trabalhos já relacionaram a doença de Alzheimer com uma mutação no RNA transportador de glutamina mitocondrial (trnQ, ou pelos sinonimos MT-TQ ou tRNA(Gln)) (EGENSPERGER et al., 1997; HUTCHIN; CORTOPASSI, 1995), e um trabalho que contraria essa informação (WRAGG et al., 1995). Porém, nenhum destes trabalhos avaliou a taxa de transcrição do trnQ entre controle e Alzheimer na ausência da mutação.

A transcrição diferencial do RNA mitocondrial indicou que os RNAs transportadores mitocondriais da fenilalanina (trnF, MT-TF ou tRNA(Phe)), serina 2 (trnS2, MT-TS2 ou tRNA(Ser2)), tirosina (trnY, MT-TY ou tRNA(Tyr)) e glutamina (trnQ, MT-TQ ou tRNA(Gln)), tem sua expressão aumentada no grupo modelo para doença de Alzheimer em relação ao grupo controle, tanto no grupo com menos de um dia de vida quanto no grupo com 10 dias, e que a taxa de transcrição aumentou ao longo dos 10 dias no grupo modelo para acúmulo de β -amilóide (Figura 17). Isso nos leva à proposição de que, visto se tratarem de RNAs transportadores portanto relacionados a taxa de tradução de mRNA e a produção de proteínas por ribossomos mitocondriais, a doença de Alzheimer leva a um aumento da atividade mitocondrial o que leva a um aumento da síntese proteica, provavelmente com interferência do mTOR, cuja uma das funções é o estímulo a proteogênese (LIPTON; SAHIN, 2014), outra proposição não excludente à primeira é a de que devido ao acúmulo de mitocôndrias por uma redução da mitofagia, o número total de mitocôndrias no cérebro das moscas aumentou e não necessariamente sua atividade traducional.

A variação da atividade mitocondrial encontrada nos dados corrobora com a literatura que afirma que a doença de Alzheimer tem relação com alterações mitocondriais, primária ou secundária a patogenese (ANSARI; SCHEFF, 2010; CHO et al., 2009; EGENSEPERGER et al., 1997; HUTCHIN; CORTOPASSI, 1995; KEIL et al., 2004; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014; ZHAO; ZHAO, 2013).

Nosso próximo passo foi avaliar a diferença da transcrição de microRNAs entre os grupos controle e modelo para Alzheimer, com 0 dias e 10 dias pós eclosão.

Curiosamente o miR-4943 (FBgn0263555) apresentou alvos preditos com alto score miTG para o gene que codifica a subunidade catalítica da PI3K, que estimula a ativação da Akt através do PIP3, e também do gene *akt*, mostrando uma redução da taxa de silenciamento por miRNA da via da Akt, o que poderia levar a um aumento da atividade desta via durante a progressão da doença de Alzheimer. Sabe-se que a redução da atividade da via da Akt leva a uma melhora no quadro de Alzheimer (CACCAMO et al., 2013; SPILMAN et al., 2010). Nossos dados mostram então que neste modelo para doença de Alzheimer a uma menor supressão do eixo Akt via miRNA.

O miR-4958 (FBgn0263516) apresentou alvos preditos com alto score miTG para o gene Toll1 (que transcreve o *Toll-like Receptor 1*, TLR1) e para o gene Nipsnap.

Apesar de haver poucos estudos sobre a ação TLR1 especificamente, um trabalho demonstrou que a resposta inflamatória microglial do *Toll-like Receptor 2* (TLR2) induzida pela β -amilóide é aumentada pelo TLR1 (LIU et al., 2012), o que indica um aumento da resposta inflamatória microglial devido a uma redução da supressão por miRNA do TLR1. A ativação microglial por um lado tem ação benéfica devido a fagocitose de β -amilóide pela microglia em estado anti-inflamatório M2 (produtora de Interleucina-10), mas por outro lado tem efeito maléfico devida a liberação de mediadores citotóxicos quando esta em estado pró-inflamatório M1 (produzindo Interleucina-6, Fator de necrose tumoral α , etc.) (GAMBUZZA et al., 2014; LIU et al., 2012). Também foi percebido que uma redução da ativação da TLR2 (que é estimulada pelo TLR1) aumenta a concentração de microglias em estado M2 em relação a M1 (LIU et al., 2012).

Já é sabido que a proteína de matrix mitocondrial Nipsnap atua como um promotor de mitofagia (PRINCELY ABUDU et al., 2019), porém a ação do Nipsnap sobre a doença de Alzheimer permanece desconhecida até o momento, encontramos um único trabalho relacionando este gene com a doença de Alzheimer, onde foi feita uma expressão diferencial de genes entre controle e Alzheimer e identificaram um aumento da expressão do Nipsnap no cortex cerebral de pacientes acometidos por doença de Alzheimer (ZAHID et al., 2014). Nosso resultado indica que esse aumento da expressão de Nipsnap pode ter relação com um menor silenciamento por miRNA.

O miRNA FBgn0263556 apresentou alvos preditos com alto escore miTG para o gene *FOI* que traduz a proteína *Fear-of-Intimacy*, uma proteína transmembrana que foi descrita como tendo função de migração celular em células da glia em *Drosophila melanogaster* (PIELAGE et al., 2004). E também para o gene *Liprin-γ* que foi descrito em um trabalho como sendo uma *Liprin* que tem ação antagonica ao *Liprin-α*, sendo este inicialmente descrito como um adaptador que interage com o receptor de tirosino-fosfatase (RPTP), além disso o *Liprin-α* age promovendo uma sinaptogenese normal em fotoreceptores e neuronios motores em *Drosophila melanogaster* (ASTIGARRAGA et al., 2010), um trabalho utilizando expressão diferencial demonstrou uma correlação entre doença de Alzheimer e o a GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein1) responsável pelo agrupamento e localização de receptores ao glutamato do tipo AMPA que se liga ao *Liprin-α* e ajudam a restaurar a expressão de superfície de receptores do tipo AMPA (CHATTERJEE; ROY, 2017), sendo a redução da presença destes receptores na superfície uma das características da doença de Alzheimer (CHANG; VERBICH; MCKINNEY, 2012). Desta forma o aumento da expressão de *Liprin-γ* por menor silenciamento por miRNA pode reduzir o numero de receptores AMPA de superfície por um antagonismo ao *Liprin-α*.

Também foram encontrados na predição de alvos com alto escore miTG do miRNA FBgn0263556 os genes TPC2 (Thiamine pyrophosphate carrier 2) e Aquaporina. O TPC2 tem a função de carrear tiamina para dentro da mitocôndria onde ela atuara como coenzima no ciclo do ácido cítrico, uma menor supressão deste gene deveria portanto aumentar o aporte mitocondrial de tiamina, o que é curioso visto que vários trabalhos associam a ingestão de tiamina ou derivados com

uma melhora no quadro da doença de Alzheimer (BLASS et al., 1988; MEADOR et al., 1993; NOLAN et al., 1991; PAN et al., 2010). A aquaporina pertence a uma família de canais de água de membrana celular e serve principalmente para regular o fluxo de água intracelular e intercelular, vários trabalhos já mostraram que há uma maior expressão de alguns tipos de aquaporina na doença de Alzheimer ou modelos para essa doença (HOSHI et al., 2012; MISAWA et al., 2008; MOFTAKHAR et al., 2010; PEREZ et al., 2007).

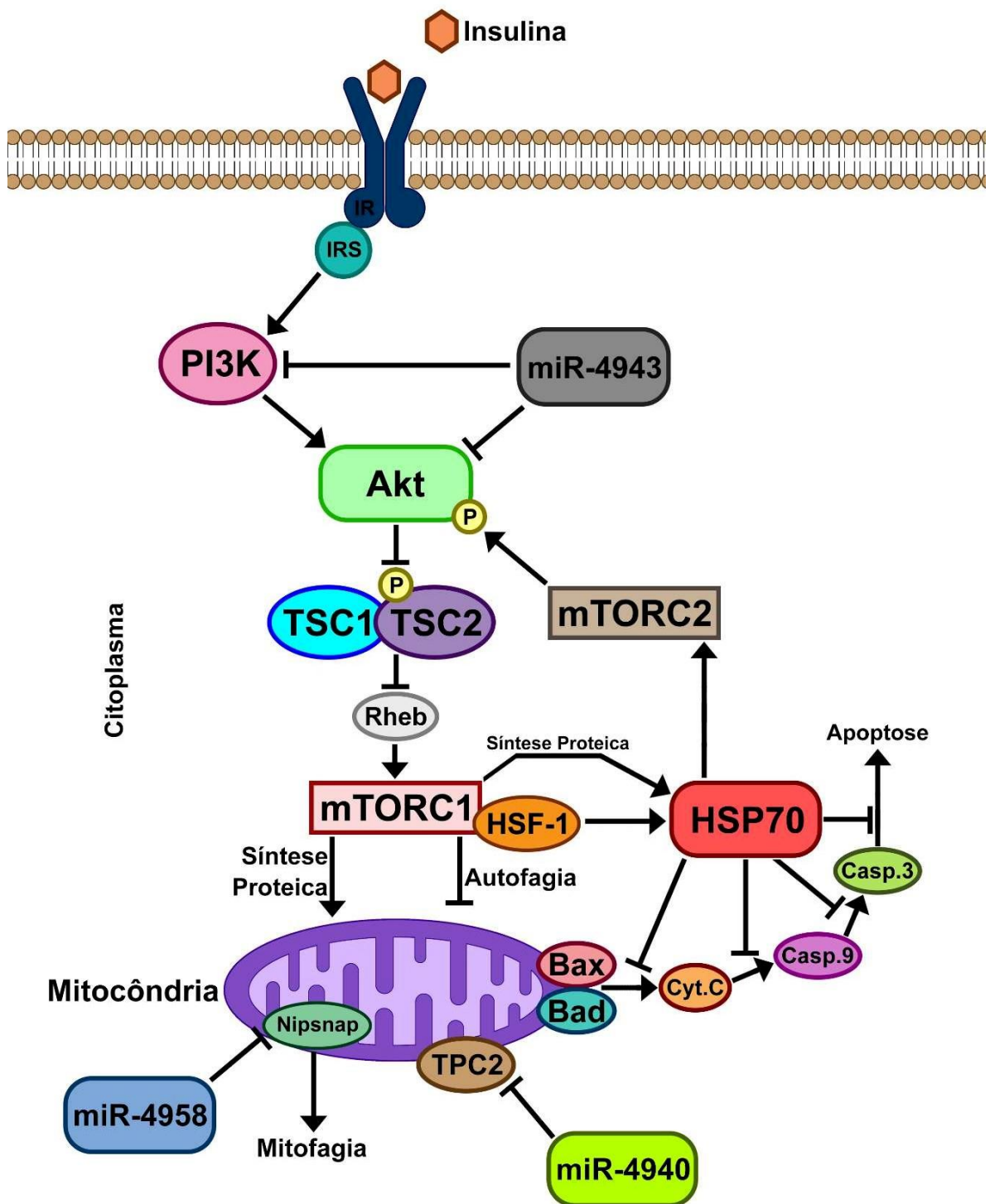


Figura 21: Modelo proposto para a via afetada, a insulina se liga no receptor de insulina (IR), fazendo o domínio intracelular fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS), ativando a fosfatidilinositol 3-quinase, que ativa a Akt, a Akt fosforila o complexo da esclerose tuberosa (TSC2) inibindo o complexo TSC1/TSC2 de inibir o homólogo RAS enriquecido no cérebro (Rheb), que tem função de estímulo da mTORC1, que estimula a síntese proteica, inibe a autofagia mitocondrial, e estimula a proteína de resposta a choque térmico, tanto pelo aumento da síntese proteica

quanto pela liberação do fator de choque térmico 1 (HSF-1). A HSP70 inibe a cascata de sinalização da apoptose mediada por citocromo c em quatro momentos. Ela inibe as proteínas reguladoras de morte celular Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) BAD (Bcl-2 associated death promoter) e a BAX (Bcl-2 associated X protein) de liberarem o citocromo c. Também inibe o citocromo c liberado pela Bad/Bax de complexar com a Caspase 9 ativando o promotor apoptótico Caspase 3 e inibe a função apoptótica da Caspase 3. O miRNA miR-4943 reduz a tradução dos transcritos da Akt e do PI3K reduzindo a atividade de toda a via. O miRNA miR-4958 reduz a tradução de Nipsnap diminuindo a mitofagia. E por fim, o miR-4940 reduz a tradução de carreador de tiamina pirofosfato 2 (TPC2) reduzindo o influxo mitocondrial de tiamina.

6. Conclusão

A utilização de modelo transgênico de *Drosophila melanogaster* para análise de efeitos e estudo de vias de ação de drogas continua se mostrando eficiente e promissor. Além de demonstrar quais as dosagens ideais para um efeito benéfico e para aumento de longevidade das drogas testadas, conseguimos entender melhor seu funcionamento e explorar vias de ação pouco elucidadas na literatura. Também avaliamos alterações de transcrição de genes mitocondriais presentes no modelo para doença de Alzheimer ainda não descritas, e que parecem corroborar com a proposição de que os farmacos testados agem na via explorada neste trabalho. Bem como descobrimos RNAs longos não codificantes com taxa de transcrição alterada no modelo para doença de Alzheimer e novos microRNAs com variação em seu nível de transcrição no modelo para Alzheimer, que tem alvos preditos com grande relação com a patogênese da doença e com a via proposta neste trabalho.

7. Referências

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* (New York, N. Y.), v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, mar. 2000.

<https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>

ALI, Y. O. et al. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. *Journal of visualized experiments: JOVE*, n. 49, mar. 2011.

<https://doi.org/10.3791/2504>

ALZHEIMER ASSOCIATION. Alzheimer's Association Report 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 11, n. 3, p. 332–384, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.02.003>

ANDREWS, S. *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Data*. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 69, n. 2, p. 155–167, fev. 2010.

<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181cb5af4>

ASTIGARRAGA, S. et al. Three *Drosophila* Liprins Interact to Control Synapse Formation. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 46, p. 15368–15368, 17 nov. 2010.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1862-10.2010>

BEKRIS, L. M. et al. Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, v. 23, n. 4, p. 213–227, dez. 2010.

<https://doi.org/10.1177/0891988710383571>

BEN-SAHRA, I. et al. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* (New York, N. Y.), v. 351, n. 6261, p. 728–733, fev. 2016.

<https://doi.org/10.1126/science.aad0489>

BHARADWAJ, P. et al. The Link between Type 2 Diabetes and Neurodegeneration: Roles for Amyloid-beta, Amylin, and Tau Proteins. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 59, n. 2, p. 421–432, 2017.

<https://doi.org/10.3233/JAD-161192>

BLANKENBERG, D. et al. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 14, p. 1783–1785, jul. 2010.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq281>

BLASS, J. P. et al. Thiamine and Alzheimer's disease. A pilot study. **Archives of neurology**, v. 45, n. 8, p. 833–835, ago. 1988.

<https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520320019008>

BOMFIM, T. R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1339–1353, abr. 2012.

<https://doi.org/10.1172/JCI57256>

BROER, L. et al. Association of HSP70 and its co-chaperones with Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 25, n. 1, p. 93–102, 2011.

<https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101560>

CACCAMO, A. et al. mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. **Ageing cell**, v. 12, n. 3, p. 370–380, jun. 2013.

<https://doi.org/10.1111/acer.12057>

CAMACHO, I. E. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 40, p. 10908–10917, dez. 2004.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3987-04.2004>

CARLSSON, C. M. et al. Effects of simvastatin on cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 13, n. 2, p. 187–197, mar. 2008. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-13209>

CASTELLANO, J. M. et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. **Science translational medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57, jun. 2011.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002156>

CAVAGHAN, M. K.; EHRMANN, D. A.; POLONSKY, K. S. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 3, p. 329–333, 1 ago. 2000.

<https://doi.org/10.1172/JCI10761>

CHAKRABORTY, R. et al. Characterization of a Drosophila Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20799, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020799>

CHAN, S. L. et al. ATP-binding cassette transporter A7 regulates processing of amyloid precursor protein in vitro. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 2, p. 804, jul. 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05433.x>

CHANG, P. K.-Y.; VERBICH, D.; MCKINNEY, R. A. AMPA receptors as drug targets in neurological disease--advantages, caveats, and future outlook. **The European journal of neuroscience**, v. 35, n. 12, p. 1908–1916, jun. 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08165.x>

CHATTERJEE, P.; ROY, D. Structural insight into GRIP1-PDZ6 in Alzheimer's disease: study from protein expression data to molecular dynamics simulations. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 35, n. 10, p. 2235–2247, 2017.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1214085>

CHENG, C. et al. Type 2 diabetes and antidiabetic medications in relation to dementia diagnosis. **The journals of gerontology . Series A, Biological and medical sciences**, v. 69, n. 10, p. 1299–1305, out. 2014.

<https://doi.org/10.1093/gerona/glu073>

CHO, D.-H. et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, p. 102–105, abr. 2009.

<https://doi.org/10.1126/science.1171091>

CHOU, S.-D. et al. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39679, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039679>

CHRUSCIEL, P. et al. Impact of statin therapy on plasma adiponectin concentrations: A systematic review and meta-analysis of 43 randomized controlled trial arms. **Atherosclerosis**, v. 253, p. 194–208, out. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.897>

CONN, C. S.; QIAN, S.-B. mTOR signaling in protein homeostasis. **Cell Cycle**, v. 10, n. 12, p. 1940–1947, 2011.

<https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15858>

CORDER, E. H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science (New York, N. Y.)**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, ago. 1993.

<https://doi.org/10.1126/science.8346443>

CRAFT, S. et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. **Archives of neurology**, v. 69, n. 1, p. 238, jan. 2012.

<https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.233>

CRANE, P. K. et al. Glucose Levels and Risk of Dementia. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 6, p. 540–548, 7 ago. 2013.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215740>

CRUCHAGA, C. et al. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 550–554, jan. 2014.

DEMATTO, R. B. et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. **Neuron**, v. 41, n. 2, p. 193–202, jan. 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00850-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00850-X)

EGENSPERGER, R. et al. Association of the mitochondrial tRNA^A4336G mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Neurobiology and Applied Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 315–321, 1997.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1997.4098040.x>

EMOTO, M.; LANGILLE, S. E.; CZECH, M. P. A role for kinesin in insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 14, p. 10677–82, 6 abr. 2001.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M010785200>

FAGAN, A. M. et al. Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 274, n. 42, p. 30001–30007, 1999.

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30001>

FANG, E. F. et al. Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 17, n. 5, p. 308–321, maio 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.14>

FUKUEN, S. et al. Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated

receptor gamma agonistic activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23653–23659, jun. 2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M412113200>

FUNG, P. C. W.; KONG, R. K. C. The Heat Shock Protein Story—From Taking mTORC1,2 and Heat Shock Protein Inhibitors as Therapeutic Measures for Treating Cancers to Development of Cancer Vaccines. **Journal of Cancer Therapy**, v. 8, n. 11, p. 962–1029, 2017.

<https://doi.org/10.4236/jct.2017.811086>

GAMBUZZA, M. E. et al. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 13, n. 9, p. 1558, 2014.

<https://doi.org/10.2174/1871527313666140806124850>

GEIFMAN, N. et al. Evidence for benefit of statins to modify cognitive decline and risk in Alzheimer's disease. **Alzheimer's research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 1, rev. 2017.

<https://doi.org/10.1186/s13195-017-0237-y>

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 122, n. 3, p. 1131–1135, ago. 1984.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91209-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91209-9)

GOLDMAN, J. S. et al. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. **Genetics in Medicine**, v. 13, p. 597, 16 maio 2011.

<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31822dd062>

GUERREIRO, R. et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 2, p. 117–127, jan. 2013.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>

GURBUZEL, M. et al. Genotoxic evaluation of two oral antidiabetic agents in the Drosophila wing spot test. **Toxicology and industrial health**, v. 30, n. 4, p. 383, maio 2014.

<https://doi.org/10.1177/0748233712456091>

HAAG, M. D. M. et al. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 13–17, jan. 2009.

<https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.150433>

HAROLD, D. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1088–1093, out. 2009.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Clinical research The**, p. 101–108, 1998.

HOLLINGWORTH, P. et al. Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 43, n. 5, p. 429–435, 2011.

HOSHI, A. et al. Characteristics of Aquaporin Expression Surrounding Senile Plaques and Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer Disease. **JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY**, v. 71, n. 8, p. 759, 2012.

<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182632566>

HOSHINO, T. et al. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5225–5234, abr. 2011.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011>

HOU, L.; KLANN, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 28, p. 6352–6361, jul. 2004.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0995-04.2004>

HRESKO, R. C.; MUECKLER, M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40406–40416, dez. 2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>

HUTCHIN, T.; CORTOPASSI, G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 15, p. 6892–6895, jul. 1995.

<https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6892>

IKEDA, Y. et al. Posttranscriptional regulation of human ABCA7 and its function for

the apoA-I-dependent lipid release. **Biochemical and biophysical communications**, v. 311, n. 2, p. 313–318, nov. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.002>

JACKSON, K. et al. Amylin deposition in the brain: A second amyloid in Alzheimer disease? **Annals of neurology**, v. 74, n. 4, p. 517–526, out. 2013. <https://doi.org/10.1002/ana.23956>

JANSON, J. et al. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 474–481, fev. 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.474>

JAROSZ-GRIFFITHS, H. H. et al. Amyloid-beta Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3743–3748, fev. 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.702704>

JARVIK, G. P. et al. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. **Neurology**, v. 45, n. 6, p. 1092–1096, jun. 1995. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.6.1092>

JICK, H. et al. Statins and the risk of dementia. **Lancet (London, England)**, v. 356, n. 9242, p. 1627–1631, nov. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03155-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03155-X)

JINWAL, U. K. et al. Chemical manipulation of hsp70 ATPase activity regulates tau stability. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 39, p. 12079–12088, set. 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3345-09.2009>

JONES, S. E.; JOMARY, C. Clusterin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 34, n. 5, p. 427–431, maio 2002. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00155-8)

KALVARI, I. et al. Non-Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 62, n. 1, p. e51, 2018. <https://doi.org/10.1002/cpbi.51>

KARCH, C. M. et al. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50976, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050976>

KASSAI, H. et al. Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates

microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. **Cell reports**, v. 7, n. 5, p. 1626–1639, jun. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.048>

KEIL, U. et al. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 48, p. 50310–50320, nov. 2004.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M405600200>

KIM, J.; BASAK, J. M.; HOLTZMAN, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 63, n. 3, p. 287–303, ago. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>

KIM, M. W. et al. Suppression of adiponectin receptor 1 promotes memory dysfunction and Alzheimer's disease-like pathologies. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12435, set. 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12632-9>

KIM, W. S. et al. Deletion of Abca7 increases cerebral amyloid-beta accumulation in the J20 mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 437–439, mar. 2013.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4165-12.2013>

KNOPMAN, D. S. et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography, aging, and apolipoprotein E genotype in cognitively normal persons. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 9, p. 2096–2106, set. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.006>

LAMBERT, J. C. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1094–1099, out. 2009.

LAMBERT, J. C. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1452–1458, dez. 2013.

LEE, J.-H. et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1146–1158, jun. 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.008>

LEE, J. H. et al. Association between genetic variants in SORL1 and autopsy-

confirmed Alzheimer disease. **Neurology**, v. 70, n. 11, p. 887–889, mar. 2008.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000280581.39755.89>

LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The neurology of mTOR. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 275–291, out. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>

LIU, F. et al. Glimepiride attenuates Abeta production via suppressing BACE1 activity in cortical neurons. **Neuroscience letters**, v. 557 Pt B, p. 90–94, dez. 2013a.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.052>

LIU, L.-Z. et al. Microtubule network is required for insulin-induced signal transduction and actin remodeling. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 357, n. 1, p. 64–74, jan. 2013b.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.09.005>

LIU, S. et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 3, p. 1098–1107, fev. 2012.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101121>

LIU, W. et al. Simvastatin ameliorates cognitive impairments via inhibition of oxidative stress-induced apoptosis of hippocampal cells through the ERK/AKT signaling pathway in a rat model of senile dementia. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 1, p. 1885–1892, jan. 2018.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8098>

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 50, 2014.

<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

LYNE, R. et al. FlyMine: an integrated database for Drosophila and Anopheles genomics. **Genome biology**, v. 8, n. 7, p. R129, 2007.

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r129>

MAGRANE, J. et al. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1700–1706, fev. 2004.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4330-03.2004>

MAHLEY, R. W.; WEISGRABER, K. H.; HUANG, Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 15, p. 5644–5651, abr. 2006.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0600549103>

MAILHOS, C.; HOWARD, M. K.; LATCHMAN, D. S. Heat shock proteins hsp90 and hsp70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death. **Journal of neurochemistry**, v. 63, n. 5, p. 1787–1795, nov. 1994.

<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051787.x>

MAJ, M. et al. The Microtubule-Associated Protein Tau and Its Relevance for Pancreatic Beta Cells. **Journal of diabetes research**, v. 2016, p. 1964634, 2016

<https://doi.org/10.1155/2016/1964634>

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2013.

<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

MATSUBARA, E.; FRANGIONE, B.; GHISO, J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7563–7567, mar. 1995.

<https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7563>

MATTSON, M. P.; GOODMAN, Y. Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. **Brain research**, v. 676, n. 1, p. 219–224, abr. 1995.

[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00148-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00148-J)

MAY, P. C. et al. Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. **Neuron**, v. 5, n. 6, p. 831–839, dez. 1990.

[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90342-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90342-D)

MEADOR, K. et al. Preliminary Findings of High-Dose Thiamine in Dementia of Alzheimer's Type. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 6, n. 4, p. 222–229, 1 out. 1993.

<https://doi.org/10.1177/089198879300600408>

MEAKIN, P. J. et al. Reduction in BACE1 decreases body weight, protects against diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity in mice. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 285 LP – 296, 1 jan. 2012.

<https://doi.org/10.1042/BJ20110512>

MISAWA, T. et al. Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains. **Acta neuropathologica**, v. 116, n. 3, p247–260, set. 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00401-008-0387-x>

MOFTAKHAR, P. et al. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 69, n. 12, p. 1201–1209, dez. 2010.

<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181fd252c>

MOLLER, H. J.; GRAEBER, M. B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 248, n. 3, p. 111–122, 1998.

<https://doi.org/10.1007/s004060050027>

MORRIS, G. P.; CLARK, I. A.; VISSEL, B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica communications**, v. 2, p. 135, set. 2014.

<https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1342777270140958>

NAM, Y. H. et al. Enhanced antidiabetic efficacy and safety of compound K-beta-cyclodextrin inclusion complex in zebrafish. **Journal of Ginseng research**, v. 41, n. 1, p. 103–112, jan. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.007>

NICHOLS, C. D. Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 677–700, dez. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.012>

NOLAN, K. A. et al. A trial of thiamine in Alzheimer's disease. **Archives of neurology**, v. 48, n. 1, p. 81–83, jan. 1991.

<https://doi.org/10.1001/archneur.1991.00530130093025>

NORAMBUENA, A. et al. mTOR and neuronal cell cycle reentry: How impaired brain insulin signaling promotes Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 13, n. 2, p. 152–167, fev. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.015>

ORKABY, A. R. et al. Metformin vs sulfonylurea use and risk of dementia in US

veterans aged ≥ 65 years with diabetes. **Neurology**, v. 89, n. 18, p. 1877–1885, out. 2017.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004586>

OSBORNE, C. et al. Glimepiride protects neurons against amyloid-beta-induced synapse damage. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 225–236, fev. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.09.030>

OTT, A. et al. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 1937–1942, dez. 1999.

<https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.1937>

PAJAK, B. et al. Preliminary Study on Clusterin Protein (sCLU) Expression in PC-12 Cells Overexpressing Wild-Type and Mutated (Swedish) AbetaPP genes Affected by Non-Steroid Isoprenoids and Water-Soluble Cholesterol. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, mar. 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20061481>

PAN, X. et al. Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. **Brain : a journal of neurology**, v. 133, n. Pt 5, p. 1342–1351, maio 2010.

<https://doi.org/10.1093/brain/awq069>

PARASKEVOPOULOU, M. D. et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W169-73, jul. 2013.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkt393>

PARMAR, N.; TAMANOI, F. Rheb G-Proteins and the Activation of mTORC1. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 39–56, 2010.

[https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)27003-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27003-8)

PATRO, R. et al. **Salmon** provides accurate, fast, and bias-aware transcript expression estimates using dual-phase inference. **bioRxiv**, p. 21592, 1 jan. 2016.

<https://doi.org/10.1101/021592>

PEREZ, E. et al. Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. **Brain research**, v. 1128, n. 1, p. 164–174, jan. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.109>

PETANCESKA, S. S. et al. Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 19, n. 1–2, p. 155–161, 2002.

<https://doi.org/10.1007/s12031-002-0026-2>

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 6, p. 1158–1171, jun. 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3018-7>

PIELAGE, J. et al. The Drosophila transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. **Developmental biology**, v. 275, n. 1, p. 245–257, nov. 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.039>

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet β cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1802–1812, 3 jul. 2006.

<https://doi.org/10.1172/JCI29103>

PRINCELY ABUDU, Y. et al. NIPSNAP1 and NIPSNAP2 Act as “Eat Me” Signals for Mitophagy. **Developmental cell**, v. 49, n. 4, p. 509–525.e12, maio 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.013>

REFOLO, L. M. et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. **Neurobiology of disease**, v. 8, n. 5, p. 890–899, out. 2001.

<https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0422>

RENSSEN, P. C. N. et al. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo - Evidence for retroendocytosis. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 275, n. 12, p. 8564–8571, mar. 2000.

<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8564>

RIZZI, F. et al. Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells. **Journal of cellular physiology**, v. 219, n. 2, p. 314–323, maio 2009.

<https://doi.org/10.1002/jcp.21671>

ROCKWOOD, K. et al. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. **Archives of neurology**, v. 59, n. 2, p. 223–227, fev. 2002.

<https://doi.org/10.1001/archneur.59.2.223>

ROGAEVA, E. et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 2, p. 168–177, fev. 2007.

ROTERMUND, C.; MACHETANZ, G.; FITZGERALD, J. C. The Therapeutic

Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 400, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00400>

RUIZ, H. H. et al. Increased susceptibility to metabolic dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with impaired hypothalamic insulin signaling and elevated BCAA levels. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 12, n. 8, p. 851–861, ago. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.008>

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, fev. 2005.

<https://doi.org/10.1126/science.1106148>

SATO, T. et al. Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 9, p. 1626–1633, set. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.009>

SCHMIDT, C. et al. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. **Molecular psychiatry**, v. 13, n. 10, p. 953–969, out. 2008.

<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002077>

SCHRIJVERS, E. M. C. et al. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. **JAMA**, v. 305, n. 13, p. 1322–1326, abr. 2011.

<https://doi.org/10.1001/jama.2011.381>

SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 10, p. 12629–12655, out. 2012.

<https://doi.org/10.3390/ijms131012629>

SLACK, C.; FOLEY, A.; PARTRIDGE, L. Activation of AMPK by the Putative Dietary Restriction Mimetic Metformin Is Insufficient to Extend Lifespan in Drosophila. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–7, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047699>

SPILMAN, P. et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e9979, abr. 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009979>

SPINDLER, S. R. et al. Statin treatment increases lifespan and improves cardiac health in *Drosophila* by decreasing specific protein prenylation. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39581, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039581>

SRODULSKI, S. et al. Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain accumulation of amylin. **Molecular neurodegeneration**, v. 9, p. 30, ago. 2014.

<https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-30>

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 8, p. 1219–1231, ago. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.010>

TALREJA, O.; CASSAGNOL, M. Simvastatin. In: Treasure Island (FL): [s.n.].

TANG, S. J. et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 467–472, jan. 2002.

<https://doi.org/10.1073/pnas.012605299>

TUCKER, H. M. et al. Human amylin induces “apoptotic” pattern of gene expression concomitant with cortical neuronal apoptosis. **Journal of neurochemistry**, v. 71, n. 2, p. 506–516, ago. 1998.

<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71020506.x>

TURNER, R.; CRAFT, S.; AISEN, P. Individuals with Alzheimer's disease exhibit a high prevalence of undiagnosed impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 9, n. 4, p. P284–P285, 1 jul. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.05.573>

UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200–205, set. 2004.

<https://doi.org/10.1038/nature02866>

VACINOVA, G. et al. Associations of polymorphisms in the candidate genes for Alzheimer's disease BIN1, CLU, CR1 and PICALM with gestational diabetes and impaired glucose tolerance. **Molecular biology reports**, v. 44, n. 2, p. 227–231, abr. 2017.

<https://doi.org/10.1007/s11033-017-4100-9>

- VIOLLET, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 122, n. 6, p. 253–270, mar. 2012.
<https://doi.org/10.1042/CS20110386>
- WHITEHEAD, J. P. et al. Adiponectin – a key adipokine in the metabolic syndrome. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 3, p. 264–280, 1 maio 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00510.x>
- WILSON, R. S. et al. The Natural History of Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. v. 27, n. 4, p. 1008–1017, 2013.
<https://doi.org/10.1037/a0029857>
- WRAGG, M. A. et al. No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. **Neuroscience letters**, v. 201, n. 2, p. 107–110, dez. 1995.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12146-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12146-3)
- XU, Q. et al. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE**, v. 26, n. 19, p. 4985–4994, 2006.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006>
- YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762–769, 2003.
<https://doi.org/10.1038/nature01705>
- YAO, K. M.; WHITE, K. Neural specificity of elav expression: defining a Drosophila promoter for directing expression to the nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 63, n. 1, p. 41–51, jul. 1994.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63010041.x>
- ZAHID, S. et al. Differential Expression of Proteins in Brain Regions of Alzheimer's Disease Patients. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 1, p. 208–215, jan. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s11064-013-1210-1>
- ZHANG, B. et al. Salidroside reduces tau hyperphosphorylation via up-regulating GSK-3 β phosphorylation in a tau transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 5, p. 21, 2016.
<https://doi.org/10.1186/s40035-016-0068-y>
- ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 316523, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/316523>

ZHU, X. et al. Microtubules Negatively Regulate Insulin Secretion in Pancreatic beta Cells. **Developmental cell**, v. 34, n. 6, p. 656–668, set. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.020>