



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame, sobre moscas

***Drosophila melanogaster*, modelo da cascata β -amilóide**

Aluna: Alice Norberto de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UBERLÂNDIA - MG

2020



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

Avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame, sobre moscas
***Drosophila melanogaster*, modelo da cascata β -amilóide**

Aluna: Alice Norberto de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de Concentração: Genética)

UBERLÂNDIA - MG

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

C331 2020	<p>Carvalho, Alice Norberto de, 1996- Avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame, sobre moscas <i>Drosophila melanogaster</i>, modelo da cascata b-amilóide [recurso eletrônico] / Alice Norberto de Carvalho. - 2020.</p> <p>Orientador: Carlos Ueira Vieira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.792 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Vieira, Carlos Ueira, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 10/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e oito de janeiro de dois mil e vinte e um.	Hora de início:	11:00h	Hora de encerramento:	11:40h
Matrícula do Discente:	11822GBI001				
Nome do Discente:	Alice Norberto de Carvalho				
Título do Trabalho:	Avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame, sobre moscas <i>Drosophila melanogaster</i> , modelo da cascata β -amilóide.				
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 vinte e oito dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e um, às 11:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Carlos Ueira Vieira (Orientador), Ana Paula Mendes Silva e Cristiane Lenz Dalla Corte. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Carlos Ueira Vieira apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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 28/01/2021, às 11:49, 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 **Ana Paula Mendes Silva, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 14:47, 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 **Cristiane Lenz Dalla Corte, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2472808** e o código CRC **8B1EB4D8**.



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

**Avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame, sobre moscas
Drosophila melanogaster, modelo da cascata β -amilóide**

Aluna: Alice Norberto de Carvalho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
(Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Mendes Silva

Prof^a. Dr^a Cristiane Lenz Dalla Corte

Data da Defesa: 28/01/2021

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Carlos Ueira Vieira

(NOME DO ORIENTADOR)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Cristina e ao meu pai Victor, pela serenidade e sabedoria com que me guiaram nessa jornada. Obrigada por manterem consigo os meus objetivos bastante claros; obrigada por todo o apoio técnico que me ofereceram. Agradeço pelo amor incondicional e por cuidarem de mim com tanto zelo e carinho. Ao meu irmão Guilherme, por me encorajar na busca pelo autoconhecimento. Por me ensinar a ser sempre grata e gentil comigo, além de empática e complacente com os demais. Ainda, ao meu cachorrinho Rex por cada dose de fofura.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, por abrir as portas de seu laboratório a uma auna recém chegada, e, posteriormente, por ter me estendido a mão no momento mais crítico do meu mestrado. Agradeço por confiar a mim a realização desse trabalho, sempre me dando espaço para originalidade e autonomia. À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti por me ensinar a cuidar do laboratório com apreço e afincos. Também, ao Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, que tanto contribuiu para o meu ingresso na pós-graduação e em fases iniciais do projeto. Deixo aqui os meus votos de admiração.

À toda equipe do Laboratório de Genética (LABGEN). Sou grata à Jéssica pela receptividade e primeiros ensinamentos. Eternamente grata à Serena, por se dispor a encarar comigo a responsabilidade de recomeçar o projeto. Obrigada pelos cursos intensivos sobre "*Drosophila* na bancada, e pelas reuniões para montagem de cronograma e para discussões teóricas e de resultados. Além disso, e principalmente por isso, agradeço pela amizade única que construímos.

Ao Heitor, Luiz Gabriel, Natileli, e novamente à Serena, por terem sido verdadeiros companheiros de laboratório. Lembrarei com carinho e certo desespero de todas as nossas comidinhas para finais de semana e madrugadas de trabalho. Vocês foram certamente essenciais em todo o processo.

Ainda, aos laboratórios parceiros, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), também do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), e, Laboratório de Multiusuários, do Instituto de Química (IQUFU). À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa,

assim como à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelas instalações e equipamentos concedidos.

Finalmente, aos professores da banca, por aceitarem o convite para fazer parte da avaliação desse trabalho e pelas valorosas contribuições para o enriquecimento do mesmo. Enfim, a todos que não foram citados aqui, mas que direta ou indiretamente fizeram parte dessa experiência; gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	1
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
DOENÇA DE ALZHEIMER.	9
PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE (APP)	10
VIA NÃO AMILOIDOGÊNICA	12
VIA AMILOIDOGÊNICA	14
EMARANHADOS NEUROFIBRILARES	16
ASPARTAME	17
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
SISTEMA GAL4/UAS	21
HIPÓTESES	23
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
LINHAGENS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	25
GENÓTIPOS MODELO.	25
GENÓTIPO MODELO DA CASCATA β -AMILÓIDE	25
GENÓTIPO MODELO DE DEGENERAÇÃO OCULAR.	26
MANIPULAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS(OS) LINHAGENS/GENÓTIPOS MODELO.	26

SOLUBILIZAÇÃO E DILUIÇÃO DO ASPARTAME.....	27
ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA.....	29
TESTE RING (<i>RAPID ITERATIVE NEGATIVE GEOTAXIS</i>).....	29
QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE PROTEÍNAS AMILÓIDES	31
ENSAIO DE GLICOSE.....	32
ANÁLISE DE DEGENERAÇÃO OCULAR.	33
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
SOLUBILIZAÇÃO E DILUIÇÃO DO ASPARTAME.....	35
ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA.....	36
TESTE RING (<i>RAPID ITERATIVE NEGATIVE GEOTAXIS</i>).....	41
QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE PROTEÍNAS AMILÓIDES	46
ENSAIO DE GLICOSE.....	50
ANÁLISE DE DEGENERAÇÃO OCULAR.	55
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO.....	66

LISTA DE ABREVIÇÕES

A	adultos
Aβ	peptídeo β -amilóide
ADAM	do inglês, <i>a desintegrin and metalloproteinase domains</i>
ADI	do inglês, <i>acceptable daily intake</i>
ADI	do inglês, <i>Alzheimer's Disease Internacional</i>
APH-1	do inglês, <i>anterior pharynx-defective 1</i>
APM	aspartame
APP	do inglês, <i>amyloid precursor protein</i>
α	alfa
BACE-1	enzima β -secretase humana
BHE	barreira hematoencefálica
°C	graus Celsius
cm	centímetros
DA	doença de Alzheimer
dL	decilitro
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleid acid</i>
d.p.e.	dias pós eclosão
EH	enzima hipóxido hidrolase
FAD	do inglês, <i>familial Alzheimer's disease</i>
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>

g	gramas
GOD	enzima glicose oxidase
HJ	hormônio juvenil
K	Kelvin
kb	quilobases
Kcal	quilocalorias
Kg	quilogramas
LABGEN	Laboratório de Genética
LOAD	do inglês, <i>late-onset Alzheimer's disease</i>
mA	milliampere
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	millimolar
n	número amostral
NAAT	transportadores de aminoácidos neutros
NCT	nicastrina
NDD	do inglês, <i>neurodegenerative disease</i>

NFTs	do inglês, <i>neurifibrillary tangle</i>
NMDA	receptores N-metil-D-aspartato
P	pupas
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PEN-2	do inglês, <i>presenilin enhancer protein 2</i>
PFs	protofibrilas
pH	potencial hidrogeniônico
PHFs	do inglês, <i>paired helical filaments</i>
PIB	produto interno bruto
PS1	presenilina-1
PS2	presenilina-2
®	marca registrada
R²	coeficiente de determinação
RFU	unidade de fluorescência randômica
RING	do inglês, <i>rapid iterative negative geotaxis</i>
RNA	do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
RNA_m	RNA mensageiro
r.p.m	rotações por minuto
SAD	do inglês, <i>sporadic Alzheimer's disease</i>
SEM	erro padrão da média

- SNC** Sistema Nervoso Central
- SNS** Sistema Nervoso Simpático
- SPs** do inglês, *senile plaques*
- UAS** do inglês, *upstream activation sequence*
- UFU** Universidade Federal de Uberlândia
- V** volts
- W** watts
- x** vezes
- xg** vezes gravidade
- %** porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Processamento diferencial/ <i>splicing</i> alternativo da proteína precursora amilóide (APP)	11
Figura 02	Clivagem da proteína precursora amilóide (APP) pela via não-amiloidogênica	13
Figura 03	Clivagem da proteína precursora amilóide (APP) e formação da placa amilóide, pela via amiloidogênica.....	15
Figura 04	Evidências biológicas da Doença de Alzheimer	16
Figura 05	Fórmula molecular do adoçante artificial aspartame.....	18
Figura 06	Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Figura 07	Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Figura 08	Sistema GAL4/UAS	22
Figura 09	Valores de pH medidos para a solução de aspartame e para o meio contendo solução de aspartame	36
Figura 10	Curva de sobrevivência dos controles e tratamentos.....	39
Figura 11	Avaliação da presença de pupas e taxa de eclosão de adultos dos controles e tratamentos.	40
Figura 12	Percentual de escalada dos controles após 5 e 10 dias de tratamento	43
Figura 13	Percentual de escalada dos tratamentos após 5 e 10 dias de consumo de aspartame	46

Figura 14	Valores de fluorescência para proteína amilóide após 5 e 10 dias de consumo de aspartame	48
Figura 15	Validação do glicosímetro como método de quantificação de glicose, em amostras de tecido de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
Figura 16	Teste de glicose dos controles após 5 e 10 dias de tratamento	52
Figura 17	Teste de glicose dos tratamentos após 5 e 10 dias de consumo de aspartame	54
Figura 18	Avaliação do grau de degeneração ocular em resposta ao tratamento com aspartame	57

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela perda progressiva e irreversível de tecido neural, sendo, por esse motivo, definida como uma afecção neurodegenerativa. Em suas duas formas de manifestação; a forma esporádica (SAD/LOAD) e a forma familiar (FAD), os pacientes apresentam disfunções cognitivas, fisiológicas e comportamentais, perda de memória e demência. A DA é a forma mais comum de demência, representando 75% do total de casos. O diagnóstico depende da identificação das marcas patológicas clássicas, que são as placas senis e os emaranhados neurofibrilares. Considerando as placas β -amilóides como um dos sinais da doença, moscas *Drosophila melanogaster*, modelo da cascata β -amilóide, foram usadas para avaliação do efeito do adoçante artificial aspartame (ASP) sobre a DA, visto que o ácido aspártico e a fenilalanina, ambos subprodutos da hidrólise do ASP, já foram descritos como agentes neurotóxicos, mas poucas vezes correlacionados, especificamente, com o Alzheimer. Usando a *Drosophila* como modelo experimental, foi possível avaliar se o consumo desse adoçante elevava a fluorescência das proteínas amilóides no cérebro da mosca, e se essa elevação correlacionava-se a um declínio motor. Além disso, foi mensurada a glicose cerebral após consumo da droga. Nossos resultados sugerem relação, ainda que fraca, entre o consumo de ASP e a DA em moscas. Considerando que o adoçante tem, atualmente, um uso indiscriminado, e que, o aumento da expectativa de vida da população mundial associa-se ao aumento do número de casos da doença, são necessários mais estudos entre ASP e DA, para uma correlação definitiva.

Palavras-chave: doença de Alzheimer; demência; doença neurodegenerativa; adoçante não-nutritivo; mosca-da-fruta.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive and irreversible loss of neural tissue, which is why it is defined as a neurodegenerative disease. In its two forms of manifestation; sporadic Alzheimer's disease (SAD/LOAD) and familial Alzheimer's disease (FAD), patients have cognitive, physiological and behavioral dysfunctions, memory loss and dementia. AD is the most common form of dementia, accounting for 75% of all cases. The diagnosis depends on the identification of classic pathological marks, which are senile plaques and neurofibrillary tangles. Considering β -amyloid plaques as one of the signs of the disease, *Drosophila melanogaster* flies, model of the β -amyloid pathway, were used to evaluate the effect of the artificial sweetener aspartame (ASP) on AD, since aspartic acid and phenylalanine, both byproducts of ASP hydrolysis, have been described as neurotoxic agents, but rarely correlated, specifically, with Alzheimer's. Using *Drosophila* as an experimental model, it was possible to assess whether the consumption of this sweetener raised the fluorescence of amyloid proteins in the fly's brain, and whether this increase correlated with a motor decline. In addition, cerebral glucose was measured after consumption of the drug. Our results suggest a relationship, albeit weak, between the consumption of ASP and AD in flies. Considering that the sweetener currently has an indiscriminate use, and that the increase in life expectancy of the world population is associated with the increase in the number of cases of the disease, further studies between ASP and AD are needed, for a definitive correlation.

Key-words: Alzheimer's disease; dementia; neurodegenerative disease; non-nutritive sweetener; fruit fly.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doença de Alzheimer

Descrita pela primeira vez em 1907, pelo patologista alemão Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer (DA) é definida como uma afecção neurodegenerativa (NDD). O termo NDD é uma classificação ampla de distúrbios, marcados pela degeneração progressiva e irreversível do tecido neural (Lane et al., 2017; Wajda et al., 2017).

Essa degeneração neural leva os pacientes a disfunções cognitivas, fisiológicas e comportamentais, perda de memória, demência, e, em casos mais graves, morte. A DA é a forma mais comum de demência, representando 75% do total de casos (Thomas et al., 2008; Qiu et al., 2009).

A doença apresenta-se em duas formas: a forma esporádica (SAD) ou de início tardio (LOAD), que é a forma não hereditária, e, a forma familiar (FAD), que é hereditária. A forma não hereditária não parece estar associada a qualquer perfil mutacional. Denomina-se como doença de início tardio por acometer, principalmente, idosos acima de 65 anos. A forma hereditária está associada a mutações nos genes: APP, PS1, PS2 e ApoE. É caracterizada como uma doença de início precoce, podendo desenvolver-se em indivíduos com menos de 50 anos (Kozlov et al., 2017).

Em relação à progressão da doença, ela é similar tanto na forma esporádica, quanto na forma familiar, ou seja, ambas formas apresentam os sintomas acima descritos, sendo a perda de memória o sintoma mais frequente (Swerdlow, 2007; Irvine et al., 2008).

O diagnóstico da DA depende da identificação das marcas patológicas clássicas: as placas senis (SPs) e os emaranhados neurofibrilares (NFTs). Além dessa comprovação histopatológica, também são realizados testes neuropsicológicos, para avaliação do estado mental do paciente (Swerdlow, 2007; Irvine et al., 2008).

Por fim, quanto a prevalência, estima-se que, no mundo, mais de 24 milhões de pessoas sejam acometidas pela doença, com 4,6 milhões de novos casos por ano. Para os próximos anos, devido ao desenvolvimento demográfico e ao aumento da expectativa de vida, é previsto um aumento no número de casos

para 63 milhões de pessoas, em 2030. Em relação à prevalência entre tipos, a forma não hereditária é mais comum, correspondendo a 95% do total de casos (Irvine et al., 2008; Thomas et al., 2008; Kozlov et al., 2017).

Proteína Precursora Amilóide (APP)

Em humanos, a proteína precursora amilóide (APP) é uma proteína transmembrana de tipo I, que além da porção transmembrana, apresenta um prolongamento extracelular amino-terminal (N-terminal), longo, e um prolongamento intracelular carboxi-terminal (C-terminal), curto (Annaert e Strooper, 2002).

Essa proteína apresenta múltiplas isoformas, sendo as quatro mais conhecidas: APP695, APP714, APP751, e, APP770. - As diferentes formas de APP são designadas pelo número de aminoácidos que as compõem, ou seja, as proteínas contêm um total de 659, 714, 751 e 770 aminoácidos, respectivamente (Panegyres e Atkins, 2011).

As diferentes isoformas dessa proteína são geradas por processamento diferencial, do RNA mensageiro (RNA_m), de um gene localizado no cromossomo 21 (21q21.3). Esse gene se estende por uma distância de aproximadamente 240 quilobases (kb), e contém 18 éxons. - Em humanos, os quatro membros da família APP são resultantes do *splicing* alternativo, entre os éxons 7 e 8, desse gene (Panegyres e Atkins, 2011; Dawkins e Small, 2014).

Variantes menos comuns, como APP639 e L-APP, também já foram relatadas para essa proteína. A primeira delas (APP639) é resultante do processamento dos éxons 2, 7 e 8. A segunda (L-APP), resultado do processamento do éxon 15 (Dawkins e Small, 2014).

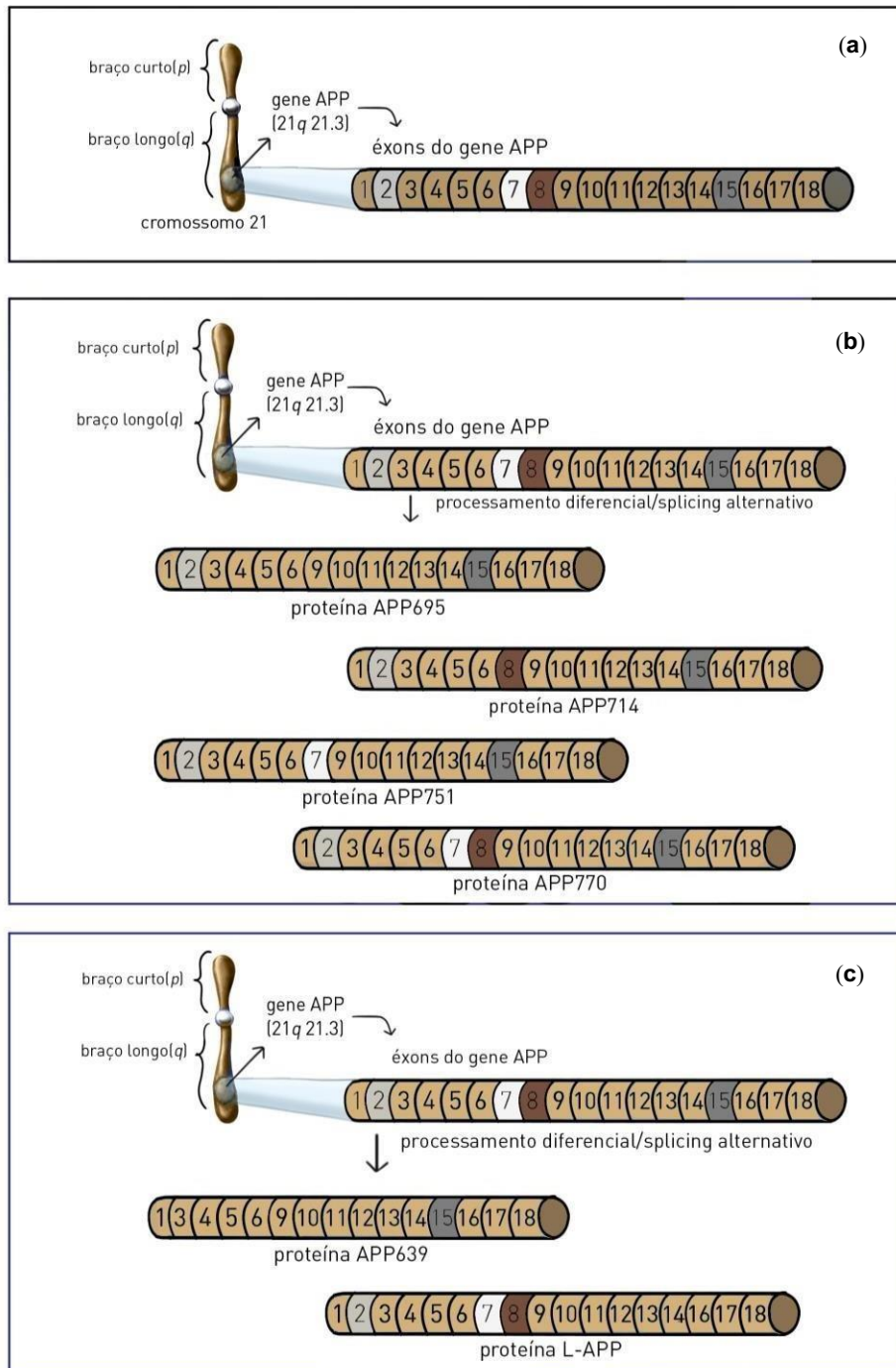


Figura 01: Processamento diferencial/*splicing* alternativo da proteína precursora amilóide (APP). (a) Esquema representativo dos 18 éxons do gene APP, localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q21.3). (b) Variantes comuns da proteína APP, resultantes do processamento diferencial. A isoforma APP695 não contém os éxons 7 e 8. A isoforma APP714 não tem o éxon 7. A proteína APP751 não tem o éxon 8. Já a proteína APP770 apresenta os éxons 7 e 8. (c) Variantes menos comuns da proteína APP, resultantes do *splicing* alternativo. A isoforma APP639 não contém os éxons 2, 7 e 8, enquanto a forma L-APP, carece do éxon 15 (arquivo pessoal).

Quanto à função, a estrutura da APP sugere que ela atue, principalmente, como receptora de superfície celular, sendo uma das proteínas mais abundantes do sistema nervoso central (SNC), expressa, predominantemente, em neurônios. Entretanto, diversas outras funções fisiológicas, tais como: a maturação dos subtipos de neurônios e a formação de sinapses funcionais, já foram mencionadas, mas, são difíceis de serem elucidadas (Gralle e Ferreira, 2007; Wolfe e Guénette, 2007).

Embora o conhecimento sobre a função de APP, gerado até o momento, seja inconclusivo, sabe-se muito sobre a clivagem dessa proteína. A clivagem de APP pode ocorrer por duas vias metabólicas distintas: a via não amiloidogênica, e a via amiloidogênica. O processamento de APP pela via não amiloidogênica parece ser protetor no contexto da doença de Alzheimer. Contrariamente, o processamento dessa proteína, pela via amiloidogênica, parece justificar a doença.

Via Não Amiloidogênica

Segundo a via não amiloidogênica, a proteína APP é clivada pela enzima α -secretase, sendo, a atividade de α -secretase mediada por uma série de proteases, membros da família das metaloproteases (ADAM). As α -secretases clivam a APP dentro do próprio peptídeo β -amilóide (A β), mais especificamente entre os resíduos 16 (lisina) e 17 (leucina). Dessa clivagem resultam dois fragmentos: SAPP α e C83. O fragmento SAPP α se desprende da membrana, sendo solubilizado no ambiente extracelular, já o fragmento C83, permanece ligado à membrana (Strooper et al., 2010).

O fragmento que permanece ligado à membrana (C83), pode ser degradado pelos lisossomos, ou, ser processado pela γ -secretase. O processamento de C83, pela γ -secretase, produz uma série de peptídeos que são coletivamente chamados de fragmentos p3, e também, o fragmento C59. Os fragmentos p3 deixam a membrana celular, e então, encaminham-se para o ambiente extracelular, enquanto o fragmento C59 permanece aderido à membrana (Strooper et al., 2010).

O processamento de APP pela via não-amiloidogênica é mais comum em indivíduos sadios, por esse motivo, essa via metabólica parece ser protetora, no contexto da DA. Acredita-se que o processamento de APP pelas α -secretases seja contrário à doença de Alzheimer, uma vez que essa secretase cliva o interior do peptídeo A β , impedindo a formação de placas amilóides (Strooper et al., 2010).

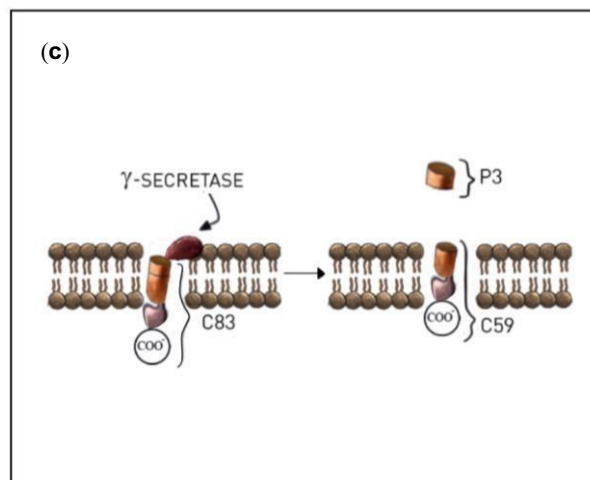
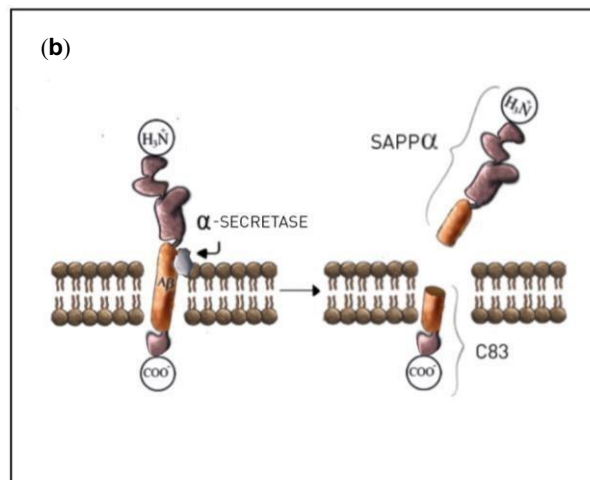
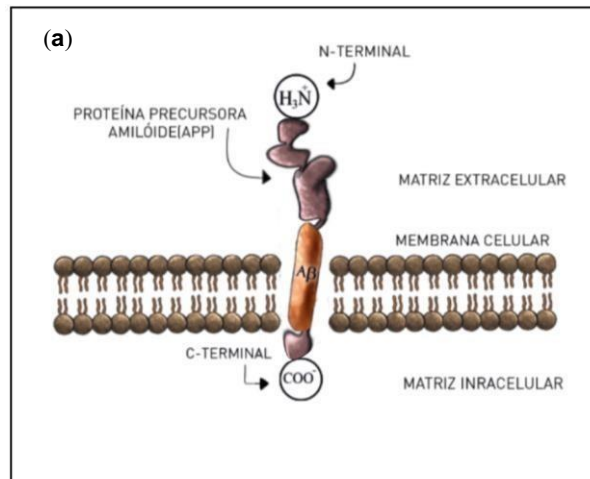


Figura 02: Clivagem da proteína precursora amilóide (APP) pela via não-amiloidogênica. (a) Esquema representativo da proteína APP. A proteína APP compõe-se por um longo prolongamento extracelular amino-terminal (N-terminal), uma porção transmembrana, e, um curto prolongamento intracelular carboxi-terminal (C-terminal). É possível visualizar o peptídeo amilóide (A β). **(b)** Quebra da APP, mediada pela enzima α -secretase. A α -secretase cliva o peptídeo entre os resíduos 16 e 17, gerando o fragmento solúvel SAPP α , que se desprende da membrana, e, o fragmento C83, que permanece aderido à membrana. **(c)** Processamento proteolítico da APP pela enzima γ -secretase. A γ -secretase cliva o fragmento C83, produzindo os peptídeos p3, dirigidos ao meio extracelular, e também, o fragmento C59, que mantém-se junto à membrana (arquivo pessoal).

Via Amiloidogênica

A via amiloidogênica sugere a formação de placas amilóides, como justificativa à doença de Alzheimer. As placas amilóides são acumulações extracelulares de peptídeos A β . Tais peptídeos originam-se devido à clivagem proteolítica da proteína APP, pelas enzimas β e γ secretase, duas secretases ligadas à membrana (Kozlov et al., 2017; Vassar et al., 2009; Strooper et al., 2010).

A β -secretase (BACE-1), uma aspartil protease do tipo I, é uma secretase endógena, sendo a principal, senão a única β -secretase presente no cérebro. Essa enzima cliva a porção N-terminal de APP (resíduo 671), produzindo o fragmento SAPP β , e, um outro fragmento C-terminal, chamado CTF β ou C99. O fragmento SAPP β desprende-se da membrana e é liberado para o ambiente extracelular, onde é solubilizado. Já o fragmento C99, permanece ligado à membrana (Strooper et al., 2010; Vassar et al., 2009).

A γ -secretase é uma aspartil protease de múltiplas subunidades: a presenilina-1 (PS1) e a presenilina-2 (PS2) formam o núcleo catalítico da enzima. Outras três proteínas: nicastrina (NCT), *anterior pharynx-defective 1* (APH-1), e, *presenilin enhancer protein 2* (PEN2), são necessárias para a formação do complexo γ -secretase (Strooper et al., 2010).

O complexo γ -secretase cliva a porção C-terminal de APP (ou a porção C-terminal de C99), gerando um peptídeo A β maduro, e um segundo fragmento denominado C59. Os peptídeos A β desprendem-se da membrana, sendo encaminhados para o meio extracelular, enquanto o fragmento C59 permanece aderido à membrana (Vassar et al., 2009; Gandy, 2005; Strooper et al., 2010).

Os peptídeos amilóides depositados no ambiente extracelular, apresentam baixa solubilidade (ou são insolúveis), e, por esse motivo, ao invés de se desfazerem, tendem a se agregar. Diferentes formas do peptídeo A β já foram identificadas, podendo ser encontrado na forma de monômeros, dímeros ou trímeros. As estruturas diméricas e triméricas agregam-se formando os oligômeros, que por sua vez, agregam-se formando as protofibrilas (PFs). As protofibrilas formam as fibrilas presentes nas placas senis (Gandy, 2005).

Os peptídeos A β -40 (peptídeo contendo 40 resíduos de aminoácidos) e A β -42 (peptídeo contendo 42 resíduos de aminoácidos), são os principais componentes das placas amilóides, sendo que o A β -42 é mais abundante dentro das placas, devido à sua maior taxa de fibrilização e insolubilidade (quando comparado ao A β -40) (Lane et al., 2017).

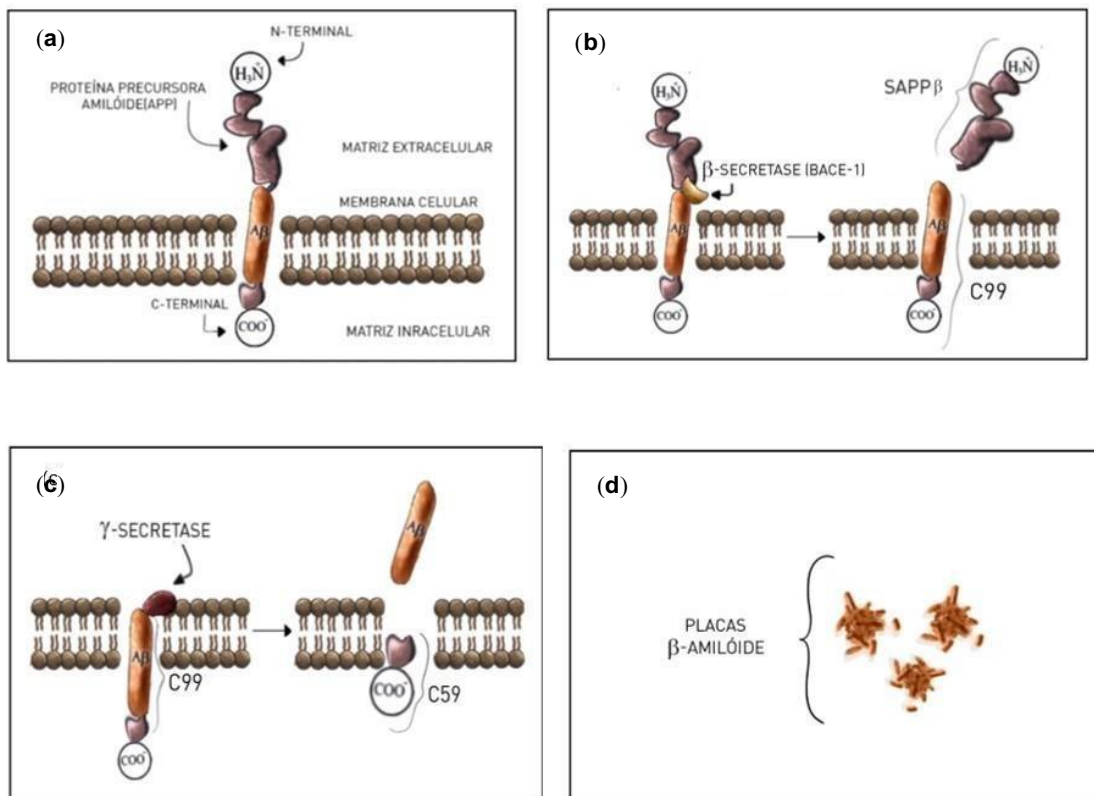


Figura 03: Clivagem da proteína precursora amilóide (APP) e formação da placa amilóide, pela via amiloidogênica. (a) Representação esquemática da APP. A proteína APP apresenta um prolongamento extracelular amino-terminal (N-terminal), uma porção transmembrana, e, um prolongamento intracelular carboxi-terminal (C-terminal). O prolongamento N-terminal é mais extenso, quando comparado com o C-terminal. Também é possível observar o peptídeo β -amilóide (A β). (b) Processamento proteolítico da APP, pela enzima β -secretase (BACE-1). A BACE-1 medeia a clivagem de APP no resíduo 671, gerando o

fragmento solúvel SAPP_β que se desprende da membrana, e, o fragmento C99, que permanece ancorado à membrana. **(c)** Processamento proteolítico da APP, pela enzima γ -secretase. A γ -secretase cliva o fragmento C99 no resíduo 712-714, gerando o peptídeo A β , e também, o fragmento C59. O peptídeo A β encaminha-se para o ambiente extracelular, enquanto C59 permanece aderido à membrana celular. **(d)** Acumulações extracelulares de peptídeos A β , e, formação da placa amilóide (arquivo pessoal).

Emaranhados Neurofibrilares

Além de uma evidência biológica extracelular, a doença de Alzheimer também é marcada por uma evidência biológica intracelular. Essas lesões intracelulares correspondem aos novos/emaranhados neurofibrilares. Os emaranhados neurofibrilares, constituem-se de filamentos helicoidais emparelhados (PHFs), compostos, principalmente, por proteínas TAU hiperfosforiladas (Querfurth e LaFerla, 2010).

A proteína TAU, predominantemente expressa em axônios, é um componente do citoesqueleto neuronal, sendo, a sua principal função, a estabilização dos microtúbulos (Ballatore et al., 2007).

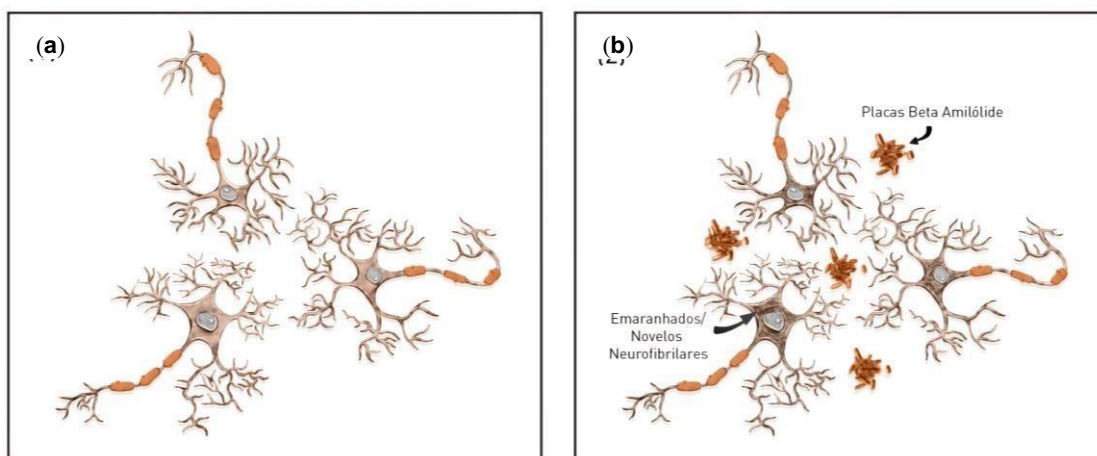


Figura 04: Evidências biológicas da doença de Alzheimer (DA). **(a)** Esquema representativo de neurônios de um indivíduo sadio, ou seja, não acometido pela doença de Alzheimer (DA). É possível inferir que esses são neurônios saudáveis, devido à ausência das marcas neuropatológicas clássicas. **(b)** Esquema representativo de neurônios de um indivíduo acometido pela DA. É possível inferir que esses são neurônios não saudáveis, devido à presença das marcas neuropatológicas clássicas (placas amilóides e emaranhados/novos neurofibrilares) (arquivo pessoal).

A relação entre essas duas marcas patológicas ainda não está claramente compreendida, mas, alguns estudos sugerem que os peptídeos A β sejam primeiro depositados intraneuronalmente, como NFTs, e, em um segundo momento,

depositados extraneuronalmente, associados às placas senis (Lacosta et al., 2017).

Aspartame

O adoçante artificial aspartame (APM) foi descoberto, em 1965, por James Schlatter. Quimicamente, o APM corresponde ao éster metílico de N-alfa-aspartil-L-fenilalanina ($C_{14}H_{18}N_2O_5$). - Ou seja, essa substância compõe-se pelos aminoácidos ácido aspártico (40%) e fenilalanina (50%), e também, por metanol (10%) (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013).

Apesar de descoberto em 1965, seu consumo foi liberado apenas em 1981, pelo Food and Drug Administration (FDA), órgão americano responsável por testar drogas, alimentos e cosméticos. Já no Brasil, o livre comércio de dietéticos foi liberado em 1988 (Martins e Azoubel, 2006).

Quando liberado, imaginava-se um consumo direcionado a diabéticos e pessoas que tentavam perder peso. Entretanto, a intensa sensação de doçura proporcionada pelo aspartame (cerca de 180-200 vezes mais doce que a sacarose) permite o uso de doses tão pequenas, que o produto é quase não calórico (4Kcal/g). O resultado disso é o uso indiscriminado, ou seja, o adoçante deixou de ser usado apenas pelo grupo mencionado, e passou a ser consumido por quaisquer grupos de pessoas (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013; Humphries et al., 2008).

Atualmente o APM é um adoçante amplamente difundido no mundo, sendo encontrado em produtos alimentícios, tais como: refrigerantes, sucos concentrados, geléias, gelatinas, iogurtes, cereais matinais e também, em medicamentos (Choudhary e Pretorius, 2017).

A FDA juntamente com outras agências, estabeleceu que a dose diária aceitável (ADI) de aspartame é de 50mg/Kg para os Estados Unidos, e, de 40mg/Kg para a União Européia, incluindo, portanto, o Brasil. - Embora o consumo de adoçantes seja considerado seguro na faixa de ingestão diária aceitável, diversos estudos mostram que seu consumo pode causar efeitos adversos à saúde, incluindo: síndrome metabólica da obesidade, alteração na microbiota intestinal, e, alterações neurocomportamentais (Ardalan et al., 2017).

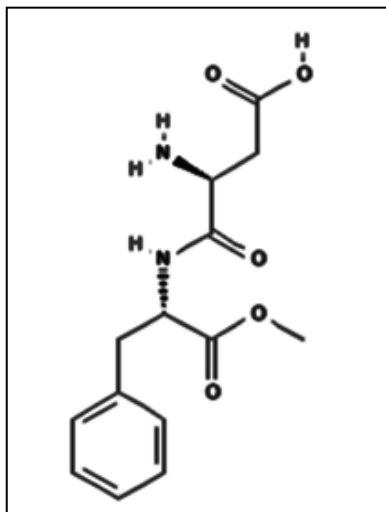


Figura 05: Fórmula molecular do adoçante artificial aspartame: N-alfa-aspartil-L-fenilalanina (C₁₄H₁₈N₂O₅) (adaptado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

***Drosophila melanogaster* como modelo experimental para doença de Alzheimer**

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um inseto pequeno com aproximadamente 2mm de comprimento, sendo as fêmeas, um pouco maiores que os machos. Além do tamanho corporal, as fêmeas diferem dos machos por apresentarem alternância de listras claras e escuras no abdômen. Os machos não têm essas listras, mas, apresentam a extremidade do abdômen escura (Roote e Prokop, 2013).

Apesar dessas diferenças, o critério que deve ser considerado para a distinção dos sexos, é a presença do pente sexual, uma estrutura exclusiva dos machos, localizada no primeiro par de patas. Assim, é possível observar dimorfismo sexual na espécie (Roote e Prokop, 2013).

Além da diferenciação entre machos e fêmeas, as fêmeas recém-eclodidas podem ser discriminadas em virgens e não-virgens pela presença, nas fêmeas virgens, de uma mancha abdominal, denominada mecônio. Outra característica desse organismo é a holometabolia, ou seja, larvas e adultos são morfologicamente diferentes (Roote e Prokop, 2013).

A *Drosophila* foi o primeiro organismo complexo a ter o seu genoma sequenciado. Com o sequenciamento do genoma humano, alguns anos depois, as homologias observadas entre ambos genomas permitiram que o entomologista americano, Charles Woodworth, propusesse, em 1990, a utilização da mosca como modelo experimental para estudos genéticos (Pandey e Nichols, 2011; Ugur et al., 2016).

Acredita-se que 75% dos genes causadores de doenças humanas, tenham um ortólogo funcional na mosca. Devido a essa conservação do genoma com organismos superiores, juntamente com a tentativa de reduzir a utilização de mamíferos em pesquisas genéticas, a *Drosophila* passou a ser extensivamente utilizada (Pandey e Nichols, 2011; Parvathi e Rajagopal, 2014; Siddique et al., 2005).

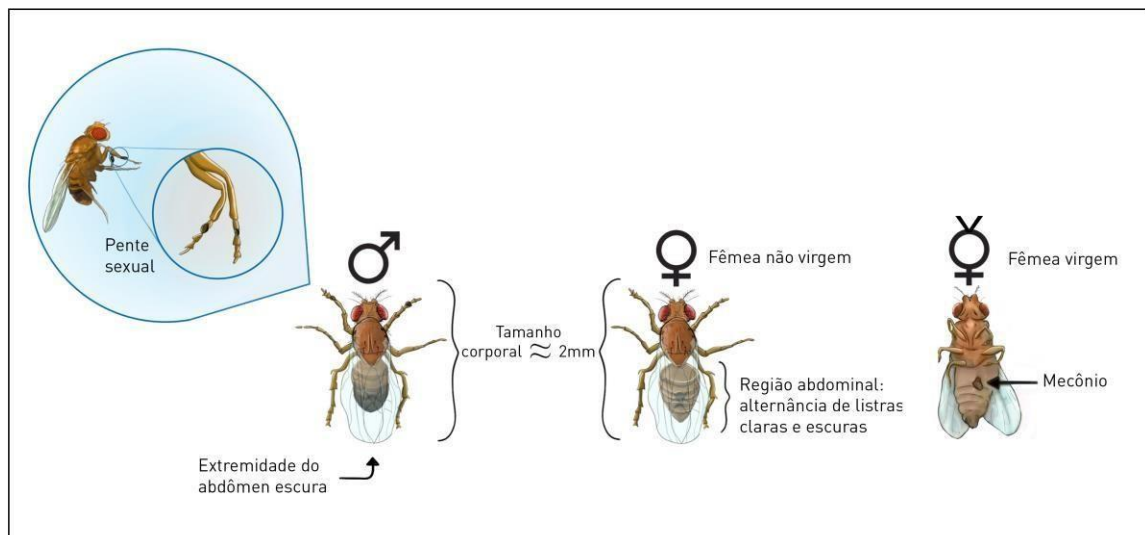


Figura 06: Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster*. O tamanho corporal desses insetos é de aproximadamente 2mm, entretanto, as fêmeas são maiores que os machos. Além do tamanho corporal, as fêmeas diferem dos machos por apresentarem alternância de listras claras e escuras no abdômen. Os machos não têm essas listras, mas, apresentam a extremidade do abdômen escura. Além disso, os machos apresentam o pente sexual, uma estrutura localizada no primeiro par de patas. Além da diferenciação entre fêmeas e machos, as fêmeas são classificadas como virgens e não-virgens. Fêmeas virgens apresentam uma mancha abdominal denominada mecônio, que não está presente em fêmeas não-virgens (arquivo pessoal).

Além disso, esse inseto apresenta outras vantagens como: a inexistência de restrições éticas, fácil manipulação e baixo custo laboratorial, tempo de

geração e de vida útil curtos, e, prole numerosa (Pandey e Nichols, 2011). A mosca tem um ciclo de vida muito rápido. Em uma temperatura de aproximadamente 25°C, após a ovoposição é necessário um dia para o aparecimento das larvas. Essas larvas passam por três estágios (primeiro, segundo e terceiro ínstars larvais), chegando no quinto dia, ao estágio de pré-pupa. Essa pré-pupa desenvolve-se em uma pupa (sétimo dia), e, por volta do décimo dia após a ovoposição, ocorre a eclosão do indivíduo adulto (Roote e Prokop, 2013).

Então, na temperatura mencionada, novos descendentes são gerados após 10 dias do acasalamento, enquanto, para os modelos tradicionais de roedores, esse tempo varia de 3 a 4 meses (Pandey e Nichols, 2011; Rajagopal, 2014).

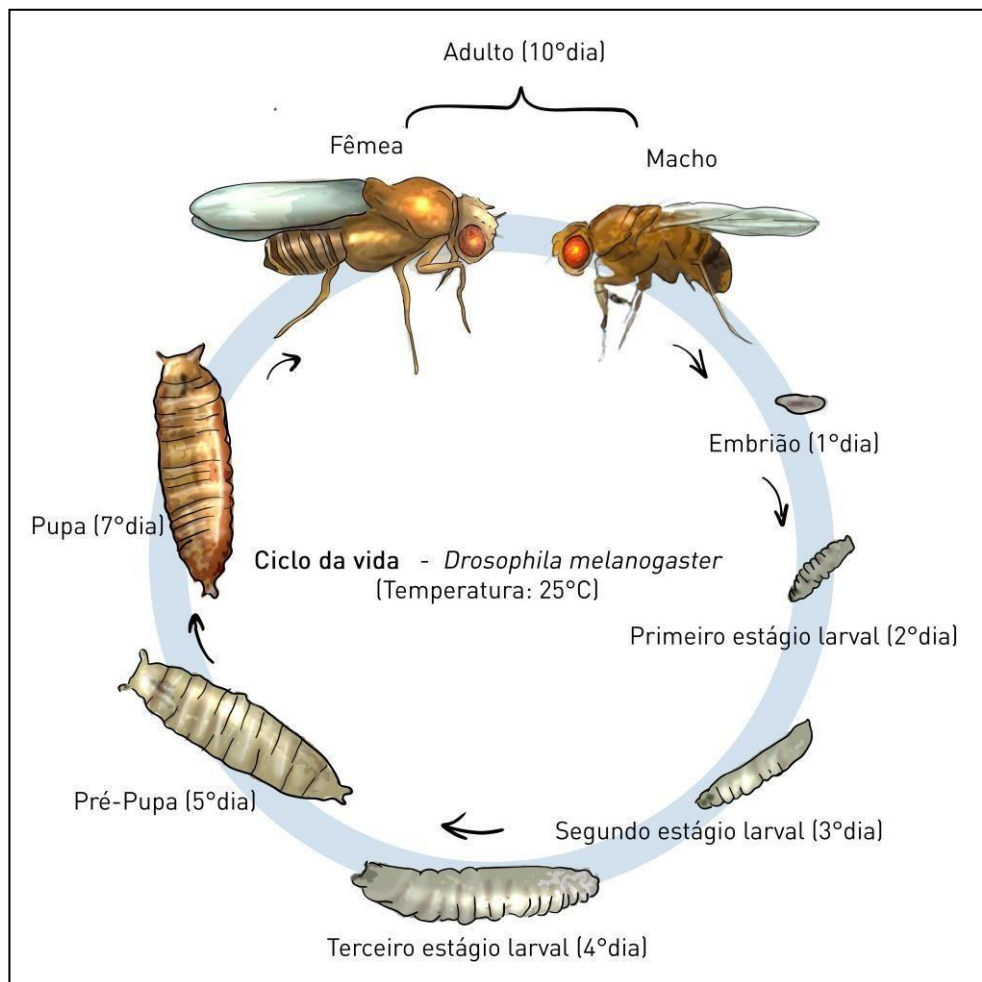


Figura 07: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* (arquivo pessoal).

As características acima mencionadas fazem da *Drosophila* um organismo ideal para o estudo de quase todas as doenças humanas. Em relação a doença de Alzheimer, o sistema teste com *D.melanogaster* permite a simulação da via amiloidogênica.

Já foi demonstrado que, em moscas, a super-expressão de peptídeos A β e da proteína TAU causam um declínio de neurônios, situação remanescente àquela observada em pacientes com DA. Além de causar perda progressiva e irreversível de neurônios, a expressão de produtos gênicos relacionados com a doença, altera o fenótipo das moscas, podendo haver locomoção reduzida em larvas e adultos, olhos com textura áspera, cegueira e morte precoce (Prüßing et al., 2013).

Por fim, algumas das características de comportamento, associadas à neurodegeneração humana, podem ser recapituladas em moscas, utilizando-se testes comportamentais/cognitivos. Assim, a análise e quantificação desses parâmetros, tanto de expressão gênica, quanto comportamentais, tornam a mosca um organismo razoável para o estudo de aspectos específicos da DA (Le Bourg e Buecher, 2002; Seugnet et al., 2009; Prüßing et al., 2013).

Sistema Gal4-UAS

O sistema Gal-4/UAS é uma ferramenta para o estudo da expressão gênica em *Drosophila melanogaster*. Como o próprio nome sugere, o sistema compõe-se por duas partes, o fator de transcrição Gal-4, e, a sequência de ativação UAS, sendo que, nenhuma dessas partes existe naturalmente na *Drosophila* (Roote e Prokop, 2013; Elliott e Brand, 2008).

O fator de transcrição Gal-4 foi identificado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como uma proteína composta por 881 aminoácidos, e também, por dois domínios, um domínio para ligação ao DNA, e outro, para a ativação da transcrição (ligação da RNA polimerase) (Duffy, 2002).

A regulação transcricional acontece através da ligação direta de Gal-4 à sequência de ativação UAS, uma sequência específica do DNA (CGG-N₁₁-CCG), frequentemente considerada análoga ao *enhancer*/promotor, em eucariotos (Duffy et al., 2002).

Na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* a ativação do sistema acontece quando a linhagem *driver* é cruzada com a linhagem *responder*. - A linhagem *driver* contém o conjunto " *enhancer/promotor* + fator de transcrição Gal4", sendo esse, um promotor tecido-específico, de um gene endógeno de *Drosophila*. Já a linhagem *responder* contém o conjunto "sequência de ativação UAS + gene de interesse" (Roote e Prokop, 2013; Elliott e Brand, 2008).

Quando moscas dessas duas linhagens são cruzadas, a prole expressa o gene ligado ao UAS, sendo, essa expressão, dirigida por Gal-4. Em outras palavras, a proteína Gal-4 se liga especificamente à sequência UAS, localizada a montante, e ativa o gene de interesse, no tecido para o qual o promotor é específico, estando esse gene localizado a justante (Roote e Prokop, 2013; Elliott e Brand, 2008).

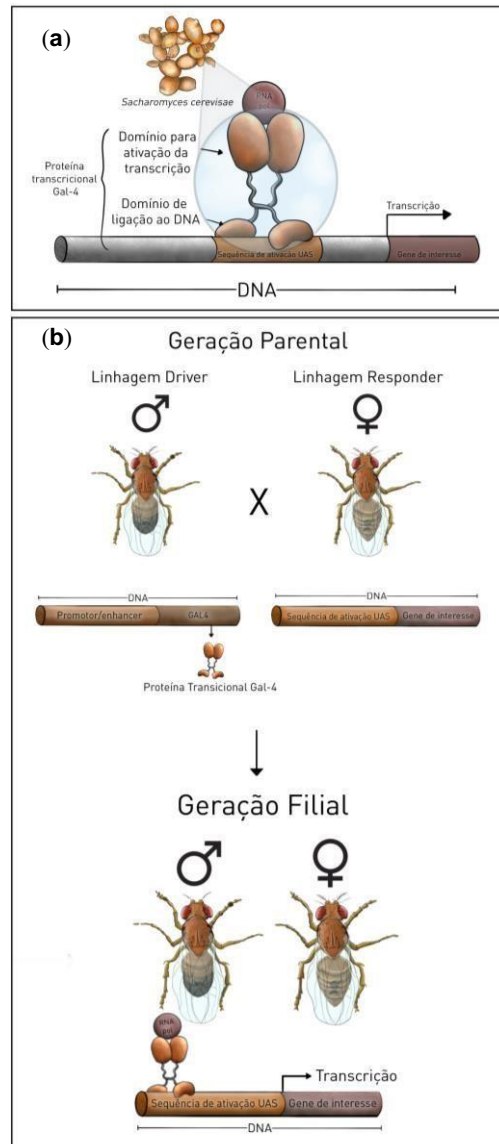


Figura 08: Sistema GAL4/UAS. (a) Estrutura do fator de transcrição Gal-4 presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No aumento é possível visualizar os domínios para ligação ao DNA e para ativação da transcrição (ligação da RNA polimerase). (b) Cruzamento entre as linhagens parentais: linhagem *driver* ("promotor/enhancer + proteína transcritora Gal-4"), e, linhagem *responder* ("sequência de ativação UAS + gene de interesse"). Na geração filial, resultante do cruzamento entre as linhagens *driver* e *responder*, a proteína Gal-4 está ligada à sequência UAS, e o gene de interesse está ativo, no tecido para o qual o promotor é específico (arquivo pessoal).

HIPÓTESES

A doença de Alzheimer tem como uma de suas principais evidências biológicas, a destruição progressiva e irreversível dos neurônios, sendo, por esse motivo, definida como uma doença neurodegenerativa.

Em humanos, o ácido aspártico e a fenilalanina já foram descritos como agentes neurotóxicos, que atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e deterioram os neurônios do cérebro. Como ambas substâncias são produtos da hidrólise do aspartame, é possível que o consumo desse adoçante esteja correlacionado com a DA (Humphries et al., 2008).

Considerando o exposto acima, a hipótese do nosso estudo é que, moscas *Drosophila melanogaster* modelo da cascata β -amilóide, alimentadas com o adoçante artificial aspartame, apresentam alterações fenotípicas como locomoção reduzida, olhos com textura áspera, cegueira e/ou morte precoce, uma vez que tais alterações são características da patologia de Alzheimer, e já foram relacionadas à morte neuronal, em moscas (Prüßing et al., 2013).

JUSTIFICATIVA

O adoçante artificial aspartame descoberto em 1965 e liberado em 1981, para diabéticos e pessoas que tentavam perder peso, passou a ter um uso indiscriminado, sendo consumido por quaisquer pessoas.

Embora o consumo seja considerado seguro na faixa de ingestão diária aceitável, diversos estudos mostram que seu consumo pode causar efeitos adversos à saúde. O ácido aspártico e a fenilalanina, subprodutos da hidrólise do aspartame, já foram descritos como agentes neurotóxicos, que deterioram os neurônios do cérebro.

Em decorrência do exposto, o projeto teve como pretexto correlacionar o consumo de aspartame com a doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa, que está em foco no meio acadêmico e nas indústrias farmacêuticas, porque, apesar de conhecida desde 1907, ainda não existe uma explicação definitiva acerca de sua patologia, assim como não há um tratamento eficaz para combatê-la em seu cerne. Além disso, o aumento da expectativa de vida da população mundial, associa-se com o aumento do número de casos da doença, tornando-a um sério caso de saúde pública.

Em relação aos gastos públicos com a doença, um estudo realizado pela Alzheimer's Disease Internacional (ADI), em 2010, mostrou que o custo global da demência foi de US\$ 604 bilhões de dólares, o equivalente a aproximadamente 1% do produto interno bruto (PIB) mundial.⁽⁸⁾

Os custos com a DA estão aumentando, sendo as principais razões, o aumento no número de casos e o aumento da severidade da doença, sendo a institucionalização o principal motivo. – A exemplo, os custos gastos pelo Reino Unido devem aumentar de €17 para €50 bilhões de euros, em 2038 (McCallion, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito do adoçante artificial aspartame, sobre a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, modelo da cascata β -amilóide.

Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da adição de uma solução acidificada sob a manutenção do pH do meio de purê enriquecido.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de aspartame na sobrevivência das moscas, para a determinação da toxicidade do composto.
- Avaliar a ação do aspartame, na função motora da mosca, por meio de teste comportamental.
- Avaliar se o consumo de adoçante está associado à formação de placas β -amilóide, no cérebro da mosca.

- Avaliar o efeito do consumo de aspartame sobre a concentração de glicose no organismo da mosca.
- Avaliar a influência do consumo de adoçante na progressão ou retrocesso da degeneração ocular de moscas *Drosophila melanogaster*.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Ao todo, foram utilizadas quatro linhagens de moscas *Drosophila melanogaster*: (1) w[1118] (BL#3605); (2) P{GawB}elav^{C155},P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4,P{hsFLP}1,w*(BL#5146); (3) w¹¹¹⁸;P(UAS-BACE,UAS-APP1.L)2 (BL#29877), e, (4) P{GMR-GAL4.w[-]}2/CyO (BL#9146), sendo, a primeira uma linhagem mutante, e as outras três, linhagens geneticamente modificadas.

Tais linhagens foram mencionadas no projeto como: (1) White; (2) Elav-Gal4; (3) UAS-BACE, UAS-APP, e, (4) GMR-Gal4. - As linhagens usadas foram obtidas do *Bloomington Drosophila Stock Center* (<https://bdsc.indiana.edu/>).

Genótipos Modelo

Genótipo Modelo da Cascata β-Amilóide

Para a obtenção do genótipo modelo da cascata β-amilóide foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem Elav-Gal4 com machos da linhagem UAS-BACE, UAS-APP. Portanto, moscas com expressão de placas β-amilóides, nomeadas nesse projeto como *Alzheimer-like*, apresentavam genótipo Elav-Gal4/+;+/+;UAS-BACE,UAS-APP/+.

Para a obtenção dos controles negativos foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem Elav-Gal4 com machos da linhagem White, e, entre fêmeas virgens da linhagem White com machos da linhagem UAS-BACE,UAS-APP.

Os controles negativos apresentavam, respectivamente, os seguintes genótipos Elav-Gal4/+;+/+;+/+, e, +/+;+/+;UAS-BACE,UAS-APP/+. Ao longo do projeto os controles negativos denominaram-se Elav-Gal4/+, e, UAS-BACE,UAS-APP/+, respectivamente.

Genótipo Modelo de Degeneração Ocular

Para a obtenção do genótipo modelo de degeneração ocular foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem GMR-Gal4 com machos da linhagem UAS-BACE,UAS-APP, sendo, o genótipo de tais moscas +/+;GMR-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+, e, as mesmas, citadas no projeto como GMR-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+.

As moscas GMR-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+ foram usadas para tratamento, e, como controle positivo. O controle negativo foi obtido a partir do cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem GMR-Gal4 com machos da linhagem White, tendo o seguinte genótipo +/+;GMR-Gal4/+;+/. A denominação dada ao controle negativo foi GMR-Gal4/+.

Manutenção e Manipulação das(os) Linhagens/Genótipos Modelo

Para se conseguir moscas Elav-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+ e seus controles negativos Elav-Gal4/+ e UAS-BACE,UAS-APP/+, as linhagens parentais Elav-Gal4, UAS-BACE, UAS-APP e White foram primeiramente expandidas em frascos de vidro contendo meio de fubá (meio padrão *Bloomington* – anexo).

O cruzamento para expansão dos parentais foi mantido durante 10 dias, havendo, no 7º dia a retirada de todas as moscas usadas no cruzamento, e, a partir do 10º dia a coleta de fêmeas virgens das linhagens Elav-Gal4 e White, e, de machos das linhagens UAS-BACE, UAS-APP e White. Para a separação de fêmeas virgens e machos as moscas foram anestesiadas com éter etílico.

O cruzamento Elav-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+, assim como seus controles negativos, também foi mantido em meio de fubá, seguindo a proporção de 2:1, ou seja, presença de duas fêmeas virgens para cada macho. Após sete dias desses cruzamentos, os frascos foram esvaziados para a coleta e seleção de pupas. Uma vez selecionadas as pupas, todas as moscas que eclodiram apresentavam o genótipo de interesse.

A obtenção de moscas GMR-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+ e de seu controle negativo GMR-Gal4/+ seguiu raciocínio parecido. Primeiramente, houve a expansão das linhagens parentais GMR-Gal4, UAS-BACE, UAS-APP e White. No 7º dia da expansão os frascos foram esvaziados, e, no 10º dia feita a coleta de

fêmeas virgens da linhagem GMR-Gal4, e, de machos das linhagens UAS-BACE, UAS-APP e White.

Fêmeas GMR-Gal4 e machos UAS-BACE, UAS-APP foram então alocadas em frascos contendo meio de purê enriquecido (meio *Kliethermes* – anexo), e mantidos juntos por aproximadamente 8 horas. O mesmo foi feito entre fêmeas GMR-Gal4 e machos White. Para ambos cruzamentos a proporção de fêmeas virgens para cada macho foi de 2:1.

Transcorridas essas oito horas, as fêmeas e machos alocados em um mesmo frasco, foram transferidos para um frasco de vidro que continha meio de postura (anexo). Essas mesmas fêmeas e machos foram deixados em meio de postura por mais oito horas. Após esse período os frascos foram esvaziados.

Uma vez retirados os parentais, o meio de postura foi dissolvido em água destilada e posteriormente filtrado para a coleta dos ovos. Os ovos coletados foram mantidos em *vials* para que alcançassem o estágio de pupa. Tais pupas foram selecionadas, e, uma vez feita a seleção, todas as moscas que eclodiram apresentavam o genótipo de interesse.

Ademais, todas as moscas citadas foram mantidas no estoque de *Drosophila* do Laboratório de Genética (LABGEN), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em câmara germinadora com fotoperíodo, à temperatura de 25°C, com ciclo circadiano de 12/12 horas de claro e escuro.

Solubilização e Diluição do Aspartame

As concentrações de aspartame testadas nesse projeto foram baseadas no trabalho de Vasconcelos et al., 2017. Vasconcelos testou as concentrações de 0,85; 1,70; 3,40; 6,80 e 13,60 (mM), entretanto, para além dessas, o presente trabalho incluiu outras duas 27,20 e 54,40 (mM), totalizando sete concentrações de aspartame testadas.

Dependendo da concentração, o aspartame torna-se insolúvel no pH da água destilada. Sendo, as duas maiores doses insolúveis (54,40 e 27,20mM), foi necessário um ajuste de pH da água, feito adicionando-se algumas gotas de ácido clorídrico 50%, tantas quantas necessárias para a solubilização da maior dose de droga.

Além de uma alteração de pH, a diluição do composto foi feita mediante agitação, ou seja, a solução de aspartame foi mantida sob agitador magnético até a obtenção de um líquido completamente transparente. Em nenhum momento houve aumento ou diminuição de temperatura.

Uma vez que as diferentes concentrações de aspartame foram conseguidas a partir de diluição seriada, existiu a possibilidade dessa diluição ser feita utilizando-se água destilada, ou, água acidificada, nomeada, a partir de agora, como veículo.

Na diluição seriada foi feita com água destilada, somente a solução-mãe continha ácido clorídrico; a cada diluição, a adição de um volume de água destilada diminuía a quantidade de ácido presente na solução. Já na diluição feita com veículo, a solução-mãe continha ácido clorídrico, e, a cada diluição, adicionou-se um volume de água que também continha ácido. Como o ácido era repostado a cada diluição, o pH das soluções de aspartame, mais e menos concentradas, mantiveram-se praticamente iguais.

Medidos os valores de pH da água destilada, veículo e das soluções de aspartame em diferentes concentrações, após diluição seriada com água destilada e veículo, foram medidos os valores de pH dos meios contendo água destilada, veículo e soluções de aspartame também diluídas com água destilada e veículo.

Os valores de pH da água destilada, veículo e das soluções de aspartame foram medidos em unicata, enquanto, os valores de pH dos meios suplementados com tais tratamentos, medidos em triplicata biológica. Todas as medições foram feitas com auxílio de um pHmêtro.

Ademais, vale ressaltar que foi testado o aspartame puro em pó do fabricante *Fragron*, fornecido pela farmácia de manipulação *A Farmacêutica*. O composto foi armazenado em temperatura ambiente ao abrigo de luz. A diluição do mesmo foi sempre feita momentos antes de sua utilização, o mesmo nunca era armazenado diluído.

Ensaio de Sobrevivência

Moscas com genótipo *Elav-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+* (*Alzheimer-like*) e seus controles negativos *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+* foram submetidas ao ensaio de sobrevivência, a fim de avaliar a toxicidade do aspartame e de definir as concentrações de adoçante a serem testadas em ensaios posteriores.

Para isso, os dois controles negativos foram alocados em *vials* contendo meio de purê enriquecido, suplementado com água destilada e veículo. De maneira semelhante, moscas *Alzheimer-like* foram armazenadas em *vials* contendo meio de purê enriquecido suplementado com água destilada, veículo e as diferentes concentrações de aspartame, citadas anteriormente, conseguidas a partir de diluição seriada feita com água acidificada (veículo).

Cada tratamento avaliado nesse ensaio foi feito em triplicata biológica, com cada um dos três *vials* contendo 30 moscas, sendo 15 fêmeas e 15 machos. Em cada *vial*, o volume total de preparação do meio foi de 5 mL. Quanto a faixa de idade das moscas, as mesmas tinham de 0-4 dias pós-eclosão (d.p.e.).

A curva de sobrevivência foi feita a partir do número de moscas mortas, contadas manualmente a cada troca do meio, sendo o meio trocado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras). Em relação ao tempo de duração do ensaio, o mesmo perdurou até a morte natural de todas as moscas.

Além de avaliar a toxicidade do aspartame e de definir as concentrações a serem usadas em experimentos posteriores, o ensaio de sobrevivência também permitiu a contagem manual do número de pupas e adultos presentes nos *vials* de cada tratamento, e conseqüentemente, de suas respectivas taxas de eclosão.

Teste RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*)

Para a avaliação do desempenho locomotor das moscas *Elav-Gal4/+;UAS-BACE,UAS-APP/+* e de seus controles negativos *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*, utilizou-se o teste RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*). Originalmente descrito por Gargano et al (2005), o teste RING avalia o desempenho locomotor da mosca através da sua capacidade de escalada.

As moscas *Alzheimer-like* foram tratadas com água destilada, veículo e

com as concentrações de aspartame definidas pelo ensaio de sobrevivência, sendo tais concentrações, conseguidas com diluição seriada feita com água acidificada. As moscas controle foram tratadas com água destilada e veículo, somente. Cada condição de tratamento foi avaliada em triplicata biológica, ou seja, foram analisados 3 *vials*, sendo que cada *vial* continha, aproximadamente, 30 machos (*vials* sem meio de cultivo).

O aparato utilizado para o teste consistiu em uma raque de madeira utilizada como suporte para a alocação dos *vials*. Para a realização do teste foram utilizadas duas raques de diferentes tamanhos: uma delas alocando 12 *vials*, e a outra, alocando 8 *vials*, sendo a maior raque usada duas vezes. - Em todos os testes, um mesmo *vial* ocupou o mesmo local, em uma mesma raque.

Uma vez montada a raque, as moscas foram mantidas, por 20 minutos, em repouso, silêncio e a 40cm de distância de uma fonte luminosa, constituída por lâmpada fluorescente de cor branca, com as seguintes especificações: 18W, 220V, 650K e 122mA.

Após o período de ambientação, as moscas foram deslocadas para o fundo dos *vials* por meio de três batidas consecutivas da raque, em esponjas. Após deslocá-las para o fundo dos *vials*, avaliou-se o progresso da escalada à uma altura igual ou superior a 5 cm (linha vermelha da raque), em função do tempo, igual a 4 segundos.

O teste foi realizado em diferentes tempos, ou seja, após 5 e 10 dias de tratamento. Considerando que o intervalo de idade das moscas era de 0-4 d.p.e, aquelas que receberam tratamento durante 5 dias, tinham de 5-9 d.p.e. quando o teste RING foi feito. Já as moscas com 0-4 d.p.e., tratadas durante 10 dias, tinham de 10-14 d.p.e no momento do ensaio.

Em cada dia de tratamento, cada raque produziu um total de cinco vídeos, ou seja, o experimento foi feito em quintuplicata técnica. Entre vídeos produzidos em um mesmo dia, por uma mesma raque, foi dado 1 minuto de repouso às moscas.

Tais testes foram registrados por meio de vídeos feitos com a câmera do celular, reproduzidos e analisados no software Quicktime ®. Para a avaliação dos vídeos no software citado, ficou padronizado que o tempo de 4 segundos

corresponderia à 120 frames de leitura do vídeo. A contagem dos frames foi feita a partir do tempo em que a raque estivesse, novamente em superfície plana, após as três batidas consecutivas da mesma, na esponja, sendo esse, considerado o tempo zero da escalada.

Quantificação Relativa de Proteínas Amilóides

Para avaliar se o consumo de aspartame teria alguma influência sobre o acúmulo de proteínas amilóides no cérebro das moscas, machos *Elav-Gal4/+* e *Alzheimer-like* tiveram sua absorvância e fluorescência mensuradas, após 5 e 10 dias de tratamento. Como as moscas tinham intervalo de idade de 0-4 dias pós-eclosão, os machos tratados por 5 dias tinham de 5-9 d.p.e. no dia do ensaio, e os tratados por 10, de 10-14 d.p.e.

O controle negativo *Elav-Gal4/+* foi tratado com água destilada e veículo. Moscas *Alzheimer-like* foram tratadas com água destilada, veículo e concentrações de aspartame escolhidas após ensaio de sobrevivência, e conseguidas por diluição seriada feita com água acidificada.

No último dia do tratamento as moscas foram mortas em nitrogênio líquido, e então, decapitadas. Cabeça e corpo foram separados visto que somente as cabeças foram usadas para a verificação do acúmulo de proteínas amilóides.

Cada genótipo e tratamento foi analisado em triplicata biológica, com cada microtubo da triplicata contendo $n=10$ cabeças. Para a homogeneização das amostras foi adicionado um volume de 100 μL de PBS-1x, por microtubo (10 μL PBS/cabeça). Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas (4°C/1000 r.p.m./2 minutos) para a coleta do sobrenadante, usado no ensaio de absorvância (ensaio de Bradford) (Bradford, 1976).

Na montagem da placa foi colocado 5 μL de sobrenadante + 250 μL de reagente bradford/poço, sendo feita duplicata técnica, da triplicata biológica, de cada genótipo e tratamento. A placa foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente e abrigo de luz, e por fim, feita a leitura dos valores de absorvância para proteína total – proteínas não amilóides e amilóides - (Bradford, 1976).

Após a absorvância, fez-se um ensaio de fluorescência para mensuração da quantidade de proteínas amilóides, somente. Para esse ensaio usou-se uma

solução de tioflavina-T diluída em PBS-1x. Nesse caso, foi feita quintuplicata técnica, da triplicata biológica, com cada poço contendo 2 μ L de sobrenadante + 198 μ L de solução de tioflavina-T. Novamente a placa foi incubada por 20 minutos, antes da leitura dos valores de fluorescência, emitidos quando a tioflavina se ligava às proteínas amilóides.

Feitos os dois ensaios os valores de fluorescência, de um determinado genótipo e tratamento, foram normalizados com os valores de absorbância, desse mesmo genótipo e tratamento, dividindo-se um pelo outro. - Em tese, se uma amostra apresenta valores altos para absorbância e baixos para fluorescência, há baixa quantidade de proteínas amilóides, sendo, o valor resultante da normalização, menor. Da mesma forma, se uma amostra tem valores de absorbância baixos e de fluorescência altos, há uma grande quantidade de proteínas amilóides, sendo o valor da normalização, maior.

O resultado de cada genótipo e tratamento, após primeira normalização, foi dividido pelo valor do genótipo *Elav-Gal4/+*, tratado com veículo, conseguido também após primeira normalização. Essa segunda normalização excluiu, do genótipo *Alzheimer-like*, proteínas não amilóides também expressas por *Elav-Gal4/+* devido a ligação inespecífica da tioflavina-T.

Por fim, vale ressaltar que a padronização da metodologia para quantificação de proteínas amilóides, aqui descrita, foi parte dos experimentos desse projeto.

Ensaio de Glicose

Com o intuito de avaliar qual a influência do consumo de aspartame sobre a concentração de glicose tissular, os genótipos *Alzheimer-like*, *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE*, *UAS-APP/+* tiveram sua glicemia mensurada, após 5 e 10 dias de tratamento.

Moscas *Alzheimer-like* com intervalo de idade de 0-4 dias pós-eclosão foram tratadas com água destilada, veículo e concentrações de aspartame resultantes de diluição com água acidificada, durante 5 dias. As concentrações de aspartame testadas no ensaio de glicose foram definidas pelo ensaio de sobrevivência.

Concomitantemente a isso, os controles negativos *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE/+*, *UAS-APP/+*, com mesmo intervalo de idade, foram tratados com água destilada e veículo, durante os mesmos 5 dias.

O cálculo dos níveis de glicose após 10 dias de tratamento também foi feito com moscas com 0-4 d.p.e, assim sendo, moscas que receberam tratamento durante 5 dias, tinham de 5-9 d.p.e. quando o ensaio foi feito. Já as moscas tratadas durante 10 dias, tinham de 10-14 d.p.e.

No dia em que o tempo de tratamento foi completado as moscas foram mortas em nitrogênio líquido, e, considerando que o cálculo dos níveis de glicose utilizou somente a cabeça das moscas, cabeça e corpo foram separados com auxílio de um bisturi.

A cada cabeça foi adicionado um volume de 4 μ L de água destilada e feita a maceração manual. Após a maceração, o material foi centrifugado por 10 minutos, a 1000xg e 4°C. Desse material centrifugado foi coletado 1.5 μ L do sobrenadante e colocado em contato com a tira reagente para medição de glicose. O glicosímetro usado foi o G-Tech Free 1.

A validação do glicosímetro como método de quantificação de glicose, em amostras de tecido de *Drosophila melanogaster*, fez parte dos experimentos desse trabalho.

A morte das moscas em nitrogênio líquido e a centrifugação a 4°C foram importantes para a manutenção da integridade do material. Por esse mesmo motivo, durante todo o experimento, todas as amostras foram mantidas em gelo. Por fim, o experimento foi feito utilizando-se somente machos, sendo o *n* de cada tratamento igual a 20.

Análise de Degeneração Ocular

Conforme descrito na seção *Manutenção e Manipulação das(os) Linhagens/Genótipos Modelo*, fêmeas virgens *GMR-Gal4* foram colocadas em meio de postura juntamente com machos *UAS-BACE*, *UAS-APP* e machos *White*. Após ovoposição, o meio de postura foi dissolvido para a coleta dos ovos, e os ovos coletados mantidos em *vials* para que os mesmos atingissem o estágio de pupa.

Nos *vials* que continham ovos provenientes do cruzamento entre fêmeas virgens GMR-Gal4 e machos White, foi adicionado, ao meio de purê enriquecido, água destilada e veículo, uma vez que moscas GMR-Gal4/+ foram usadas como controle negativo. Os *vials* com ovos do cruzamento entre fêmeas GMR-Gal4 e machos UAS-BACE, UAS-APP, continham meio suplementado com água destilada, veículo e concentrações de aspartame escolhidas com os resultados do ensaio de sobrevivência. Moscas GMR-Gal4/+, UAS-BACE, UAS-APP/+, tratadas com água destilada, foram usadas como controle positivo.

Após o tratamento dos ovos e demais estágios do ciclo de vida das moscas, machos com idade de 1 d.p.e. tiveram os olhos direito e esquerdo fotografados em microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para que as moscas pudessem ser fotografadas em estereomicroscópio, as mesmas foram anestesiadas com éter etílico. As moscas usadas no MEV foram armazenadas em álcool 70%, e antes de serem fotografadas, metalizadas durante 10 minutos, sendo que cada minuto correspondia a uma espessura de metalização de 5nm.

As fotografias dos olhos das moscas foram usadas para o estudo da influência do aspartame sobre a progressão ou retrocesso da degeneração ocular. Tal estudo foi feito a partir da comparação de fotografias dos olhos de moscas tratadas com água destilada, veículo e aspartame.

Para avaliar se o aspartame tinha alguma influência sobre a degeneração ocular, foi feita a comparação entre moscas tratadas com veículo e adoçante. Seguindo o mesmo raciocínio, para verificar se veículo utilizado para a diluição da droga tinha alguma influência na degeneração dos olhos da *Drosophila*, foram comparadas fotografias de moscas alimentadas com água destilada e veículo.

Análise Estatística

Todos os dados obtidos nesse trabalho foram submetidos aos testes de normalidade Anderson-Darling, sendo $\alpha=0,05$. Os experimentos denominados como *Solubilização e Diluição do Aspartame*, *Ensaio de Sobrevivência* e *Quantificação Relativa de Proteínas Amilóides* tiveram, como resultado à verificação de normalidade, dados não normais. Já os experimentos *Teste RING*

e *Ensaio de Glicose* tiveram parte de seus resultados considerados como normais, e parte, considerados como não normais.

A partir dessa análise de normalidade, os experimentos *Solubilização e Diluição do Aspartame* e *Quantificação Relativa de Proteínas Amilóides* foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$), enquanto o *Ensaio de Sobrevivência*, analisado pelos testes não paramétricos Log-Rank ($p < 0,0001$), Múltiplo- t ($p < 0,05$), Sidak's ($\alpha = 0,05$) e Kruskal-Wallis, sendo o primeiro utilizado para avaliação das curvas de sobrevivência e os outros três, para avaliação das taxas de eclosão.

Quanto ao *Teste RING* e *Ensaio de Glicose*, os dados normalizados de ambos experimentos, foram submetidos ao teste t ($p < 0,05$), enquanto, os dados não normalizados, submetidos ao teste Mann-Whitney. Por fim, todas as análises estatísticas foram feitas no *software* GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilização e Diluição do Aspartame

Sendo o aspartame um composto insolúvel no pH da água destilada, pelo menos nas duas maiores concentrações testadas (54,40 e 27,20mM), fez-se necessário corrigir o pH da água até um valor suficiente para a solubilização da maior dose. Conforme mostrado na figura 09(a), a água destilada tem pH 6,90, enquanto a maior dose obteve sua solubilização completa em pH 2,82.

Entretanto, como as moscas não foram alimentadas com soluções de aspartame, mas sim, com meio de purê enriquecido, suplementado com tais soluções, além de medir o valor de pH das soluções de aspartame, também foram medidos os valores de pH dos meios suplementados com essas soluções (figura 09b).

Primeiramente, para avaliar se a adição do veículo sobre o meio de purê enriquecido causaria alguma interferência sobre o pH do mesmo, foi feita uma comparação entre o valor de pH do meio tratado com água destilada e o valor de pH do meio tratado com veículo, entretanto, tal comparação não mostrou diferença estatística significativa (figura 09b, barras identificadas como “água”).

Já a comparação entre o valor de pH do meio de purê enriquecido tratado com veículo, e do meio de purê enriquecido tratado com diferentes concentrações

de aspartame, quando a diluição seriada foi feita com veículo, também não mostrou diferenças estatísticas (figura 09b, barras em cor branca). Em suma, conclui-se que nem o veículo, nem o ASP, nas concentrações testadas, exerce influência sobre o pH do meio.

Como não foram vistas diferenças estatísticas entre os meios tratados com água destilada, veículo e aspartame, nem na diluição com água destilada, nem na diluição com água acidificada, podia-se optar por qualquer uma das diluições. Para excluir o viés de as soluções de aspartame mais concentradas apresentarem maior quantidade de ácido que as menos concentradas, situação decorrente da diluição com água destilada, escolheu-se pela diluição seriada com água acidificada.

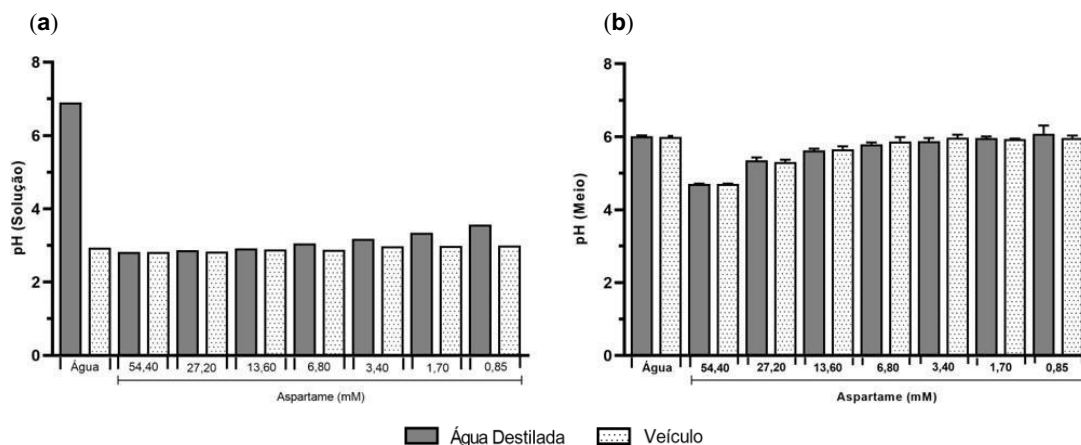


Figura 09: Valores de pH medidos para a solução de aspartame e para o meio contendo solução de aspartame. (a) Valores de pH medidos para a água destilada, veículo e para as soluções de aspartame em diferentes concentrações. **(b)** Média dos valores de pH do meio de purê enriquecido suplementado com água destilada, veículo e soluções de aspartame. As médias foram calculadas com base nos valores da triplicata biológica. O teste estatístico utilizado foi o teste não paramétrico Mann-Whitney, não sendo encontrada nenhuma diferença significativa. As linhas acima das barras representam o erro padrão da média (SEM).

Ensaio de Sobrevivência

Para a avaliação da toxicidade do aspartame o genótipo *Alzheimer-like* foi tratado com água destilada, veículo e diferentes concentrações do adoçante, enquanto os controles negativos *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE*, *UAS-APP/+*, tratados com água destilada e veículo.

A figura 10(a) mostra o gráfico de sobrevivência dos três genótipos, após tratamento com água destilada e veículo. Considerando o tratamento com água

destilada, *Alzheimer-like* apresentou o maior tempo de vida, *Elav-Gal4/+* um tempo de vida intermediário, e, *UAS-BACE, UAS-APP/+* o menor tempo. Foram vistas diferenças significativas entre *Alzheimer-like* e *Elav-Gal4/+* ($p < 0,0001$), mas não entre *Alzheimer-like* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*.

Moscas com genótipo *Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+* têm os genes APP e BACE humanos, e por isso, sintetizam a proteína precursora amilóide (APP) e enzima β -secretase (BACE-1) humanas, sendo, a expressão de ambas, direcionada ao cérebro. A clivagem de APP, pela BACE-1, gera subprodutos neurotóxicos, associados à morte neuronal. Considerando, justamente, esse quadro de morte neuronal, esperava-se um tempo de vida menor para *Alzheimer-like*. Contrariamente, os resultados mostraram um tempo de vida maior para essas moscas (Das e Chinnathambi, 2019; Sreeprasad e Narayan, 2019).

Quando os controles foram tratados com veículo, o genótipo *Alzheimer-like* apresentou, novamente, a maior curva de sobrevivência. O genótipo *Elav-Gal4/+* manteve sobrevida intermediária, enquanto, *UAS-BACE, UAS-APP/+*, o menor tempo de vida. Apesar do perfil de sobrevivência visto no tratamento com água destilada ter sido mantido no tratamento com veículo, o tempo, em dias, diferiu.

Contrariamente ao tratamento com água destilada, a diferença de sobrevida observada entre as moscas *Elav-Gal4/+* e *Alzheimer-like* não foi significativa. A comparação entre os genótipos *UAS-BACE, UAS-APP/+* e *Alzheimer-like*, entretanto, mostrou diferença ($p < 0,01$).

O tratamento de cada controle com água destilada e água acidificada permitiu uma avaliação da influência do veículo sobre a sobrevivência das moscas. Em comparação com a água destilada, o veículo aumentou o tempo de vida dos genótipos *Elav-Gal4/+* e *Alzheimer-like*. Para o primeiro genótipo esse aumento não foi significativo, para o segundo, sim ($p < 0,001$). Ou seja, a acidificação da água parece aumentar a sobrevida das moscas *Alzheimer-like*. O genótipo *UAS-BACE, UAS-APP/+* apresentou o mesmo tempo de vida nos dois tratamentos; o veículo parece não ter influência, nesse caso.

Moscas com genótipo *Alzheimer-like* tratadas com água destilada viveram 63 dias, enquanto o tempo de vida, do mesmo genótipo, tratado com veículo, foi de 67 dias. Ou seja, a acidificação da água aumentou a expectativa de vida em 4 dias. Tais resultados estão de acordo com os de Staats (2018). Nesse trabalho,

um composto de caráter ácido mostrou aumento, de 12 dias, na expectativa de vida média, em *D. melanogaster*.

A figura 10(b) traz as curvas de sobrevivência do genótipo *Alzheimer-like* após tratamento com diferentes concentrações de aspartame. Moscas tratadas com concentrações de ASP iguais a 3,40 e 0,85 mM exibiram o maior tempo de vida, seguido das concentrações de 27,20 e 6,80 mM. Moscas tratadas com 13,60 mM apresentaram sobrevivência intermediária. As menores curvas foram vistas em moscas tratadas com 1,70 e 54,40 mM de adoçante, respectivamente. – O tempo de sobrevivência das doses 3,40 e 0,85 mM foi semelhante, assim como de 27,20 e 6,80 mM.

Quando as curvas dos tratamentos foram comparadas com a curva do veículo (também mostrado na figura 10b), foram vistas diferenças significativas em todas as concentrações testadas, sendo, para quase todas, $p < 0,0001$. Somente para o aspartame diluído em 3,40mM a diferença foi menor ($p < 0,01$). Como as moscas que receberam aspartame viveram menos do que as que receberam somente veículo, para todas as concentrações testadas, conclui-se que o aspartame diminui o tempo de vida das mesmas.

Os resultados de sobrevivência encontrados condizem com os apresentados por Vasconcelos (2016). Nesse trabalho, moscas de *D. melanogaster* foram tratadas com 0,85; 1,70; 3,40; 6,80 e 13,60 (mM) de aspartame, sendo que nenhuma das concentrações foi considerada tóxica. A concentração com maior percentual de sobrevivência foi a de 3,40mM, seguida de 6,80; 13,60 e 0,85 e 1,70 (mM), que teve o menor percentual.

Conforme já foi citado, no presente trabalho, a concentração de 3,40 mM também apresentou a maior curva de sobrevivência, seguida das doses 6,80; 13,60 e 1,70 (mM), igualmente aos resultados apresentados por Vasconcelos. Somente a dose de 0,85mM mostrou resultados divergentes.

Enquanto no trabalho de Vasconcelos a menor dose apresentou um dos menores percentuais de sobrevivência (segundo menor), aqui, apresentou a maior curva, juntamente com a concentração de 3,40mM. As concentrações de 54,40 e 27,20 mM não receberam comparação, por não terem sido testadas no trabalho de 2016.

A diferença de sobrevivência da menor dose pode ser explicada, por terem sido usados genótipos diferentes, ou, pela idade em que as moscas entraram em contato com a droga. No trabalho comparativo a droga foi administrada ainda em estágio larval, e aqui, durante a fase adulta. Por fim, os resultados de ambos trabalhos também mostraram a inexistência de uma relação direta entre a concentração e o tempo de vida.

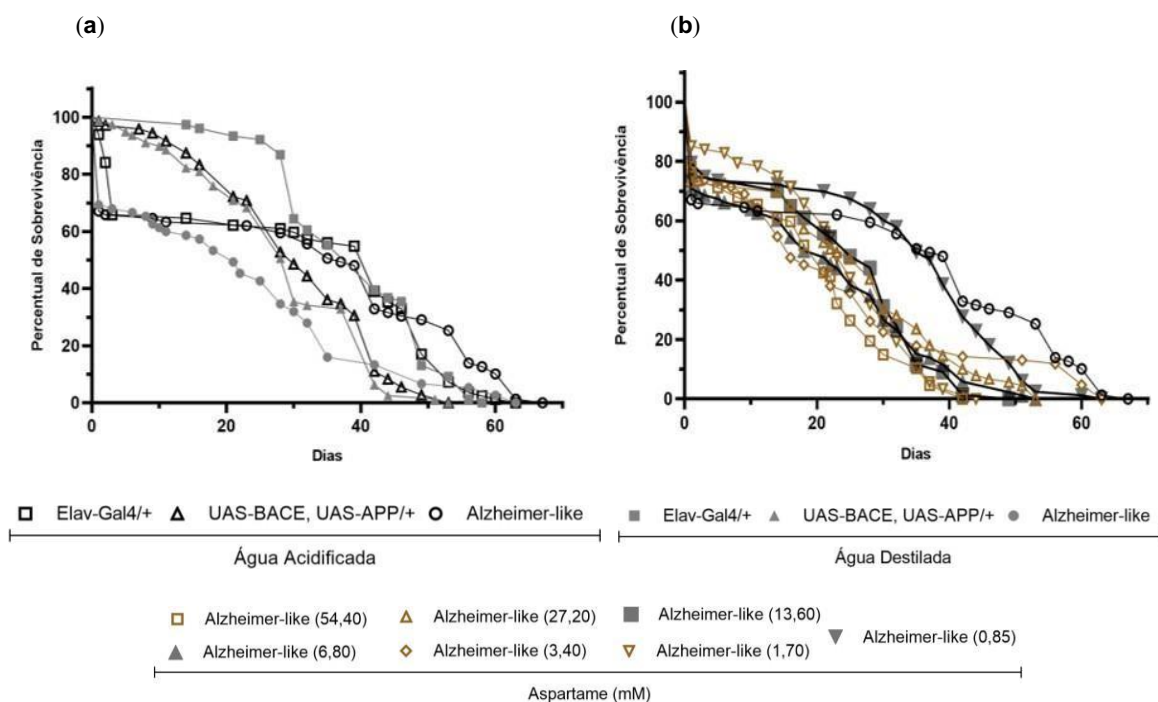


Figura 10: Curva de sobrevivência dos controles e tratamentos. (a) Representação gráfica do percentual de sobrevivência de moscas com genótipo Elav-Gal4/+ e UAS-BACE, UAS-APP/+, usadas como controle negativo, e, genótipo Alzheimer-like, após tratamento com água destilada e veículo. (b) Representação gráfica do percentual de sobrevivência de moscas Alzheimer-like, tratadas com veículo e diferentes concentrações de aspartame. O gráfico foi plotado com base na média da triplicata. Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Log-Rank.

No ensaio de sobrevivência foram testadas sete concentrações de aspartame, para que, a partir dos resultados, fossem selecionadas aquelas a serem usadas em experimentos posteriores. Como nenhuma das doses foi considerada tóxica, e, todas elas mostraram diferenças significativas com o veículo, podia-se optar por qualquer uma.

As concentrações escolhidas foram as duas maiores (54,40 e 27,20mM) e duas das menores (3,40 e 1,70mM). A escolha foi pautada na possibilidade de

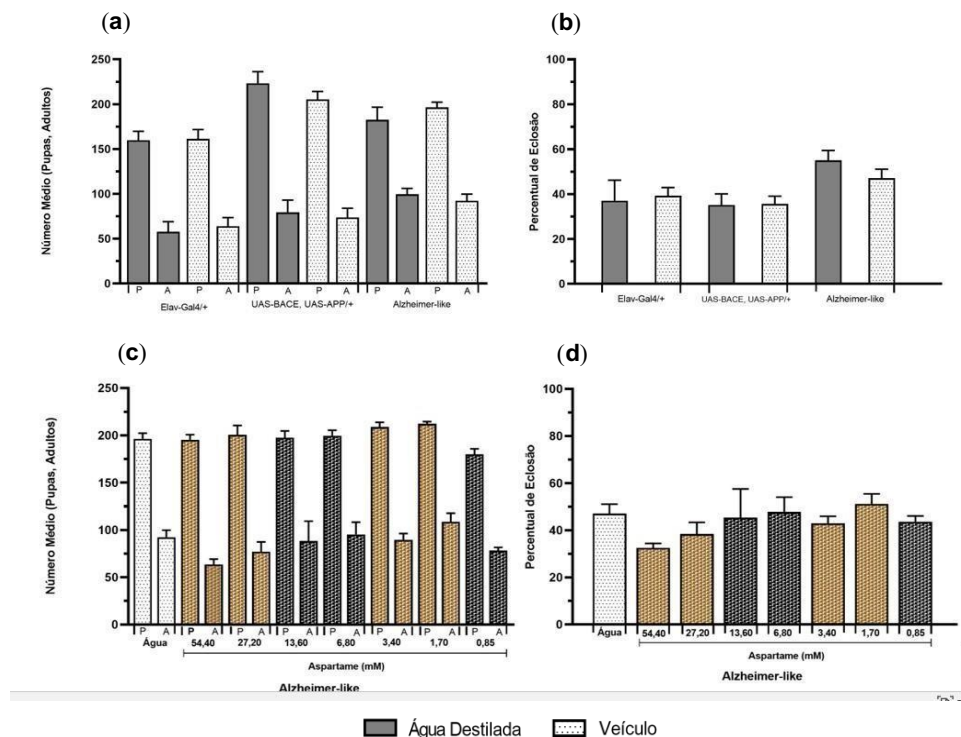
avaliar o efeito de altas e baixas doses de aspartame, sobre moscas *Drosophila melanogaster*, modelo para doença de Alzheimer.

Além de avaliar a toxicidade do aspartame, para a definição das concentrações a serem testadas, o ensaio de sobrevivência permitiu uma análise de pupação e de eclosão de adultos.

A figura 11(a) traz o número médio de pupas (P) e adultos (A) de moscas tratadas com água destilada (barras em cinza) e veículo (barras em branco). Em relação ao número de pupas, a comparação entre os tratamentos não mostrou diferenças significativas, concluindo que o veículo não tem influência na pupação de nenhum dos genótipos analisados.

A comparação do número de adultos eclodidos, após tratamento com água destilada e veículo, novamente não mostrou diferenças estatísticas para nenhum dos genótipos, ou seja, o veículo também não influencia na eclosão dos adultos.

A figura 11(c) compara o número médio de pupas e adultos, do genótipo Alzheimer-like, tratado com veículo e diferentes concentrações de aspartame. Como nenhuma diferença estatística foi vista, nem para o número de pupas, nem para o número de adultos, para nenhuma das concentrações testadas, conclui-se que o adoçante não tem influência sobre a pupação e eclosão de adultos, pelo menos para esse genótipo.



P: pupas; A: adultos

Figura 11: Avaliação da presença de pupas e da taxa de eclosão de adultos dos controles e tratamentos. (a) Número médio de pupas e de adultos, após tratamento dos controles negativos *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*, e do genótipo *Alzheimer-like*, com água destilada e veículo. (b) Percentual de eclosão dos adultos mostrados em (a). (c) Número médio de pupas e de adultos, após tratamento do genótipo *Alzheimer-like* com veículo e diferentes concentrações de aspartame. (d) Percentual de eclosão dos adultos mostrados em (c). As médias foram calculadas com base nos valores da triplicata biológica. Foram usados os testes não paramétricos T múltiplo, Sidak's e Kruskal-Wallis, não sendo vistas diferenças significativas. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

Teste RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*)

Visto que o teste RING pode indicar quando há redução da atividade locomotora da mosca, devido a fatores como idade e/ou neurodegeneração, o mesmo foi usado para avaliar o potencial neurodegenerativo do aspartame (Mesquita et al., 2008).

O primeiro passo, antes da avaliação da neurotoxicidade do adoçante, foi realizar um teste piloto para a validação do genótipo modelo, no estudo da doença de Alzheimer. Nesse ensaio piloto, machos *Alzheimer-like*, *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*, com intervalo de idade de 0-4 d.p.e., foram tratados com água destilada por um período de 5 e 10 dias, o que significa que o experimento foi feito com moscas que tinham de 5-9 d.p.e (figura 12a, barras em cinza), e, de 10-14 d.p.e (figura 12b, barras em cinza).

Conforme mostrado na figura 12a, o genótipo *Alzheimer-like* apresentou um menor percentual de escalada, quando comparado aos dois controles negativos, sendo vistas diferenças significativas ($p < 0,001$ na comparação entre *Elav-Gal4/+* e *Alzheimer-like*, e, $p < 0,01$ na comparação entre *UAS-BACE, UAS-APP/+* e *Alzheimer-like*). Na figura 12b as diferenças foram $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente.

Uma vez que o modelo utilizado mimetizava, de forma reduzida, a cascata β -amilóide, supôs-se que esse declínio na capacidade de escalada tivesse relação com um acúmulo de placas amilóides, no cérebro da mosca. Em outras palavras, o retardo motor foi avaliado para a verificação da existência de um quadro de neurodegeneração, associado ao acúmulo de placas senis.

López-Arias (2012) descreveu que moscas modelo para a doença de Alzheimer tendem a apresentar capacidade de escalada reduzida em relação aos controles, e que essa dificuldade ao escalar pode estar associada à

neurodegeneração. Liu et al (2015) demonstrou que um modelo de *Drosophila* que expressava peptídeos A β -arc em seus neurônios, exibia um declínio na capacidade de escalada, quando comparado com dois controles que não expressavam tais peptídeos. Ambos resultados corroboram com a validação do nosso modelo.

Ao longo do tempo, o genótipo *Alzheimer-like* apresentou queda no percentual de escada. Com cinco dias de tratamento o valor médio era igual a 24.632, e, com 10, igual a 15.866 (valores não mostrados). Essa diminuição na escalada pode associar-se a um agravamento do quadro neurodegenerativo, indicando progressão da doença. Concordante com os resultados encontrados, já foi demonstrado que, assim como em humanos, a progressão da DA em *D. melanogaster* é dependente da idade. Liu et al (2015) e Cao et al (2017) mostraram uma diminuição dependente da idade, na altura escalada, em moscas modelo para DA.

Conforme mencionado, o teste RING foi feito somente com machos. A decisão pelo uso exclusivo de machos baseou-se nos resultados de Woods et al (2014) e Rhodenizer et al (2008). Segundo Woods, a atividade locomotora espontânea da mosca é dependente do sexo, sendo mais linear nos machos. Rhodenizer concorda com o fato da escalada dos machos apresentar uma maior linearidade em função do tempo.

Se o teste RING fosse feito utilizando-se fêmeas, algumas delas poderiam estar carregando ovos o que aumentaria seu peso e prejudicaria sua escalada, enquanto outras, que não estivessem carregando ovos, não seriam prejudicadas ao escalar. Uma comparação somente entre fêmeas que carregam ovos, também poderia ser enviesada, uma vez que a quantidade de ovos que cada uma carrega é determinante sobre o seu peso e sua capacidade locomotora. Como os machos nunca carregam ovos eles tendem a ter um peso corporal mais padronizado, um em relação ao outro, e conseqüentemente, uma escalada mais linear.

As barras brancas da figura 12a trazem o percentual de escalada de machos *Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+* e *Alzheimer-like*, tratados com veículo e com intervalo de idade de 5-9 d.p.e. As barras brancas da figura 12b trazem o percentual de escalada dos mesmos genótipos e tratamentos, mas, com idade de 10-14 d.p.e.

O tratamento com veículo não mostrou diferenças significativas sobre os controles *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*, entretanto, melhorou a capacidade de escalada do genótipo *Alzheimer-like*, nos dois intervalos analisados, ou seja, após 5 e 10 dias de tratamento ($p < 0,01$). Esses resultados indicam que o veículo tem influência positiva sobre a atividade locomotora de *Alzheimer-like*, e, que o consumo prolongado é indiferente, quando comparado a um consumo mais efêmero.

Nossos resultados estão de acordo com Staats (2018) que mostrou melhora significativa na escalada de machos tratados com substância ácida, em comparação com não tratados (controle). Além de concordar com Staats, os resultados do teste RING condizem com o ensaio de sobrevivência visto que, novamente, o veículo mostrou diferenças significativas somente sobre o genótipo *Alzheimer-like*. Por fim, na figura 12c vê-se uma representação gráfica da escalada dos controles ao longo do tempo total do experimento.

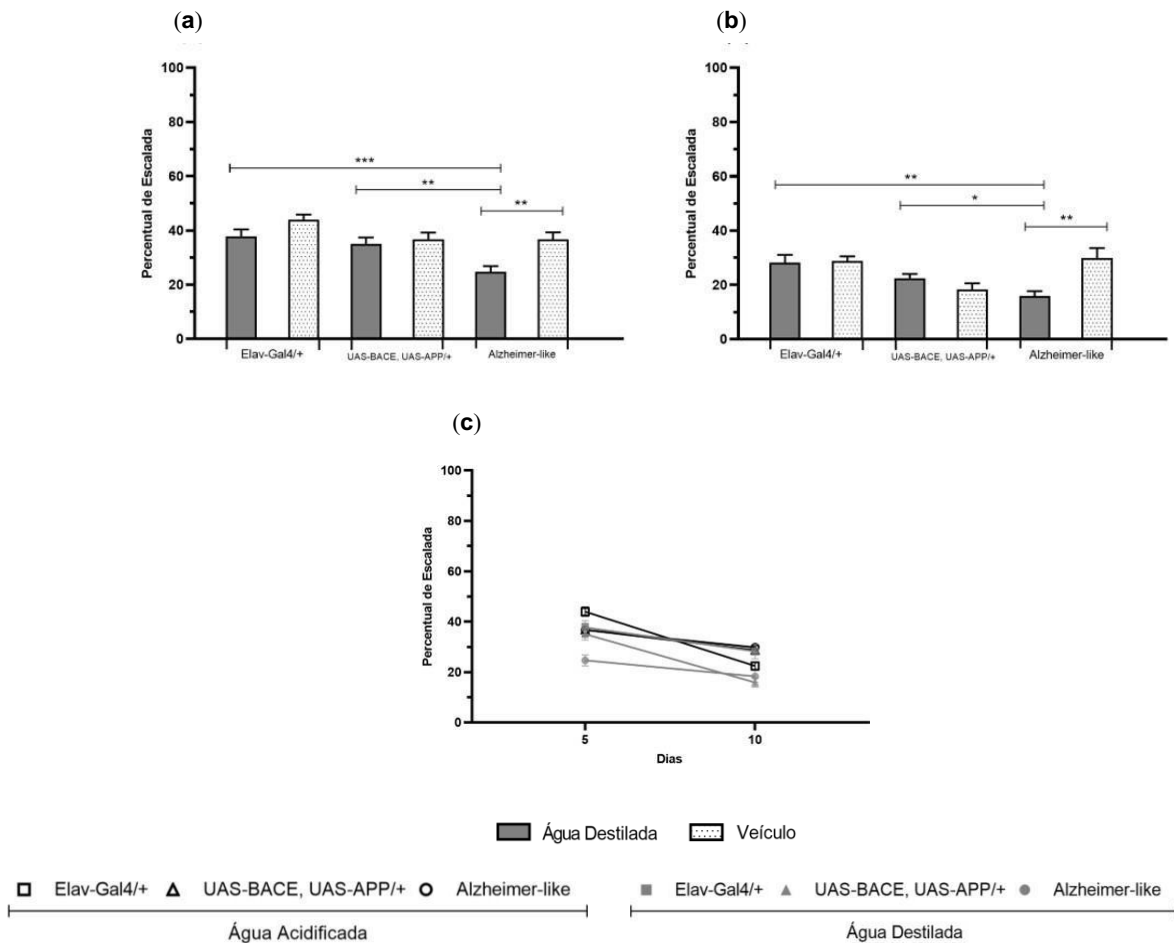


Figura 12: Percentual de escalada dos controles após 5 e 10 dias de tratamento. (a) Percentual de escalada de machos com genótipo *Elav-Gal4/+* e *UAS-BACE, UAS-APP/+*, usados como controle negativo, e, genótipo *Alzheimer-like*, após 5 dias de tratamento com água destilada e veículo (machos com 5-9 d.p.e.). (b) Percentual de escalada de machos *Elav-Gal4/+*, *UAS-BACE, UAS-APP/+* e *Alzheimer-like*, após 10 dias de tratamento com água destilada e veículo (machos com 10-14 d.p.e.). (c) Representação gráfica da escalada ao longo do tempo total do experimento. Os gráficos foram plotados com base na média da triplicata biológica. Foi usado o teste paramétrico T, em que * indica $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

A figura 13 traz os resultados do aspartame sobre a atividade locomotora de machos *Alzheimer-like*. Em (a) tem-se o percentual de escalada após 5 dias de tratamento (machos com 5-9 d.p.e.), e, em (b), após 10 dias (machos com 10-14 d.p.e.).

Após cinco dias de tratamento, foram vistas diferenças significativas entre veículo e as quatro concentrações de aspartame, sendo $p < 0,01$ para a maior concentração, $p < 0,001$ para as duas concentrações intermediárias, e, $p < 0,0001$ para a menor. Na diferença vista entre veículo e maior dose, o adoçante melhorou a capacidade de escalada das moscas. As três menores doses mostraram diferenças, mas com as moscas tratadas escalando menos que o veículo.

Gaspar et al (2003) mostrou que o consumo de aspartame pode afetar funções motoras complexas. Em humanos, os metabólitos do aspartame, em especial a fenilalanina, podem atravessar a barreira hematoencefálica, ligando-se aos transportadores de aminoácidos neutros (NAAT). Os transportadores NAAT são usados para carrear aminoácidos como o triptofano, ao cérebro.

Uma vez que a afinidade do aminoácido ao transportador é proporcional à concentração desse aminoácido no sangue, e que, após o consumo de aspartame têm-se um aumento nas concentrações sanguíneas de fenilalanina, NAAT fica ocupado com fenilalanina, comprometendo o transporte dos demais aminoácidos. Um déficit de triptofano no cérebro compromete a síntese de serotonina, e por consequência, o funcionamento dos neurônios serotoninérgicos, que coordenam as funções motoras complexas (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2103; Bowel e Evangelista, 2002; Gaspar et al., 2003).

Além de Gaspar et al (2003), Rycerz e Jaworska-Adamu (2013) mostraram redução na mobilidade, equilíbrio e caminhada após consumo do adoçante. Conforme mencionado anteriormente, o consumo de aspartame resulta em uma

ligação quase que exclusiva dos transportadores NAAT, à fenilalanina, havendo deficiência do aminoácido tirosina, necessário para a síntese de dopamina. O sistema dopaminérgico está ativo na manutenção do comportamento motor normal, e a perda de dopamina está relacionada a dificuldade de movimentação (Kolb e Whishaw, 2003).

Diante dos resultados descritos na literatura esperava-se que as moscas tratadas com aspartame apresentassem percentual de escalada inferior ao de moscas tratadas com veículo. Os resultados encontrados foram condizentes com os esperados, com exceção da maior dose.

Após 10 dias de tratamento não foram vistas diferenças estatísticas entre veículo e nenhuma das quatro concentrações de aspartame. Entretanto, a média do percentual de escalada diminuiu para o veículo e duas maiores doses (54,40 e 27,20mM), e aumentou para as duas menores (3,40 e 1,70mM).

Essa diminuição na capacidade de escalada, vista no veículo e duas maiores doses, ao longo do tempo, pode estar associada a uma piora no quadro neurodegenerativo, indicando progressão da doença, em *Drosophila*. A presença de diferenças estatísticas entre veículo e composto no 5º dia de tratamento, e a ausência dessa diferença, no 10º dia, pode dever-se ao fato da progressão da doença ter minimizado os efeitos negativos do aspartame.

O porquê as duas menores doses de aspartame apresentaram melhora na capacidade de escalada, com 10 dias de tratamento, não foi entendido. O consumo prolongado da droga, nessas concentrações, pode de fato ser benéfico, o que não condiz com os demais resultados da literatura, ou, pode ter havido um viés experimental decorrente da morte de moscas ao longo do tempo.

No dia zero do experimento tinha-se $n=30$ moscas, em cada *vial* da triplicata, de cada tratamento analisado no teste RING. No 10º dia do experimento esse $n<30$, e, mesmo garantindo que ele fosse, no mínimo, $n=10/vial$ da triplicata, para não invalidar o experimento, a perda das moscas pode ter sido a causa da ausência de diferenças estatísticas. Finalmente, a figura 13c traz uma representação gráfica da escalada dos tratamentos ao longo do tempo total do experimento.

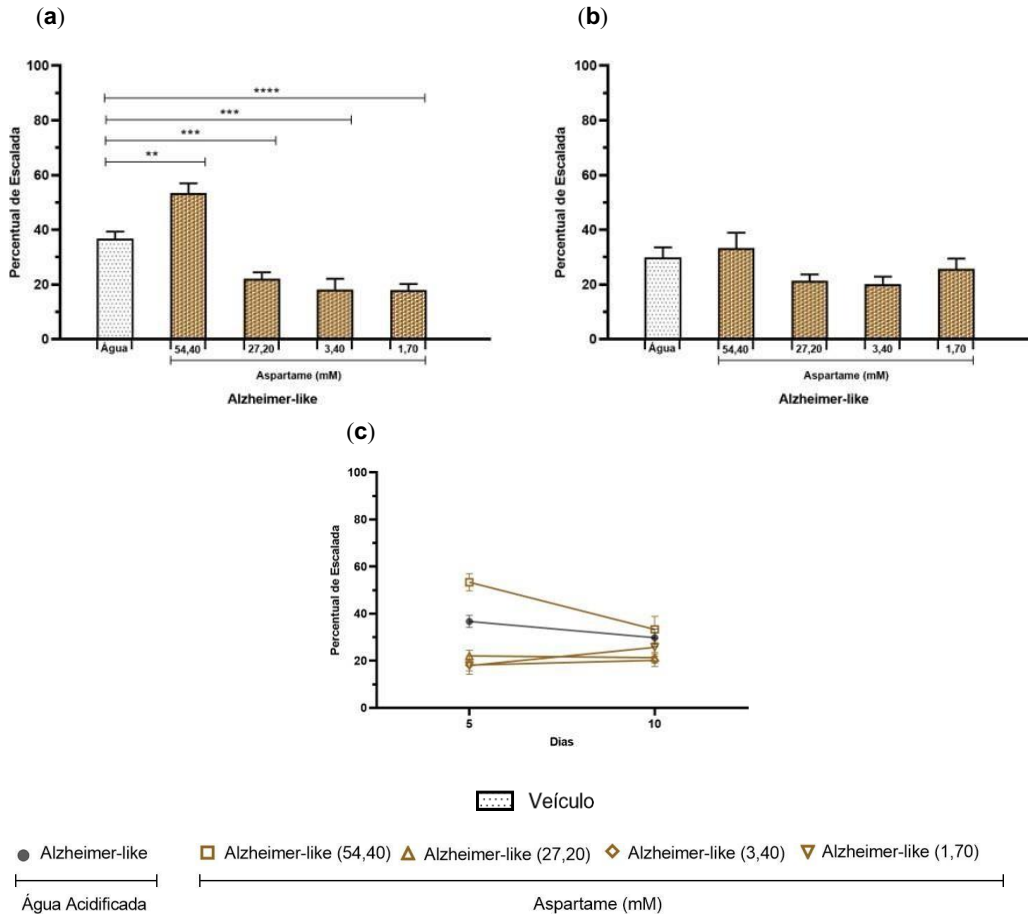


Figura 13: Percentual de escalada dos tratamentos após 5 e 10 dias de consumo de aspartame. (a) Comparação do percentual de escalada de machos *Alzheimer-like* tratados com veículo e diferentes concentrações de aspartame, durante 5 dias (machos com 5-9 d.p.e.). (b) Comparação do percentual de escalada de machos *Alzheimer-like* tratados com veículo e diferentes concentrações de aspartame, durante 10 dias (machos com 10-14 d.p.e.). (c) Representação gráfica da escalada, ao longo do tempo total do experimento. Os gráficos foram plotados com base na média da triplicata biológica. Foi usado o teste não paramétrico Mann-Whitney, em que ** indica $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

Quantificação Relativa de Proteínas Amilóides

Conforme exposto no tópico “Teste RING” o declínio na capacidade de escalada, visto no genótipo *Alzheimer-like*, parecia relacionar-se ao acúmulo de proteínas amilóides no cérebro da mosca. A quantificação relativa de proteínas amilóides teve por objetivo verificar, se o genótipo em questão, apresentava um maior acúmulo de proteínas amilóides, em relação ao seu controle.

A primeira normalização indicou quanto de proteína total correspondia à proteínas amilóides. – O genótipo *Alzheimer-like* tratado com água destilada teve valor de normalização superior ao controle negativo *Elav-Gal4/+*, após 5 e 10 dias

de tratamento. Após cinco dias as diferenças entre *Elav-Gal4/+* e *Alzheimer-like* não foram significativas, mas, após 10, sim ($p < 0,0001$) (valores não mostrados).

O fato do genótipo *Alzheimer-like* apresentar valor de normalização superior ao controle, nos dois intervalos de tempo analisados, sugere um maior acúmulo de proteínas amilóides nessas moscas, corroborando com a validação do modelo como mimético para a cascata β -amilóide.

Após normalizar a quantidade de proteínas amilóides em relação à proteína total, para cada genótipo e tratamento, os resultados obtidos foram novamente normalizados, agora com *Elav-Gal4/+* tratado com veículo. A figura 14 apresenta esses resultados.

Em (a) tem-se os níveis de amilóide, de *Alzheimer-like*, após normalização com *Elav-Gal4/+* e tratamento com veículo e aspartame, durante cinco dias. O valor de amilóide do veículo foi superior ao valor de amilóide do tratamento com adoçante, em todas as concentrações testadas. Foram vistas diferenças significativas entre veículo e 27,20mM, e, entre veículo e 3,40 mM ($p < 0,05$).

No confronto entre os valores quantificados para proteínas amilóides e teste RING, esperava-se que a concentração com maior capacidade de escalada apresentasse a menor fluorescência relativa, e contrariamente, apresentou a maior. Excluindo a concentração de 54,40mM, moscas tratadas com 27,20 mM de aspartame passam a ter o maior desempenho locomotor e menor valor de fluorescência. A concentração de 3,40 mM teve valor intermediário para fluorescência escalada, por fim, 1,70 mM mostrou atividade locomotora inferior e fluorescência superior.

Ou seja, separadamente, os resultados de fluorescência, após cinco dias, refutam a hipótese de que o consumo de aspartame tenha relação com o acúmulo cerebral de proteínas amilóides, entretanto, analisados conjuntamente com o teste RING, tais resultados confirmam a correlação entre o uso do adoçante e a DA, com exceção da maior dose testada.

O gráfico (b) traz os níveis de amilóide de *Alzheimer-like* depois de 10 dias de tratamento e de ambas normalizações terem sido feitas. Agora, a média do veículo foi inferior a das concentrações 54,40; 27,20; 3,40 e 1,70 mM, de maneira inversamente proporcional, ou seja, quanto menor a dose de aspartame, maior a fluorescência. Existiram diferenças estatísticas entre veículo e 3,40 mM ($p < 0,05$),

e, entre veículo e 1,70 mM ($p < 0,001$).

Mesmo antes da comparação com o teste RING, os resultados após 10 dias confirmam a hipótese de que o consumo de aspartame tenha relação com a DA., uma vez que, as moscas que ingeriram a droga tiveram mais proteínas amilóides fluorescentes, do que as que não. Quando os resultados de ambos experimentos foram comparados, a maior dose (54,40mM), apresentou a maior atividade locomotora e o menor valor de amilóide. A queda na capacidade de escalada foi acompanhada do um aumento de amilóide, para a concentração de 1,70mM.

Ainda em uma comparação entre todas as doses, as concentrações de 27,20 e 3,40 mM mostraram queda de atividade locomotora, sem aumento de fluorescência. Entretanto, quando ambas concentrações foram comparadas somente entre si, houve queda na escalada, acompanhada de aumento de fluorescência. Finalmente, o gráfico (c) reporta os valores de fluorescência ao longo do tempo total do experimento.

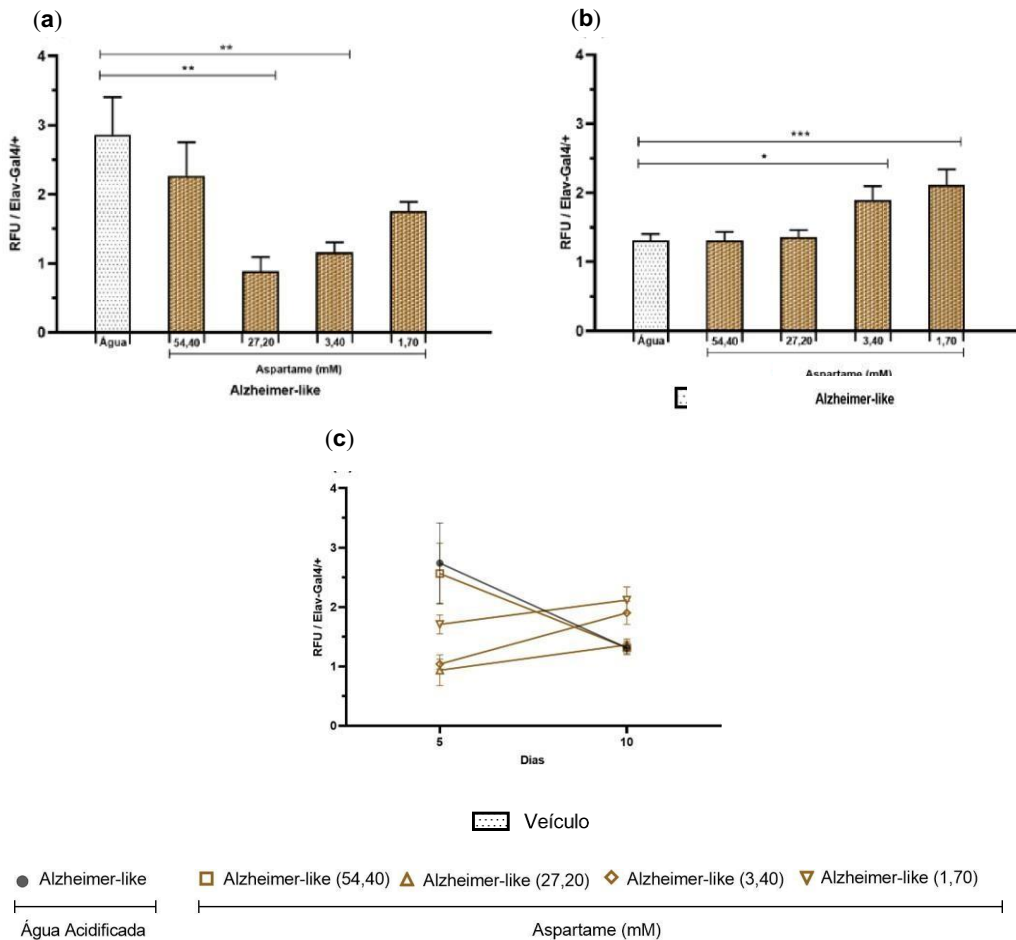


Figura 14: Valores de fluorescência para proteína amilóide após 5 e 10 dias de consumo de aspartame. (a) Valores de fluorescência para proteína amilóide, após o genótipo *Alzheimer-like* ter sido tratado com aspartame durante 5 dias (cabeça de machos com 5-9 d.p.e.). (b) Valores de fluorescência para proteína amilóide, após o genótipo *Alzheimer-like* ter sido tratado com aspartame durante 10 dias (cabeça de machos com 10-14 d.p.e.). (c) Fluorescência de *Alzheimer-like* ao longo do tempo total do experimento. Os gráficos foram plotados com base na média da triplicata biológica. Foi usado o teste não paramétrico Mann-Whitney, em que * indica $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

Assim como o nosso, diversos trabalhos da literatura correlacionam o consumo de aspartame com a doença de Alzheimer, não necessariamente pela análise direta de proteínas amilóides, mas por efeitos neurocomportamentais gerais decorrentes de seu uso. Segundo Bowel e Evangelista (2002), o consumo de aspartame abaixa o nível neuronal de glicose, necessário para a produção de acetilcolina. Havendo um déficit de acetilcolina, os neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert podem ser perdidos, sendo tal perda, uma alteração neurológica precoce da DA. Assim, o ASP pode estar envolvido na causa da afecção.

O consumo de aspartame influencia não somente a produção de acetilcolina, mas também de glutamato, um outro neurotransmissor comum do cérebro. Aproximadamente 40% da composição do adoçante corresponde ao metabólito ácido aspártico, sendo o resultado do consumo constante de ASP, um aumento dos níveis plasmáticos e cerebrais de aspartato (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013).

O aspartato é precursor do glutamato. Então, após a ingestão de ASP, há um excesso não somente de aspartato, mas também de glutamato. Apesar de produzido principalmente pelos neurônios, o excesso de glutamato não pode ser absorvido por eles e nem pelos astrócitos, sendo sorvidos pelos transportadores de aminoácidos astrocíticos. A atividade constante dos transportadores astrocíticos, entretanto, leva à hiperexcitabilidade de neurônios e astrócitos, e conseqüentemente, à morte de ambos (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013; Humphries et al., 2008).

Ou seja, pelo fato do aspartame levar à depleção neural e da DA ser uma doença neurodegenerativa, ambos podem estar relacionados. Ademais, além de excitar continuamente os transportadores astrocíticos, esse adoçante ativa ininterruptamente os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Os canais NMDA

estão envolvidos na plasticidade sináptica subjacente ao aprendizado e armazenamento de memória ao longo da vida. O consumo de ASP reduz a atividade desses canais, reduzindo, por consequência, a aprendizagem e memória, perdas comuns no Alzheimer (Herlenius & Lagercrantz, 2004).

Além dos receptores NMDA, o sistema colinérgico, citado anteriormente por ser afetado pelo aspartame, também desempenha um papel no aprendizado e memória. Áreas do cérebro envolvidas na memória e tomada de decisões, afetadas devido à ingestão da droga, incluem o hipotálamo e o córtex pré-frontal.

Por fim, parâmetros neurocomportamentais (aprendizado e memória) foram prejudicados não apenas quando o adoçante foi consumido acima da ADI, mas também, quando consumido em dosagens seguras (Iyyaswamy e Rathinasamy, 2012; Choudhary e Pretrobus, 2017; Simintzi et al., 2007).

Ensaio de Glicose

Para avaliar se o consumo de aspartame intervinha nas concentrações de glicose foi feita a mensuração da glicemia tissular da cabeça de moscas *Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ e Alzheimer-like*. - O primeiro passo, antes do teste glicêmico, entretanto, foi a validação do glicosímetro como método de quantificação de glicose, em amostras de tecido de *Drosophila*.

Para essa validação, machos e fêmeas da linhagem Canton-S, com 1 d.p.e., tiveram a glicose da cabeça e corpo conjuntamente aferidas, por meio de kit enzimático-colorimétrico, método já validado para a determinação quantitativa de glicose tissular, em moscas (Tennessee et al., 2014).

O ensaio enzimático de base colorimétrica mensura os níveis de glicose a partir da atividade da glicose oxidase (GOD), enzima que catalisa a oxidação da glicose à ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um composto de cor vermelha, a quinoneimina, cuja absorvância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra ⁽²¹⁾.

Feito o ensaio enzimático-colorimétrico, as mesmas amostras tiveram os seus valores de glicose mensurados com o glicosímetro G-Tech Free ₁, permitindo assim, que ambos valores fossem comparados. Conforme mostrado na figura 15, os dados foram comparados por meio de regressão linear, sendo o valor do

coeficiente de determinação (R^2) igual a 0.9948.

Tal resultado indica que os valores de glicose, anotados pelo glicosímetro, são significativamente semelhantes aos anotados pelo kit enzimático-colorimétrico, tanto quanto necessário para validação do glicosímetro como método de quantificação, em amostras de *Drosophila melanogaster*.

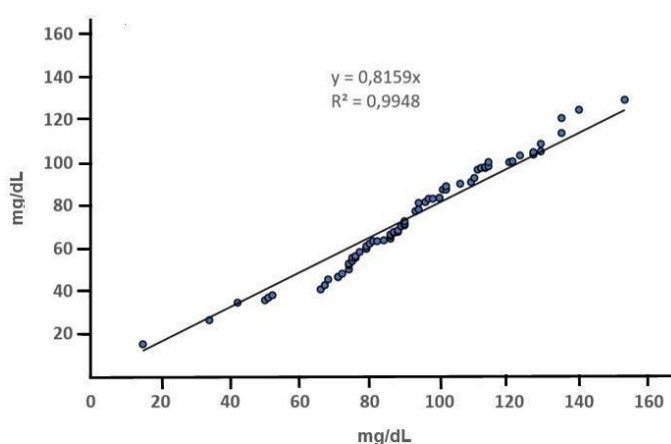


Figura 15: Validação do glicosímetro como método de quantificação de glicose, em amostras de tecido de *Drosophila melanogaster*.

Tendo o método validado, machos dos dois controles negativos e do genótipo mimético, com intervalo de idade de 0-4 d.p.e., tratados com água destilada e veículo, durante 5 (5-9 d.p.e.) e 10 dias (10-14 d.p.e.), tiveram os seus níveis de glicose medidos.

As barras cinzas da figura 16 a e b mostram os valores glicêmicos de Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ e Alzheimer-like, tratados com água destilada durante 5 e 10 dias, respectivamente. As barras brancas da mesma figura exibem os valores de glicose, após tratamento dos genótipos, com veículo.

Em relação às diferenças estatísticas, elas foram vistas somente após 10 dias de tratamento. Entre Elav-Gal4/+ e Alzheimer-like, após consumo de água destilada ($p < 0,0001$), justamente por serem os genótipos com as diferenças de glicemia mais e menos expressivas para tal tratamento, e, entre Elav-Gal4/+ tratado com água destilada e veículo ($p < 0,0001$), por motivo semelhante. Elav-Gal4/+ teve o maior aumento nos níveis de glicose, associado à idade, quando tratado com destilada, e o menor, quando tratado com veículo. Ambos casos comparam valores extremos, o que justificaria a diferença. Finalmente, o gráfico

(c) evidencia o aumento dos valores de glicose, ao longo do tempo total do experimento.

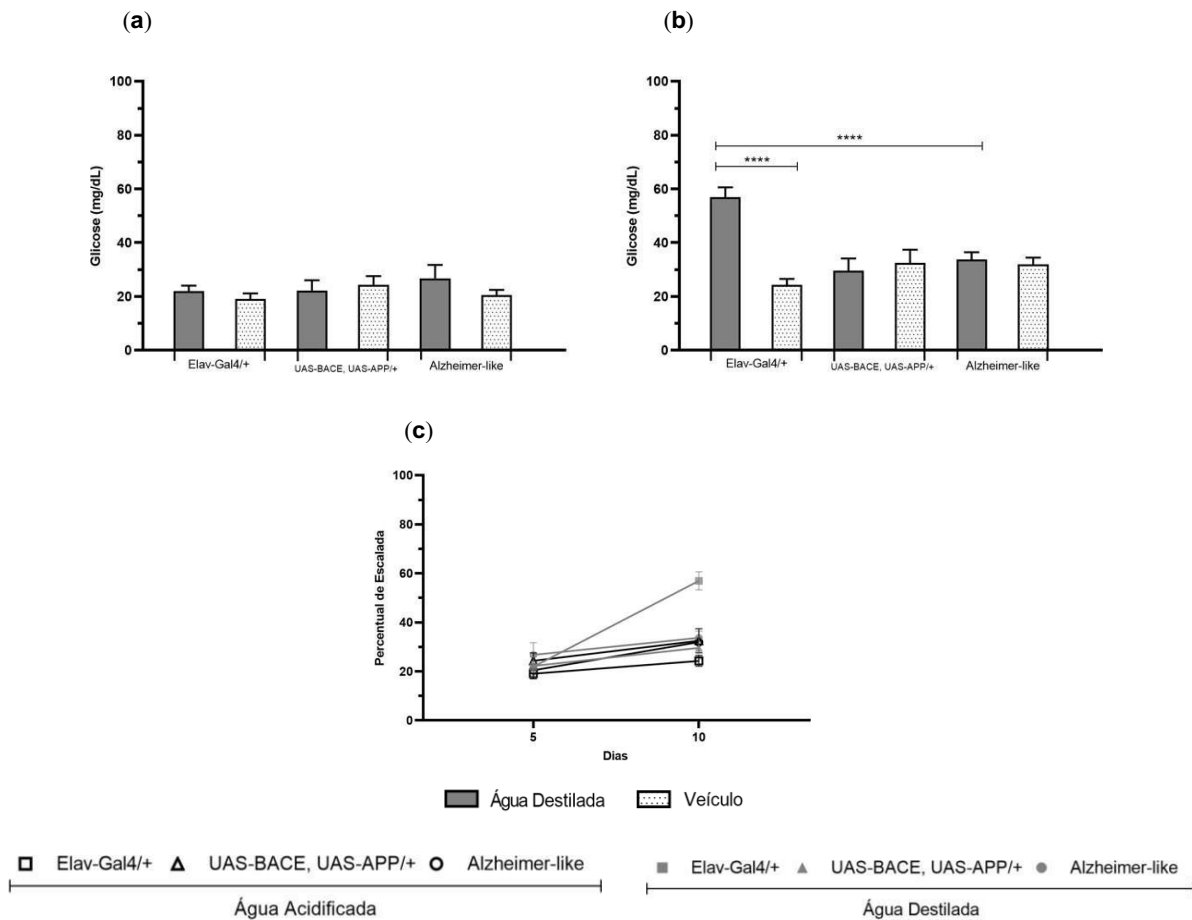


Figura 16: Teste de glicose dos controles após 5 e 10 dias de tratamento. (a) Valores de glicose mensurados para machos com genótipo Elav-Gal4/+ e UAS-BACE, UAS-APP/+, usados como controle negativo, e, genótipo Alzheimer-like, após 5 dias de tratamento com água destilada e veiculo (machos com 5-9 d.p.e.). (b) Valores de glicose mensurados para machos Elav-Gal4/+, UAS-BACE, UAS-APP/+ e Alzheimer-like, após 10 dias de tratamento com água destilada e veiculo (machos com 10-14 d.p.e.). (c) Representação gráfica dos valores de glicose ao longo do tempo total do experimento. Os gráficos foram plotados com base na média dos $n=20$ machos mensurados por tratamento. Em (a) foi usado o teste não paramétrico Mann-Whitney, e, em (b) o teste paramétrico T, em que **** indica $p<0,0001$. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

Em relação a outros trabalhos que correlacionaram o consumo de aspartame com os níveis glicêmicos, alguns estudos que utilizaram ratos e camundongos como modelos experimentais mostraram que o consumo desse adoçante, mesmo em baixas doses, pode desencadear um quadro de resistência à insulina (Palmnäs et al., 2014; Suez et al., 2014).

Assim como em humanos, em ratos e camundongos, a insulina é um hormônio que tem por função o transporte da glicose sanguínea para dentro das células. Em um quadro de resistência à insulina, esse hormônio tem uma menor capacidade de carrear a glicose circulante para o meio intracelular, resultando em um quadro de hiperglicemia (Lebovitz, 2001).

Um estudo revelou que a resistência à insulina, causada pelo ASP, deve-se ao fato de que, quando administrado, esse adoçante eleva os níveis de propionato, um ácido graxo de cadeia curta (Palmnäs et al., 2014). Segundo Tirosh et al (2019) o propionato aumenta a liberação de norepinefrina pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS), levando a um aumento de glucagon circulante, e conseqüentemente, à hiperglicemia.

Estando, o consumo de aspartame, associado a elevação da glicose sanguínea e diminuição da glicose tissular, a glicemia da cabeça de machos tratados com 54,40; 27,20; 3,40 e 1,70mM/ASP, durante 5 e 10 dias foi medida, para verificar se o adoçante, de fato, diminuiria os níveis de glicose cerebral.

Contrariamente ao que vem sendo postulado na literatura, a figura 17a mostra que após 5 dias de consumo, somente a maior dose (54,40mM) teve valores de glicose mais baixos que o controle, sendo, não significativo.

Após 10 dias, os resultados aproximaram-se um pouco mais do esperado, visto que três das quatro doses testadas (54,40; 27,20 e 1,70mM) tiveram valores mais baixos que o controle, duas, 27,20mM ($p < 0,05$) e 1,70mM ($p < 0,0001$), com diferenças estatísticas (figura 17b). Por fim, quando foi verificada a relação do consumo prolongado com os níveis de glicose, somente duas doses, 27,20 e 1,70 mM, mostraram diminuição devido ao tempo de tratamento (figura 17c).

Os dados referentes à glicose tissular após consumo de aspartame, aqui mostrados, são um pouco controversos entre si, assim como com a literatura. Essas diferenças de resultado podem ser pelo fato da literatura considerar ratos e camundongos, e não *Drosophila*, como organismos modelo. Organismos diferentes metabolizam o adoçante de maneira distinta, sendo o processo de metabolização influente sobre os resultados.

Apesar da metabolização ser espécie-específica, Gordesky-Gold et al (2008) demonstrou que a mosca *Drosophila melanogaster* responde a um

repertório de adoçantes igualmente amplo ao dos humanos, uma vez que existem semelhanças funcionais entre os receptores gustativos de moscas e mamíferos. Esse repertório de adoçantes inclui o aspartame.

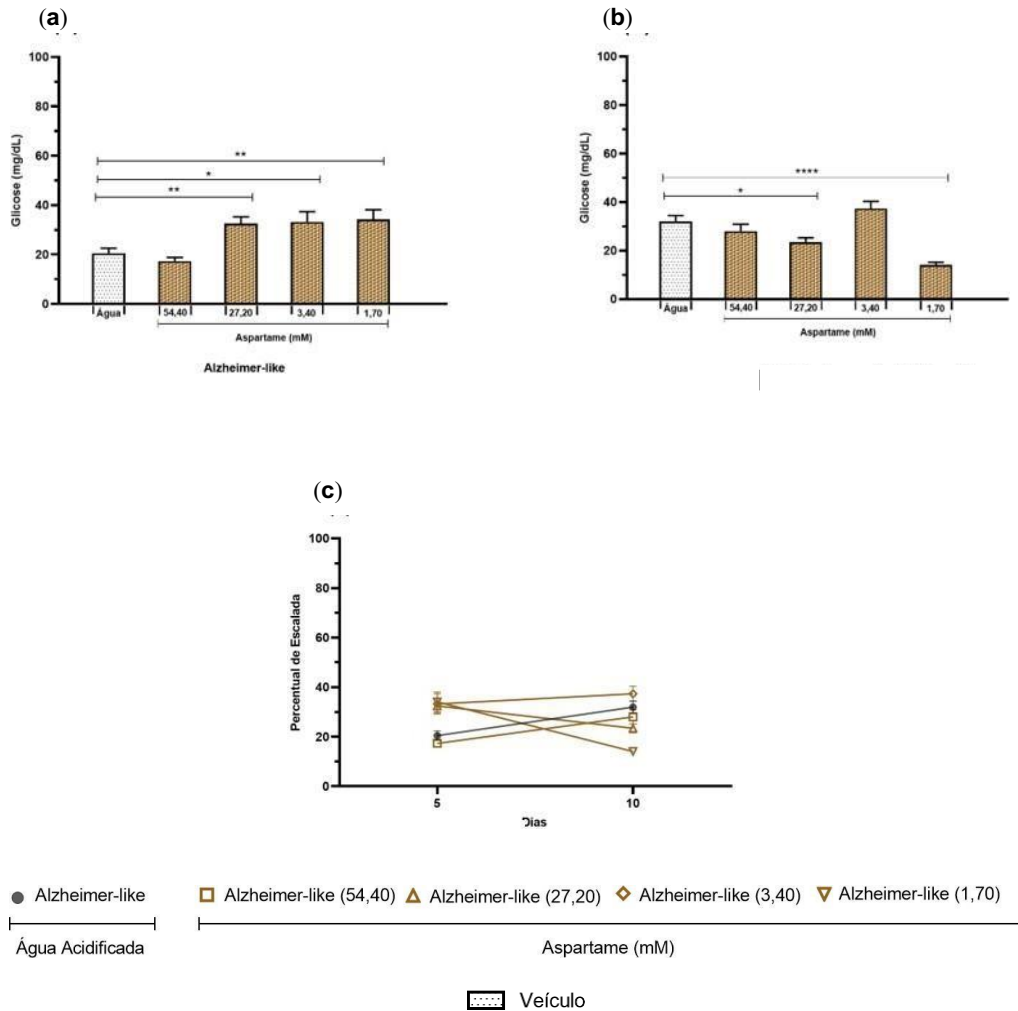


Figura 17: Teste de glicose dos tratamentos após 5 e 10 dias de consumo de aspartame. (a) Comparação dos níveis de glicose entre machos com genótipo *Alzheimer-like* tratados com veículo e diferentes concentrações de aspartame, durante 5 dias (machos com 5-9 d.p.e.). **(b)** Comparação dos níveis de glicose entre machos *Alzheimer-like* tratados com veículo e diferentes concentrações de aspartame, durante 10 dias (machos com 10-14 d.p.e.). **(c)** Representação gráfica dos valores de glicose ao longo do tempo total do experimento. Os gráficos foram plotados com base na média dos $n=20$ machos mensurados por tratamento. Foi usado o teste não paramétrico Mann-Whitney, em que * indica $p<0,05$; ** $p<0,01$ e **** $p<0,0001$. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

Finalmente, considerando que além da glicose, a trealose (dissacarídeo de glicose) também compõe-se como um dos principais carboidratos circulantes em *Drosophila*, seria óbvio considerar a influência do aspartame não somente sobre

as concentrações de glicose, mas também, de trealose. Porém, de acordo com os resultados de Tennessen et al (2014) a trealose é um carboidrato presente em larvas e adultos, enquanto a glicose, quase que exclusivamente em adultos, e, uma vez que tal experimento foi feito utilizando-se somente moscas adultas, parecia um pouco mais primordial mensurar o carboidrato exclusivo para tal faixa de idade.

Análise de Degeneração Ocular

Para avaliar se a ingestão de aspartame intervinha na capacidade visual das moscas, usou-se a linhagem GMR-Gal4 que tem o *driver* direcionado para o olho e não para os neurônios como a linhagem Elav-Gal4, sendo os genes de interesse APP e BACE humanos, expressos no tecido ocular e não neural.

Primeiramente, o modelo de estudo foi validado. Para isso, o controle negativo GMR-Gal4/+ foi tratado com água destilada, assim como o genótipo mimético GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+. Na figura 18 a linha identificada por “A” refere-se ao controle, enquanto a assinalada por “C” ao genótipo mimético.

Na comparação entre ambas linhas, vê-se que, em relação ao controle (A1), o genótipo GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ (C1), apresentou opacidade. Tal genótipo também mostrou perda na estrutura dos omatídios, unidade formadora dos olhos, ao mesmo tempo em que o controle, manteve a anatomia ocular preservada (C2 e A2, respectivamente).

Segundo Yadav e Tapadia (2013), a opacidade vista em GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ (C1), assim como as alterações dos omatídios (C2), caracterizam o nosso modelo como portador de uma degeneração ocular leve.

Uma vez validado o modelo, o passo seguinte foi verificar se o veículo utilizado para a diluição da droga tinha alguma influência sobre a degeneração ocular do genótipo controle. Para isso, foi feita a comparação entre moscas GMR-Gal4/+ tratadas com água destilada (linha A) e veículo (linha B). Seguindo o mesmo raciocínio, comparou-se moscas GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ tratadas com água destilada e veículo (linhas C e D), para estudo da interferência do veículo sobre o genótipo mimético.

O fato das imagens A2 e B2 serem bastante semelhantes, indica que o veículo não tem efeito degenerativo sobre os omatídios, ao menos para GMR-Gal4/+. As imagens C2 e D2 também assemelham-se, ou seja, o veículo também não influí na degeneração ocular de moscas GMR-Gal4/++; UAS-BACE, UAS-APP/+. Em nenhum dos casos foram vistas diferenças consideráveis de opacidade (A1 e B1, ou, C1 e D1).

Finalmente, para investigar o resultado do consumo de aspartame, moscas GMR-Gal4/++; UAS-BACE, UAS-APP/++ tratadas com veículo e adoçante, tiveram as fotografias de seus olhos comparadas. Quando olhos de machos tratados com veículo e maior dose (54,40mM) foram confrontados (D2 e E2, respectivamente), viu-se em E2, omatídios ligeiramente mais definidos. Resultados semelhantes foram vistos entre veículo e 3,40mM (D2 e G2), e, entre veículo e 1,70 mM (D2 e H2), ou seja, nessas concentrações, a droga não parece ter efeito degenerativo.

A dose de 27,20 mM, contrariamente, não mostrou nenhuma unidade ocular minimamente formada. Segundo Yadav e Tapadia (2013), essa concentração de ASP tem efeito degenerativo moderado.

Em relação as imagens obtidas em microscópio de luz, o olho tratado com 54,40 mM (E1) parece mais áspero do que o tratado com veículo (D1). Os tratados com as outras três doses (F1, G1 e H1), diferentemente, não parecem mais opacos ou ásperos do que o tratado com veículo (D1).

Os resultados da ação do aspartame sobre características estruturais (ou anatômicas) dos olhos da *Drosophila*, são meramente descritivos, ou seja, incapazes de indicar mudanças oculares funcionais, como cegueira. – Em humanos, o metanol, um dos metabólitos do ASP, já foi descrito como um composto capaz de causar cegueira (Humpries et al., 2008).

A ingestão do adoçante, mesmo quando dentro da ADI, eleva as concentrações sanguíneas de metanol cerca de 3-6 vezes. O metanol é primeiramente convertido em formaldeído, e, em seguida, em ácido fórmico (formato). Mehl-Madrone (2005) considera, como causa da cegueira, a conversão do aspartame em formaldeído, na retina do olho. Já Humphries et al (2008) descreveu o ácido fórmico como o composto citotóxico do metanol. O acúmulo de formato, na retina, pode causar cegueira.

Independentemente da toxicidade do metanol ser devida ao formaldeído, ácido fórmico, ou ambos, o consumo de aspartame pode evocar, direta ou indiretamente, problemas oculares, incluindo visão turva e perda de visão. Finalmente, apesar da figura 18 mostrar somente o olho esquerdo da mosca, ambos olhos foram fotografados. (Mehl-Madrona, 2005; Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013).


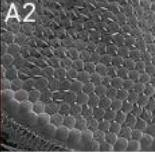


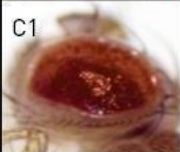
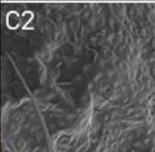
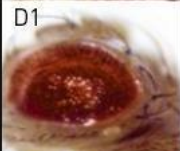
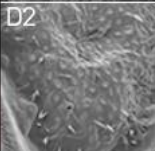

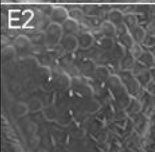

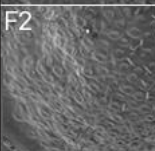

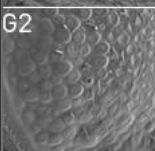

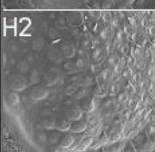
		Estereomicroscópio(5x)		MEV (1230x)																					
		A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2	F1	F2	G1	G2	H1	H2								
GMR-Gal 4/+	Tratamentos	Água Destilada			Água Acidificada			Água Destilada			Água Acidificada			Aspartame (54,40mM)			Aspartame (27,20mM)			Aspartame (3,40 mM)			Aspartame (1,70 mM)		
		Olho Esquerdo																							

Figura 18: Avaliação do grau de degeneração ocular em resposta ao tratamento com aspartame. Em (A) e (B) machos com genótipo GMR-Gal4/+, usados como controle negativo, ou seja, com ausência de degeneração ocular. Em (A) os machos foram tratados com água destilada, e, em (B) com veículo. Em (C) e (D) machos com genótipo GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+, usados como controle positivo, ou seja, com presença de degeneração ocular, tratados com água destilada e veículo, respectivamente. De E-H machos com genótipo GMR-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+, tratados com diferentes concentrações de aspartame. As imagens indicadas com (1) foram tiradas em microscópio de luz (estereomicroscópio 5x), enquanto as indicadas com (2) em microscópio eletrônico de varredura (MEV), em aumento de 1230x. Todas as imagens referem-se ao olho esquerdo da mosca.

CONCLUSÃO

Considerando que anteriormente à realização de qualquer experimento houve a validação do genótipo, pode-se concluir que moscas *Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+* são um bom modelo para o estudo da cascata β -amilóide. Em relação à toxicidade do adoçante artificial aspartame, para esse genótipo, o mesmo não se mostrou tóxico em nenhuma das concentrações testadas.

Sobre a ação do adoçante sobre a patologia em questão, nossos resultados podem sugerir alguma relação entre o consumo de ASP e a doença de Alzheimer em moscas, visto que em algumas doses e tempos de tratamento, houve redução na capacidade de escalada e valores elevados para β -amilóide. Entretanto, como outras doses e tempos de tratamento mostraram capacidade locomotora superior à do controle e valores reduzidos para β -amilóide, tais resultados não são suficientes para ratificar a hipótese do trabalho.

O ensaio de glicose e a análise de degeneração ocular também mostraram resultados favoráveis e desfavoráveis a nossa hipótese, atestando a necessidade de mais estudos relacionando o consumo desse adoçante com o Alzheimer, uma vez que tal composto tem sido indiscriminadamente utilizado, e que o número de casos da doença tem aumentado, devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial, aumentando, por consequência, os gastos públicos destinados ao tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Annaert, W.; Strooper, B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 18:25-51, 2002.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.020402.142302>
- 2) Ardalan, M. R.; Tabibi, H.; Atarri, V. E.; Mahdavi, A. M. Nephrotoxic effect of aspartame as an artificial sweetener. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 11:339-343, 2017.
- 3) Ballatore, C.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature*. 8:663-672, 2007.
<https://doi.org/10.1038/nrn2194>
- 4) Bowen, J.; Evangelista, M. A. Brain cell damage from amino acid isolates: a primary concern from aspartame-based products and artificial sweetening agents. 2002.
- 5) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 6) Cao, W.; Song, L.; Cheng, J.; Yi, N.; Cai, L.; Huang, F.; Ho, M. An automated rapid iterative negative geotaxis assay for analyzing adult climbing behavior in a *Drosophila* model of neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 127, 2017.
<https://doi.org/10.3791/56507>
- 7) Choudhary, A. K.; Pretorius, E. Revisiting the safety of aspartame. *Nutrition Reviews*. 75:718-730, 2017. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux035>
- 8) Custo atual e futuro e prevalência da doença de Alzheimer e outras demências. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/dementia-in-the-americas-BRAZILIANPORTUGUESE.pdf> Acesso em: 24 de Janeiro de 2021.

- 9) Das, R.; Chinnathambi, S. Microglial priming of antigen presentation and adaptive stimulation in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76(19): 3681-3694, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03132-2>
- 10) Dawkins, E.; Small, D. H. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 129: 756-769, 2014. <https://doi.org/10.1111/jnc.12675>
- 11) Duffy, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*. 34:1-15, 2002. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- 12) Elliott, D. A.; Brand, A. H. The GAL4 system: A versatile system for the expression of genes. *Methods in Molecular Biology*. 420:79-95, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_5
- 13) Gandy, S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *Science in Medicine*. 115:1121-1129, 2005. <https://doi.org/10.1172/JCI25100>
- 14) Gargano, J. W.; Martin, I.; Bhandari, P.; Grotewiel, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*. 40:386-395, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>
- 15) Gaspar, P.; Cases, C.; Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*. 4: 1002-1012, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrn1256>
- 16) Gordesky-Gold, B.; Rivers, N.; Ahmed, O. M.; Breslin, P. A. S. *Drosophila melanogaster* prefers compounds perceived sweet by humans. *Chemical Senses*. 33: 301-309, 2008. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjm088>
- 17) Gralle, M.; Ferreira, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Progress in Neurobiology*. 82:11-32, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.001>

- 18)**Herlenius, E.; Lagercrantz, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*. 190(1): 8-21, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.027>
- 19)**Humphries, P.; Pretorius, E.; Naudé, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*. 62:451-462, 2008.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602866>
- 20)**Irvine, G. B.; El-Agnaf, O. M.; Shankar, G. M.; Walsh, D. M. Protein aggregation in the brain: The molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular Medicine*. 14: 451-464, 2008. <https://doi.org/10.2119/2007-00100.Irvine>
- 21)**Iyyaswamy, A.; Rathinasamy, S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. *Journal of Biosciences*. 37(4): 679-688, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9236-0>
- 22)**Kit para determinação de glicose por metodologia enzimática-colorimétrica. *Gold Analisa*. 434, 8/12. Disponível em: <http://www.goldanalisa.com.br>. Acesso em: 03 de Novembro de 2020.
- 23)**Kozlov, S.; Afonin, A.; Evsyukov, I.; Bondarenko, A. Alzheimer's disease: As it was in the beginning. *Reviews in the Neuroscience*. 28:825-843, 2017.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0006>
- 24)**Kolb B.; Whishaw, I. Q. *Fundamentals of human neuropsychology*. 6 ed. (2008).
- 25)**Lacosta, A.; Insua, D; Bandi, H.; Pesini, P; Sarasa, M. Neurofibrillary tangles of A β _{x-40} in Alzheimer's disease brains. *Journal of Alzheimer's Disease*. 58:661-667, 2017. <https://doi.org/10.3233/JAD-170163>
- 26)**Lane, C. A.; Hardy, J.; Schott, J. M. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. 25:59-70, 2017. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>

- 27) Le Bourg, E.; Buecher, C. Learned suppression of photopositive tendencies in *Drosophila melanogaster*. *Animal Learning & Behavior*. 30:330-341, 2002. <https://doi.org/10.3758/BF03195958>
- 28) Lebovitz, H. E. Insulin resistance: Definition and consequences. *Experimental and Clinical Endocrinology e Diabetes*. 109(2): 135-148, 2001. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>
- 29) Liu, H.; Ham, M.; Li, Q.; Zhang, X.; Wang, W.; Huang, F. Automated rapid iterative negative geotaxis assay and its use in a genetic screen for modifiers of A β 42-induced locomotor decline in *Drosophila*. *Neuroscience Bulletin*. 31(5):541- 549, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1526-0>
- 30) López-Arias, B. *Drosophila melanogaster* como modelo de la pérdida sináptica temprana en la enfermedad de Alzheimer. 2012.
- 31) Martins, M. R. I.; R. Azoubel. Efeitos do aspartame no rim fetal de ratos - Estudo cariométrico. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 28:151-157, 2006.
- 32) McCallion, H. Dementia Training. *Mental Health Practice*. 12(7):8, 2009. <https://doi.org/10.7748/mhp.12.7.8.s9>
- 33) Mehl-Madrona, L. Autism an overview and theories on its causes. 2005.
- 34) Mesquita, C. B. et al. A resposta ao teste de atividade motora RING test em indivíduos de *Drosophila melanogaster* varia de modo dependente das. p. 3-5, 2008.
- 35) Palmnäs, M. S. A.; Cowan, T.E.; Bomhof, M. R.; Su, J.; Reimer, R. A.; Vogel, H. J.; Hittel, D. S.; Shearer, J. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *Plos One*. 9(10), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
- 36) Pandey, U. B.; Nichols, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*. 63:411-436, 2011. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>

- 37) Panegyres, P. K.; Atkins, E. R. The functions of the amyloid precursor protein gene and its derivative peptides: I molecular biology and metabolic processing. *Neuroscience e Medicine*. 2:120-131, 2011. <https://doi.org/10.4236/nm.2011.22018>
- 38) Parvathi, V. D.; Rajagopal, K. Nanotoxicology testing: Potential of *Drosophila* in toxicity assessment of nanomaterials. *International Journal of NanoScience and Nanotechnology*. 5:25-35, 2014.
- 39) Prüßing, K.; Voigt, A.; Schulz, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2013. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35>
- 40) Qiu, C.; Kivipelto, M.; Strauss, E. Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 11(2): 111-128, 2009. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu>
- 41) Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 362: 329-344, 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- 42) Rajagopal, K. Nanotoxicology testing: Potential of *Drosophila* in toxicity assessment of nanomaterials. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 5:25-35, 2014.
- 43) Rhodenizer, D.; Martin, I.; Bhandari, P.; Pletcher, S. D.; Grotewiel, M. Genetic and environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed. *Experimental Gerontology*. 43(8): 739-748, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.04.011>
- 44) Roote, J.; Prokop, A. How to design a genetic mating scheme: A basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda)*. 3:353-358, 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>
- 45) Rycerz, K.; Jaworska-Adamu, J. E. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathologica*. 51:10-17, 2013. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34191>

46)Seugnet, L.; Suzuki, Y.; Stidd, R.; Shaw, P. J. Aversive phototoxic suppression: evaluation of a short-term memory assay in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain Behavior*. 8:377-389, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00483.x>

47)Siddique, H. R.; Chowdhuri, D. K. A.; Saxena, D. K.; Dhawan, A. validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 20:285-290, 2005. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei032>

48)Simintzi, I. Schulpis, K. H.; Angelogianni, P.; Liapi, C.; Tsakiris, S. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase: Na In Vitro Study. *Food and Chemical Toxicology*. 45(12): 2397-2401, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.016>

49)Simintzi, I. Schulpis, K. H.; Angelogianni, P.; Liapi, C.; Tsakiris, S. The effect of aspartame on acetylcholinesterase activity in hippocampal homogenates of suckling rats. *Pharmacological Research*. 56(2): 155-159, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.05.003>

50)Sreeprasad, S.; Narayan, M. Nanoscopic portrait of an amyloidogenic pathway visualized through tip-enhanced raman spectroscopy. *ACS Chemical Neuroscience*. 10(8):3343-3345, 2019. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00353>

51)Staats, S.; Rimbach, G.; Kuenstner, A.; Graspeuntner, S.; Rupp, J.; Busch, H.; Sina, C.; Ipharraguerre, I. R.; Wagner, A. E. Lithocholic acid significantly improves the survival of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800424>

52)Strooper, B.; Vassar, R.; Golde, T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 6:99-107, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.218>

- 53) Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C. A.; Maza, O., Israeli, D.; Zmora, N.; Gilad, S.; Weinberger, A.; Kuperman, Y.; Harmelin, A.; Kolodkin-Gal, I.; Shapiro, H.; Halpern, Z.; Segal, E.; Elinav, E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 514: 181-186, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13793>
- 54) Swerdlow, R. H. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiology of Aging*. 28: 1465-1480, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.021>
- 55) Tennessen, J. M.; Barry, W. E.; Cox, J.; Thummel, C. S. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*. 68: 105-115, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.034>
- 56) Thomas, A. V.; Berezovska, O.; Hyman, B. T.; Arnim, C. A. F. Visualizing interaction of proteins relevant to Alzheimer's disease in intact cells. *Methods*. 44:299-303, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.02.003>
- 57) Tirosh, A.; Calay, E. S.; Tuncman, G.; Claiborn, K. C.; Inouye, K. E.; Eguchi, K. The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Science Translational Medicine*. 11, 2019. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0120>
- 58) Ugur, B.; Chen, K.; Bellen, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *The Company of Biologists*. 9: 235-244, 2016. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>
- 59) Vasconcelos, M. A.; Orsolin, P. C.; Silva-Oliveira, R.G.; Nepromuceno, J. C.; Spanó, M. A. Assessment of the carcinogenic potential of high intensity sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 101:1-7, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.028>

- 60) Vassar, R.; Kovacs, D.M.; Yan, R.; Wong, P. C. The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: Regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *Journal of Neurosciencce*. 29:12787-12794, 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009>
- 61) Wolfe, M. S., Gu nette, S. Y. APP at a glance. *Journal of Cell Science* 120:3157-3161, 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.03481>
- 62) Woods, J. K.; Kowalski, S.; Rogina, B. Determination of the spontaneous locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*. 86, 2014. <https://doi.org/10.3791/51449>
- 63) Yaday, S.; Tapadia, M. G. Neurodegeneration Caused by Polyglutamine Expansion Is Regulated by P-Glycoprotein in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 195(3): 857, 870, 2013. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155077>

ANEXO

Meios de Cultura *Drosophila melanogaster*

Meio de Fubá (Meio Padrão <i>Bloomington</i>)	
Ingredientes	Quantidade
Ágar	0,60g
Água Destilada	1000.00 mL
Farinha de Soja	1.00g
Fermento Biológico Seco (Levedura)	1.80g
Fubá	7.30g
Solução Ácida	0.50mL
Solução Nipagin	0.60mL
Xarope de Glicose	15.40g
Rendimento	1000.00 mL

Meio de Purê Enriquecido (Meio <i>Kliethermes</i>)	
Ingredientes	Quantidade (g)
Extrato de Levedura	15.00
Glicose	9.30
Nipagin	0.70
Purê de Batata (<i>Yoki</i>)	75.00
Rendimento	100.00

Meio de Postura	
Ingredientes	Quantidade
Açúcar Refinado	10.00g
Ágar	15.00g
Água Destilada	150.00mL
Fermento Biológico Fresco	100.00g
Rendimento	6 frascos (pequenos)

Para volumes maiores ou menores de meio, as quantidades proporcionais de cada ingrediente devem ser mantidas.



