



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeito da Quinacrina, um inibidor de PLA₂, em modelo de β -amilóide
expresso em *Drosophila melanogaster*

Aluna: Natieli Saito

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Dra. Fernanda Van Petten V. Azevedo

Uberlândia – MG

Junho – 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeito da Quinacrina, um inibidor de PLA₂, em modelo de β -amilóide
expresso em *Drosophila melanogaster*

Natieli Saito

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Orientador

Dra. Fernanda Van Petten V. Azevedo

Coorientadora

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

Uberlândia – MG

Junho – 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeito da Quinacrina, um inibidor de PLA₂, em modelo de β -amilóide
expresso em *Drosophila melanogaster*

Natieli Saito

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Orientador

Dra. Fernanda Van Petten V. Azevedo
Coorientadora

Homologado pela Coordenação do Curso
de Biotecnologia em / / .

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior
Coordenador do Curso de Biotecnologia

Uberlândia – MG

Junho – 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeito da Quinacrina, um inibidor de PLA₂, em modelo de β-amilóide
expresso em *Drosophila melanogaster*

Natieli Saito

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha trajetória até aqui.

A minha família que me deu suporte e me guiou até este momento. Que me acompanharam e vivenciaram comigo todas as batalhas enfrentadas para alcançar meus objetivos, pelos exemplos de força e perseverança, que me deram garra para quebrar as barreiras que a vida impõe. E ao meu namorado Augusto por me dar todo suporte e sempre me fazer ver o lado bom das coisas, além de comemorar cada conquista comigo e enfrentar todos os problemas juntos.

Aos meus amigos de vida que me deram suporte e sempre me acompanharam, e que eu tenho toda admiração por quem estão se tornando.

Aos meus amigos da faculdade que estavam presentes no dia a dia, e que estão no mesmo caminho da ciência, lutando por dias melhores.

À equipe do laboratório de Genética da UFU (LABGEN), que passaram dias e noites fazendo experimentos para que conseguíssemos alcançar com êxito os resultados de todos, apesar de todas as dificuldades encontradas.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por me orientar e direcionar para que fosse possível a realização desta e de muitas outras pesquisas.

À minha coorientadora Fernanda Van Petten que me guiou nos melhores caminhos, e que me instruiu sempre a buscar o meu melhor.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência que atinge elevado número de pessoas sendo comum entre idosos acima de 65 anos. A doença é caracterizada pela perda de memória progressiva combinada com outras disfunções cognitivas, que alteram o cotidiano do indivíduo impossibilitando-o a ter ações independentes. Segundo a hipótese da cascata amiloidal, o significativo acúmulo de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) leva ao desenvolvimento da DA, sendo, portanto, um importante alvo farmacológico que possibilita o tratamento da doença de Alzheimer. Devido a isso, o presente estudo tem como objetivo o uso da Quinacrina, um inibidor de PLA_2 que atua como um provável agente anti-polimerização de $A\beta$, através de estudos *in vivo* em modelo de *Drosophila melanogaster* (Dmel) para expressão de β -amiloide em tecido cerebral. No estudo foi observado que a Quinacrina apresentou resultados positivos contra a DA, sendo que houve redução da quantificação de placas amiloidais em Dmel, além de melhora na atividade locomotora. Isto torna possível estudos futuros em diferente modelo animal para comprovação e aprofundamento da atuação da Quinacrina contra a Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, *Drosophila melanogaster*, Quinacrina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Doença de Alzheimer e Quinacrina	4
1.2. Justificativa	10
2. OBJETIVO GERAL	10
2.1. Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Obtenção da linhagem de <i>Drosophila melanogaster</i> que tem expressão de β -amiloide 11	
3.2. Quinacrina	12
3.3. Interferência da Quinacrina no ciclo de vida do modelo	13
3.4. Ação de toxicidade da Quinacrina em modelo <i>in vivo</i> de Dmel	13
3.5. Ação da Quinacrina em teste locomotor em Dmel	14
3.6. Quantificação da deposição de β -amiloide por Tioflavina-T	16
3.7. Análise metabolômica	17
3.8. Análises estatísticas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Interferência da Quinacrina no ciclo de vida do modelo	18
4.2. Ação de toxicidade da Quinacrina em modelo <i>in vivo</i> de Dmel	21
4.3. Ação da Quinacrina em teste locomotor em Dmel	22
4.4. Quantificação da deposição de β -amiloide por Tioflavina-T	29
4.5. Análise metabolômica	31
5. CONCLUSÃO	33
6. BIBLIOGRAFIA	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos grupo preventivo.....	31
Tabela 2 – Metabólitos grupo tardio	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Quinacrine dihydrochloride	13
Figura 2 – Foto do aparelho utilizado no teste de escalada	15
Figura 3 – Gráfico do número total de pupas eclodidos em indivíduos adultos	19
Figura 4 – Gráfico de porcentagem de eclosão	20
Figura 5 – Gráfico porcentagem de sobrevivência.....	21
Figura 6 – Gráficos porcentagem do teste de escalada grupo preventivo	25
Figura 7 – Gráficos porcentagem do teste de escalada grupo tardio	28
Figura 8 –Fluorescência de peptídeo β -amiloide em Dmel.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. QNC – Quinacrina
2. Dmel – *Drosophila melanogaster*
3. A β – Peptídeo β -amiloide
4. DA – Doença de Alzheimer
5. APP – Proteína precursora de amiloide
6. BACE – β -secretase
7. PLA₂ – fosfolipase A₂
8. GAL4 – driver de direcionamento
9. Elav – gene para direcionamento de tecido cerebral
10. μ g – micrograma
11. mL – mililitro
12. mg - miligrama

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer e Quinacrina

Segundo dados do *World Alzheimer Report* (INTERNATIONAL, 2019), a cada 3 segundos um indivíduo desenvolve alguma demência, sendo que atualmente estima-se que 50 milhões de pessoas possuem alguma demência. Estima-se que em 2050 haverá 152 milhões de pessoas com demência, sendo que, na população americana de idade igual ou superior a 65 anos o número de pessoas com Doença de Alzheimer irá crescer de 55 milhões em 2019 para 88 milhões em 2050, de acordo com (“2019 Alzheimer’s disease facts and figures,” 2019; “Alzheimer’s Disease International,” [s.d.]).

Comumente a Doença de Alzheimer afeta idosos acima de 65 anos, o que se torna um fator preocupante frente aos dados fornecidos por (“Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,” [s.d.]) que demonstram que a população nacional com idade acima de 60 anos, na década de 70 era de 5,8% e em 2020 é de 18,8%, o que indica aumento de fator de risco para demências. A DA representa cerca de 50 a 80% dos casos de demência relatados.

O impacto socioeconômico que envolve a Doença de Alzheimer (DA) é alto e, em 2010, foram gastos US\$604 bilhões (dólares), em 2015 houve um crescimento de 35,4%, atingindo a marca de US\$ 818 bilhões (dólares), e para 2030 está estimado gastos que ultrapassarão a marca de US\$ 1 trilhão (dólares) (PRINCE et al., 2015). Somente nos Estados Unidos os custos com DA são em média de US\$ 236 bilhões (dólares) por ano, e a projeção é de que em 2050 os custos anuais passem a ser de >US\$700 bilhões (dólares) (PANZA et al., 2019).

A Doença de Alzheimer é uma demência que apresenta sinais que compreendem o esquecimento de fatos e acontecimentos recentes, alterações da capacidade de planejamento ou soluções de problemas, dificuldade de realização de tarefas que antes eram cotidianas, desorientação de tempo e espaço, mudança de humor, personalidade ou comportamento e outros (“Instituto Alzheimer Brasil,” [s.d.]). As demências são caracterizadas por alterações das atividades cognitivas de uma pessoa devido a doenças que atingem o sistema nervoso central, em mais específico o cérebro.

O primeiro episódio de demência foi descrito pelo médico Psiquiatra e Neuroanatomista alemão, Alois Alzheimer, em 1906, a cuja publicação de um caso clínico em que relatava alterações comportamentais, como as descritas anteriormente e que a afetavam no cotidiano (“Instituto Alzheimer Brasil,” [s.d.]). Aprofundando os estudos após o óbito da paciente foi possível realizar imagens do cérebro e observaram diversas alterações, dentre elas uma atrofia generalizada das células do córtex cerebral (relacionado às habilidades intelectuais como atenção, consciência perceptiva e outros), e alterações no hipocampo (localizado no lobo temporal e essencial para formação de memória), que era comum em idosos, porém estavam mais acentuadas. Além disso, foi notada a presença de emaranhados neurofibrilares e placas senis, que levaram a morte progressiva de neurônios, assim como a interrupção das sinapses.

O diagnóstico da DA é feito com base em exames clínicos, que confirmam os sinais já apresentados em um relato histórico do paciente e seu acompanhante, e de exames físicos que visam excluir outras deficiências que possam estar atreladas aos mesmos sinais (APRAHAMIAN; EDUARDO MARTINELLI; SANCHES YASSUDA, 2008). Para fins científicos o diagnóstico do Alzheimer também está sendo feito por meio de biomarcadores, que permitem a detecção do peptídeo β -amiloide e pela proteína TAU,

estudos tem demonstrado que as alterações nestes marcadores podem ocorrer anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas (ANÍZIO et al., 2011).

Atualmente existem duas hipóteses para explicar a DA, ambas se originaram com base nas características histopatológicas da doença (HUANG; CHAO; HU, 2020). A primeira hipótese refere-se a proteína TAU, que está relacionada aos emaranhados neurofibrilares. Essa proteína normalmente é solúvel e fica associada aos microtúbulos, porém, nos casos de Doença de Alzheimer, pode ser encontrada hiperfosforilada, tornando-se um polímero insolúvel filamentosos que causa alterações na cascata citoplasmática de fosforilações e desfosforilações. Ainda não se sabe ao certo a origem do desequilíbrio que leva a hiperfosforilação da TAU, mas é conhecido que estes emaranhados estão envolvidos em outras doenças neurológicas (DE FALCO et al., 2016).

A segunda hipótese envolve a proteína precursora de amiloide (APP), caracterizada por ser uma proteína transmembranar que, ao ser clivada pela enzima α -secretase, gera um substrato para a enzima γ -secretase que a cliva resultando em um fragmento de APP curto e inócuo, sendo esta via denominada de não amiloidogênica. Contudo, quando a APP é clivada pela β -secretase (BACE), gera a formação de um substrato diferente de clivagem pela γ -secretase, que gera um peptídeo denominado beta-amiloide ($A\beta$), formando assim a via amiloidogênica. Esse processo ocorre de forma natural no organismo e está presente em todos os indivíduos, já que $A\beta$ solúvel tem funções fisiológicas de manter a homeostase, bem como de modulação da função sináptica, auxílio no crescimento neuronal, proteção do tecido cerebral contra infecções, reparações da barreira hematoencefálica e recuperação de lesões do tecido cerebral (HUANG; CHAO; HU, 2020).

Um desequilíbrio entre as duas vias, cascata amiloidal e hiperfosforilação da TAU, faz com que os peptídeos $A\beta$ se agreguem formando oligômeros e fibrilas que são

depositados, formando então as placas amiloidais, que geram uma resposta inflamatória exacerbada, devido a sua ação pró inflamatória, e desregulação de diversas vias bioquímicas, que levam, por fim, a morte neuronal (DELANOGARE et al., 2019). As duas hipóteses levam a acreditar que a DA é desenvolvida por 3 fases, a primeira é quando a proteína TAU tem sua desregulação em locais específicos do cérebro, seguido por uma desregulação de A β que é feita de modo compensatório pelo cérebro, e por fim, ocorre a deposição do peptídeo A β que gera a inflamação e inicia os sinais de Alzheimer (PANZA et al., 2019).

Atualmente os fármacos disponíveis possuem esses alvos como características principais para exercer sua função e assim possibilitar uma evolução no quadro do paciente como exemplo, os tratamentos farmacológicos de estabilização que buscam estabilizar ou modificar a evolução da DA, isto de acordo com FREITAS et al., 2013. Existem também os inibidores de colinesterase, receptores antagonistas não-competitivos de N-metil-D-aspartato e agonistas de dopamina, utilizados para amenizar os sinais da doença (WELLER; BUDSON, 2018). Além disso, essas hipóteses permitiram que diversos estudos fossem realizados, e dentre eles, um dos mais pesquisados são os tratamentos que bloqueiam a maquinaria proteolítica que formam a substância A β (SERENIKI; VITAL, 2008).

Em busca de novos alvos ou drogas mais eficazes, encontra-se a Quinacrina (QNC), caracterizada como um inibidor de fosfolipase A₂, tipo gama, com alto peso molecular (508,91M) e fórmula expressa por C₂₃H₃₆Cl₃N₃O₃ de acordo com (“Quinacrine dihydrochloride dihydrate,” [s.d.]). Essa molécula foi muito utilizada durante a Segunda Guerra Mundial como agente antimalárico, visto que tinha um potencial de ação superior e mais estável do que a quinina, até então utilizada (PARIKH; LEE; AWEEKA, 2011). Ao longo do desenvolvimento de diversos estudos foi observado resultados que

demonstraram a interação com a substância A β e o potencial de inibir o processo de polimerização amiloidal, *in vitro* (DOLPHIN et al., 2008).

A formação de placas amiloidais levam a liberação também de fatores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α que agem estimulando a fosfolipase A₂, caracterizada como uma enzima transmembranar que é capaz de clivar os fosfolipídios de membrana, liberando ácido araquidônico que pode participar da via enzimática oxidativa da ciclooxigenase-1 ou ciclooxigenase-2, que posteriormente levam a formação de fatores inflamatórios como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Tais fatores são vistos em excesso em processos inflamatórios, que ocorre na Doença de Alzheimer. Com isso, além da possível interação da Quinacrina com o peptídeo β -amiloide, há estudos que investigam o efeito da Quinacrina como inibidor da fosfolipase A₂ (PLA₂) em modelo animal (ratos) (AL ASMARI et al., 2017), e é notável que a PLA₂ está envolta no processo de neurodegeneração (FAROOQUI et al., 2005).

Diante dos dados apresentados e da possibilidade de utilizar a Quinacrina para inibir os efeitos da doença de Alzheimer, visto que o reposicionamento dessa droga com alvos de ação diferentes do original não necessitaria passar por diversas etapas de validação e toxicidade, como na busca de um novo composto, produção sintética e diversos outros tipos de avaliações. Devido a isso o processo de estudo e aplicação deste medicamento seria facilitado. A opção por utilizar um modelo animal alternativo como a *Drosophila melanogaster* (Dmel) se faz viável, já que ela cumpre com os requisitos necessários para ser um modelo *in vivo* eficiente, como, por exemplo, a possibilidade em estudar fenômenos biológicos ou comportamentais (FAGUNDES; TAHA, 2004).

A semelhança encontrada entre a Dmel e o tecido cerebral humano diz respeito aos aspectos básicos de biologia celular, regulação da expressão gênica, conexões

neuronal, sinalização celular, síntese e morte celular (TUE et al., 2020). A Dmel é de fácil manipulação e manutenção, como também possui um modelo bastante conhecido e funcional de mimetização da expressão de β -amiloide em tecido cerebral (SILVA, 2019), possibilitando assim realização de diversos experimentos que possam envolver o uso da Quinacrina.

O modelo de expressão de proteína β -amiloide ocorre devido ao cruzamento realizado entre duas linhagens modificadas geneticamente, e que, quando há a combinação de seus genes resulta na expressão dos precursores necessários para o modelo. Ou seja, para o desenvolvimento da Dmel que mimetiza a Doença de Alzheimer há o cruzamento entre as linhagens *elavGAL4* ($P\{GawB\}elavC155,P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL4,P\{hsFLP\}1,w^*(BL\#5146)$) e *UASbace* ($w1118;P(UAS-BACE,UAS-APP1.L)2$ (BL#29877)) obtidas de estoque do Bloomington, sendo que a primeira é selecionada e utilizada a porção feminina e a segunda a porção masculina, devido ao local em que cada uma expressa individualmente. A linhagem *elavGAL4* tem como característica genética possuir um *driver* para direcionamento (*GAL4*), em específico para o cérebro (*elav*), enquanto a linhagem *UASbace* possui duas possibilidades em suas cromátides ou *UASAPP* ou *Tm6Tb*. A primeira possibilidade, quando em conjunto com a outra linhagem tem como objetivo a expressão de proteína precursora de amiloide (APP) em conjunto com a enzima β -secretase (*bace*), havendo direcionamento para o tecido cerebral. Já a segunda possibilidade não expressa proteína precursora de amiloide ou a enzima, mas sim um gene que altera seu fenótipo na fase de pupa (*Tm6Tb*), possibilitando assim a diferenciação fenotípica do modelo que realmente mimetiza a DA, demonstrando que o cruzamento é efetivo.

Com o desenvolvimento do modelo de Dmel representativo da Doença de Alzheimer, é possível avaliar diferentes aspectos e ações de drogas sobre esta via da

cascata amiloidal. As moscas que possuem tal genótipo tem como características degeneração do tecido do cérebro, formação de placas amiloidais que são originadas devido a polimerização de substância A β , tempo de vida reduzido e deficiência locomotora (TAN; AZZAM, 2017).

1.2. Justificativa

Com base nos dados apresentados, e na dificuldade em encontrar um fármaco que seja eficaz contra a DA tem-se hoje a Quinacrina, caracterizada como um inibidor de fosfolipase de amplo espectro. Visando o reposicionamento desta droga e a possibilidade em utilizar um modelo *in vivo* como a Dmel, cujo estudos permitem entender a ação e função da droga no organismo, e com um custo acessível. Esses resultados inclusive poderão abrir futuras portas para a ciência e a possibilidade de estudos mais aprofundados para uma doença que inflige tantos prejuízos ao ser humano.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Quinacrina em modelo de β -amiloide expresso em *Drosophila melanogaster*.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Avaliar a interferência da Quinacrina no ciclo de vida do modelo;

2.1.2. Avaliar a toxicidade da Quinacrina em modelo *in vivo* de Dmel;

- 2.1.3. Avaliar a ação da droga em teste de locomotor;
- 2.1.4. Quantificar substância β -amiloide por Tioflavina-T;
- 2.1.5. Analisar metabólitos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da linhagem de *Drosophila melanogaster* que tem expressão de β -amiloide

Para obtenção da linhagem utilizada, que apresenta modelo mimético a hipótese da cascata amiloide da Doença de Alzheimer foram utilizadas moscas das linhagens elavGAL4-UASGFP/elavGAL4-UASGFP; cruzadas com a linhagem ;;UASBACE,UASAPP/Tm6Tb. A partir de agora denominadas, respectivamente de elav-GAL4 e UAS-BACE.

Foram mantidas as fêmeas virgens elav-GAL4 com os machos UAS-BACE em um frasco de vidro contendo meio de cultura adequado, para que fosse possível o cruzamento. Após 7 dias de cruzamento, as moscas parentais eram removidas para que posteriormente fosse feita a coleta de pupas.

Do cruzamento são gerados dois tipos diferentes de moscas, as que possuíam genótipo elavGAL4/+;;+/UASBACE,UASAPP e elavGAL4/+;;+/Tm6Tb, sendo que as primeiras originavam pupas que eram denominadas de alongadas, e a segunda pupas “tubby” que eram diferenciadas por serem menores e mais achatadas, com isso era possível, a olho nu, fazer esta diferenciação e seleção somente das pupas alongadas que gerariam as Dmel de interesse, mantendo somente estas no frasco para que pudessem

completar seu ciclo de vida, a partir de agora estas moscas serão citadas como as de modelo de Alzheimer.

Também foi realizado o cruzamento de fêmeas virgens *elav-GAL4* com machos de linhagem denominada *white*, deste cruzamento se originam moscas que não possuem a predisposição de desenvolver o acúmulo de β -amiloide no tecido cerebral. Estas são utilizadas como controle e serão denominadas como *Elwhite*. O uso dessa linhagem para controle é devido ao seu “*background*” genético que se torna mais próximo da linhagem Alzheimer, já que quantitativamente ambas as linhagens possuem a mesma quantidade de driver *GAL4*.

Para os ensaios, as moscas foram mantidas em meio de cultura (purê de batata Yoki, suplementado com glicose em pó e nipagin), sendo que, para os tratamentos a Quinacrina foi diluída em água destilada nas concentrações de 3,125; 1,56 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$ (retirada da solução estoque) e colocada junto do meio, e os controles continham somente água destilada no meio de cultura. As doses foram previamente escolhidas com base no trabalho de SANTOS, 2021.

3.2. Quinacrina

A Quinacrina foi adquirida da empresa Sigma Aldrich (EUA) como *Quinacrine dihydrochloride* (Q3251) (figura 1). O produto chegou estocado em frasco de 25 gramas em pó, e foi diluído em água destilada com concentração em estoque de 720 $\mu\text{g/mL}$. Aliquotas foram feitas e mantidas a 4°C para que houvesse total preservação da droga após diluição.

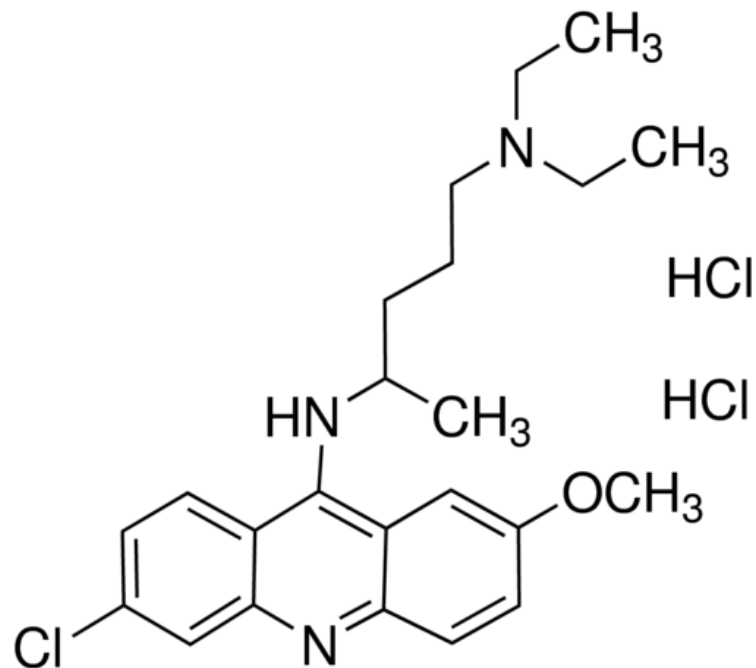


Figura 1 – Estrutura química da Quinacrine dihydrochloride

3.3. Interferência da Quinacrina no ciclo de vida do modelo

Para este ensaio foram utilizadas moscas Dmel, divididas em 4 grupos, que compreende o grupo controle Alzheimer e 3 tratamentos. Foi realizado o cruzamento de seus parentais em um frasco de modo que o N total era 30 e a proporção de 1:1 (entre machos e fêmeas).

O resultado do cruzamento (ovos) foi mantido em tratamento e monitorado o desenvolvimento dos ovos em larvas, e posteriormente em pupas. As pupas foram contabilizadas e, em seguida, foram calculadas também quantas pupas sofreram o processo de eclosão e originaram as *Drosophilas melanogaster* adultas.

3.4. Ação de toxicidade da Quinacrina em modelo *in vivo* de Dmel

Com o uso de moscas modelo de Alzheimer foi feito ensaio para avaliar a toxicidade do fármaco por meio da quantificação do tempo de vida destas. Foi feito o cruzamento que gerou o modelo final que se assemelha a Doença de Alzheimer, foram separados em frascos com média de 30 indivíduos. Para avaliar a toxicidade foram feitos grupos controles que continham moscas Elwhite e o ensaio foi executado em triplicata. As moscas foram mantidas em tratamento como descrito anteriormente.

Os tratamentos foram trocados com intervalos de 1 dia até completarem 9 dias totais de tratamento e depois foram trocados a cada 2 dias até que todas morressem. Ao longo da troca dos frascos, foram sendo contabilizadas as moscas mortas e transferidas para o novo frasco as que permaneceram vivas, após a contagem foi feita uma curva de toxicidade.

3.5. Efeito da Quinacrina em teste locomotor em Dmel

O teste locomotor, também descrito como teste de geotaxia negativa (GARGANO et al., 2005), pode também ser denominado como teste de escalada, pois compreende um ensaio onde é mensurado a capacidade inata da *Drosophila melanogaster* de escalar a parede de um recipiente quando é exposta a algum tipo de pressão que a leva para o fundo, sendo, portanto, em sentido contrário à gravidade, por isso geotaxia negativa.

Para este ensaio foram utilizadas em média 27 moscas por frasco, que compreende os grupos controle Elwhite e Alzheimer, como também os grupos tratados nas doses anteriormente mencionadas, todos feitos em triplicata. Para isso foram feitos dois grupos, um que foi submetido a tratamento quando tinha idade de 0 – 3 dias pós-eclosão,

denominado de preventivo, e o outro quando possuía de 10 – 13 dias pós-eclosão, chamado de tardio.

As moscas que iniciaram do tratamento preventivo foram sujeitas a 5 testes, demarcados pelo tempo de tratamento, ou seja, a escalada foi feita com 4, 7, 13, 19 e 26 dias de tratamento. Já o outro grupo, tardio, foram sujeitas a 3 testes que aconteceram com 14, 20 e 27 dias de tratamento.

Os frascos utilizados eram transparentes e foram alocados em suporte com doze lugares, sendo mantidas 20 minutos para aclimação (ou seja, sem interferência de mudança externa, como barulhos, alteração de luz ou temperatura), a uma distância de 40 centímetros de uma fonte luminosa constituída por lâmpada fluorescente de cor branca (especificações: 18W, 220V, 6500K e 112mA).



Figura 2 – Foto do aparelho utilizado no teste de escalada - Foto retirada de acervo pessoal

Após decorrido o tempo de ambientação, as gravações dos testes eram iniciadas sempre pelo mesmo aparelho e na mesma distância, tentando preservar também o mesmo ângulo. O suporte era “batido” em espumas por 3 vezes consecutivas, para forçar a descida das moscas para o fundo dos frascos. Os ensaios gravados eram analisados utilizando o critério da quantidade de moscas que escalaram uma altura igual ou superior a 5 centímetros, dentro do tempo de 4 segundos. O objetivo do teste era de avaliar a

diferença de atividade locomotora devido a idade e a neurodegeneração (MADABATTULA et al., 2015).

3.6. Quantificação da deposição de β -amiloide por Tioflavina-T

O ensaio de quantificação de β -amiloide foi realizado com base no protocolo de (WESTFALL; LOMIS; PRAKASH, 2019) e (SILVA, 2019), com adaptações. Foram coletadas amostras em triplicata seguindo os dois grupos de tratamento delimitados no ensaio descrito anteriormente.

Após o tratamento o grupo denominado agora de preventivo (que teve início de tratamento com 0 – 3 dias pós-eclosão) teve o tratamento finalizado com 20 dias de tratamento. O mesmo aconteceu no grupo denominado de tardio (início de tratamento de 10 – 13 dias pós eclosão), que também teve tratamento finalizado com 20 dias decorridos. Para a finalização, as moscas foram eutanasiadas em nitrogênio líquido, de forma a preservar todos os compostos.

Após a eutanásia, houve o corte das cabeças com separação em grupos de 10 cabeças em cada tubo, de forma a formar a triplicata de cada tratamento. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas em gelo.

O primeiro passo, anterior a quantificação de β -amiloide é a dosagem de proteína total por Bradford, no qual são colocados 5 μ L de amostra em uma placa de 96 poços, e cada poço foi completado com 95 μ L de água Milli-Q, e foi adicionado 200 μ L do Bradford filtrado, na ausência de luz. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 576nm.

Após isso, o protocolo para preparo da solução de Tioflavina T e da amostra, consistiu no preparo da solução estoque de Tioflavina a 8mg em 10ml de PBS 1x, filtrada e armazenada. Do estoque pegou-se 20 μ L e diluiu em 4,98mL de PBS 1x. Desta solução foi utilizado 10 μ L para cada cabeça, que foi homogeneizado novamente e depois centrifugado, para coleta de sobrenadante.

Para o ensaio final de quantificação de β -amiloide pegou-se o sobrenadante que foi pipetado em um volume de 2 μ L em placa de 96 poços, e adicionou-se 198 μ L/poço da solução de tioflavina T, o procedimento foi feito no escuro, e houve incubação e agitação por 20 minutos. A leitura final foi feita no fluorímetro (*Perkin-Elmer LS 55*) com excitação a 450nm e emissão de 482nm.

3.7. Análise metabolômica

Para mensurar os metabólitos expressos e/ou reduzidos após o tratamento com QNC, foi utilizado dois grupos denominados de preventivo e tardio, sendo processadas após eutanásia e corte das cabeças e todo experimento foi feito em duplicata.

Em cada microtubo de 2mL com 10 cabeças cada, foi adicionado 200 μ L de PBS 1x com homogeneização da amostra. Posteriormente as amostras foram processadas em metanol seguida de leitura em espectrômetro de massa (*quadrupole time-of-light – C-TOF / Agilent 6520B*). Os resultados obtidos foram processados por software *Mass Profiler Professional (Agilent)*.

3.8. Análises estatísticas

Os resultados encontrados nos testes detalhados foram analisados por meio do software GraphPad PrismR versão 7, sendo que foram utilizados teste T para comparação entre dois grupos e anova quando foi feita múltipla comparação. E, para análise dos metabólitos foi analisado em software específico *Mass Profiler Professional (Agilent)*, utilizando teste de Tukey, não pareado. De modo que cada resultado foi analisado de forma a fazer uma análise comparativa dos grupos controle com o tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Interferência da Quinacrina no ciclo de vida do modelo

Para avaliar a ação da Quinacrina no ciclo celular da *Drosophila melanogaster* o ensaio foi para analisar o desenvolvimento das pupas em moscas adultas, após a contagem da quantidade de pupas e de moscas adultas, foi plotado o seguinte gráfico.

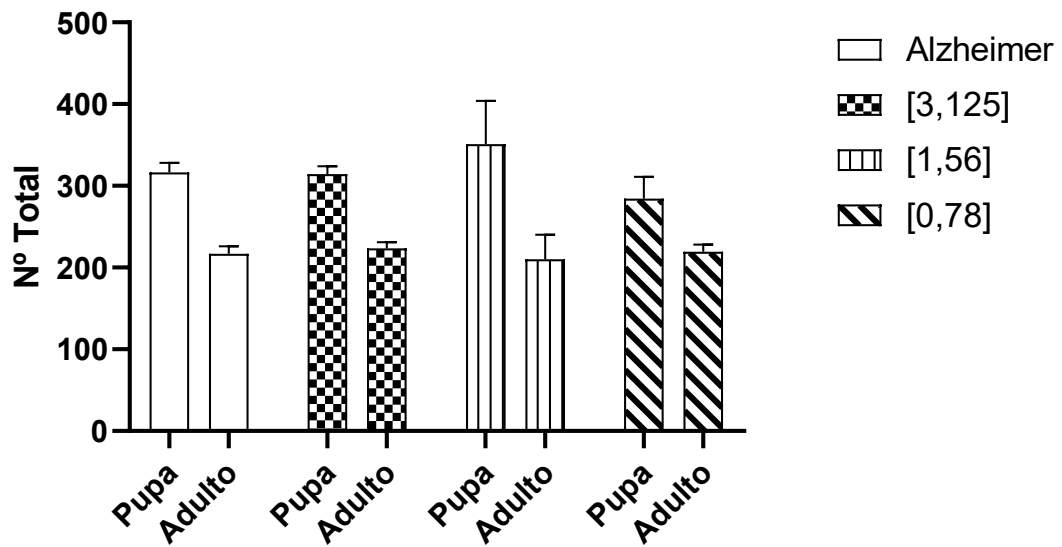


Figura 3 – Gráfico do número total de pupas eclodidas em indivíduos adultos - Número total de pupas e de moscas adultas contabilizadas, submetidas a tratamento com Quinacrina nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A Figura 3 quantifica a taxa de eclosão sofrida pelas pupas, após tratamento nas seguintes concentrações (0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), demonstrando que grande parte das pupas contabilizadas completaram seu ciclo de vida, portanto, mesmo que a Dmel seja submetida a tratamento desde o início de seu desenvolvimento, não haverá perda no número final de moscas advindas do cruzamento entre parentais Alzheimer (F_1).

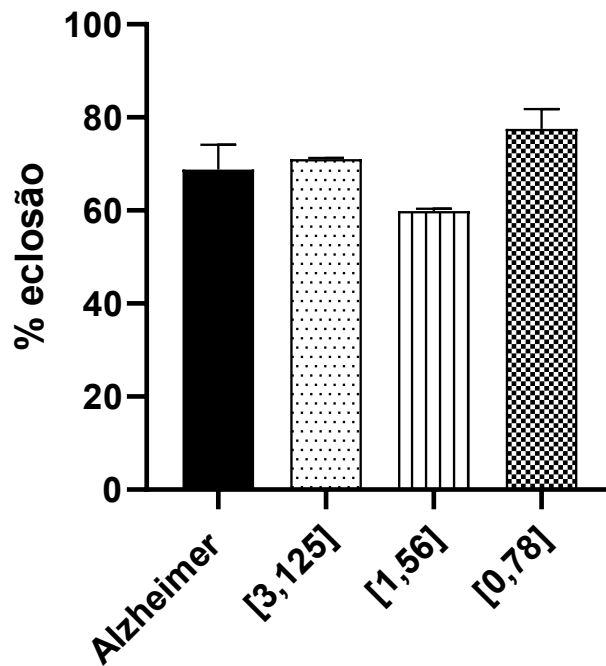


Figura 4 – Gráfico de porcentagem de eclosão - Porcentagem de pupas que completaram o ciclo de vida (eclodiram) transformando-se em moscas adultas, após tratamento com Quinacrina nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o controle água. Teste anova para múltiplas comparações.

A Figura 4 demonstra que os tratamentos com QNC nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não se diferenciam estatisticamente do controle Alzheimer que foi tratado somente com água. Ou seja, os tratamentos não afetam a parte reprodutiva das moscas Alzheimer, assim como o desenvolvimento de sua F_1 .

De acordo com a literatura, foi demonstrado que diversos hormônios são responsáveis pelo desenvolvimento do ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*, de forma que estes se tornam potenciais alvos para inseticidas, e que sua ação intervém no desenvolvimento das moscas (MINAKUCHI; RIDDIFORD, 2006). Com isso, observamos que a Quinacrina não é ligante de tais hormônios, não interferindo, portanto, no ciclo de vida da Dmel.

4.2. Ação de toxicidade da Quinacrina em modelo *in vivo* de Dmel

Para avaliar a toxicidade da Quinacrina foi utilizado o ensaio de sobrevivência da *Drosophila melanogaster*, bem como acompanhar a morte dos indivíduos comparativamente aos controles Elwhite e Alzheimer, sendo representado pelo gráfico abaixo.

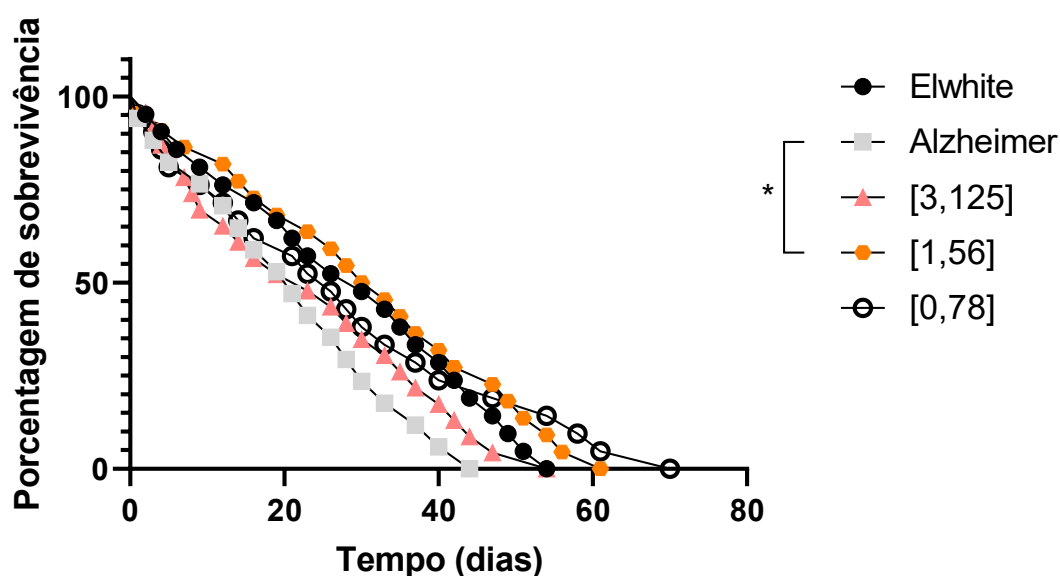


Figura 5 – Gráfico porcentagem de sobrevivência - Acompanhamento do tempo de vida da Dmel, avaliado em dias e porcentagem de sobrevivência. Após tratamento com QNC nas doses de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e grupos controle Alzheimer e Elwhite Modelo estatístico de curva de sobrevivência, com * = $P < 0,5$.

O gráfico demonstra a porcentagem de sobrevivência dos indivíduos dos grupos (Elwhite, Alzheimer e Quinacrina) identificados na legenda da Figura 5, sendo contabilizado através de tempo, descrito em dias. O grupo Elwhite, controle saudável, possui expectativa de vida mais elevada quando comparado ao grupo controle de água, que devido a neurodegeneração, possui tempo de vida reduzido. O trabalho de BAUER et al., 2005 demonstra resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, onde o grupo Elwhite mostra melhor desenvolvimento durante o ensaio realizado.

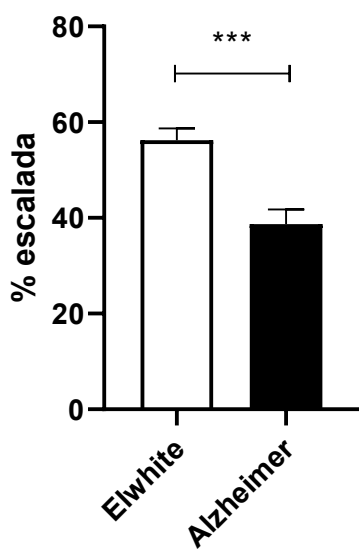
A análise comparativa entre os grupos tratados e o controle para Alzheimer demonstra que os tratamentos não reduzem a expectativa de vida dos indivíduos, visto que todas as curvas se encontram acima da curva descrita pelo controle. Além disso, estatisticamente é demonstrado que o tratamento na dose de 1,56 µg/mL supera a sobrevivência do controle, o que não é visto nas demais doses. Assim como corroborado no trabalho que analisa o uso da QNC em modelo de mamíferos, foi notável que o uso da QNC em camundongos, não piora do tempo de vida do modelo, podendo em algumas doses superar o controle. (ABDULGHANI et al., 2016).

Também pode ser visto que drogas que possuem potencial de ação de estabilizar ou reverter limitações motoras advindos da idade ou também de desordens psicomotoras, possuem a capacidade de prolongar o tempo de vida no modelo de Dmel, assim como de melhorar a atividade locomotora desta (NAVROTSKAYA et al., 2012).

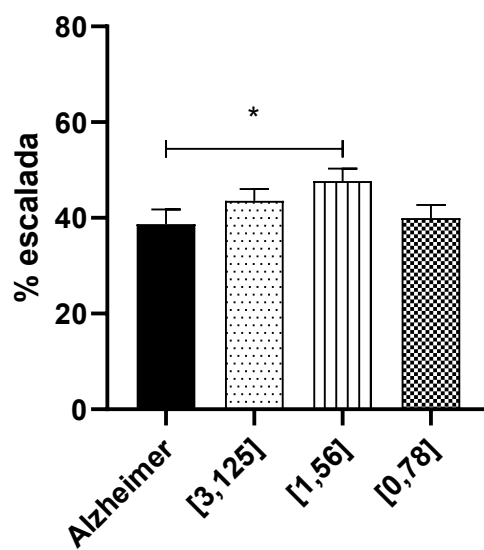
4.3. Efeito da Quinacrina em teste locomotor em Dmel

O teste de escalada foi feito em dois grupos distintos, como foi detalhado previamente, no primeiro grupo denominada preventivo foi feito 5 testes que geraram os seguintes gráficos.

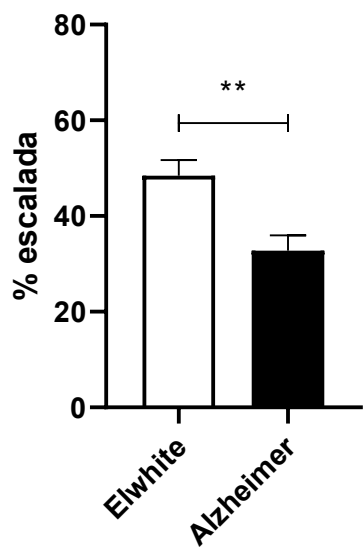
1ª escalada controle



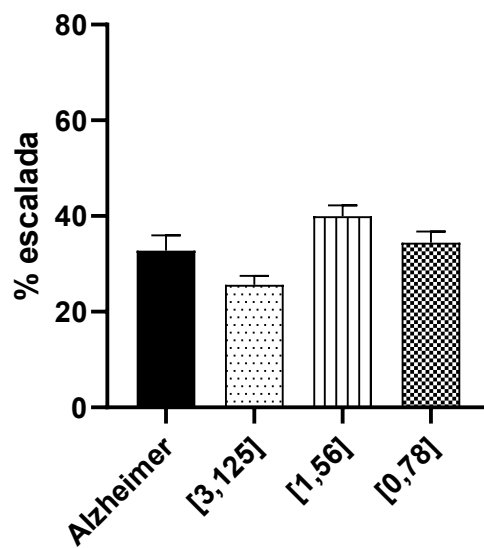
1ª escalada tratamento



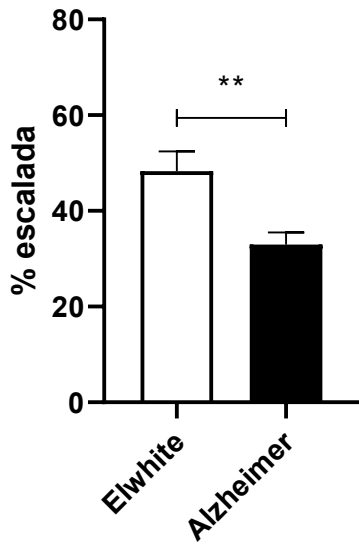
2ª escala controle



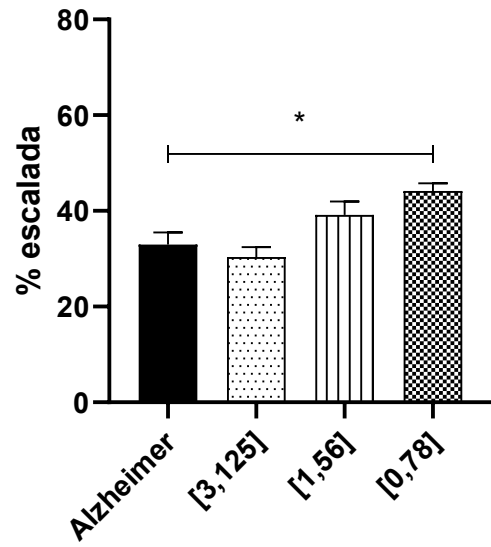
2ª escalada tratamento



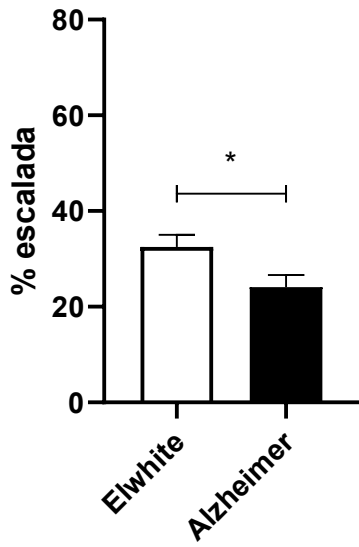
3ª escalada controle



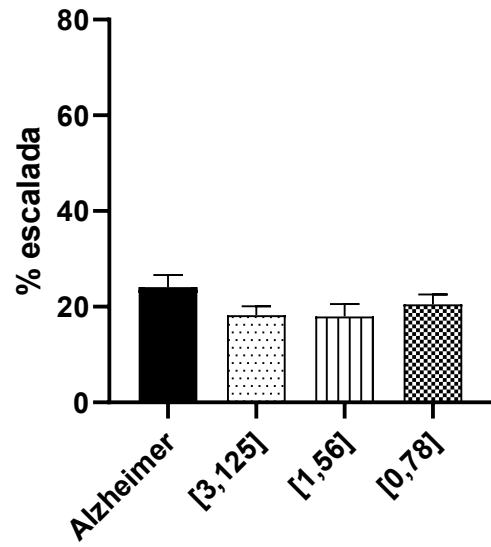
3ª escalada tratamento



4ª escalada controle



4ª escalada tratamento



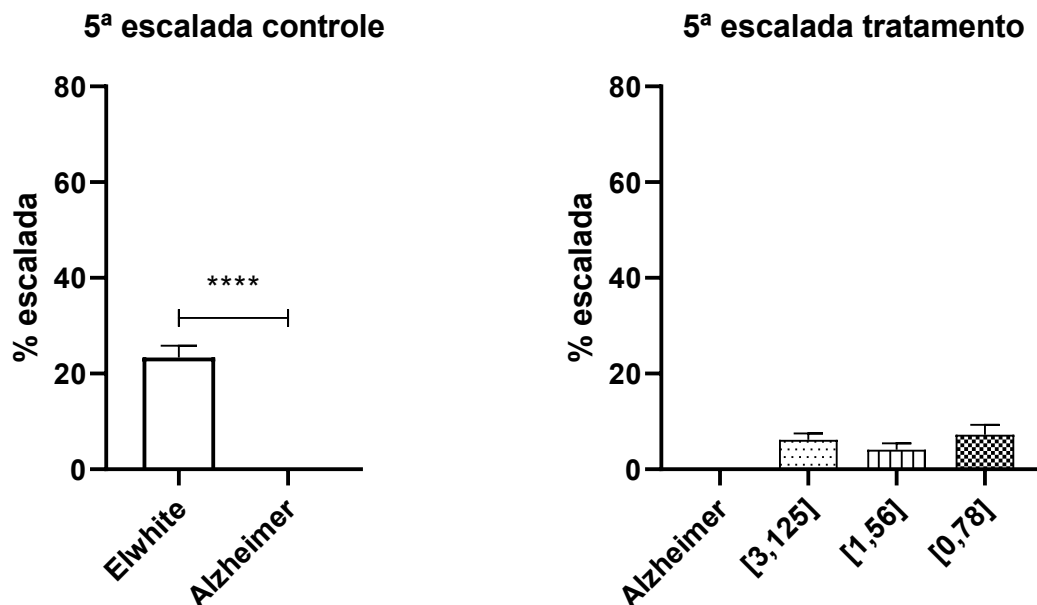


Figura 6 – Gráficos porcentagem do teste de escalada grupo preventivo - Gráficos que representam a porcentagem de escalada que cada grupo realizou em diferentes momentos. As figuras da esquerda mostram o comparativo entre os grupos controle Elwhite e Alzheimer. As figuras da direita são as comparações entre o controle Alzheimer e os grupos tratados com QNC nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$. A 1ª escalada corresponde a idade de 4 dias pós eclosão, a 2ª de 7 dias, 3ª de 13 dias, 4ª de 17 dias e 5ª de 24 dias. Sendo que foi analisado com teste anova com * = $P < 0,5$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ e **** = $P < 0,0001$.

De acordo com os resultados, foi notável a diferença da capacidade locomotora entre o grupo controle Elwhite e o controle Alzheimer, em que o segundo apresentou baixa capacidade locomotora frente ao primeiro grupo, já que a neurodegeneração do modelo leva a uma perda da capacidade inata que a Dmel apresenta frente ao teste de geotaxia negativa, que é o representado pelo grupo Elwhite.

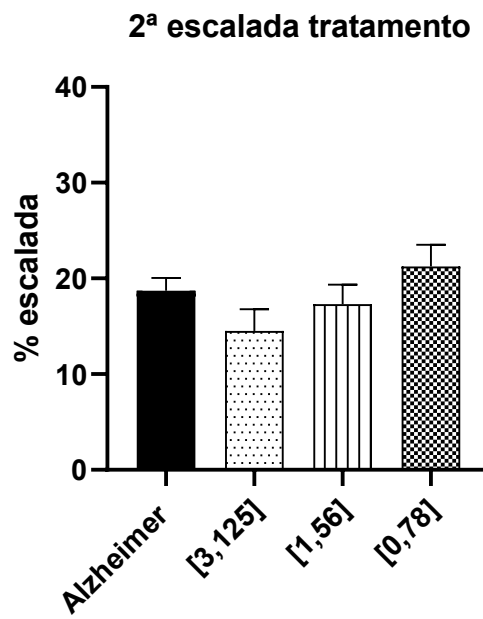
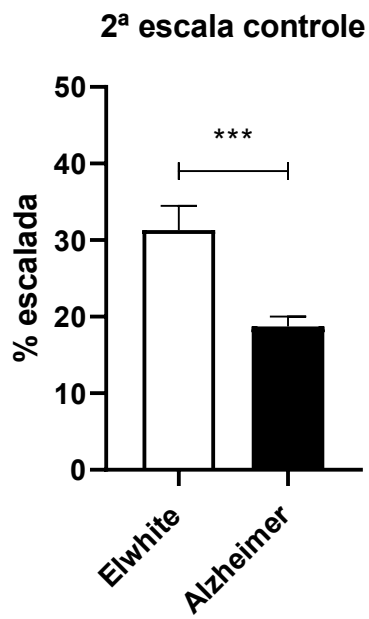
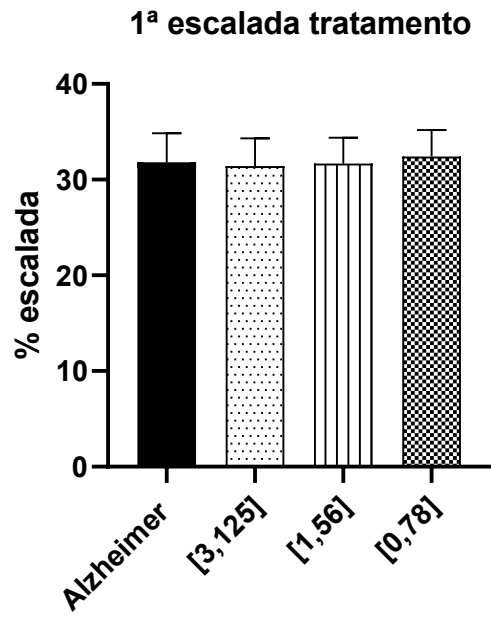
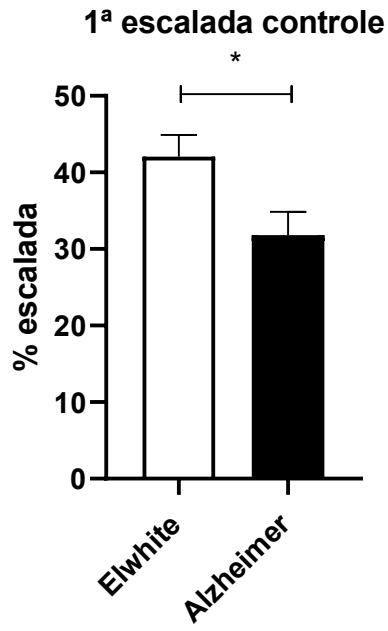
O tratamento iniciou antes mesmo da acentuação de sinais da Doença de Alzheimer, por isso seu caráter preventivo. Com isso é feita a comparação entre os grupos tratados e o controle Alzheimer, no qual pode ser notado diferença estatística na primeira escalada na dose de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e na terceira escalada na dose de 0,78 $\mu\text{g/mL}$. E, apesar de não ter resultado estatístico na última escalada, é possível observar que houve uma pequena disparidade onde o grupo Alzheimer não escalou devido a fase de

neurodegeneração, enquanto os demais grupos submetidos à tratamento obtiveram pequena porcentagem de escalada.

Descrito primeiramente por (CHAKRABORTY et al., 2011) o modelo de Alzheimer expresso em Dmel pode ter validação no ensaio realizado, já que a deposição de substância A β utilizada nas moscas levam a perda em quesitos como memória, aprendizagem e atividade motora, podendo assim ser observado nos grupos tratados se houve estabilização ou regressão de tais déficits (ALI et al., 2011).

A redução na taxa de escalada após o 3º teste de escalada pode ser explicada devido a idade das moscas e a redução do número total de moscas por frasco, já que devido a idade, é normal que elas sofram morte natural, acarretando uma análise estatística final alterada. Portanto, ainda são necessários aprimoramentos de forma a tentar manter o número de moscas. Pode ser realizado ainda uma abordagem de doses maiores para que seja possível visualizar a dose ótima de ação da QNC, assim como foi feito por PHAM et al., 2018.

O grupo, denominado tardio, foi submetido à 3 testes e gerou os gráficos a seguir.



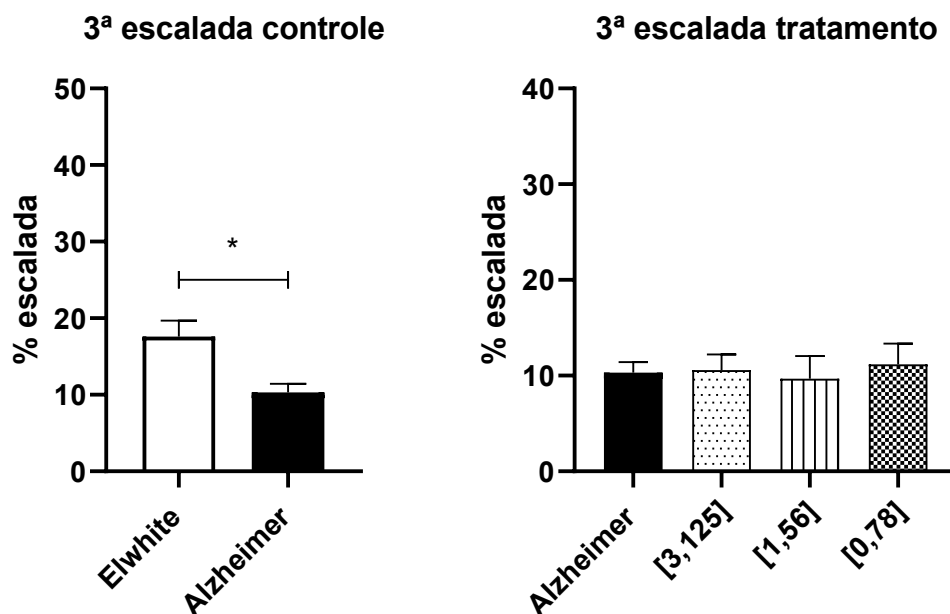


Figura 7 – Gráficos porcentagem do teste de escalada grupo tardio - Gráficos que representam a porcentagem de escalada que cada grupo realizou em diferentes momentos. As figuras da esquerda mostram o comparativo entre os grupos controle Elwhite e Alzheimer. As figuras da direita são as comparações entre o controle Alzheimer e os grupos tratados com QNC nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 1ª escalada corresponde a idade de 13 dias pós eclosão, a 2ª de 17 dias e a 3ª de 24 dias. Sendo que * = $P < 0,5$ e *** = $P < 0,001$.

Assim como esperado entre os grupos controle Elwhite e Alzheimer, em todos os testes foram apresentadas diferenças estatísticas devido a neurodegeneração sofrida pelo grupo denominado Alzheimer. O presente grupo teve início de seu tratamento após alguns dias de eclosão, o que a caracteriza como um grupo tardio (tratamento pós desenvolvimento da Doença de Alzheimer).

Na 1ª escalada não é possível notar nenhuma diferença entre os grupos tratados e o controle Alzheimer, isso se justifica pelo tempo de início de tratamento, já que o grupo tardio tem como finalidade a regressão dos sinais da DA já apresentados, além disso pode ser observado nesse grupo que o tratamento se inicia quando a Dmel já possui uma idade mais avançada, podendo retardar o metabolismo da droga no modelo.

Durante a 2^a e 3^a escalada, apesar de não ter apresentado diferença estatística, observamos que houve uma disparidade entre o grupo controle e a dose de 0,78 µg/mL, provavelmente, a redução do número de moscas finais utilizadas no teste, e as alterações climáticas podem ser motivos que afetaram os dados estatísticos.

Como já descrito no trabalho de Liu e colaboradores de (LIU et al., 2015), o modelo β-amiloide expresso em Dmel apresenta decaimento da atividade locomotora, principalmente, após o 10^o dia pós-eclosão, com isso, a resposta frente o tratamento com QNC no grupo tardio condiz com o estudo, já que o ensaio locomotor se adequa mais após este período, quando se destaca a diferença entre os grupos controle Elwhite e Alzheimer, e pode-se observar com mais clareza os resultados obtidos dos tratamentos.

Já foi demonstrado que a cascata amiloida e a substância Aβ tem grande função na demência de Alzheimer, sendo pesquisada diversas substâncias capazes de ter ação na deposição de tal peptídeo, assim como foi descrito por Bland e colaboradores (BLAND et al., 2009). Em estudos que relacionam os príons com a DA, notou-se resultados efetivos da Quinacrina na longevidade do modelo animal mamífero utilizado, como também alterações no sistema neural (GHAEMMAGHAMI et al., 2009).

4.4. Quantificação da deposição de β-amiloide por Tioflavina-T

Com objetivo de quantificar a substância Aβ no tecido cerebral da *Drosophila melanogaster* foi feito um ensaio utilizando somente as cabeças das moscas a fim de que o teste tenha maior precisão.

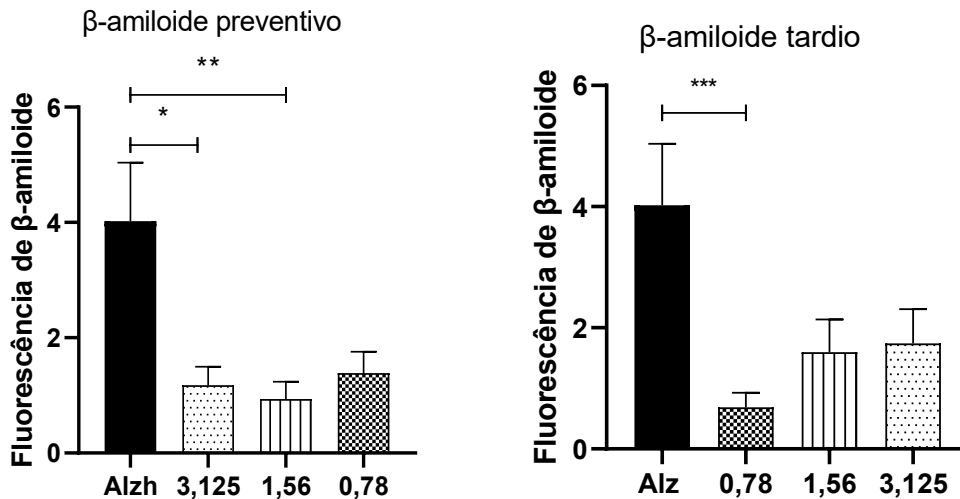


Figura 8 –Fluorescência de peptídeo β -amiloide em Dmel - Gráficos que demonstram a deposição de β -amiloide no tecido cerebral, após tratamento com QNC nas concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125 para os grupos preventivo e tardio. Teste anova utilizado com * = $P < 0,5$; ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$.

A fim de facilitar o entendimento, os resultados foram divididos em dois grupos, apresentando um resultado para o grupo preventivo e outro para o tardio. No grupo preventivo é notável a presença de grande quantidade de substância $A\beta$ no grupo controle, enquanto há redução estatisticamente significativa nos grupos tratados nas doses de 3,125 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a maior discrepância é entre a segunda dose e o controle, assim como notado no teste de escalada.

No grupo tardio observou-se diferença estatística entre o grupo controle e a dose de 0,78 $\mu\text{g/mL}$, equivalendo aos resultados vistos no teste de escalada. Dessa forma é possível notar a ação da Quinacrina como redutor da substância $A\beta$ no tecido cerebral, mesmo quando a doença se encontra em estado avançado.

Silva e colaboradores, descreveu o ensaio de quantificação da deposição de peptídeo β -amiloide, que demonstrou que as moscas do grupo tardio são as que mais apresentam diferença na deposição deste composto. Portanto os resultados encontrados

confirmam que houve redução na deposição da substância no tecido cerebral na dose ótima de 0,78 µg/mL de QNC em relação ao grupo controle (SILVA, 2019).

4.5. Análise metabolômica

A fim de validar os resultados obtidos no estudo e em busca de descobrir quantos metabólitos se diferenciam entre os grupos controle e os tratados, foi realizada uma análise metabolômica, no grupo preventivo representado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Metabólitos grupo preventivo - Análise metabolômica após tratamento das moscas *Dmel* com concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125. A tabela representa o número de compostos que apresentaram metabólitos diferenciais entre os grupos utilizados. Método estatística de Tukey não pareado.

Group Name	3,125	1,56	0,78	Alzheimer
Alzheimer	8	8	7	0
Elwhite	12	12	9	12

Os resultados obtidos apresentaram diferença em 12 metabólitos entre o grupo Alzheimer e Elwhite, e houve alterações com o uso da Quinacrina que levaram a diferenciação de metabólitos entre o grupo Alzheimer e os tratados, sendo os maiores encontrados nas doses de 3,125 e 1,56 µg/mL, significando que há diferenciação metabólica com o uso da QNC frente a DA. O número total de metabólitos encontrados em todos os grupos foi de 30, e entre os 30 consegue-se diferenciar os 12 metabólitos expostos na tabela 1.

Para o tratamento no grupo tardio foi feita a mesma análise que demonstrou esta diferença entre os grupos.

Tabela 2 – Metabólitos grupo tardio - Análise metabolômica após tratamento das moscas *Dmel* com concentrações de 0,78; 1,56 e 3,125. A tabela representa o número de compostos que apresentaram metabólitos diferenciais entre os grupos utilizados. Método estatístico de Tukey não pareado.

Group Name	3,125	1,56	0,78	Alzheimer
Alzheimer	76	66	65	0
Elwhite	38	35	38	77

Assim como nos demais ensaios foi encontrado um resultado otimista frente ao uso da Quinacrina no grupo tardio, o total de metabólitos entre os grupos foi de 106, e os que se diferenciaram encontram-se na tabela 2. Foi apresentado elevada diferença entre o controle Alzheimer e a dose de 3,125 $\mu\text{g/mL}$, assim também ocorreu nos demais tratamentos. Em concordância com os demais resultados foi notável também a diferença de metabólitos entre o Alzheimer e a dose de 0,78 $\mu\text{g/mL}$. Ressaltando que a própria produção de substância $A\beta$ induz uma resposta metabólica distinta que está associado a toxicidade, assim como o envelhecimento que leva a alterações no metabolismo.

Conhecer os metabólitos alterados na Doença de Alzheimer pode ser um alvo importante para estudos que envolvam o diagnóstico e o acompanhamento da doença, visto que isso permite o desenho e/ou entendimento de uma possível via de sinalização. O estudo de Trushina e Wilkins, demonstra que houve alterações nos metabólitos antes mesmo dos primeiros sinais da doença, bem como ao longo do desenvolvimento da demência (WILKINS; TRUSHINA, 2018). A mudança na presença de metabólitos também foi notada em *Drosophila melanogaster* como descrito por (COX; THUMMEL; TENNESSEN, 2017), e, devido a isso, o presente estudo foi realizado para predição da diferença dos metabólitos na presença e ausência do tratamento com Quinacrina.

Para que o estudo de metabólitos seja conclusivo ainda é preciso a identificação dos mesmos, e a relação entre os grupos controle Elwhite e Alzheimer com os tratamentos

nas doses de 0,78; 1,56 e 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Porém com os demais ensaios realizados pode concluir que no grupo preventivo há uma diferença entre o Alzheimer e a dose de 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo possível a interposição de que a droga possivelmente tem capacidade de impedir a formação de aglomerados de substância $A\beta$ no tecido cerebral, consequentemente inibindo a ação da PLA_2 , diminuindo a exacerbação da resposta inflamatória gerada pela mesma. Com isso sua função preventiva frente a Doença de Alzheimer.

Além disso, no grupo tardio os resultados são direcionados para a dose de 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que apresentou diferença estatística em todos os testes apresentados, sendo possível firmar que a menor dose de uso da Quinacrina apresentou resultados significativos na regressão da DA, principalmente pelo fato de reduzir o aglomerado de substância $A\beta$ no tecido cerebral.

Portanto, podemos inferir com base nos nossos resultados que a Quinacrina pode ser melhor estudada para um possível tratamento para a DA tem um potencial de ação distinto e que seu uso em baixas doses pode se tornar viável, além de que é notável sua ação na deposição de substância $A\beta$, ação essa semelhante a nova droga, Aldhelm, recentemente aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso na Doença de Alzheimer (“FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer’s Drug,” 2021).

5. CONCLUSÃO

Após a análise de todos os resultados, é possível constatar que a Quinacrina não afeta o desenvolvimento do ciclo de vida do modelo, assim como também não é tóxica já que permite com que o tempo de vida das moscas utilizadas seja normal quando comparado aos controles. Além disso as doses utilizadas neste trabalho são sub-tóxicas e foram

capazes de promover resultados satisfatórios nos testes locomotor e quantificação de β -amiloide do modelo *in vivo* estudado. Tornando assim a Quinacrina uma potencial molécula para estudos posteriores em mamíferos e avaliação da sua eficácia em ensaios clínicos.

6. BIBLIOGRAFIA

2019 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 3, p. 321–387, mar. 2019.

ABDULGHANI, J. et al. Sorafenib and quinacrine target anti-apoptotic protein MCL1: A poor prognostic marker in Anaplastic Thyroid Cancer (ATC). **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 24, p. 6192–6203, 15 dez. 2016.

AL ASMARI, A. K. et al. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats. **BMC Nephrology**, v. 18, n. 1, 28 jan. 2017.

ALI, Y. O. et al. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, 2011.

Alzheimer's Disease International. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/statistics>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

ANÍZIO, N. et al. **Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer** **Dement Neuropsychol**. [s.l.: s.n.].

APRAHAMIAN, I.; EDUARDO MARTINELLI, J.; SANCHES YASSUDA, M. **Doença de Alzheimer: Revisão da Epidemiologia e Diagnóstico**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/263808978>>.

BAUER, J. H. et al. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. **Current Biology**, v. 15, n. 22, p. 2063–2068, 22 nov. 2005.

BLAND, N. D. et al. Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 571–574, mar. 2009.

CHAKRABORTY, R. et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

COX, J. E.; THUMMEL, C. S.; TENNESSEN, J. M. Metabolomic studies in *Drosophila*. **Genetics**, v. 206, n. 3, p. 1169–1185, 1 jul. 2017.

DE FALCO, A. et al. **Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento** *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 1 jan. 2016.

DELANOGARE, E. et al. **Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados**. [s.l: s.n.].

DOLPHIN, G. T. et al. A multimeric quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's β -amyloid fibril formation. **ChemBioChem**, v. 9, n. 6, p. 952–963, 14 abr. 2008.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. **Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente** *Acta Cirúrgica Brasileira*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>.

FAROOQUI, A. A. et al. **Inhibition of Brain Phospholipase A2 by Antimalarial Drugs: Implications for Neuroprotection in Neurological Disorders** *Medicinal Chemistry Reviews-Online*. [s.l: s.n.].

FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Drug. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

FREITAS, E. V. et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. v. 3.ed., 2013.

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, maio 2005.

GHAEMMAGHAMI, S. et al. Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 11, nov. 2009.

HUANG, L. K.; CHAO, S. P.; HU, C. J. **Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease** *Journal of Biomedical Science* BioMed Central Ltd., , 6 jan. 2020.

Instituto Alzheimer Brasil. Disponível em: <<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/iab/>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html>>. Acesso em: 29 maio. 2021.

INTERNATIONAL, A. D. **World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia; World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.daviddesigns.co.uk>.

LIU, H. et al. 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**, v. 31, n. 5, p. 541–549, 26 out. 2015.

MADABATTULA, S. T. et al. Quantitative analysis of climbing defects in a drosophila model of neurodegenerative disorders. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 100, 13 jun. 2015.

MINAKUCHI, C.; RIDDIFORD, L. M. **Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management**. [s.l: s.n.].

NAVROTSKAYA, V. V. et al. Berberine Prolongs Life Span and Stimulates Locomotor Activity of < i>Drosophila melanogaster</i> **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 07, p. 1037–1040, 2012.

PANZA, F. et al. **A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease** *Nature Reviews Neurology* Nature Publishing Group, , 1 fev. 2019.

PARIKH, S.; LEE, M.-N. T.; AWEEKA, F. T. Antimalarial Agents. In: **Drug Interactions in Infectious Diseases**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 561–579.

PHAM, H. M. et al. Cinnamaldehyde Improves Lifespan and Healthspan in Drosophila melanogaster Models for Alzheimer’s Disease. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

PRINCE, M. et al. **World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An AnAlYsIs of prevAlence, IncIDence, cosT AnD TrenDs**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.alz.co.uk/worldreport2015corrections>.

Quinacrine dihydrochloride dihydrate. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds020709?lang=pt®ion=BR&gclid=CjwKCAjw2dD7BRASEiwAWCtCb6pJUVIXRS3i9TS6mMPxMhymQko53RAT4xmMxICaqtbfm_Ap7NSMBoCXoAQAvD_BwE>. Acesso em: 4 nov. 2020.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. **A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos.** [s.l: s.n.].

SILVA, J. **Uso de Drosophila melanogaster como modelo de doenças neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação comportamental.** [s.l: s.n.].

TAN, F. H. P.; AZZAM, G. *Drosophila melanogaster - deciphering Alzheimer's disease.* 2017.

TUE, N. T. et al. Insights from Drosophila melanogaster model of Alzheimer's disease. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 25, n. 1, p. 134–146, 1 jan. 2020.

WELLER, J.; BUDSON, A. **Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment**F1000ResearchF1000 Research Ltd, , 2018.

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. A novel synbiotic delays Alzheimer's disease onset via combinatorial gut-brain-axis signaling in Drosophila melanogaster. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.

WILKINS, J. M.; TRUSHINA, E. **Application of metabolomics in Alzheimer's disease**Frontiers in NeurologyFrontiers Media S.A., , 12 jan. 2018.