



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

**Efeito do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval de
Frieseomelitta varia em *Drosophila melanogaster* modelo para doença de
Alzheimer**

Aluna: Michelle Ribeiro Sales

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Coorientadora: Dra. Tamiris Sabrina Rodrigues

UBERLÂNDIA - MG
2023



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

Efeito do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval de *Frieseomelitta varia* em *Drosophila melanogaster* modelo para doença de Alzheimer

Aluna: Michelle Ribeiro Sales

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Coorientadora: Dra. Tamiris Sabrina Rodrigues

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

UBERLÂNDIA - MG
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

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

S163	Sales, Michelle Ribeiro, 1996-
2023	EFEITO DO SECRETOMA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE <i>Friesemelitta varia</i> EM <i>Drosophila melanogaster</i> MODELO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER [recurso eletrônico] : EFEITO DO SECRETOMA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE <i>Friesemelitta varia</i> EM <i>Drosophila melanogaster</i> MODELO PARA DOENÇA DE ALZHEIMER / Michelle Ribeiro Sales. - 2023.
<p>Orientadora: Ana Maria Bonetti. Coorientadora: Tamiris Sabrina Rodrigues. 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.2023.123 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p>	
<p>I. Genética. I. Bonetti, Ana Maria ,1949-, (Orient.). II. Rodrigues, Tamiris Sabrina, 1992-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p>	
CDU: 575	

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



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

Efeito do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval de *Frieseomelitta varia* em *Drosophila melanogaster* modelo para doença de Alzheimer

Aluna: Michelle Ribeiro Sales

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
Dra. Wanessa Rocha de Souza

Data da Defesa: 30/03/2023

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

Ana Maria Bonetti

“A razão da existência humana é ser uma força ativa. É, pois, necessário que cada dia seja para nós a criação de um resultado.”

Rémy de Gourmont

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Flávio Ribeiro Costa e Kátia Rodrigues Sales Costa**, ao meu irmão **Guilherme Ribeiro Sales**, pelo carinho, apoio, confiança e estímulo. A vocês, meu amor eterno e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer infraestrutura para a realização deste trabalho. Aos meus pais Flávio e Kátia e ao meu irmão Guilherme que acreditaram no meu potencial e investiram na realização do meu sonho, não me deixando desistir em nenhum momento, provando que são exemplos de vida para a busca por um futuro cada vez melhor. À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Bonetti pela oportunidade, pelas valiosas orientações, por me receber como aluna no laboratório e se preocupar com cada detalhe. Obrigada por acreditar no meu trabalho e reconhecer todo o meu esforço em cada etapa realizada. Também agradeço à Drª. Tamiris Sabrina Rodrigues pela coorientação, pelo incentivo e por não desistir de me colocar no caminho certo na busca pelos resultados.

A todos os colegas, alunos e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC/UFU) pelos serviços prestados e apoio. À toda equipe do LABGEN, Profº Dr. Carlos Ueira, Luiz Fernando, Karine, João Pedro, Débora, Serena e Carol que sempre estiveram presentes me ajudando, participando dos experimentos, pela colaboração e disposição no processo de obtenção de dados. À minha chefe, Wanessa que abriu portas para mim, me dando a oportunidade do primeiro emprego como Bióloga e acreditando no meu potencial, o qual sou eternamente grata. Ainda, aos laboratórios parceiros, Laboratório de Bioquímica (Labibi) e Laboratório de Nanobiotecnologia, do Instituto de Biotecnologia-UFU e Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos professores da Comissão Examinadora, 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, o meu eterno agradecimento.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética e Laboratório de Nanobiotecnologia, do Instituto de Biotecnologia e Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia – Minas Gerais, Brasil), com o apoio das seguintes Agências de Fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
Capítulo I – Fundamentação Teórica	11
1. Doença de Alzheimer	12
1.1 Epidemiologia e fisiopatologia	12
1.2 Hipótese amiloide	15
2. <i>Drosophila melanogaster</i>	17
2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	17
2.2 Sistema GAL4/UAS: utilização em <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3. Abelhas sem ferrão	21
3.1 Abelhas sem ferrão	21
3.2 Alimento das larvas de abelha sem ferrão	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo geral	25
4.2 Objetivos específicos	25
Capítulo II - Efeito do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval de <i>Frieseomelitta varia</i> em <i>Drosophila melanogaster</i> modelo para Doença de Alzheimer	26
Resumo	27
Abstract	29
Introdução	30
Material e métodos	31
Resultados	37
Discussão	41
Conclusão	43
Referências.....	44

APRESENTAÇÃO

O aumento da expectativa de vida traz consigo um aumento na prevalência de doenças crônicas, tais como a demência, sendo a mais prevalente, a doença de Alzheimer (DA). Conhecida como uma patologia neurodegenerativa, a doença de Alzheimer (DA) está associada à idade e às manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas, que resultam em deficiência progressiva e incapacitante, sendo considerada a principal causa de demência em idosos. É responsável por 60-70% dos casos de demência diagnosticados, cujo aumento estimado é de 10 milhões de diagnósticos anuais.

A DA é caracterizada pela formação de placas senis pela via amiloidogênica e emaranhados neurofibrilares, causados pelo acúmulo de precipitados de peptídeo β -amiloide e de proteína Tau hiperfosforilada, respectivamente. Essas alterações causam neurotoxicidade, levam à perda de sinapses e morte seletiva de neurônios, que resulta em desgaste emocional e perda de qualidade de vida para o paciente e seus familiares.

A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca da fruta, é um organismo modelo para estudo de mecanismos moleculares de doenças neurodegenerativas. Por se tratar de um organismo de fácil manuseio e conservação, baixo custo e fácil cultivo em laboratório, o seu emprego para entendimento dos eventos envolvidos na doença de Alzheimer é uma ferramenta muito adequada. Nesse contexto, o presente estudo busca avaliar o potencial efeito neuroprotetor de secretomas bacterianos isolados do alimento de larva de abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* em linhagem transgênica de *D. melanogaster*, modelo para o estudo da DA.

No Capítulo I, descrevemos a Doença de Alzheimer e seu mecanismo de ação. No Capítulo II, descrevemos o uso de *D. melanogaster* como organismo modelo para avaliar os efeitos neuroprotetores de secretomas bacterianos obtido a partir do alimento de larva de abelha sem ferrão sobre a via amiloidogênica de desenvolvimento da Doença de Alzheimer.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

1. DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1 Epidemiologia e fisiopatologia

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa considerada a causa mais comum de demência, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma prioridade de saúde pública global. É um dos maiores desafios da neurociência moderna e do diagnóstico médico devido à vasta complexidade de progressão na forma latente do processo neuropatológico (RABBITO et al., 2020).

O envelhecimento populacional é consequência do desenvolvimento econômico e social e, nesse processo, há aumento da prevalência de demência, especialmente da doença de Alzheimer (DA) que progride de forma lenta e gradual, com morte celular, resultando em danos cerebrais. (RIZZI et al., 2014). Atualmente, é evidenciado o aumento do número de idosos, sobretudo pela diminuição da taxa de natalidade e aumento da expectativa de vida. Estimativas revelam que, em 2025, haverá no mundo 1,2 bilhões de idosos e, no Brasil, 32 milhões. Neste contexto, as doenças crônico-degenerativas configuram-se como um crescente desafio, visto sua elevada prevalência nessa parcela da população (SILVA, et al, 2020). Dentro de uma amostra de idosos com mais de 65 anos, um estudo demonstrou taxa de incidência de doenças degenerativas de 7,1%, sendo a DA causadora de 55% dos casos (CONITEC, 2017).

A DA foi descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer, médico alemão. Em estudo *post mortem*, de cérebro de sua primeira paciente afetada por esta doença, Alzheimer identificou dois dos principais achados histopatológicos de DA: as placas amiloides e os emaranhados neurofibrilares (HUNTING, 2015). A DA é considerada uma doença de desordem crônica, progressiva e irreversível que causa destruição de neurônios colinérgicos, se manifestando, principalmente, na perda de memória e cognição, com prejuízos no comportamento social. (SILVA et al., 2020).

O comprometimento da memória é o sintoma inicial mais comum da demência da DA. Em pacientes com a forma típica da doença, déficits em outros domínios cognitivos podem aparecer com ou após o desenvolvimento de comprometimento de memória (APA, 2013). Dificuldades na fala, distúrbios de atenção, incapacidade de fazer cálculos, perda das habilidades espaciais e da

capacidade de usar objetos podem ocorrer (LINDEBOOM et al., 2004). Esses sintomas são acompanhados por distúrbios de comportamento como, irritabilidade, agressividade, alucinações, hiperatividade (RASKIND, 1995). Sintomas depressivos estão presentes em cerca de 50% dos pacientes. É comum que as pessoas com DA apresentem apatia, lentidão da marcha ou discurso, dificuldade de concentração, perda de peso, insônia e agitação (EASTWOOD et al., 1996). Embora existam tratamentos disponíveis, que possam melhorar alguns sintomas, atualmente não há cura para a DA.

Dentre as características patológicas da doença, estão a presença de placas amiloides, ou placas senis (Figura 1) que consistem em agregados de peptídeos β -amiloides ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares (NFTs) com a presença de proteína Tau fosforilada.

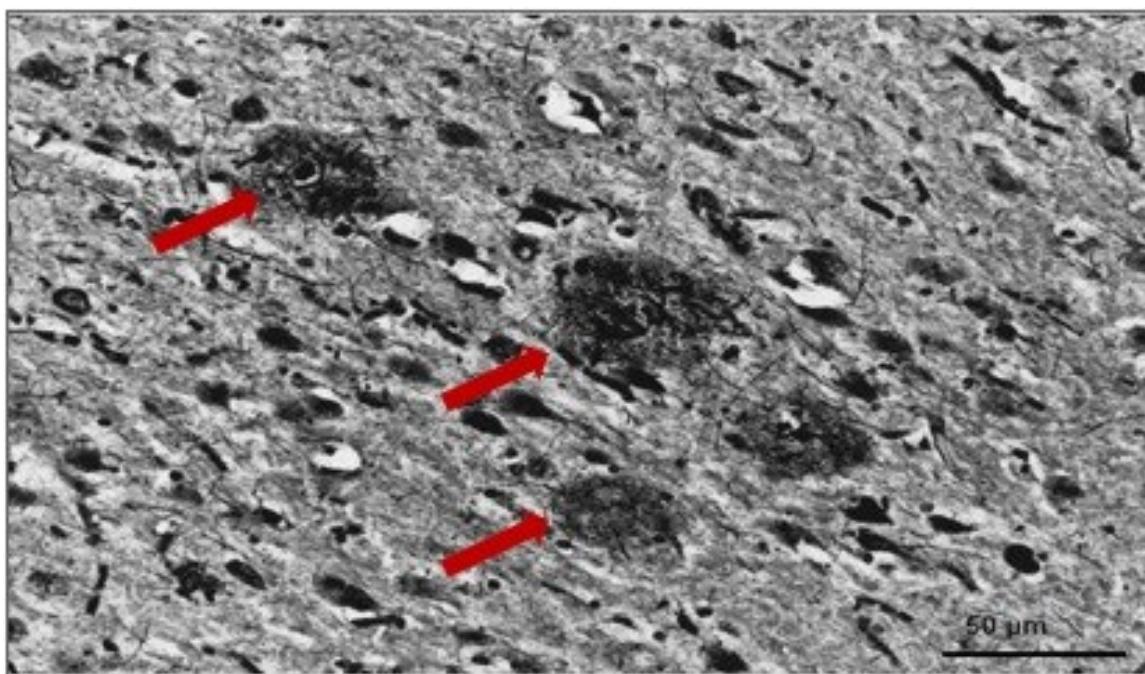


Figura 1. Corte histológico do cérebro de paciente com DA. Uma das características da histopatologia da DA é a aparecimento de lesões extracelulares conhecidas como placas senis ou amiloides, que são compostas pelo peptídeo $A\beta$. É possível observar (setas vermelhas) manchas mais escuras no centro da foto, que são as placas senis. Corte de 50 μm (segundo VALLET et al., 1992).

Os $A\beta$ s são produzidos a partir do processamento da proteína precursora de amiloide por ação sequencial das enzimas β -secretase e γ -secretase. As formas mais tóxicas de $A\beta$ são oligômeros solúveis e amiloides intermediários, que podem causar perda sináptica, neurotoxicidade, apoptose neuronal,

inflamação e disfunção mitocondrial (BOESE, HAMBLIN, & LEE, 2020; WANG, QIN & TANG, 2019). A hipótese da cascata amiloide sugere que o desequilíbrio entre a produção e eliminação de A β é o principal responsável por uma série de eventos que levam à DA e que a depuração de A β é defeituosa nas formas de início tardio e precoce da doença.

Além das placas A β , o cérebro de pacientes com DA também exibem emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos pela proteína Tau (Figura 2) hiperfosforilada, que está associada aos microtúbulos e promove o transporte das vesículas. Nos neurônios, os microtúbulos são essenciais para a manutenção da estrutura neuronal, transporte axonal e plasticidade neuronal. Dessa forma, a proteína Tau altamente fosforilada pode perder sua capacidade de estabilização e o desequilíbrio entre as formas hiperfosforiladas e desfosforiladas resulta na formação de NFTs. Não está completamente compreendido como o estado de fosforilação da Tau afeta sua função, mas é proposto que a hiperfosforilação da tau prejudica sua capacidade de se associar aos microtúbulos.

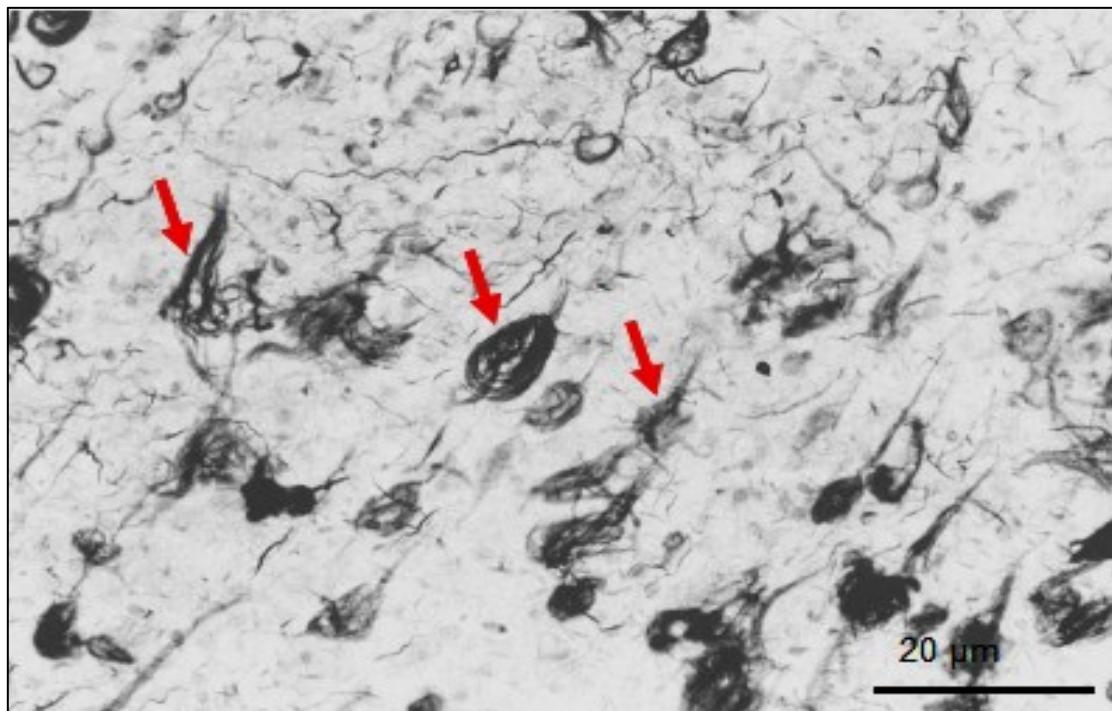


Figura 2. Corte histológico do cérebro de paciente com DA. A imagem mostra a degeneração dos neurônios causados pela fosforilação da proteína tau, levando à formação dos emaranhados neurofibrilares (setas vermelhas). Corte de 20 μ m (segundo VALLET et al., 1992). As setas mostram alguns emaranhados neurofibriliares.

Diversas hipóteses tentam explicar a origem da DA como, a Hipótese Inflamatória, Hipótese Tau, Hipótese Colinérgica. A Hipótese da Disfunção Glutamatérgica ou Excitotóxica, Hipótese Oligomérica, Hipótese Metálica e Hipótese da Diabetes Tipo 3 também já foram propostas. A Hipótese Amiloide é uma das mais difundidas na comunidade científica e considera o acúmulo excessivo de proteínas A β como lesão primordial para o desenvolvimento da DA.

1.2 Hipótese amiloide

A literatura científica indica que a DA está relacionada ao acúmulo no cérebro de placas formadas pela proteína β -amiloide. Sua aglutinação entre os neurônios impede a transmissão de sinais, prejudicando a atividade neural (CHAKRABORTY et al., 2011).

A hipótese da cascata amiloide, estudada neste trabalho, postula que o peptídeo β -amiloide oriundo da clivagem amiloidogênica da Proteína Precursora de Amiloide (APP) apresenta toxicidade e pode levar à formação das placas senis, resultando em morte celular dos neurônios.

Embora a causa fundamental da DA permaneça desconhecida, a hipótese da cascata amiloide é atualmente, o quadro conceitual mais bem definido e mais bem descrito (HARDY et al., 1992; HAASS et al., 2012; FERREIRA et al., 2011). O peptídeo beta-amiloide (A β), de 36 a 43 aminoácidos de comprimento, é um produto do processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP), uma proteína transmembrana do tipo I (SELKOE et al., 2002).

As secretases são enzimas responsáveis pelo processo proteolítico normal da APP, resultando em fragmentos da β -amiloide. As secretases podem ser classificadas de acordo com seu sítio de proteólise, sendo α -, β - e γ -secretases. As α -secretases clivam o peptídeo β -amiloide em fragmentos extracelulares solúveis, que são fagocitados pelas microglias e eliminados, portanto, a quebra da APP pela α -secretase inibe a formação dos depósitos de β -amiloide. Quando a APP é clivada pelas β - e γ -secretases são formados os peptídeos de 40 ou 42 aminoácidos, que são insolúveis e formarão as conhecidas placas senis (Figura 3) (FRIDMAN et al., 2004; VIEGAS et al., 2011).

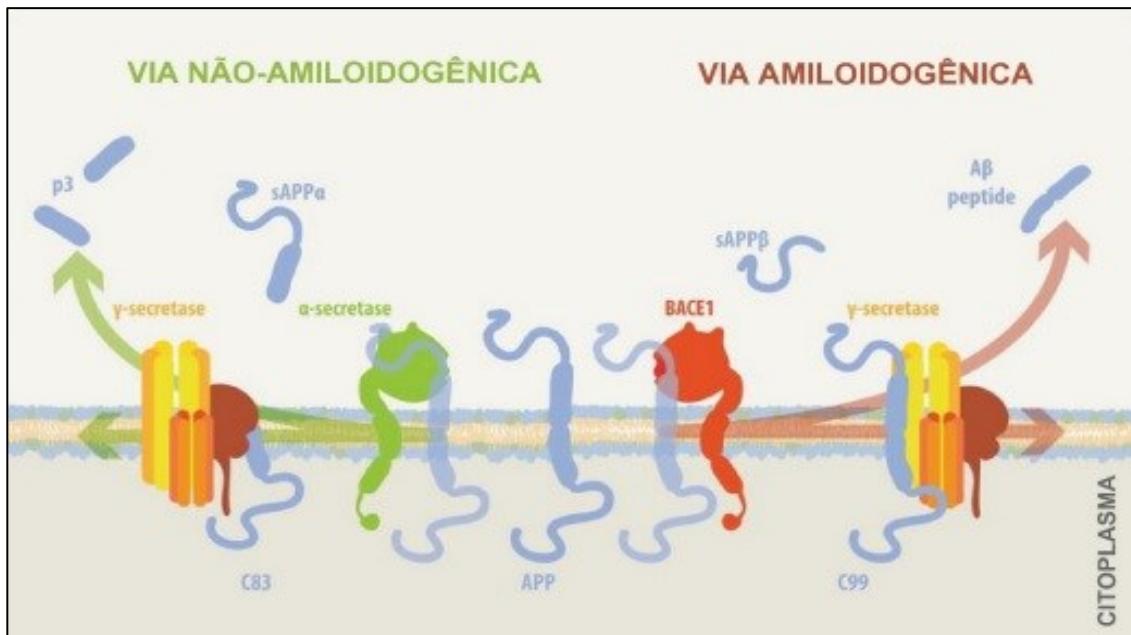


Figura 3. Mecanismo de formação e agregação do peptídeo β -amiloide. Esquematizado do lado esquerdo a via não amiloidogênica e do lado direito a via amiloidogênica. A APP é uma proteína transmembranar que pode ser clivada em ambas vias. Na via não amiloidogênica, representada de verde, há o processamento da APP primeiramente pela α -secretase liberando um fragmento solúvel indicado na ilustração como sAPP α e posteriormente pela γ -secretase liberando o peptídeo P3 e remanescendo um fragmento C-terminal C83. Já na via amiloidogênica o processamento ocorre por meio da clivagem pelas enzimas β -secretase e posteriormente pela γ -secretase, liberando ao final, no meio extracelular o peptídeo β -amiloide (Adaptado de ZOLEZZI e INESTROSA et al., 2017).

A clivagem de APP pela enzima α -secretase gera um terminal C que sofre clivagem pela γ -secretase, via não amiloidogênica, e resulta na produção de um fragmento APP mais curto, impedindo assim a formação de A β (CHOW et al., 2010).

A clivagem da APP pela enzima β -secretase (BACE-1) gera um fragmento do C terminal (β -CTF) que é um substrato imediato para a enzima γ -secretase que cliva o β -CTF para produzir um espectro de peptídeos A β com diferentes comprimentos, via amiloidogênica (HARDY et al., 2002). A principal forma de A β é de 40 aminoácidos (A β 1-40) mas a forma menos abundante, de 42 aminoácidos (A β 1-42) é a mais amiloidogênica (HAASS et al., 2012).

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, um desequilíbrio entre a produção e a depuração do peptídeo A β é um processo chave na complexa

cascata patológica da DA (HARDY et al., 1992; KURZ et al., 2011). Não surpreende, assim, que o A β tenha se tornado um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de fármacos para a DA (SCHNEIDER et al., 2014). De fato, esta hipótese proporcionou um quadro coerente para a compreensão da patogênese da DA e abordagens farmacológicas que visavam o peptídeo amiloide estavam cientificamente fundamentadas.

Há dificuldades de várias ordens para o estudo da DA em humanos. Como alternativa, podem ser utilizados organismos modelo já validados como, camundongos (FERRETTI et al., 2011; SARASA; PESINI et al., 2009), ratos (COHEN et al., 2013), *C. elegans* (WU; LUO et al., 2005), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) (MOLONEY et al., 2009) e outros, na busca de moléculas biologicamente ativas que possam contribuir com a prevenção/tratamento da DA.

2. *Drosophila melanogaster*

2.1 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um inseto holometábolo, de porte pequeno (LYNCH et al., 2012). Produz grande número de descendentes em um único cruzamento e sua manutenção é fácil e de baixo custo (GRAF et al., 1996; JENNINGS, 2011). Possui ampla variedade de mutantes, alguns facilmente visualizados. *D. melanogaster* é considerado um organismo experimental que oferece inúmeras vantagens na investigação de mecanismos moleculares e celulares adjacentes às doenças humanas devido a seu rápido ciclo de vida, grande quantidade de informações sobre seu genoma, fácil manipulação laboratorial, pouca exigência nutritiva e baixo custo de manutenção. (JEIBMANN et al., 2009). Portanto, o genoma da *D. melanogaster* está completamente sequenciado (ADAMS et al., 2000), o que permite o desenvolvimento de modelos transgênicos de doenças humanas, com genes candidatos expressos em regiões específicas (HALES et al., 2015), favorecendo o emprego desse organismo modelo em testes sobre os efeitos de biomoléculas em doenças humanas.

O ciclo de vida (Figura 4) e o seu desenvolvimento embrionário, após fertilização e formação do zigoto, ocorre dentro da membrana do ovo, que eclode

em larva. Em temperatura de 25°C, o ciclo de vida deste inseto se completa em período de 10-12 dias, quando a pupa eclode em adulto (PARVATHI et al., 2009). O período larval se divide em três estágios (*instars*). No terceiro e último estágio (3º *instar* – L3) a larva pode alcançar o comprimento de 4,5 milímetros, desenvolvendo-se para o próximo estágio, de pupa. Possui quatro pares de cromossomos ($2n = 8$) sendo três pares autossônicos e um par de cromossomos sexuais.

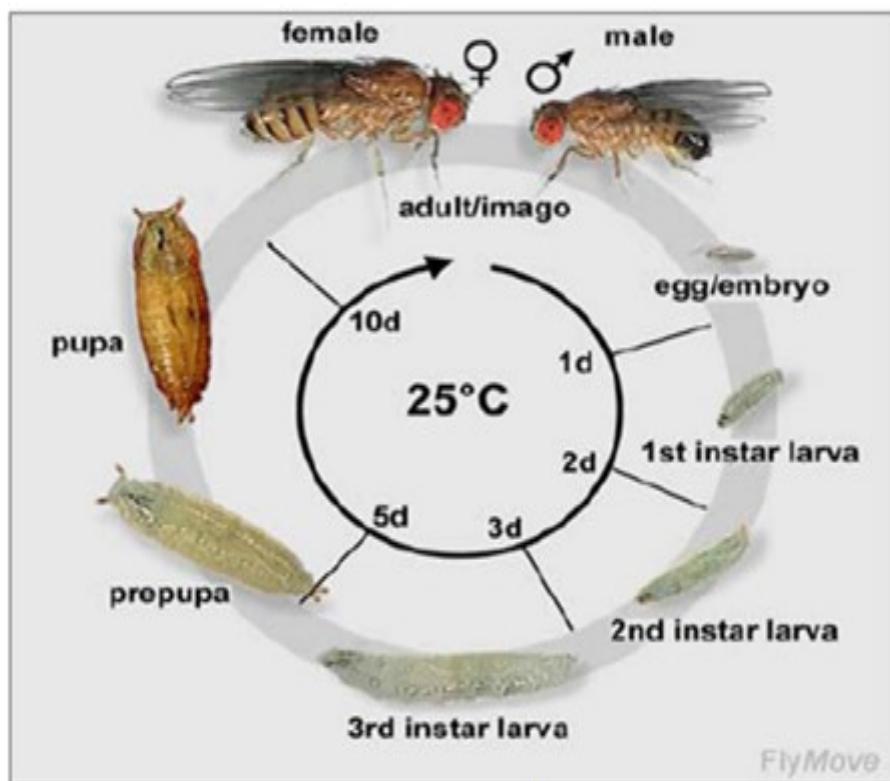


Figura 4. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Após o cruzamento entre moscas adultas, ocorre a postura dos ovos no meio, que a 25°C levam cerca de 10-12 dias até a eclosão dos indivíduos adultos. Durante esse processo ocorrem três estágios de larva, com duração média de 5-6 dias à 25°C e a fase de pupa do 7º dia até o 9º, seguido do processo de eclosão. Fonte: <http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>.

Linhagens transgênicas de *D. melanogaster* são ferramentas nos estudos relacionados à diferentes doenças, incluindo a Doença de Alzheimer (DA). Essas linhagens são obtidas em centros de estoque, como o Centro de Estoque

Bloomington da Universidade de Indiana, Estados Unidos, de onde são provenientes as linhagens utilizadas nessa investigação.

Aproximadamente 75% dos genes relacionados à DA em humanos possuem ortólogos funcionais em *D. melanogaster*. A homologia de sequência desses genes com a de humanos é de cerca de 40%, sendo de 80% – 90% em domínios funcionais conservados (REITER et al., 2001).

A semelhança dos aspectos da biologia celular entre *Drosophila* e humanos varia da expressão gênica à sinaptogênese, conectividade neural, sinalização e morte celular (SANG & JACKSON et al., 2005). *D. melanogaster* apresenta um sistema nervoso complexo, com capacidade de desenvolver comportamentos como aprendizagem e memória, o que é atraente para estudos de disfunções neuronais e doenças neurodegenerativas (CHAN & BONINI, et al., 2000).

Atualmente, existem testes validados para avaliar a neurodegeneração em *Drosophila*, como a avaliação da vacuolização do cérebro, através de coloração histológica e medidas de desempenho locomotor, pelo teste de escalada (MCGURK et al., 2015; GEVEDON et al., 2019). Assim, a análise e quantificação desses parâmetros, tanto de expressão gênica, quanto de comportamento, tornam a mosca um organismo modelo ideal para o estudo de aspectos específicos da DA (LE BOURG E BUECHER et al., 2002; SEUGNET et al., 2009; PRÜSSING et al., 2013).

2.2 Sistema GAL4/UAS: utilização em *Drosophila melanogaster*

O sistema binário de expressão Gal4/UAS é um ativador de transcrição de leveduras. Utilizando esse sistema, genes humanos podem ser expressos no cérebro da *D. melanogaster* de forma precisa (JACKSON et al., 2008; JENETT et al., 2012). UAS e Gal4 não existem naturalmente em *D. melanogaster* (DUFFY et al., 2002). A ativação desse sistema acontece pelo cruzamento entre linhagens da mosca expressando Gal4 (designados como *driver*) com linhagens contendo o elemento UAS (designados como *responder*).

As linhagens *driver* são construídas para o direcionamento da expressão de um gene de interesse a um tecido específico. As linhagens GMR-GAL4 e elav-GAL4 possuem a expressão de GAL4 controlada por promotores gênicos

como o repórter múltiplo ocular (*Glass multiple reporter*) para o olho (LI et al., 2012) e elav, para o cérebro.

Nas linhagens *responder*, a transcrição do gene alvo está sob o comando de uma sequência de ativação antecedente (UAS) dependente de GAL4 (COOK et al., 2010) como a linhagem UAS-BACE1, APP, para os genes ligados à Doença de Alzheimer.

A progênie resultante do cruzamento entre linhagem *driver* e *responder* (Figura 5) expressará o gene de interesse ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por Gal4 (DUFFY et al., 2002; ELLIOTT e BRAND et al., 2008). Os genes de interesse podem ser repórter, diferentes isoformas ou genes de outras espécies e RNAs de interferência. O sistema Gal4/UAS permite análise temporal e espacial da expressão gênica (ELLIOTT e BRAND, 2008).

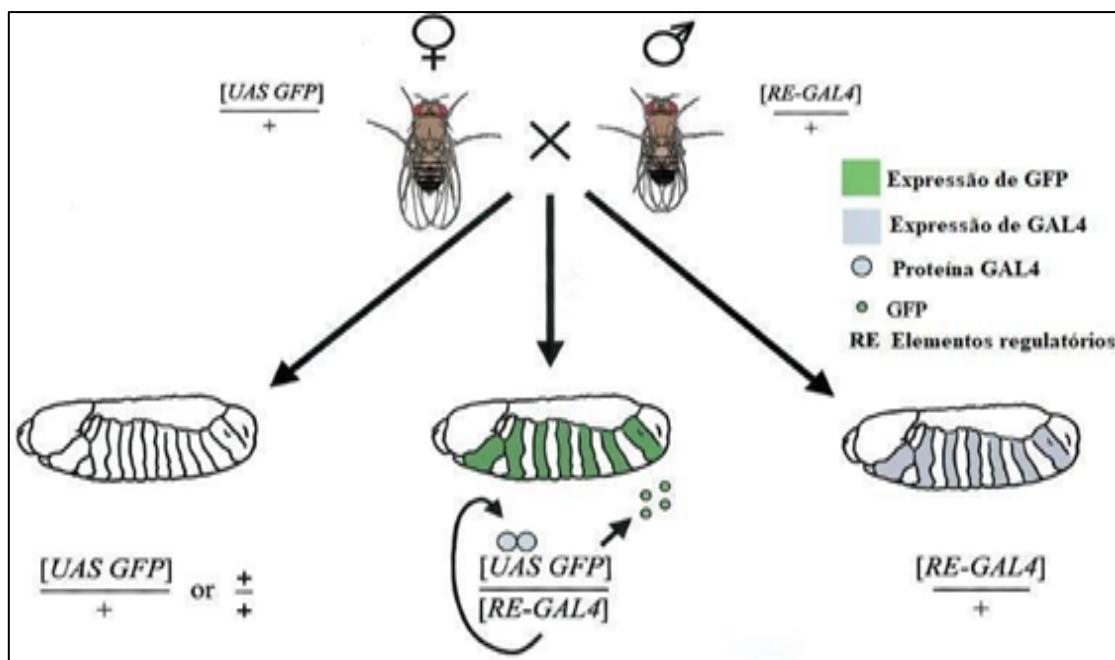


Figura 5. Sistema GAL4/UAS em *Drosophila melanogaster*. Fêmeas portando o *responder* (UAS-GFP) cruzadas com machos expressando o *driver* GAL4 (RE-GAL4) resulta em progênie contendo ambos os elementos do sistema. A presença de GAL4 em segmentos embrionários alternados dirige a expressão do *responder* (UAS-GFP) para esses locais. 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. Fonte: (DUFFY et al., 2002).

É possível expressar proteínas específicas da DA, como a proteína precursora de amiloide (APP) e a enzima β -secretase direcionadas para o cérebro da *D. melanogaster* e mimetizar a via amiloidogênica da doença e sua resposta a tratamentos (CHAKRABORTY et al., 2011). Um exemplo é o modelo utilizado em nosso experimento, gerado pelo cruzamento entre a linhagem *driver* elav-Gal4 (direcionando a expressão de GAL4 para o cérebro da mosca) e a linhagem *responder* UAS-BACE, UAS-APP expressando β -secretase e APP humanas.

3. ABELHAS SEM FERRÃO

3.1 Abelhas sem Ferrão

As abelhas sem ferrão, em função de seu mecanismo peculiar de diferenciação das larvas em Rainhas ou Operárias, que envolve interação genótipo (genes) e ambiente (alimento) indicando controle epigenético. São organismos já empregados em análises de genética, epigenética, morfologia, fisiologia, citogenética, comportamento, entre outros. Nessa investigação, estão fornecendo o alimento das larvas para pesquisa de alvos biotecnológicos de importância farmacológica para utilização para fins terapêuticos em Doença de Alzheimer.

As abelhas sem ferrão, abelhas indígenas ou abelhas tropicais fazem parte de um grupo composto por mais de 500 espécies (ROUBIK et al., 2018). No Brasil, de acordo com dados de Villas-Boas (2012), são encontradas cerca de 350 espécies. São abelhas que não possuem glândulas de veneno e tem ferrão atrofiado (não funcional) daí o nome “abelhas sem ferrão”.

São abelhas sociais e vivem em colônias permanentes formadas pelas fêmeas (rainha e operárias) e machos. A rainha é a fêmea responsável pela postura dos ovos que darão origem às crias. As operárias são fêmeas que não tem aparelho reprodutor externo desenvolvido, não tem capacidade de copular e são responsáveis pela manutenção da colônia com produção e modelagem de cera, coleta de néctar, pólen, água, barro, resina, restos vegetais e sementes. aprovisionamento das células de cria, limpeza da colmeia. Os machos fecundam a rainha e conseguem permanecer na colmeia apenas no primeiro terço de vida.

Podem, em algumas espécies, produzir e manipular cera, além de coletar néctar (KERR et al., 1996; CARVALHO et al., 2017).

As abelhas sem ferrão constroem favos horizontais, ocasionalmente em espiral, ligados por pilastras de cera. Constroem células de cria para postura dos ovos e, separadamente, potes de cera ovalados, para armazenamento de pólen e mel (Figura 6).

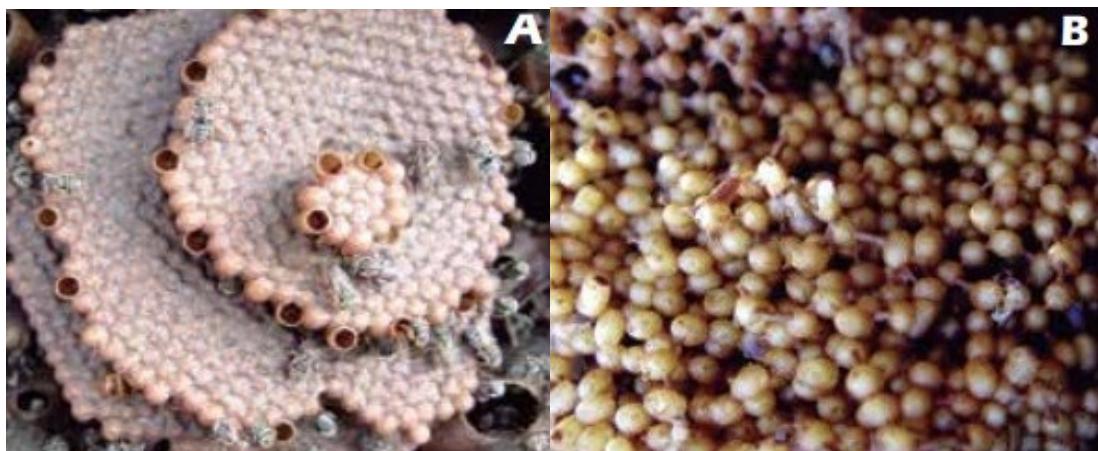


Figura 6. Células de cria de abelhas sem ferrão nativas brasileiras. As células de crias em colmeia de abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia* são construídas com cerume e normalmente organizadas em discos dispostos na horizontal (A) ou em cachos (B) localizados no centro do ninho. A quantidade de cria depende da espécie e da disponibilidade de alimento.

Fonte:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166288/1/CriacaoAbelhasSemFerrao.pdf>>.

A relevância ecológica e econômica das abelhas sem ferrão é inegável por serem polinizadores naturais de plantas nativas de diferentes biomas (FELIPE NETO, et al., 2015). Dependendo do ecossistema, podem ser responsáveis por 40 a 90% da polinização de plantas nativas e cultivadas, garantindo a preservação da biodiversidade (KERR et al., 1996). A maioria das espécies ainda produz mel, cera, própolis mostrando sua importância para economia e saúde.

A microbiota associada aos ninhos de abelhas sem ferrão inclui vírus, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (De PAULA et al., 2020). Bactérias e leveduras são metabolicamente ativas nas colmeias e suas características fisiológicas, incluindo a produção de enzimas, fermentação de açúcar e

produção de ácido orgânico, são fundamentais na transformação do pólen e do néctar, proporcionando mudanças bioquímicas que agregam benefícios nutricionais para as larvas e abelhas adultas (SOUZA et al., 2021).

Os produtos fornecidos pelas abelhas possuem alto potencial energético, são utilizados para fins alimentícios, além de possuírem conhecidas propriedades medicinais, estando inseridos, há séculos, na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (FÉAS et al., 2012).

No contexto dessa investigação, utilizamos o alimento da larva das abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia* (Figura 7) como fonte de moléculas com potencial bioativo para prevenir/tratar a DA.



Figura 7. Abelha sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*. Fonte: <https://pensecomida.com.br/mel-de-abelha-nativa-da-amaz%C3%A3nia-faz-sucesso-no-mercado-livre-c97b1a509f4a>.

A espécie *Frieseomelitta varia* apresenta vasta distribuição geográfica, cobrindo os estados brasileiros da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Tocantins, Mato Grosso e alcançando a região central da Bolívia (GONÇALVES, et al., 2010).

3.2 Alimento das larvas de abelhas sem ferrão

O alimento larval das abelhas sem ferrão é composto por uma mistura de secreção glandular, mel e pólen, o qual é colocada dentro das células de cria (Figura 8) para servir de alimento para as larvas que eclodem de ovos que foram depositados pela rainha sobre esse alimento. O pólen e o néctar coletados fornecem carboidratos e proteínas para a dieta das abelhas adultas e alimentam as larvas (MICHENER et al., 1974; ROUBIK et al., 1989).

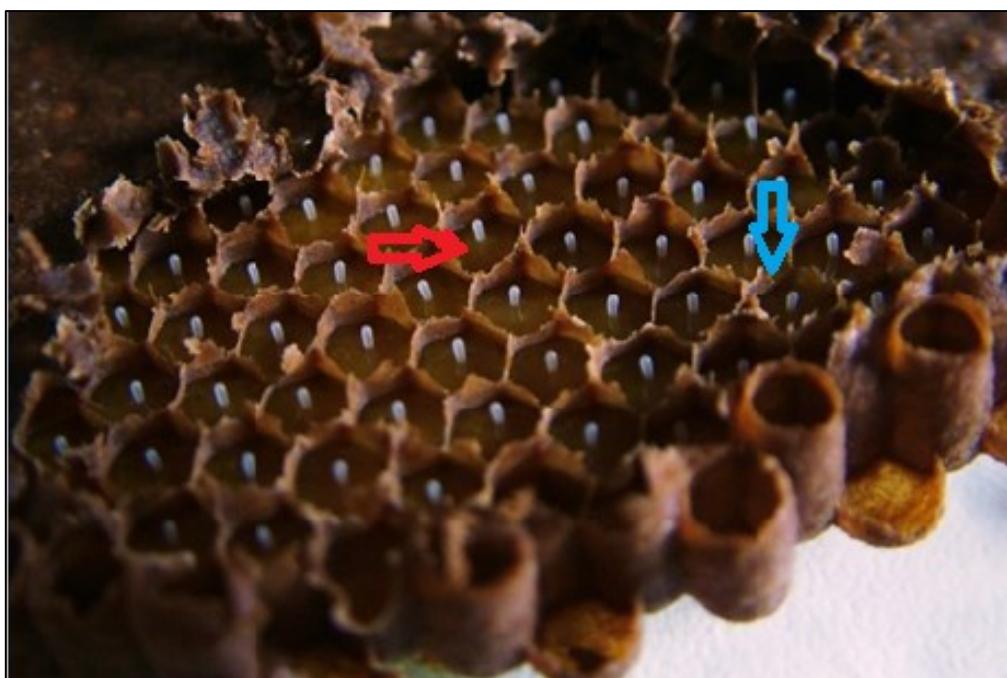


Figura 8. Favo de abelha sem ferrão. Célula de cria (seta vermelha) contendo alimento larval e o ovo (seta azul) posto pela rainha. Fonte: (MENEZES, et al. 2015)

O pólen é fermentado pela secreção glandular das abelhas, que é uma fonte de microrganismos presentes no intestino das abelhas. Após deposição do alimento na célula de cria e oviposição pela rainha, a célula é vedada com cera pelas operárias, não havendo mais contato com o ambiente externo. O ambiente escuro, quente e a umidade dentro da célula de cria contribui para o crescimento de microrganismos (KERR et al., 1996).

O foco do estudo foi avaliar o efeito do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* em linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster*, modelo para estudo de Doença de Alzheimer.

4- OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos neuroprotetores de secretomas de bactérias isoladas do alimento da larva da abelha sem ferrão da espécie *Friesiomyelitta varia*, em *Drosophila melanogaster* modelo para a doença de Alzheimer.

4.2 Objetivos Específicos:

Em moscas submetidas ao tratamento com diferentes secretomas de bactérias isoladas do alimento de larvas da abelha *F. varia* e respectivos Controles:

- Avaliar, por meio do teste de comportamento RING (Teste Interativo Rápido de Geotaxia Negativa), a taxa de escalada de moscas da linhagem transgênica elav-GAL4; UAS-BACE1, UAS-APP;
- Quantificar os níveis de β -amiloide dos cérebros de moscas da linhagem transgênica elav-GAL4; UAS-BACE1, UAS-APP;
- Realizar análise histológica do cérebro de moscas da linhagem transgênica elav-GAL4; UAS-BACE1, UAS-APP.

Capítulo II

**EFEITO DO SECRETOMA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ALIMENTO
LARVAL DE *Frieseomelitta varia* EM *Drosophila melanogaster* MODELO
PARA DOENÇA DE ALZHEIMER**

RESUMO

O aumento da expectativa de vida traz consigo um aumento na prevalência de doenças crônicas, entre elas a demência. Dentre os tipos de demência, a mais comum, responsável por mais óbitos em países desenvolvidos e a mais prevalente no Brasil é a doença de Alzheimer (DA). Conhecida como uma patologia neurodegenerativa, a DA está associada à idade e às manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas, que resultam em deficiência progressiva e incapacitante. É responsável por 60-70% dos casos de demência diagnosticados em idosos e o aumento estimado é de 10 milhões de diagnósticos por ano. O aumento da expectativa de vida da população mundial associa-se ao aumento do número de casos da doença. A consequência social disso é o desgaste emocional e perda de qualidade de vida do paciente e de seus familiares. A hipótese da cascata amiloide sugere que o desequilíbrio entre a produção e eliminação de beta amiloide (A β) é o principal responsável por uma série de eventos que levam à Doença de Alzheimer e que a depuração de A β é defeituosa nas formas de início tardio e precoce da doença. A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca da fruta, por ser de fácil manuseio e conservação, baixo custo e fácil cultivo em laboratório tem sido um organismo muito adequado para entendimento dos eventos envolvidos na DA. O presente estudo investigou o efeito neuroprotetor e a atividade inibitória do secretoma de bactérias isoladas do alimento larval de abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* em uma linhagem transgênica de *D. melanogaster*, modelo para o estudo da DA. Moscas modelo DA de *D. melanogaster* foram tratadas com vários secretomas bacterianos por 10 e 15 dias após a eclosão. As moscas tratadas com o secretoma S27 e S40 apresentaram melhora na taxa de escalada e a análise histológica do cérebro apresentou um potencial ação da diminuição da neurodegeneração quando comparadas aos grupos controle negativo e veículo. Portanto, o secretoma bacteriano dos alimentos larvais de abelhas sem ferrão se mostraram uma fonte potencial de moléculas terapêuticas visando distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer. O presente trabalho mostrou o potencial dos secretomas bacterianos para busca de moléculas bioativas capazes de reduzir o processo de neurodegeneração nas moscas modelo de DA. No entanto, são necessários mais estudos para uma correlação definitiva.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas, *Friesomelitta varia*, *Drosophila melanogaster*, moléculas bioativas, alimento de larvas, beta amiloide, mosca da fruta.

ABSTRACT

The increase in life expectancy brings with it an increase in the prevalence of chronic diseases, including dementia. Among the types of dementia, the most common, responsible for more deaths in developed countries and the most prevalent in Brazil is Alzheimer's disease (AD). Known as a neurodegenerative pathology, AD is associated with age and cognitive and neuropsychiatric manifestations, which result in progressive and disabling disability. It accounts for 60-70% of cases of dementia diagnosed in the elderly and the estimated increase is 10 million diagnoses per year. The increase in life expectancy of the world's population is associated with an increase in the number of cases of the disease. The social consequence of this is emotional exhaustion and loss of quality of life for patients and their families. The amyloid cascade hypothesis suggests that the imbalance between the production and elimination of amyloid beta (A β) is primarily responsible for a series of events that lead to Alzheimer's Disease and that A β clearance is defective in both late-onset and early-onset forms. of the disease. *Drosophila melanogaster*, popularly known as the fruit fly, for being easy to handle and conserve, low cost and easy to grow in the laboratory, has been a very suitable organism for understanding the events involved in AD. The present study investigated the neuroprotective effect and the inhibitory activity of the secretome of bacteria isolated from the larval food of stingless bee *Frieseomelitta varia* in a transgenic strain of *D. melanogaster*, a model for the study of AD. DA model flies of *D. melanogaster* were treated with various bacterial secretomes for 10 and 15 days after hatching. Flies treated with the S27 and S40 secretome showed improvement in the rate of climbing and the histological analysis of the brain showed a potential action of decreasing neurodegeneration when compared to the negative control and vehicle groups. Therefore, bacterial secretome from larval food of stingless bees has been shown to be a potential source of therapeutic molecules targeting neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. The present work showed the potential of bacterial secretomes to search for bioactive molecules capable of reducing the neurodegeneration process in AD model flies. However, further studies are needed for a definitive correlation.

Keywords: Neurodegenerative diseases, *Frieseomelitta varia*, *Drosophila melanogaster*, bioactive molecules, larval food, amyloid beta, fruit fly.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo e é a forma mais comum de demência que ocorre em mais de 35% dos indivíduos com 85 anos ou mais. As marcas clínicas da DA são perda de memória lenta e prejuízo nas habilidades cognitivas. Patologicamente, a DA é caracterizada por emaranhados neurofibrilares nos neurônios do córtex cerebral e hipocampo. Outros fatores patológicos, incluindo inflamação, interrupção da homeostase iônica, estresse oxidativo e diminuição dos níveis de neurotransmissores também foram identificados e são considerados eventos sequenciais de agregação de A β . (SU et al., 2000; GREEN et al., 2008; HARDY et al., 1991).

Nesta via, a proteína precursora de amiloide (APP) é clivada pela enzima β -secretase, gerando peptídeos A β de 40 e 42 aminoácidos (LANE, et al. 2018), que oligomerizam e fibrilam, formando placas senis, que levam à degeneração da sinapse (HARDY et al. 2002). Esses fatores contribuirão para a disfunção sináptica e patogênese da DA.

O diagnóstico preciso da DA, em humanos, só pode ser feito após a morte, com análise de tecido cerebral. (WILSON et al., 2013). A mosca *Drosophila melanogaster* apresenta sistema nervoso central semelhante, porém mais simples, quando comparado aos mamíferos, o que viabiliza seu emprego na investigação de doenças neurodegenerativas (TUE et al., 2020; LENZ et al., 2013). A utilização de *D. melanogaster* reduz significativamente os custos para estudos que visam o entendimento de mecanismos moleculares e fisiológicos aplicáveis aos mamíferos (LLOYD, TAYLOR et al., 2010; REITER et al., 2001).

O conhecimento das propriedades do mel, própolis e pólen fermentado obtidos de abelhas sem ferrão são importantes para a indústria farmacêutica como fonte de produtos naturais. Os microrganismos geralmente são vistos como agentes patogênicos, principalmente os fungos e as bactérias. Entretanto, eles também são úteis na produção de substâncias químicas, como antibióticos, antitumorais, imunossupressores, antioxidantes, antiinflamatórios, analgésicos, sedativos, expectorantes e efeitos hipossensibilizantes (ALMARAZ et al., 2007; WIESE et al., 1986). Os produtos naturais gerados por esses microrganismos estão sendo investigados para atender à crescente necessidade por novos

medicamentos (CONTI et al., 2012). Uma vez que o alimento larval é uma mistura de pólen, mel e secreção mandibular, é possível que vários microrganismos estejam presentes secretando moléculas biologicamente ativas que podem ser benéficas para a saúde humana.

Abordagens alternativas para tratamento da DA tornam-se relevantes como forma de minimizar os seus sintomas. Essas investigações visam elucidar os mecanismos de ação da DA, bem como buscar novas biomoléculas que apresentem ação terapêutica para esses pacientes. A falta de sucesso, até o momento, em desenvolver terapias efetivas para a DA e o aumento dos custos com o tratamento de demência, incentiva a busca de novos compostos que possam ser usados como tratamento (WINBLAD et al., 2016).

Nesse estudo investigamos o potencial neuroprotetor de secretomas bacterianos isolados do alimento larval da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* em uma linhagem transgênica de *D. melanogaster*, modelo para o estudo da DA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Foram testados quatro secretomas bacterianos (S17, S24, S27 e S40) obtidos de bactérias da Coleção de microrganismos isolados de abelhas sem ferrão do LABGEN UFU (ComisBee) do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia.

Todos os secretomas analisados neste estudo foram obtidos de bactérias isoladas da colmeia de abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia*, localizada em Meliponário urbano no Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Para as investigações conduzidas nesse estudo, *Drosophila melanogaster* foi utilizada como organismo modelo.

2.2 Organismo modelo *Drosophila melanogaster*

As linhagens em estudo foram mantidas em estoque no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia (LABGEN-UFU) em frascos contendo ¼ de meio de cultivo padrão *Bloomington* (farinha de soja em pó 0,01%, xarope de glicose 7,2%, ágar-ágard 0,6%, fubá de milho 0,073%, fermento

biológico 0,018%, solução nipagin 0,06% e solução ácida 0,05%) em incubadora BOD (SOLAB) a 25°C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 horas.

As linhagens utilizadas nesse estudo foram adquiridas do Centro de Estoque *Bloomington*, da Universidade de Indiana, Estados Unidos, e estão listadas abaixo:

- P{GawB}elavC155,P{UAS-mCD8::GFP.L}LL4,P{hsFLP}1,w* (denominado elav-GAL4; número de estoque BL#5146);
- P(UAS-BACE,UAS-APP1) (nomeado como UAS-BACE1, UAS-APP; BL#29877) e,
- w1118 (BL#3605), linhagem mutante e *background* para construção de transgênicos.

2.3 Obtenção de moscas modelo para Doença de Alzheimer

Para obtenção das moscas modelo para DA, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 e machos da linhagem UAS-BACE, UAS-APP. As linhagens parentais foram previamente expandidas em frascos de vidro contendo meio de cultivo padrão *Bloomington*.

Os cruzamentos para expansão de cada linhagem foram mantidos por 10 dias. No 7º dia, os adultos da linhagem elav-GAL4 foram coletados para seleção de fêmeas virgens que, posteriormente, foram cruzadas com machos da linhagem UAS-BACE, UAS-APP.

Após o cruzamento, aguardou-se o estágio de pupa da geração F1. Apenas 50% destes descendentes possuíam o genótipo de interesse (AD-like), sendo selecionados através do formato alongado das pupas. Os demais indivíduos foram descartados ainda na fase de pupa, apresentando o fenótipo achatado e volumoso devido à presença do cromossomo balanceador TM6,tb sendo tb o gene dominante que confere fenótipo *Tubby*. As pupas restantes, podem ter genótipo w*, elav-GAL4; UAS-BACE, UAS-APP / + (fêmeas) ou Y/elav-Gal4 ; UAS-BACE, UAS-APP/+ (machos) originando moscas adultas do tipo AD que foram submetidas aos tratamentos e analisadas.

2.4 Produção do secretoma bacteriano

Quatro bactérias isoladas do alimento de larvas de *Friesomelitta varia* foram obtidas da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas sem Ferrão do Laboratório de Genética (ComisBee) da Universidade Federal de Uberlândia. Os sobrenadantes produzidos por essas bactérias foram descritos neste trabalho como sobrenadantes S17, S24, S27 e S40.

Para obter o sobrenadante de cada bactéria isolada do alimento larval, 50 mL de meio Luria Bertani (LB) foi preparado e autoclavado, seguido da inoculação de 200 µL de bactérias. O meio foi incubado em incubadora bacteriológica rotativa a 30°C por 48 horas sob agitação de 200 rpm. O meio foi transferido para um tubo estéril de 15 mL e centrifugado a 10000 xg por 4 minutos. O sobrenadante foi recuperado para um novo tubo de 15 mL e centrifugado novamente sob as mesmas condições. Os sobrenadantes foram então recuperados e armazenados em freezer a -80°C até sua utilização no tratamento de moscas.

2.5 Grupos experimentais

Para a realização desse estudo, foram selecionadas quatro bactérias da Coleção de Microrganismos Isolados do Alimento Larval de Abelhas Sem Ferrão (ComisBee). As colônias dessas bactérias foram representadas numericamente. A Tabela 1 contém características dessas bactérias, a saber: representação numérica, meio de cultivo utilizado em seu isolamento e coloração de gram. O secretoma dessas bactérias foi coletado e utilizado na suplementação do alimento de moscas transgênicas da linhagem elav-Gal4; UAS-BACE, UAS-APP, modelo-DA.

Tabela 1. - Características das bactérias isoladas do alimento larval de *F. varia*.

Alimento larval de abelha <i>Frieseomelitta varia</i>		
Bactéria	Meio de cultivo	Coloração de Gram
17	NUT	Gram positiva
24	MRS	Gram negativa
27	MYP	Gram positiva
40	MRS	Gram negativa

Características das bactérias do ComisBee utilizadas para busca de moléculas bioativas anti-Alzheimer.

Selecionadas as bactérias, quatro secretomas bacterianos, S17, S24, S27 e S40, isolados de alimento larval de abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia* foram testados em moscas transgênicas elav-GAL4 ; UAS-BACE1, UAS-APP de *D. melanogaster*. Comportamento e morfologia/alterações estruturais no cérebro de moscas adultas após suplementação com os secretomas (sem diluições) foram avaliados. O grupo não-tratado (NT) teve o meio preparado com água. Para controle negativo (CN), ou seja, moscas sem DA, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens da linhagem elav-Gal4 com machos da linhagem w¹¹¹⁸ descrito como controle positivo (CP).

2.6 Teste de Escalada

O teste de escalada (RING - Rapid Iterative Negative Geotaxis), foi realizado conforme descrito por Gargano et al. (2005), com modificações. Esse teste avalia o padrão de comportamento das moscas que escalam, contra a gravidade, após um estímulo mecânico suficiente para levá-las ao fundo do tubo. O teste RING indica se há redução da capacidade locomotora atividade associada à idade ou fatores como neurodegeneração.

Para o teste, tubos transparentes de 9,5 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro foram colocados em um aparato tipo rack com capacidade para 12 tubos. Para cada replicata, foram transferidas cerca de 20 moscas de cada grupo de tratamento/controle aos tubos e, após serem posicionados no rack, foram mantidos por 30 minutos em repouso em local silencioso. Durante essa ambientação das moscas, uma câmera fotográfica foi posicionada a 40 cm de distância de uma fonte de luz (lâmpada fluorescente, cor branca - especificações:

18W, 220V, 6500K e 430 122mA). Nenhum anestésico foi usado para transferir as moscas para os tubos. Apenas machos elav-GAL4 ; UAS-BACE1, UAS-APP foram analisadas neste teste.

O aparato foi apoiado com as duas mãos e batido por 3 vezes sobre uma superfície plana para que todas as moscas sejam deslocadas para o fundo dos tubos. Após a última batida, o aparato foi colocado em superfície plana e iniciada a filmagem por um intervalo de 20 (vinte) segundos.

Após a primeira filmagem, os procedimentos de ambientação, batidas e filmagem foram repetidos 6 vezes, com intervalo de 1 minuto entre as repetições. Todos os procedimentos foram filmados com câmera de 13 megapixels e as análises do testes RING foram realizados no programa Quicktime®, com padronização de 4 segundos correspondendo a 120 quadros de leitura de vídeo. A contagem dos frames iniciou-se no momento em que a rack foi posicionada na superfície da bancada.

2.7 Quantificação relativa de β -amiloide

Para quantificação relativa de β -amiloide nas moscas modelo de DA, foi utilizado o protocolo Westfall et al (2019), com adaptações. O ensaio foi realizado em triplicata, para os grupos AD-like e Controle.

Para extração de proteínas, foram maceradas vinte cabeças em 200 μ L de tampão de extração de proteínas (50mM Tris-HCl buffer pH 8.0 contendo 1mM EDTA e 1% Triton X-100), juntamente com inibidores de protease (pastilha complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail diluída em 10 mL do tampão gelado). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min. Após isso, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e acondicionado em gelo até sua utilização para quantificar β -amiloide por Tioflavina T e proteínas totais por Bradford.

Para quantificação de amiloide por Tioflavina T foi preparada uma solução estoque (5X), dissolvendo 8 mg de Tioflavina T em 10 mL de PBS pH 7,0. Foi utilizado uma parte de solução estoque (5X), diluída em quatro partes de PBS (1X). Em placas de 96 poços, foram adicionados 198 μ l da solução de trabalho e 2 μ l do homogeneizado (sobrenadante da proteína extraída). A leitura da fluorescência seguiu os parâmetros de excitação a 450 nm e emissão 482nm.

Na análise dos dados, foi descontado o valor do branco (apenas tioflavina T) das quantificações e normalizados os níveis de amiloide com proteínas totais dosadas por Bradford.

2.8 Análise Histológica do cérebro *Drosophila melanogaster*

Para análise histológica, 10 moscas adultas de elav-GAL4;UAS-BACE1, UAS-APP foram coletadas e tratadas com os diferentes secretomas. Após 15 dias de tratamento, as moscas de cada grupo foram coletadas, anestesiadas com éter etílico e fixadas em solução de Carnoy (6:3:1, 99% etanol, clorofórmio e ácido acético glacial ácido) por 24 horas e processadas em álcool etílico 70% (2x), álcool etílico 80% (2x), 90% álcool etílico (2x), álcool etílico absoluto (2x), xanol (2x), parafina líquida 60% (2x) por 15 minutos em cada repetição. As cabeças das moscas foram alinhadas no molde e embebidas em parafina. Os blocos foram seccionados com 3 μ m de espessura usando um micrótomo semiautomático (SLEE CUT5062). Os cortes foram desidratados, corados com hematoxilina e eosina e as lâminas montadas.

Os cortes foram analisados no aumento de 100x em microscópio de luz (Leica) com sistema de captura de imagens acoplado (Software LAS EZ) a fim de identificar vacúolos de neurodegeneração.

2.9 Análise Estatística

Os resultados do teste comportamental realizado apenas com machos foram avaliados por meio do teste t com significância definida em $p < 0,05$. Para a análise da quantificação de β -amilóide, D'Agostino & Pearson foi aplicado para verificar a normalidade, seguido do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações, com significância definida em $p < 0,05$. Por fim, todas as análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism.

3. RESULTADOS

3.1 Secretomas bacterianos afetam a taxa de escalada de *D. melanogaster* modelo DA

O teste RING indica se há redução da atividade locomotora das moscas, devido a fatores de idade e/ou neurodegeneração. Moscas modelo DA não tratadas tiveram seus reflexos motores testados e comparados ao controle (elav-Gal4), 10 e 15 dias após a eclosão. Essas moscas apresentaram redução na capacidade de escalada quando comparadas às moscas da linhagem elav-Gal4. Figura 1A, $p < 0,001$ (10 dias) e Figura 1B, $p < 0,001$ (15 dias).

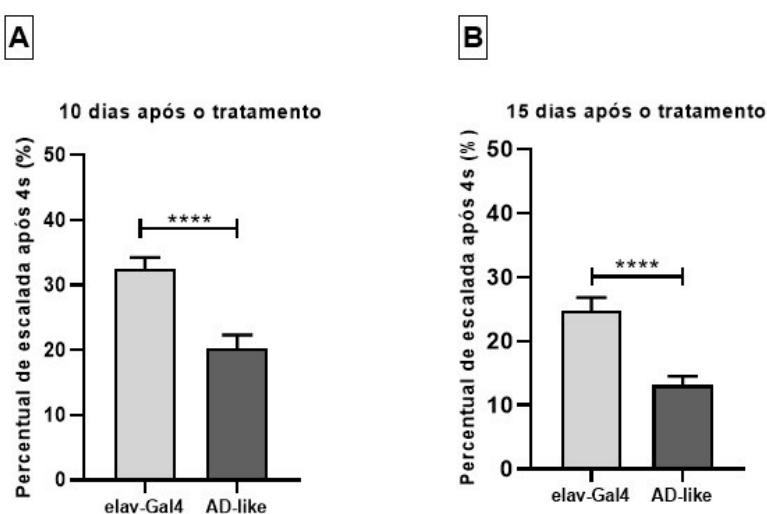


Figura 1. Percentual de escalada de moscas modelo DA e elav-Gal4. Moscas modelo de DA com 10 (Fig. 1A) e 15 dias p. e. (Fig. 1B) apresentaram redução da capacidade de escalar quando comparadas a moscas da linhagem elav-Gal4 (moscas sem DA). Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. A significância estatística está indicada como * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$, de acordo com test-t.

Em (A) a comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-like tratados com veículo e não tratado (água), após 10 dias de tratamento (machos com 10 d.p.e.) e em (C) após 15 dias (machos com 15 d.p.e.). Em (B) está representado o percentual de escalada de machos Alzheimer-like nos diferentes grupos de tratamento com veículo, durante 10 dias (machos com 10 d.p.e.) e em (D) a comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-

like dos diferentes grupos de tratamento com veículo, durante 15 dias (machos com 15 d.p.e.) A Figura 2 demonstra os resultados da atividade locomotora de machos modelo de DA após o tratamento, via alimento, com os secretomas bacterianos.

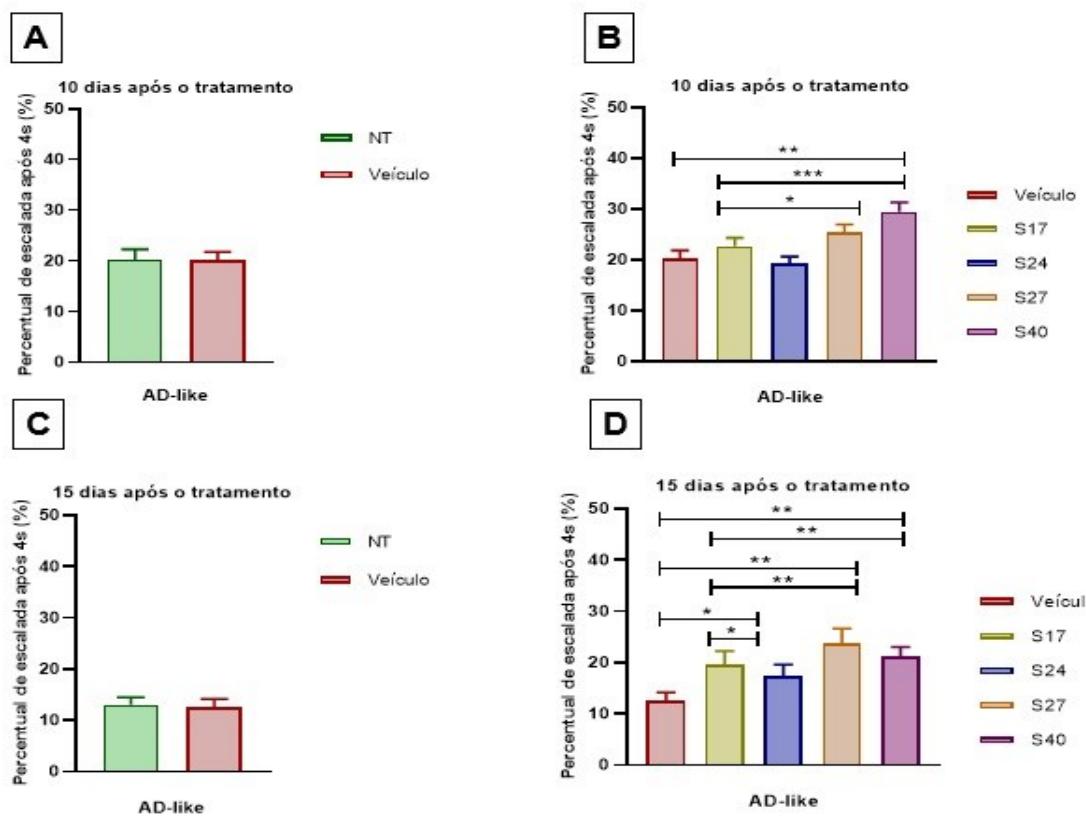


Figura 2. Percentual de escalada das moscas com secretoma bacteriano isolado do alimento de larva de abelha. (A) Comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-like tratados com veículo e não tratado (água), durante 10 dias (machos com 10 d.p.e.). **(B)** Comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-like tratados com veículo e diferentes sobrenadantes, durante 10 dias (machos com 10-15 d.p.e.). **(C)** Comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-like tratados com veículo e não tratado (água), durante 15 dias (machos com 10 d.p.e.). **(D)** Comparação do percentual de escalada de machos Alzheimer-like tratados com veículo e diferentes sobrenadantes, durante 15 dias (machos com 10 d.p.e.). Para a análise estatística, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, em que * indica $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. NT = Não Tratada.

Dez dias após o tratamento, as moscas tratadas com os secretomas S27 ($p < 0,05$) e S40 ($p < 0,01$) tiveram sua capacidade de escalar aumentada, quando comparadas ao grupo veículo (somente meio LB) e as que foram

tratadas durante quinze dias p.e., os secretomas S17 ($p < 0,05$), S27 ($p < 0,01$) e S40 ($p < 0,01$), apresentaram aumento na taxa de escalada quando comparadas ao grupo tratado apenas com veículo.

Não houve diferença significativa entre o grupo não tratado e o grupo tratado apenas com veículo. No entanto, o resultado sugere uma redução da atividade locomotora quando comparadas ao grupo controle.

3.2 Secretomas bacterianos não reduzem os níveis de β -amiloide no cérebro das moscas

Nesse teste, a fluorescência total foi corrigida para o conteúdo total de proteína de cada amostra e aos níveis de fluorescência da amostra controle. Esta etapa adicional foi necessária porque as amostras poderiam apresentar autofluorescência. A Figura 3 apresenta o resultado dos níveis de amiloide em moscas modelo de DA, com normalização superior ao controle positivo (CP) elav-Gal4/+, após 15 dias de tratamento. Não houve diferença significativa entre a quantificação relativa de β -amiloide dos grupos controle e tratamento.

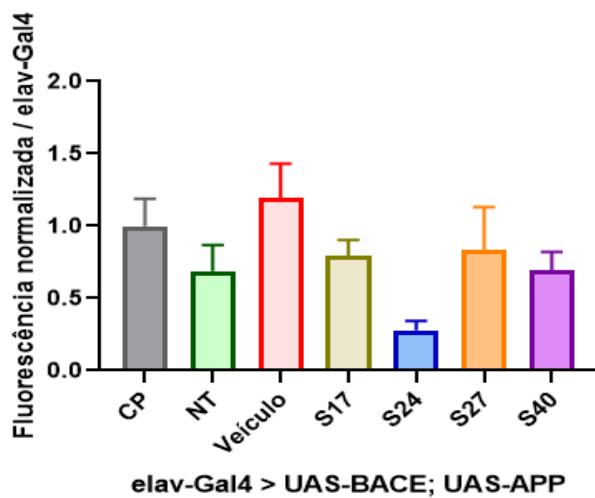


Figura 3. Quantificação relativa de amiloide por tioflavina T, normalizada por fluorescência, no cérebro de moscas de 15 dias tratadas e não tratadas com secretomas bacterianos. Os gráficos foram plotados com base na média da triplicata biológica. Foi usado para a análise estatística, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. A significância estatística é indicada como * para $P < 0,05$ de acordo com o teste t, com pós-teste Dunn para múltiplas comparações. CP = Controle Positivo; NT = Não Tratada (água).

3.3 S27 e S40 reduzem a neurodegeneração no cérebro de moscas modelo DA, após 15 dias de tratamento

Uma das características clássicas da histopatologia da doença de Alzheimer é a perda neuronal e redução da massa cerebral, principalmente nas regiões do córtex cerebral, hipocampo e ventrículo. Por esse motivo, para verificarmos a ação dos secretomas na redução da neurodegeneração, realizamos uma análise histopatológica do cérebro de moscas tipo AD tratadas por 15 dias após a eclosão (Figura 4). A ocorrência de neurodegeneração se manifesta pelo aparecimento lesões vacuolares na região central do cérebro. As moscas tratadas com S27 (Fig. 4G) e S40 (Fig. 4H) mostraram características histológicas semelhantes ao grupo controle elav-GAL4 (Fig. 4A, 4B), livre de vacúolos. Nos cortes histológicos dos grupos NT, veículo e tratados com S17, e S24 (Fig. 4C-F, respectivamente), visualizamos o cérebro com numerosas lesões vacuolares.

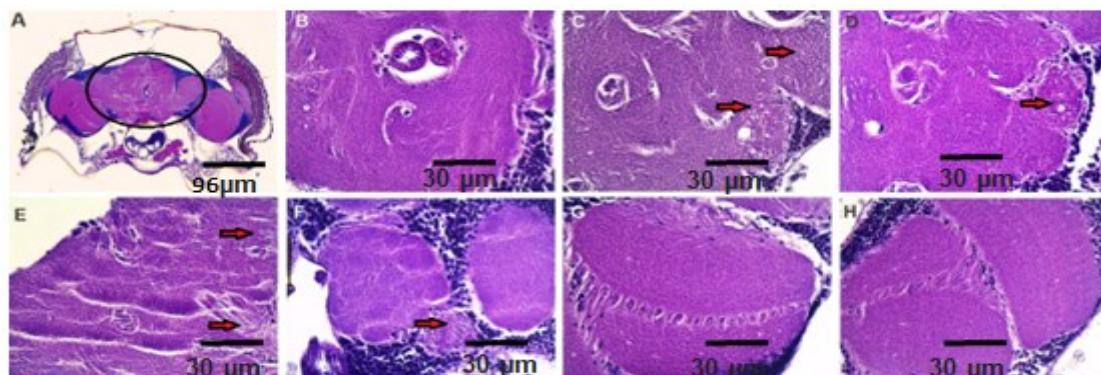


Figura 4. Histologia do cérebro de moscas modelo AD-like tratadas e não tratadas com secretomas bacterianos. Secções de parafina de 3 μm do mesencéfalo de moscas 15 dias após eclosão. **A.** Controle: elav-Gal não tratada (ampliação de 40x), indicando as áreas do cérebro onde as imagens foram capturadas para análise. **B.** elav-Gal4 não tratada, 100x. Moscas semelhantes a DA tratadas com: **C.** Água, Alzheimer-like não tratada, 100x; **D.** Veículo, 100x; **E.** S17, 100x; **F.** S24, 100x; **G.** S27, 100x; **H.** S40, 100x.

Investigação mais profunda das frações que ocorrem em secretomas bacterianos e testes bioquímicos que indiquem quais biomoléculas afetam a via amiloidogênica da DA são passos importantes na pesquisa para a descoberta de novos produtos biotecnológicos para emprego terapêutico nessas doenças.

4. DISCUSSÃO

Dentre os diversos modelos experimentais utilizados para o estudo de doenças neurodegenerativas, a mosca das frutas *Drosophila melanogaster* tem sido empregada no estudo da Doença de Alzheimer por compartilhar inúmeros genes em comum com o do ser humano, além da conservação de vias metabólicas à nível celular. Dessa forma, seu uso é descrito na literatura e considerado viável, uma vez que possui um cérebro com subestruturas funcionalmente especializadas e conservação de genes relacionados a tais patologias em humano (BELFIORI-CARRASCO; MARCORA; BOCAI; CERIANI et al., 2017; MOLONEY; SATTELLE; LOMAS; CROWTHER et al., 2010). Tais patologias ainda são uma incógnita, principalmente devido à dificuldade de acesso do cérebro humano, sem riscos ao paciente.

Vários aspectos contribuem para que este organismo seja tão atrativo, tais como, uma manutenção em laboratório fácil e pouco dispendiosa, um ciclo de vida curto e elevada fertilidade, anatomia bem caracterizada e as “ferramentas genéticas” disponíveis. Além disso, foi demonstrado que apesar do genoma de *D. melanogaster* ser relativamente pequeno, possui um elevado grau de conservação em relação aos mamíferos, uma vez que 75% dos loci associados a doenças em humanos têm pelo menos um ortólogo em *Drosophila* (REITER et al., 2001).

Muito se tem discutido sobre os biomarcadores da doença e são inúmeros a quantidade de artigos publicados sobre o tema com o intuito de elucidar a fisiopatologia da DA no seu todo e, posteriormente, desenhar estratégias que permitam contribuir para a prevenção do seu aparecimento e desenvolver fármacos que permitam tratar a doença e definir certeiramente onde se pode atuar e qual a abordagem mais eficaz e rápida no tratamento da Doença de Alzheimer.

Avaliações comportamentais são ferramentas essenciais na detecção dos danos gerados pelas doenças neurodegenerativas. Apesar de seu mecanismo patogênico ainda não ter sido identificado, estudos anteriores evidenciam que o processo amiloidogênico é um fator fundamental na causa e progressão da Doença de Alzheimer (LANE; HARDY; SCHOTT et al., 2018). O ensaio de escalada é um teste comportamental eficiente com metodologia simples,

confiável e eficaz. (MADABATTULA; STRAUTMAN; BYSICE; O'SULLIVAN et al., 2015; MOLONEY; SATTELLE; LOMAS; CROWTHER, et al., 2010).

A utilização de substâncias produzidas pelas abelhas tem evidenciado a ação antimicrobiana em diferentes tipos de organismos. (SANTOS et al., 2022). O uso de bactérias isoladas de alimentos larvais de abelhas sem ferrão abre caminho para a identificação de novas moléculas com potencial terapêutico antineurodegenerativo. Assim, o efeito das substâncias bioativas produzidas por essas bactérias foi avaliado quanto à sua capacidade de prevenir ou tratar a Doença de Alzheimer.

Os secretomas S27 e S40 avaliados neste trabalho mostraram potencial anti-DA eficiente nos testes realizados no modelo AD-like de *D. Melanogaster*, melhorando a capacidade de escalada da mosca e reduzindo o declínio do reflexo motor relacionado à neurodegeneração, quando comparados à mosca não tratada e tratada com veículo. A análise histológica do cérebro da mosca mostrou diminuição dos sinais de neurodegeneração nos grupos tratados com S27 e S40, com redução das lesões vacuolares e aspecto semelhante ao cérebro normal (elav -GAL4).

Assim, este trabalho mostrou o potencial dos secretomas bacterianos para busca de moléculas bioativas capazes de reduzir o processo de neurodegeneração nas moscas modelo de DA. Mais testes precisarão ser realizados para identificar quais moléculas presentes nos secretomas S27 e S40 são capazes de fornecer uma melhoria na taxa de escalada e na histologia do cérebro das moscas e qual microrganismo foi responsável pela secreção das mesmas.

O impacto desta doença na população é enorme e a possibilidade de poder oferecer um tratamento eficaz aos doentes é uma motivação para que se trabalhe cada vez mais esta temática. Os estudos nestas áreas são futuristas e têm uma alta progressão no que diz respeito à descoberta do melhor fármaco para impedir o aparecimento e a progressão desta doença.

5. CONCLUSÃO

Antecipadamente à realização do experimento houve a validação do genótipo, concluindo que *Drosophila melanogaster* com genótipo Elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ representa um excelente modelo para o estudo da cascata β -amiloide da Doença de Alzheimer e para elucidar eventos moleculares relacionados à transcrição.

Nossos resultados sugerem uma relação entre o consumo de secretomas bacterianos e a doença de Alzheimer em moscas, visto que na análise histológica do cérebro da mosca e no teste de capacidade motora mostrou diminuição dos sinais de neurodegeneração nos grupos tratados com S27 e S40.

Em conclusão, a DA é um dos principais focos de investigação na atualidade e a cada dia surgem novos ensaios, novos estudos e indicações sobre novas estratégias terapêuticas potenciais. A continuidade dos estudos em sua caracterização molecular, faz-se necessária, uma vez que os resultados apresentados até o momento indicam uma possível alternativa para a prevenção ou tratamento da Doença de Alzheimer e qual a abordagem mais eficaz e rápida no tratamento. É um passo importante na pesquisa e abre portas para a descoberta ou para os estudos de novos produtos biotecnológicos com vistas ao emprego terapêutico, com potenciais marcadores levando a uma identificação e melhor compreensão da doença de Alzheimer de forma mais rápida, segura e não invasiva.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, M.D. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. 2000 Mar 24; 287 (5461):2185-95. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>

ALMARAZ-ABARCA, N. et al. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopisjuliflora*, Leguminosae). **J Food Comp**. 2007, 20(2), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.001>

BELFIORI-CARRASCO, L. F.; MARCORA, M. S.; BOCAI, N. I.; CERIANI, M. F. et al. A Novel Genetic Screen Identifies Modifiers of Age-Dependent Amyloid beta Toxicity in the *Drosophila* Brain. **Front Aging Neurosci**, 9, p. 61, 2017. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00061>

BOESE, A. C., HAMBLIN, M. H., & LEE, J. P. (2020). Neural stem cell therapy for neurovascular injury in Alzheimer's disease. **Experimental neurology**, 324, 113112. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113112>

BPBES/REBIPP (2019): Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carvalheiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva; Padgurschi M. C. G. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas. ISBN: 978-85- 60064-83- 0

CARVAJAL CARVAJAL, Carlos. Biologia molecular da doença de Alzheimer. **Med. perna. Costa Rica**, Heredia, v. 33, n. 2, pág. 104-122, dezembro de 2016. Disponível em http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200104&lng=en&nrm=iso

CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B. de A. Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos. 1. ed. SalvadorBA: SEAGRI-BA, 2003. 42 p. **Série Meliponicultura 01**.

CARVALHO, A. T., MAIA-SILVA, C., JAFFÉ, R., SOUZA, B. A., ZANELLA, F. C. V., MARTINS, C. F., CARVALHO, C. A. L., ALVES, R. M. O., KOEDAM, D., ACOSTA, A. L., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & GIANNINI, T. C. (2017). Distribuição geográfica atual da abelha jandaíra e previsões para a sua distribuição futura. In: Imperatriz-Fonseca, V. L., Koedam, D. & Hrncir, M. (Ed.). A abelha jandaíra no passado, no presente e no futuro. Mossoró: EDUFERSA, 73-78.

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

CHAN, H. Y.; BONINI, M. N. *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. **Cell death differ.** v. 7, p. 1075-1080, 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400757>

CHOW VW, SAVONENKO AV, MELNIKOVA T, KIM H, PRICE DL, LI T. Modeling an Anti-Amyloid Combination Therapy for Alzheimer's Disease. **Sci Transl Med** 2010 ; 2(13): 13ra1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000337>

CITRON M. β -secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. **J Neurosci Res** 2002; 70 (3): 373-379. <https://doi.org/10.1016/j.jnur.2008.05.007>

COHEN, R. M. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A, and Frank Neuronal Loss. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 15, p. 6245-6256, 2013. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3672-12.2013>

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Memantina para o tratamento da doença de Alzheimer [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Recomendacao/Relatorio_memantina_DoencaAlzheimer_310_FINAL.pdf

CONTI R, GUIMARÃES DO, PUPO MT. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiontes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc Cult** 2012; 64(3):43-7. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300014>

COOK D, BROWN D, ALEXANDER R, MARCH R, MORGAN P, SATTERTHWAITE G, PANGALOS MN. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. **Nature Reviews Drug Discovery** 2014; 13: 419-431. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>

COOK, K. R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. **Fly**, v. 4, n. 1, p. 88–91, 2010. <https://doi.org/10.4161/fly.4.1.11230>

DAI M-H, ZHENG H, ZENG L-D, ZHANG Y. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. **Oncotarget**. 2018; 9(19):15132-43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23738>

DE PAULA, G. T. et al. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>

DIAS LLC, SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, BALBUENA TS, FLOH EIS. 2007. Comparative analysis of the two-dimensional gel electrophoresis patterns during seed development in *Ocotea catarinensis*. **Proteomics**. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000100003>

DUFFY, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. **Genesis**, v. 34, n. 1-2, p. 1-15, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 1526-954X. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>

EASTWOOD, R.; REISBERG, B. Mood and behaviour. In: Gauthier S, editor. Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease. **London: Martin Dunitz**; p. 175-90, 1996. <https://doi.org/10.31887%2FDCNS.2000.2.2%2Faburns>

EL-LEITHY, M.; EL-SIBAEL, K. Role of microorganisms isolated from bees, its ripening and fermentation of honey. **Egyptian Journal of Microbiology** v. 75, p. 679-681, 1992.

ELLIOTT, D. A.; BRAND, A. H. The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. **Methods Mol Biol**, v. 420, p. 79-95, 2008. ISSN 10643745. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_5

FALCO A, CUKIERMAN S, HAUSER-DAVIS A, REY A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**. 2016, 39(1): 63-80. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>

FÉAS, X. et al. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8359–8377, 2012 <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>

FELIPE NETO, C. A. L. Influência da estrutura da paisagem sobre a produção e qualidade de mel da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*, Apidae: *Meliponini*) na Caatinga. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

FERREIRA ST, KLEIN WL. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem** 2011;96(4):529-43. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.08.003>

FERRETTI, M. T. Transgenic mice as a model of preclinical Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 8, p. 4-23, 2011. <https://doi.org/10.2174/156720511794604561>

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S. P.; DIAS NETO, E.; e OJOPI, É. P. B Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 31, n. 1, p. 19- 25, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832004000100004>

GARGANO, J., MARTIN, I., BHANDARI, P. et al. Rapid iterative negative 760 geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Exp Gerontol**. 762 2005; 40(5):386-95. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>

GEVEDON, O. et al. In Vivo Forward Genetic Screen to Identify Novel Neuroprotective Genes in *Drosophila melanogaster*. **J. Vis. Exp.** v. 149, 2019. <https://doi.org/10.3791/59720>

GILLIAM, M.; PREST, B. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*, **Journal of Invertebrate Pathology** v. 49; p. 70–75, 1987. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90127-3)

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie** v. 21, p. 89-97, 1990. <https://doi.org/10.1051/apido:19900201>

GONÇALVES, P. H. P. Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas. 2010. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

GREEN, K., LAFERLA, F. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. **Neuron**. 618 2008; 59(2):190–4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.013>

HAASS C, SELKOE DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007;8(2):101-12. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>

HALES, K. G. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815-42, Nov 2015. ISSN 1943-2631. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>

HARDY, J., ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends Pharmacol Sci**. 1991; 12(10):383–8. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-v](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-v)

HARDY J, SELKOE DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science** 2002;297(5580):353-6. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

HARDY JA, HIGGINS GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** 1992; 10;256(5054):184-5. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>

HUNTING, P. Alois Alzheimer (1864-1915). **Journal of Medical Biography**, v. 23, n. 4, p. 238-239, 2015. <https://doi.org/10.1177/0967772015589881>

JACKSON, G. R. Guide to understanding *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. **PLoS Biol**, v. 6, n. 2, p. e53, Feb 2008. ISSN 15457885. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060053>

JEIBMANN, A. PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. *Int. J. Mol. ciência* 2009, 10 (2), 407-440. <https://doi.org/10.3390/ijms10020407>

JENETT, A. A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep*, v. 2, n. 4, p. 991-1001, Oct 2012. ISSN 2211-1247. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.011>

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

KAUFMAN, T. C. A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. **Genetics**, 206, n. 2, p. 665-689, 2017. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.199950>.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. (Org.). Abelha Urucu: **Biologia, Manejo e Conservação**. Paracatu: Fundação Acangaú. 1996.

KUMAR A, SINGH A, EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**. 2015 abr;67(2):195-203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>

KURZ A, PERNECZKY R. Amyloid clearance as a treatment target against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011;24 Suppl 2:61-73. **PMID:** 21422524. <https://doi.org/10.3233/jad-2011-102139>

LACERDA, D. C. de O.; AQUINO, I. de S.; BORGES, P. de F.; BARBOSA, A. da S. Influência dos pontos cardeais e colaterais na nidificação de abelhas nativas em colmeias octogonais. **Gaia Scientia**, [S. I.], v. 11, n. 2, 2017. DOI: 10.22478/ufpb.1981-1268.2017v11n2.32849. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/article/view/32849>.

LANE CA, HARDY J, SCHOTT JM. Alzheimer's disease. **Eur J Neurol**. 2018;25(1):59–70 <https://doi.org/10.1111/ene.13439>

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>

LENZ S, KARSTEN P, SCHULZ JB, VOIGT A. Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **J Neurochem**. 2013;127(4):453–60. <https://doi.org/10.1111/jnc.12446>

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol*. v. 490, n. 1-3, p. 83-6, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.046>

LI, W. Z. et al. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and molecular research**: GMR, v. 11, n. 3, p. 1997–2002, 2012. <https://doi.org/10.4238/2012.august.6.4>

LLOYD, T. E.; TAYLOR, J. P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, jan. 2010v. 1184, p. e1-20. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1749-6632.2010.05432.x>

LYNCH, J. A.; EL-SHERIF, E.; BROWN, S. J. Comparison of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*. Wiley Interdiscip Ver Dev Biol, v. 1, n. 1, p. 16- 39, Jan-Fev 2012. ISSN 1759-7692 (Eletronic). <https://doi.org/10.1002/wdev.3>

MICHENER, C. D. The Social Behavior of the Bees. Massachussets: Harvard University Press, Cambridge. 1974.

MARÇAL, L. N. Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie *Melipona seminigra*: diversidade e potencial enzimático. 2017. 134 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N.M. *Drosophila* as an *In Vivo* Model for Human Neurodegenerative Disease. **Genetics**. v. 201, p. 377–402. <https://doi.org/10.1534%2Fgenetics.115.179457>

MENEZES et al., 2015, Current Biology 25, 2851–2855 November 2, 2015 ©2015 Elsevier Ltd All rights reserved <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.028>

MOHAMMAD, Salma Malihah; MAHMUD-AB-RASHID, Nor-Khaizura; ZAWAWI, Norhasnida. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 1, p. 172-187, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152>

MOLONEY, A. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 228-234, 2009. <https://doi.org/10.2741/4798>

MOLONEY, A.; SATTELLE, D. B.; LOMAS, D. A.; CROWTHER, D. C. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. **Trends in Biochemical Sciences**, 35, n. 4, p. 228-235, 2010/04/01/ 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.004>

PARK OK. 2004. Proteomic studies in plants. **J. Bioch. Mol. Biol.** 37: 133-138. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2004.37.1.133>

PARVATHI, D.; AMRITHA, A.; PAUL, S. F. D. Wonder Animal Model for Genetic Studies – *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – A review. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v.2, p.33-38, 2009.

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>

RASKIND, M. A. Alzheimer's disease: treatment of noncognitive behavioural abnormalities. In: Bloom FE, Kupper DJ. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press; p. 1427-35, 1995. <https://doi.org/10.1590/S0101-81082008000200002>

REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene. **Pubmed**. 2001, 11 (6): 1114-25 <https://doi.org/10.1101/gr.169101>

RIZZI, L.; ROSSET, I.; RORIZ-CRUZ, M. Epidemiologia Global de Demência: Tipos de Alzheimer e Vascular. **BioMed Res Int.** 2014; 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/908915>

ROUBIK, D. W. (2018). Applied pollination and selected studies. In: Roubik, D. W. The pollination of cultivated plants: A compendium for practitioners. Vol 1, chapter 9: 183-197. Italy, Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 324 p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/180143/1/I9201EN-1.pdf>.

ROUBIK, D.W. Ecology and Natural History of Tropical Bees. David W. Roubik. Cambridge University Press, New York, 1989. x, 514 pp., illus. \$69.50. Cambridge Tropical Biology Series. **Science**. 1990 May 25;248(4958):1026-7. PMID: 17745410. <https://doi.org/10.1126/science.248.4958.1026>

SARASA, M.; PESINI, P. Natural Non-Trasgenic Animal Models for Research in Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**, 2009. <https://doi.org/10.2174%2F156720509787602834>

SANTOS, ACC, MALTA, SM, DANTAS, RCC et al. Atividade antimicrobiana de sobrenadantes produzidos por bactérias isoladas de larvas de abelhas sem ferrão brasileiras. **BMC Microbiol** 22, 127 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02548-4>

SCHNEIDER LS, MANGIALASCHE F, ANDREASEN N, FELDMAN H, GIACOBINI E, JONES R. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. **J Intern Med** 2014; 275(3):251-83. <https://doi.org/10.1111/joim.12191>

SELKOE DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev** 2001;81(2):741-66. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul**, v. 30, n. 1 supl 0, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-81082008000200002>

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>

SILVA, Sabrina Piccineli Zanchettin et al. Assistência de enfermagem aos pacientes portadores de alzheimer: uma revisão integrativa. **Nursing** (São Paulo), v. 23, n. 271, p. 4991-4998, 2020. <https://doi.org/10.36489/nursing.2020v23i271p4991-4998>

SOUZA, E. C. A.; MENEZES, C.; FLACH A. Stingless bee honey (*Hymenoptera, Apidae, Meliponini*): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, p. 113-132, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00802-0>

SU, B. et al. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res.** 616 2008; 5(6):525–32. <https://doi.org/10.2174%2F156720508786898451>

TUE NT, DAT TQ, LY LL, ANH VD, YOSHIDA H. Insights from *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer's disease. **Front Biosci - Landmark**. 2020;25(1):134–46 <https://doi.org/10.2741/4798>

VALLET, P.G.; GUNTERN, R.; HOF, P.R.; GOLAZ, J.; DELACOURTE, A.; ROBAKIS, N.K.; e BOURAS, C. A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 83, n. 2, p. 170-178, 1992. <https://doi.org/10.1007/bf00308476>

VIEGAS, F. P.; SIMÕES, M. C. R.; DA ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R.; MOREIRA, M. S.; E VIEGAS JR, C Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 286-306, 2011. <https://rvq-sub.sbj.org.br/index.php/rvq/article/view/163>

WANG, M., QIN, L., & TANG, B. (2019). MicroRNAs in Alzheimer's disease. **Frontiers in genetics**, 10, 153. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00153>

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. A novel symbiotic delays Alzheimer's disease onset via combinatorial gut-brain-axis signaling in *Drosophila melanogaster*. **PLOS ONE**, 14, n. 4, p. e0214985, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214985>

WIESE, H. NEW BEEKEEPING. 7 ed. Porto Alegre: **Agropecuária**. 493pp.1986.

WILSON RS, SEGAWA E, BOYLE PA, ANAGNOS SE, HIZEL LP, BENNETT DA. The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. **Psychol Aging**. 2012 Dec;27(4):1008-17. doi: 10.1037/a0029857. Epub 2012 Sep 3. PMID: 22946521; PMCID: PMC3534850. <https://doi.org/10.1037/a0029857>

WILKINS MR, PASQUALI C, APPEL RD, OU K, GOLAZ O, SANCHEZ JC, JAN JX, GOOLEY AA, HUGHES E, HUMPHERY-SMITH I, WILLIANS KL, HOCHSTRASSER DF. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology** 14: 61-65. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>

WU, Y-H.; SWAAB, D. F. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. **J Pineal Res.** 2005 Apr; 38(3):145-52 <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2004.00196.x>

YAN, R.; VASSAR, R. Targeting the b secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. **Lancet Neurol.** v. 13, p. 319–329, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X) [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70276-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70276-x)