

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

VALIDAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *DROSOPHILA*
***MELANOGASTER* COMO MODELOS ALTERNATIVOS DE ESTUDO DA DOENÇA**
DE ALZHEIMER.

JOYCE DA SILVEIRA PEREIRA

UBERLÂNDIA-MG

2025

JOYCE DA SILVEIRA PEREIRA

**VALIDAÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER COMO MODELOS ALTERNATIVOS DE ESTUDO DA DOENÇA
DE ALZHEIMER.**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado
ao curso de Biomedicina, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Coorientador: Me. Matheus Henrique Silva

UBERLÂNDIA-MG

2025

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje; mas continue em frente de qualquer maneira.”

Martin Luther King Jr.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, que percorreu estradas sem fim atrás de um volante e à minha mãe, que iluminou caminhos através da pedagogia e de seus ensinamentos. Com sacrifício e amor, eles fizeram de tudo para que eu chegasse até aqui. Também dedico ao meu irmão, que sempre esteve do meu lado, me apoiando e garantindo que eu não me sentisse sozinha. Essa conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, Patrícia e Carlos que não mediram esforços para apoiar meus sonhos e me permitir essa experiência incrível dentro da Universidade Federal de Uberlândia. Vocês criaram e moldaram a pessoa que sou hoje e devo todas as conquistas a vocês, agradeço infinitamente pela paciência, perseverança, por todas as chamadas de vídeo marcadas impreterivelmente às 20h de cada dia para que a saudade pudesse ser amenizada e para que eu conseguisse os inteirar de todos os acontecimentos. Eu amo vocês infinitamente, obrigada por me acalmarem em minhas muitas ligações chorando e obrigada, principalmente, por acreditarem em mim e no meu potencial, quando eu mesma não o fazia.

Ao meu irmão por todo companheirismo, apoio e todos os conselhos, por ter me permitido acompanhar seu crescimento e pela compreensão e paciência com minha ausência em alguns momentos da sua vida. Eu te amo muito e não poderia ter recebido presente melhor da vida!

À minha família como um todo, minha avó, meus padrinhos e madrinhas, tios e tias por todo apoio, carinho e amor que me deram e por não terem deixado a distância afetar nada. Agradeço principalmente aos meus primos que através de chamadas de vídeo e memes nas redes sociais me arrancaram sorrisos, compartilharam fofocas e choraram comigo nos momentos difíceis, me permitindo estar próxima, mesmo que não fosse presencialmente. Vocês são meu porto seguro!

Aos meus amigos, de Uberlândia, da UFU e de Paraopeba, que escutaram meus desabafos e lamentações, que riram, dançaram e choraram comigo, mas que em nenhum momento deixaram de apoiar, aconselhar e principalmente, não deixaram com que eu me sentisse sozinha, fazendo com que esses anos na faculdade se tornassem mais leves e divertidos.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Ueira pelo acolhimento, confiança, ensinamentos e por ser um exemplo de profissional e de pessoa, sua tranquilidade e seu amor pela ciência me inspiram e ter você como orientador é uma honra .

Ao meu co-orientador Matheus Henrique Silva, que foi além da sua função várias vezes, se tornando um amigo, uma referência e um ponto de apoio. Obrigada por todos os conselhos, por todas as conversas, risadas e ensinamentos. Você me deu a confiança que eu precisava para que eu pudesse me desenvolver no meio acadêmico e a liberdade de encontrar

meu próprio caminho profissional. Obrigada por acreditar no meu potencial, por não deixar eu me abalar diante das dificuldades que surgiam e pela boa vontade de me ensinar tudo que podia sem medir esforços, te admiro imensamente.

À minha co-orientadora Serena, primeiramente por ter me dado a Sofia, por elevar a energia do laboratório com sua personalidade única, por ser também um exemplo de cientista. Obrigada por me ceder suas moscas, por todos os macetes e protocolos de laboratório e por desafiar meu pensamento crítico e científico cada vez mais. Obrigada por todos os ensinamentos e por, literalmente, desenhar até que eu pudesse entender determinado assunto, você tem toda a minha admiração.

Agradeço também de uma forma geral a toda a equipe do Labgen-UFU por todo o companheirismo e ajuda, fazendo essa jornada ser mais leve e proveitosa. Meu muito obrigada a cada um de vocês que de direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui!

Agradeço também à Débora e a Lúbia do Laboratório de Patologia Bucal da UFU que me ajudaram na produção de mais de 70 lâminas histológicas e ao Tarcísio do Labibi-UFU por me ceder suas curvas de calibração, reagentes e pipetas multicanal.

Agradeço também ao corpo docente da UFU por todos os conhecimentos compartilhados durante esses quatro anos de curso e por me darem embasamento para seguir meu caminho profissional.

Ademais, agradeço às agências de fomento da pesquisa, CAPES e CNPq.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui, gratidão a todos vocês!

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é neurodegenerativa e irreversível, associada à senescência e genética, resultante do acúmulo do peptídeo β -amilóide (β A) resultante da clivagem da proteína precursora de amilóide (APP) pela enzima beta-secretase (BACE). Essa pesquisa visa avaliar duas formas de manifestação do fenótipo da DA que acontece em humanos utilizando *Drosophila melanogaster* transgênica como ferramenta alternativa de estudo. Para isso, foram utilizados dois modelos: Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP, que expressa genes humanos de BACE1 e APP, e Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A, que expressa genes que levarão, diretamente, à produção do próprio peptídeo β A neurotóxico. Foram conduzidas análises comportamentais utilizando o teste RING (geotaxia negativa), em diferentes faixas etárias com o objetivo de avaliar o comprometimento locomotor. Os dados revelaram que o modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP apresentou disfunção locomotora precoce, com desempenho inferior ao grupo controle e ao modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A nas idades iniciais. A análise histopatológica revelou vacuolização cerebral em ambos os modelos, sendo mais precoce no modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A, mas mais acentuada no modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP nas idades de 5 e 10 dias pós-eclosão (d.p.e). A análise bioquímica de quantificação do peptídeo β A, feita por fluorescência com Tioflavina T (ThT), indicou acúmulo de β A nos dois modelos em relação ao controle, com diferenças estatisticamente significativas somente aos 15 d.p.e, em que o modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A se mostrou com maior quantidade do peptídeo. Os resultados demonstram que ambos os modelos são viáveis e apresentam características compatíveis com a fisiopatologia da DA, embora com perfis distintos: o modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP é mais sensível para detectar disfunções locomotoras precoces, enquanto o Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A mostra degeneração morfológica mais rápida e acúmulo mais evidente de β A. Assim, os modelos são complementares e úteis tanto para estudos fisiológicos quanto para triagens de compostos terapêuticos voltados ao tratamento da DA com vantagens de custo, tempo e facilidade de manejo em relação a modelos vertebrados..

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; *Drosophila melanogaster*; β -amilóide; Modelos transgênicos; Neurodegeneração.

LISTA DE FIGURAS

1. Diferenças entre machos e fêmeas de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
2. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3. Representação do sistema UAS/GAL4	20
4. Fenótipos relacionados aos genótipos de interesse	25
5. Esquema ilustrativo dos processos e equipamentos envolvidos na produção de lâminas histológicas	27
6. Materiais utilizados na execução do ensaio RING. A linha vermelha indica a marca de 5cm.....	29
7. Anatomia do Sistema Nervoso da <i>Drosophila melanogaster</i>	30
8. Comparação de imagens histológicas do cérebro das moscas dos grupos Elav-Gal4>UAS-GFP , Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP e Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A em 2, 5, 10 e 15 d.p.e	31
9. Quantificação de β -amilóide com ThT - One-Way ANOVA	34
10. Taxas de escalada do grupo controle e modelos Alzheimer (4s)	37
11. Taxas de escalada do grupo controle e modelos Alzheimer (18s)	39

LISTA DE TABELAS

1. Linhagens utilizadas no presente trabalho, com respectivos códigos no Bloomington, genótipo, características fenotípicas e aplicações	22
2. Cruzamentos a serem realizados e possíveis genótipos da prole (F1), com genótipos de interesse sublinhados.....	24
3. Média \pm EPM (erro padrão médio) da quantificação de β -amilóide	35
4. Valores de p para comparações da quantificação de β -amilóide entre os grupos avaliados por idades - One-way ANOVA	35
5. Média \pm EPM (erro padrão médio) da taxa de escalada (4s)	37

6. Valores de p para comparações de atividade locomotora entre os grupos avaliados por idades (4s) - Two-way ANOVA	38
7. Média ± EPM (erro padrão médio) da taxa de escalada (18s)	39
8. Valores de p para comparações de atividade locomotora entre os grupos avaliados por idades (18s) - Two-way ANOVA	40

LISTA DE ABREVIATURAS

1. DA - Doença de Alzheimer
2. PS1 - Presenilina-1
3. PS2 - Presenilina-2
4. APP - Proteína precursora de amilóide
5. OMS - Organização Mundial da Saúde
6. β A - Peptídeo β -amilóide
7. PET - Tomografia cerebral por emissão de pósitrons
8. sAPP β - Fragmento solúvel de APP
9. BACE - *Beta-site APP Cleaving Enzyme*
10. RING - *Rapid iterative negative geotaxis*
11. HE - Hematoxilina e eosina
12. ThT - Tioflavina T
13. d.p.e - Dias pós-eclosão

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 Doença de Alzheimer: definições, mecanismos de patogênese	11
1.2 Modelo animal: <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3 Construção do transgênico	18
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. Metodologia	22
4.1. Grupos experimentais	22
4.2. Análise Histopatológica	26
4.3. Quantificação de β -amilóide	27
4.4. Análise comportamental	27
4.5. Análise estatística	29
5. Resultados	29
5.1 Ambos os modelos de DA desenvolvidos em <i>D. melanogaster</i> apresentaram lesões vacuolares no parênquima cerebral	29
5.2 Ambos os modelos de DA desenvolvidos em <i>D. melanogaster</i> apresentaram aumento significativo da quantidade de peptídeo β A à 15 d.p.e	33
5.3 Indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas apresentaram diminuição significativa da taxa de escalada.	36
6. Discussão	40
7. Conclusão	44
9. Referências	46

1. Introdução

1.1 Doença de Alzheimer: definições, mecanismos de patogênese

Descrita pela primeira vez em 1904 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, a Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e afeta 30 milhões de indivíduos mundialmente (Réus et al., 2016). Ela é uma neuropatologia degenerativa e irreversível ligada, principalmente, à senescência e com predisposição genética associada aos cromossomos 1, 14 e 21 que estão ligados a mutações na Presenilina-1 (PS1), Presenilina-2 (PS2) e na proteína precursora de amilóide (APP) (Hilsabeck *et al*, 2024; Ortiz GG *et al.*, 2015).

A demência, intimamente associada à DA, foi reconhecida como uma prioridade da saúde pública em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma vez que, com o constante alargamento do topo da pirâmide etária mundial, as doenças ligadas ao envelhecimento carecem de mais atenção e estudo, pois com os avanços da ciência médica e da tecnologia, a expectativa de vida tende a crescer cada vez mais. Isso posto, a OMS estima que o Alzheimer atinge sete entre dez das 55 milhões de pessoas que vivem com algum tipo de demência no mundo atualmente. Nesse sentido, a OMS alerta que as estimativas de portadores de Alzheimer podem chegar a 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050, o que corrobora a necessidade de investimentos em pesquisas acerca dessa neuropatologia (*Alzheimer's Disease International; World Health Organization, 2022*).

O sinal patognomônico da doença é a presença de placas senis extracelulares no parênquima cerebral. Essas placas são formadas por peptídeos β -amilóide insolúveis (em especial o peptídeo A β 42) que se agregam em fibrilas, que, embora possam aparecer em indivíduos saudáveis, sua presença em grande quantidade leva à degeneração cerebral e desencadeia as consequências patológicas características da doença, como a diminuição da capacidade intelectual, perda de memória recente, dificuldade de comunicação, prejuízos na habilidade de locomoção e desorientação espacial, pois foi evidenciado que o peptídeo está relacionado com a presença de marcadores de necroptose em células neuronais com degeneração granulovacuolar (Lei *et al.*, 2021; Hilsabeck *et. al*, 2024; Araújo, 2021; Kelley AR *et al.*, 2016).

A degeneração granulovacuolar presente na histopatologia da DA consiste em uma alteração de neurônios em que é observada a presença de pequenos vacúolos agrupados ao

longo do parênquima cerebral. Embora tais vacúolos possam ser encontrados em cérebros idosos saudáveis, sua presença em grande número nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas está fortemente associada à DA (Ortiz GG *et al.*, 2015).

O principal sinal clínico da DA é o comprometimento da memória de curto prazo (que se evidencia por perguntas repetitivas, perda frequente de objetos e esquecimento de compromissos, por exemplo) e da memória de longo prazo do tipo episódica (que se refere à experiência de vida do indivíduo em um dado momento cronológico, sendo exposta por meio de palavras, via evocação) (Huang, 2018; Novellino *et al.*, 2020). Além da memória, outras funções cognitivas também sofrem declínio, como o raciocínio e as habilidades visuo-espaciais e práticas (atos motores voluntários, coordenados e orientados para um objetivo específico, determinados por um contexto), com consequente prejuízo na habilidade de locomoção e desorientação espacial (Araújo, 2021; Hilsabeck *et al.*, 2024; Kelley *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2021; Novellino *et al.*, 2020).

A maior parte dos casos de DA é esporádica (85-95%) e apresenta início tardio (Huang, 2018). O principal fator de risco para o desenvolvimento da doença é a idade: a incidência aumenta consideravelmente após os 60 anos (Sundman *et al.*, 2014). Os casos familiares (5-15%) têm início precoce (antes dos 65 de idade) e normalmente estão relacionados a mutações genéticas nos genes da PS1, PS2 e APP (Hilsabeck *et al.*, 2024; Huang, 2018, Ortiz *et al.*, 2015). Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento da DA são: disfunções metabólicas, doenças cardiovasculares, injúria cerebral, depressão, diabetes, hipercolesterolemia e sedentarismo (Réus *et al.*, 2016). A doença tem um grau de progressão variável e pode se estabilizar por alguns períodos; o declínio cognitivo, entretanto, é inevitável. O tempo médio de sobrevivência após comprometimento locomotor severo é de cerca de seis meses (Huang, 2018).

Segundo a Sociedade Americana de Psiquiatria, o diagnóstico da DA é feito através da anamnese do paciente e da pesquisa de seu histórico familiar, além da análise de biomarcadores associados aos sinais de atrofia cerebral e do acúmulo de peptídeos ou de vacúolos no tecido neural, detectados em exames histopatológicos *post mortem*, ou através de exames de tomografia cerebral por emissão de pósitrons (PET). Marcadores genéticos relacionados aos genes da APP e PS1 ou PS2 também podem ser usados no diagnóstico da doença (*American Psychiatric Association*, 2014).

Por ser uma doença multifatorial, múltiplas são as hipóteses da causa da DA, dentre elas, está a explicação da cascata amiloidal, a qual diz que a neurodegeneração na doença de Alzheimer começa com uma clivagem alternativa da APP e resulta na produção, agregação e deposição do peptídeo β A no tecido cerebral (Sereniki, A *et al.*, 2008).

A APP pode ser processada por duas vias de clivagem. Na via amiloidogênica, a APP é clivada pela enzima β -secretase na região extracelular, liberando um fragmento solúvel de APP (sAPP β) e gerando outro fragmento de 99 aminoácidos associados à membrana celular. Em seguida, a enzima γ -secretase cliva esse fragmento de 99 aminoácidos no domínio transmembrânico, o que resulta na liberação de peptídeos β A, especialmente com 40 e 42 aminoácidos, sendo o de 42 aminoácidos considerado o mais neurotóxico, pois é mais hidrofóbico e tende a formar agregados que podem se depositar como placas amiloides no cérebro, um marco patológico da DA. Já na via não amiloidogênica, a APP é clivada pela enzima α -secretase em uma região intracelular, liberando somente um fragmento solúvel de APP (sAPP α), o que impede a formação das placas de peptídeos β A, uma vez que a clivagem da α -secretase ocorre dentro da sequência amiloidogênica do APP, eliminando o potencial tóxico. Após, a enzima γ -secretase pode então clivar o fragmento remanescente, mas os produtos desta ação não são patogênicos (Yan, R., & Vassar, R., 2014).

As duas vias ocorrem naturalmente nos seres humanos, porém, a problemática se dá quando há um desequilíbrio, em que a primeira clivagem é intensificada pela ação da enzima proteolítica β -secretase, também conhecida como BACE (*Beta-site APP Cleaving Enzyme*), resultando em um aumento na produção de fragmentos de β A. Esse acúmulo leva à formação de placas senis, resultando na perda de sinapses e na morte neuronal (Chakraborty R. *et al.*, 2011).

Os estudos genéticos de casos familiares da DA constituem fortes evidências da hipótese da cascata amiloide: mutações nos genes que codificam a APP e as PS1 e PS2 estão relacionados a formas autossômicas dominantes de DA; nesses pacientes, observou-se alterações no processamento da APP, aumento da proporção A β 42/A β 40 e, conseqüentemente, maior presença de agregados amiloides (Bentahir *et al.*, 2006; Huang, 2018; Nilsberth, 2001; Suzuki, 1994). Já foram descritas 51 mutações patogênicas no gene da APP, 219 no gene da PS1 e 16 no gene da PS2 (Esquerda-Canals *et al.*, 2017).

A pesquisa sobre a DA envolve várias abordagens metodológicas para entender a fisiopatologia da doença, identificar biomarcadores e desenvolver tratamentos eficazes. Essas metodologias incluem a combinação de diferentes abordagens, como a integração de dados genéticos, neuroimagéticos e clínicos, o que é fundamental para uma compreensão mais completa da doença e para o desenvolvimento de novas terapias (Trentini *et al.*, 2009).

Nesse contexto, é evidenciada a grande necessidade do desenvolvimento de um modelo eficaz para os estudos moleculares e morfológicos dos eventos que desencadeiam a DA. Embora desafiador, dada a dificuldade de se acessar e se mensurar alguns sinais e sintomas complexos associados à DA, o uso de modelos biológicos é fundamental para a compreensão dos mecanismos de patogênese associados à doença e para o delineamento de métodos invasivos de estudo, pois como os efeitos da doença ocorrem em um ambiente biológico dinâmico, modelos experimentais são essenciais para estudá-los de forma integrada, segura e assertiva. Esses fatores ajudam a compreender como a doença se inicia e progride, permitindo a busca por possíveis alvos de intervenção (Drummond E, Wisniewski T, 2017).

Embora modelos animais nunca repliquem completamente a complexidade do cérebro humano, eles são ferramentas indispensáveis para a compreensão e tratamento da DA. Algumas possibilidades de modelos são os roedores, camundongos ou ratos, transgênicos que possuem uma ampla variabilidade de fenótipos mas que muitos ainda não foram totalmente validados, primatas não humanos, que apesar da similaridade com humanos possuem limitações de disponibilidade e custo, e cultura de células que apesar do alto rendimento são de difícil manuseio e não substituem os modelos *in vivo*. Outra possibilidade amplamente utilizada são animais invertebrados transgênicos, como o *C. elegans* e a *Drosophila melanogaster*, que são de fácil manuseio, baixo custo e ciclo de vida curto, sendo que a *D. melanogaster* apresentou maior taxa de sucesso nessa abordagem (Drummond E, Wisniewski T, 2017).

No presente trabalho, foram utilizadas linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster* como modelo animal de pesquisa dos mecanismos fisiopatológicos do Alzheimer (E. Bier, 2005). A *Drosophila melanogaster* é um modelo experimental altamente eficiente para o estudo da DA, pois possibilita investigações detalhadas sobre mecanismos moleculares, alterações comportamentais e triagem de potenciais tratamentos. A combinação de sua facilidade de manipulação genética, que permite expressar genes humanos relacionados à DA, rápida reprodução, que permite testes em larga escala, e ciclo de vida curto, que permite a observação de processos neurodegenerativos em poucas semanas, aliado

ao sistema nervoso bem caracterizado, possibilita avanços significativos na compreensão de doenças neurodegenerativas. Dessa forma, o uso da *Drosophila* é uma ferramenta essencial para a pesquisa sobre a DA (Reiter *et al.*, 2001; Greeve *et al.*, 2004).

1.2 Modelo animal: *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é uma mosca pequena, de aproximadamente 3 mm de comprimento, dotada de listras horizontais de coloração amareladas na região abdominal, caracterizada por metamorfoses completas (inseto holometábolo) ao longo de seu curto ciclo de vida e normalmente encontrada ao redor de frutas em putrefação – por isso, conhecida popularmente como “mosca-da-fruta” (Lynch, El-Sherif e Brown, 2014). Essa mosca foi um dos modelos pioneiros usados para pesquisas na área genética, uma vez que é um organismo de fácil manejo e baixos custos de manutenção. O manejo inclui condições adequadas de temperatura (25°C), umidade (50-70%) e fotoperíodo (12h de luz e 12h de escuridão) para manter a atividade biológica normal das moscas. A alimentação inclui um meio com base ágar, farinha de milho ou batata como fonte de carboidratos, extrato de levedura que fornece proteínas essenciais, xarope de glicose ou sacarose como fonte de energia e antifúngicos (como nipagin ou ácido propiônico) de acordo com a base de dados Bloomington.

A respeito das técnicas de manejo com espécimes, a coleta das moscas sem causar danos, envolve o uso de anestesia com CO₂ ou éter e a manutenção das colônias requer transferência periódica dos adultos para novos frascos para evitar superpopulação e escassez de alimento. A separação de machos e fêmeas pode ser feita com base na morfologia do abdome e presença de órgãos sexuais visíveis (Figura 1) (Govind, R *et al.*, 2021).

Tal inseto possui quatro pares de cromossomos, em que o primeiro par corresponde aos cromossomos sexuais e os outros pares, aos autossômicos. A quantidade de cromossomos X irá determinar o dimorfismo sexual, já que as fêmeas possuem dois (XX) e os machos possuem um (XY) (Yamaguchi M, Yoshida H, 2018).

O ciclo de vida da *D. melanogaster* dura aproximadamente 10 a 12 dias a 25°C, passando por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. A duração desse ciclo pode variar conforme a temperatura. Após a fertilização, os ovos são depositados na superfície do meio de cultura. Eles eclodem em cerca de 24 horas, dando origem às larvas. A larva passa por três instares larvais (L1, L2 e L3), nos quais se alimenta ativamente e cresce rapidamente. Durante essa fase, há intensa divisão celular e crescimento. A larva entra em

metamorfose, formando a pupa, onde ocorre a reorganização celular e desenvolvimento das estruturas adultas, como asas, pernas e olhos compostos. A fase pupal dura cerca de 4 dias. O adulto emerge da pupa (processo chamado ecdise) e, após 8-12 horas, atinge a maturidade sexual (Figura 2). As moscas vivem, em média, 30 a 50 dias, dependendo das condições ambientais e genéticas (Govind, R *et al.*, 2021)..

O uso de *D. melanogaster* como modelo experimental para estudos genéticos remonta ao início do século XX, quando Thomas Hunt Morgan (1866-1945) e sua equipe demonstraram que essa espécie era ideal para investigações sobre hereditariedade e mutações genéticas a partir da descrição de uma mutação que causava alteração fenotípica da cor dos olhos do inseto e com o avanço da biologia molecular e genética, a *Drosophila* passou a ser amplamente utilizada para estudar diversas doenças humanas, incluindo desordens neurodegenerativas como a DA. (Stephenson R, Metcalfe N, 2013) .

Este modelo tem um cérebro complexo, capacidade de aprendizagem e memória, controle motor e um conjunto de comportamentos heterogêneos, além de genoma completamente sequenciado, com extensas ferramentas moleculares e bancos de dados disponíveis. Ademais, a *D. melanogaster* possui um ciclo de vida curto, o que facilita os estudos sobre neurodegeneração e permite a análise de múltiplos indivíduos simultaneamente, possibilitando o desenvolvimento de estudos em larga escala (E. Bier, 2005).

O sistema nervoso da *D.melanogaster* consiste em cerca de 100.000 neurônios e, apesar do cérebro de uma mosca ser anatomicamente diferente de um humano, muitas características-chave do desenvolvimento e função deste sistema são iguais. Isso inclui a biologia celular fundamental, como tráfego de membrana, regulação da expressão gênica e morte celular, que estão presentes em todos os sistemas vertebrados (Stephenson R, Metcalfe NH., 2013).

Outro fato com grande relevância é que 77% dos genes que desencadeiam doenças humanas do banco de dados *Online “Mendelian Inheritance in Man”*, correspondem a sequências ortólogas na *D. melanogaster*. Portanto, esse é um modelo atrativo que permite tanto análises fisiopatológicas, bioquímicas e comportamentais (L Reiter, L Potocki, S Chien, M Gribskov, E Bier, 2001).

A alta compatibilidade genética entre a *D. melanogaster* e os humanos possibilita a modelagem de doenças neurodegenerativas de forma eficiente e fidedigna nos níveis bioquímicos, morfológicos e comportamentais. Além disso, com o advento da engenharia

genética, é possível introduzir ortólogos de genes humanos no inseto para que se possa avaliar os efeitos e as vias envolvidas no processo da doença de forma detalhada, pois a presença de poucos cromossomos possibilita a manipulação rápida e relativamente simples do genoma da *Drosophila*, o que proporciona o desenvolvimento de organismos transgênicos e mutantes que expressam genes humanos (McGurk L, *et al.*, 2015). Assim, tal espécie é um modelo promissor para o estudo das funções e alterações causadas pelo peptídeo β A.

Figura 1 - Diferenças entre machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster*.



Figura 2 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.



1.3 Construção do transgênico

Na tentativa de gerar indivíduos com grande produção do peptídeo β A, diferentes linhagens foram cruzadas, usando o sistema da engenharia genética UAS/GAL-4, identificado em fungos *Saccharomyces cerevisiae* por Brand e Perrimon (1993), a fim de encontrar um modelo satisfatório de DA que possa ser usado para a busca de mecanismos terapêuticos (da Costa Silva JR *et al.*, 2022; Malta *et al.*, 2022).

Tal sistema é utilizado para regular a expressão de genes. O componente Gal4 é um fator de transcrição proteico que tem como alvo as Sequências Regulatórias de Ativação Antecedente (sequências UAS), as quais realizam a regulação de regiões promotoras. Uma vez havendo a interação Gal4-UAS, diversos fatores de transcrição serão recrutados e agirão em conjunto, resultando na expressão do gene sob regulação das sequências UAS de forma controlada, tanto no espaço quanto no tempo. Essa abordagem possibilita a ativação de genes em momentos específicos do desenvolvimento e em tipos celulares determinados (McGurk L, *et al.*, 2015).

A proteína GAL4 se liga a uma sequência específica denominada UAS, elemento cis que se encontra próxima à região promotora do gene de interesse e promove a transcrição. Dessa forma, o mecanismo permite a expressão do gene determinado de maneira tecido específica e em momento específico do ciclo de vida, uma vez que a linhagem, chamada *driver*, que possui o elemento GAL4 no seu genoma seja cruzada com outra linhagem, denominada *responder*, que possui o componente UAS de interesse, obtendo uma geração F1 com ambos os componentes do sistema binário e uma superexpressão do peptídeo de interesse (Busson, D., Pret, AM.,2007; Silva,2022) (Figura 3).

No contexto da DA, a *D.melanogaster* naturalmente possui os elementos das vias amiloidogênica e não amiloidogênica, porém, a expressão do gene APP não é suficiente para desencadear os efeitos neurodegenerativos característicos da DA quando comparado à expressão da APP humana e quantidade da enzima BACE produzida é pequena em relação ao que ocorre na patologia humana (Malta, 2021).

Nesse sentido, utilizando o sistema UAS/GAL4 é possível inserir na *Drosophila* os genes humanos codificantes de APP, BACE e β A, aumentando a similaridade dos efeitos patológicos nos humanos e no modelo, uma vez que a enzima γ -secretase endógena é capaz de clivar o aminoácido resultante da interação entre APP e BACE transgênicas em fragmentos

idênticos aos da via amiloidogênica humana (Tan FHP, Azzam G, 2017). Isso permite avaliar os efeitos fenotípicos e comparar a eficiência do modelo animal na progressão da DA.

Isso posto, fica evidente a relevância da validação das linhagens transgênicas de *D. melanogaster* como modelos de estudo da DA, pois ela combina um genótipo completamente sequenciado que permite amplas modificações genéticas, ciclo de vida curto, que possibilita uma análise de processos associados ao envelhecimento em curto período de tempo, alta reprodutibilidade dos indivíduos, permitindo uma grande amplitude de testes um cérebro complexo com capacidade de aprendizagem e memória. Além disso, a neuroanatomia bem descrita, com sistema nervoso complexo dotado de regiões neurópilas (áreas de densas conexões sinápticas formadas por dendritos compactos, processos de células gliais, ramos axonais não mielinizados e um número relativamente pequeno de corpos celulares; como exemplo, cita-se o lobo óptico, lobo antenal e os corpos em cogumelo) relacionadas à comportamento funcionalmente semelhantes àquelas vistas em vertebrados; e, por fim, a possibilidade de caracterização fenotípica do sistema nervoso de forma fácil e rápida utilizando-se, por exemplo, a análise macroscópica do olho composto (Prüßing, Voigt e Schulz, 2013; Ito *et al.*, 2014; Walters, Manion e Neely, 2019; Mcgurk, Berson e Bonini, 2015).

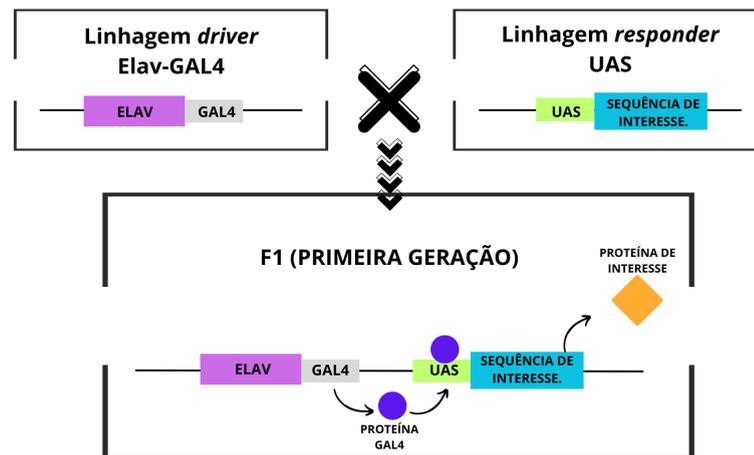
Nesse sentido, um estudo que valide, padronize, otimize organismos modelo eficazes com intensa produção de peptídeo β A é de grande importância e valia, uma vez que, após a comprovação da eficiência do modelo, ele que poderá ser usado para estudos fisiopatológicos e terapêuticos da doença.

Portanto, a fim de avaliar os diferentes aspectos da DA, foram avaliados dois grupos modelos, os quais, através de caminhos diferentes, levam à superexpressão do produto final da via amiloidogênica, o peptídeo β A. O primeiro modelo transgênico conta com genes que expressam a enzima BACE1 e seu substrato APP, que irá permitir o processamento da proteína pela via amiloidogênica. Já o segundo modelo baseia-se na expressão direta de peptídeos humanos A β de 42 aminoácidos nos neurônios da *Drosophila* (Bergkvist L *et al.*, 2016).

Tendo em vista que os dois modelos culminam no desenvolvimento de manifestações fenotípicas semelhantes ao que se entende por DA através de diferentes caminhos, é de se esperar que características como neurodegeneração, acúmulo de peptídeo β A e déficit

locomotor apareçam, também, em diferentes características ao se comparar tais modelos, o que será investigado no presente trabalho.

Figura 3 - Representação do sistema UAS/GAL4



2. Justificativa

A DA é um problema de saúde pública que tende a crescer cada vez mais com o constante aumento da expectativa de vida da população. Ela constitui um grande desafio para os sistemas públicos de saúde ao redor do mundo, não só pelos gastos financeiros implicados, mas também pelos efeitos sociais e na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares. Os custos diretos abrangem despesas com internações, medicamentos, consultas e equipamentos médicos, já que o tratamento do Alzheimer exige cuidados prolongados, devido ao curso lento e irreversível da doença. Os custos indiretos, por outro lado, referem-se à perda de produtividade e ao esgotamento emocional dos familiares, que frequentemente enfrentam problemas de saúde mental e física devido à exigência de cuidados constantes (Wimo *et al.*, 2013). Em termos globais, o custo anual da DA foi estimado em mais de US\$1,3 trilhões em 2019, com projeção de chegar a US\$2.8 trilhões em 2030 (*Alzheimer's Disease International*, 2024).

Reconhecendo a DA como uma prioridade de saúde pública, a OMS propôs um plano de ação global para enfrentar o impacto das doenças neurodegenerativas. Entre as principais recomendações estão o aumento dos investimentos em pesquisa e inovação na área de

demências, incluindo Alzheimer. O objetivo é que governos e organizações invistam mais em pesquisa básica, clínica e de saúde pública, para desenvolver terapias mais eficazes, métodos de diagnóstico precoce e políticas de cuidado. Além disso, a organização sugere que todos os países implementem planos nacionais de ação para combater as demências, focando no apoio aos cuidadores, na capacitação de profissionais de saúde e em campanhas públicas de conscientização. A OMS também destaca a importância da cooperação internacional para o compartilhamento de dados de avanços científicos e tecnológicos, sobretudo entre países com menor capacidade de investigação e infraestrutura de saúde (Organização Mundial de Saúde, 2017).

Em virtude disso, é crucial a busca por um modelo de pesquisa ideal dessa doença, para que tratamentos possam ser testados, a fim de se obter terapias e fármacos que possam ser usados de forma precoce e tenham sucesso na mitigação das graves consequências desta patologia, tanto para o paciente, que carece de manter suas memórias e sua dignidade, quanto para os familiares, que muitas vezes se sentem impotentes diante de tal situação. Com isso, espera-se reduzir não apenas os custos financeiros, mas também o impacto emocional e social desta doença debilitante sobre pacientes, cuidadores e comunidades inteiras.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o aparecimento de manifestações fenotípicas semelhantes ao que se compreende por DA em dois diferentes modelos experimentais obtidos via cruzamentos entre linhagens de *D. melanogaster* transgênica, sendo um modelo caracterizado pela expressão de peptídeo β A neurotóxico e o outro caracterizada pela expressão de genes que codificam a enzima BACE1 humana e seu substrato, a APP;

3.2 Objetivos específicos

- Verificar características histopatológicas do parênquima cerebral nos dois modelos avaliados;
- Verificar níveis de peptídeo β A em pool de amostras nos dois modelos avaliados;
- Verificar a atividade locomotora nos dois modelos avaliados.

4. Metodologia

4.1. Grupos experimentais

As linhagens utilizadas no presente trabalho foram obtidas por meio do Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) e estão relacionadas na Tabela 1, que apresenta os códigos das linhagens nesse banco de dados (#BDSC), o respectivo genótipo e as características fenotípicas, bem como aplicação no presente trabalho. O uso de tais linhagens foi baseado nos trabalhos de Batista e colaboradores (2021), Costa-Silva (2022) e Jonson (2015).

A procura por um modelo assertivo de Alzheimer com grande produção do peptídeo β A se deu através de 3 cruzamentos descritos na Tabela 2, gerando moscas com genótipos Elav-Gal4,UAS-GFP/+;+;+ (controle negativo) que será denominado neste trabalho como Elav-Gal4>UAS-GFP, Elav-Gal4,UAS-GFP/+;UAS-BACE,UAS-APP/+;+, denominado neste trabalho como Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP, e Elav-Gal4,UAS-GFP/+;+;UAS- β A/+, denominadas neste trabalho como Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A (Figura 4). Tais genótipos de interesse foram selecionados dentre as possibilidades das proles descritas na Tabela 2.

Tabela 1: Linhagens utilizadas no presente trabalho, com respectivos códigos no Bloomington, genótipo, características fenotípicas e aplicações.

#BDSC	Genótipo	Fenótipo e aplicação
3605	w^{1118}	W^{1118} , controle negativo de cruzamento.
5146	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155],P{w[+mC]=UAS-mCD8::GFP.L}Ptp4E[LL4],P{ry[+t7.2]=hsFLP}	Elav-Gal4 , expressa Gal4 dirigida aos neurônios (<i>driver</i> Elav) no estágio embrionário, sendo o transgênico inserido no cromossomo X – e por isso utilizou-se apenas as fêmeas dessa linhagem para os cruzamentos. Pode segregar

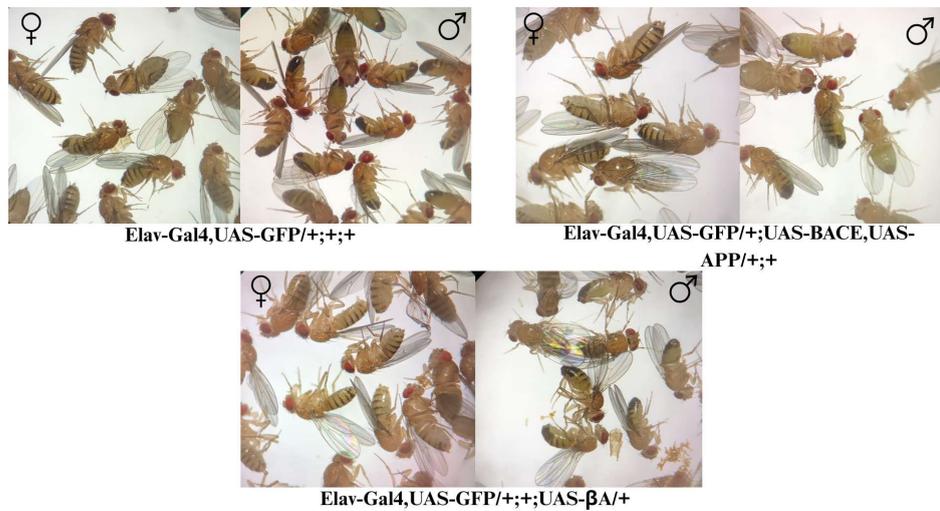
		FM7 e/ou Cyo, balanceadores associados, respectivamente, à presença de olhos reduzidos no eixo horizontal e com concavidade medial na borda superior (formato semelhante a um coração); e à presença de asa curva.
33797	c[1118];P{w[+mC]=UAS-BACE1.Exel}7b, P{w[+mC]=UAS-APP.695.Exel}1/TM6B, Tb[1]	UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP , possui genes que codificam APP e de BACE1 humanas através do transgênico inserido no cromossomo 3. Pode segregar TM6B, balanceador associado à presença de pupa arredonda.
64216	c[*];PBac{y[+mDint2]w[+mC]=UAS-Abeta.1-42}VK00033	UAS-GFP,UAS-βA , possui genes que codificam o peptídeo βA através do transgênico inserido no cromossomo 3. Pode segregar TM3,Sb, balanceador associado à presença de cerdas curtas.

Tabela 2: Cruzamentos a serem realizados e possíveis genótipos da prole (F1), com genótipo de interesse sublinhado

Fêmeas	Machos	F1
BL#5146	BL#3605	<p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w¹¹¹⁸;CyO/+</p> <p><u>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w¹¹¹⁸;+/+</u></p> <p>FM7/w¹¹¹⁸;CyO/+</p> <p>FM7/w¹¹¹⁸;+/+</p>
BL#5146	BL#33797	<p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w*;CyO/UAS-BACE,UAS-APP</p> <p><u>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w*;+/UAS-BACE,UAS-APP</u></p> <p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w*;CyO/TM6,Tb</p> <p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/w*;+/TM6,Tb</p> <p>FM7/w*;CyO/UAS-BACE,UAS-APP</p> <p>FM7/w*;+/UAS-BACE,UAS-APP</p> <p>FM7/w*;CyO/TM6,Tb</p> <p>FM7/w*;+/TM6,Tb</p>
BL#5146	BL#64216	<p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/c*;CyO/UAS-βA</p> <p><u>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/c*;+/UAS-βA</u></p> <p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/c*;CyO/TM3,Sb</p> <p>w*,Elav-Gal4,UAS-GFP/c*;+/TM3,Sb</p> <p>FM7/c*;CyO/UAS-βA</p> <p>FM7/c*;+/UAS-βA</p> <p>FM7/c*;CyO/TM3,Sb</p> <p>FM7/c*;+/TM3,Sb</p>

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Figura 4 - Fenótipos relacionados aos genótipos de interesse.



Após adquiridas, as linhagens passaram por expansão no Laboratório de Genética (LABGEN) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) a fim de se obter matriz para posterior realização dos cruzamentos. Durante a expansão, as moscas permaneceram em frascos de vidro tampados com esponjas que, por sua vez, estiveram alocados em incubadora BOD configurada à temperatura de 25°C, a 60% de umidade relativa e a ciclos de claro/escuro de 12 horas. O alimento, *ad libitum*, consistiu em meio composto por mistura de pó de purê de batata desidratado 75% m/v, extrato de levedura de cerveja 15% m/v, glicose anidra 9,3% m/v e Nipagin 0,07% m/v.

Nos cruzamentos, o sistema UAS/GAL4 foi usado para expressão de genes UAS no décimo segundo estágio do desenvolvimento no tecido cerebral, direcionada por Elav (Brand e Perrimon, 1993; Robinow E White, 1991). Por isso que, após a expansão, apenas fêmeas de fenótipo Elav-Gal4 (BDSC#5146) foram utilizadas nos cruzamentos.

Os casais foram mantidos em frascos pequenos contendo meio de purê de batata desidratado supracitado e descartados após 5 dias. A F1 também foi mantida no mesmo meio.

A escolha do genótipo de interesse foi feita através da análise dos fenótipos, pois os cromossomos balanceadores possuem alelos ou genes dominantes que manifestam características fenotípicas associadas a eles, como a asa curva, relacionada a presença do balanceador CyO, os olhos reduzidos no eixo horizontal e com uma concavidade medial na borda superior, resultando em um formato semelhante a um coração, associado a presença de FM7, a pupa arredonda relacionada ao TM6,Tb e as cerdas curtas relacionadas ao TM3,Sb, de

acordo com o banco de dados *FlyBase*. Esses fenótipos foram analisados com auxílio de uma lupa e as moscas com as respectivas características foram descartadas.

4.2. Análise Histopatológica

Tendo em vista que a presença de placas senis formadas por fibrilas de peptídeos β A é sinal patognomônico de DA e que essas placas acarretam neurodegeneração (Chakraborty R. *et al.*, 2011) e que esta se manifesta na *D. melanogaster* pela presença de lesões vacuolares no parênquima cerebral (Ortiz GG *et al.*, 2015), buscou-se avaliar sinais de neurodegeneração mediada por peptídeos β A no parênquima cerebral dos diferentes grupos experimentais utilizando-se cortes coronais corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para tanto, 10 moscas de cada grupo, sendo 5 machos e 5 fêmeas, com idades de 2, 5, 10 e 15 dias pós-eclosão (d.p.e), foram anestesiadas com éter etílico e fixadas por 24 horas com solução Carnoy (mistura de etanol 99%, clorofórmio e ácido acético glacial na proporção 6:3:1), sendo que o volume da solução foi de 10x o volume da amostra. As amostras passaram por processamento histológico padrão (desidratação com soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, sendo 20 minutos em cada solução; seguida por clarificação com duas soluções de xilol, também por 20 minutos em cada solução; e, finalmente, banho dos tecidos em solução de parafina por 20 minutos para posterior inclusão neste material). Os blocos de parafina foram submetidos a cortes com micrótomo de aproximadamente 4 μ m, os quais foram posteriormente corados com HE por metodologia padrão de coloração (hidratação utilizando-se, na sequência, xilol, soluções decrescentes de álcool etílico e água destilada; seguida por exposição dos cortes aos corantes e montagem das lâminas com goma de Damar). As imagens foram capturadas em um microscópio óptico LEICA modelo DM500 acoplado a uma câmera HD ICC 50 utilizando-se o software LEICA LAS EZ (v1.8.1, Leica Microsystems Limited, Suíça), sob aumento de 100x, 400x e 1000x (Figura 5) (Silva, 2022).

Figura 5 - Esquema ilustrativo dos processos e equipamentos envolvidos na produção das lâminas histológicas.



4.3. Quantificação de β -amilóide

Foram coletados 3 pools de 10 cabeças para cada grupo resultante do cruzamento (triplicata), com idades de 2, 5, 10 e 15 d.p.e, que foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas no ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Após, as cabeças passaram por homogeneização em PBS 1x e depois foram centrifugadas (2 min, 10.000 xg a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Seguindo o protocolo de Westfall *et al.* com modificações, o sobrenadante foi incubado em solução de corante Tioflavina T (ThT) ($20\text{ }\mu\text{M}$) por 20 minutos sob agitação. A fluorescência foi mensurada a 450 nm de excitação/482 nm de emissão e padronizada para amostra única de ThT. A fluorescência total foi corrigida para a quantidade total de proteínas de cada amostra, em que foram normalizados os níveis de amilóide com proteínas totais dosada por Bradford e aos níveis de fluorescência da mosca controle, prevendo que as amostras *in vivo* possam apresentar autofluorescência (Malta, 2022).

4.4. Análise comportamental

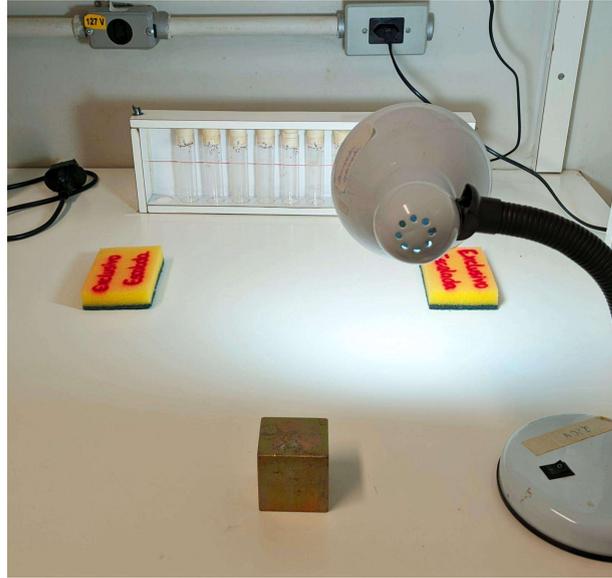
Tendo em vista que a DA se manifesta também a nível comportamental, além da memória, outras funções cognitivas também sofrem declínio, como o raciocínio e as

habilidades visuo-espaciais e práxicas (atos motores voluntários, coordenados e orientados para um objetivo específico, determinados por um contexto), com consequente prejuízo na habilidade de locomoção e desorientação espacial (Araújo, 2021; Hilsabeck *et al.*, 2024; Kelley *et al.*, 2016 Lei *et al.*, 2021; Novellino *et al.*, 2020).

O ensaio RING (*Rapid iterative negative geotaxis*) é uma ferramenta amplamente aceita para avaliar genes ou condições que possam impactar na atividade locomotora da *D. melanogaster* (Batista *et al.*, 2020, Malta *et al.*, 2022). O ensaio avalia o comportamento de “escalada” da mosca, isto é, uma resposta inata de fuga da *D. melanogaster*: quando colocada em recipiente fechado e este sofre agitação, a mosca tende a se movimentar verticalmente contra a gravidade, ao que se entende por "escalada" (Gargano *et al.*, 2005).

Para tanto, realizou-se o protocolo proposto por Gargano e colaboradores (2005), com adaptações. As moscas foram colocadas em tubos transparentes de 9,5 cm de altura por 2,3 cm de diâmetro, os quais foram colocados em raques de madeira, sob condições ambientais controladas, silêncio e em dias não chuvosos. Para aclimatação dos espécimes, as moscas foram expostas a uma fonte de luz a 50cm de distância da raque, durante 20 minutos sob silêncio absoluto (Figura 6). Foi posicionada uma câmera em gravação e a raque foi batida três vezes, com avaliações por minuto, seguidas de 1 minuto de intervalo, o que foi repetido 5 vezes. Após, foram analisadas quantas moscas tiveram sucesso na escalada de 5cm ou mais em decorridos 4 (160 *frames*) e 18 segundos (720 *frames*) desde a última batida da raque. O experimento foi gravado e os vídeos analisados com o *software QuickTime Player 7.7.9*. Para esse teste, foram usadas 30 moscas, sendo 15 machos e 15 fêmeas, provenientes de cada cruzamento, com intervalos de 2 a 4, 5 a 7, 10 a 12 e 15 a 17 d.p.e, com triplicata de cada grupo (Gargano JW *et al.*, 2005; da Costa Silva JR *et al.*, 2022).

Figura 6- Materiais utilizados na execução do ensaio RING. A linha vermelha indica a marca de 5cm.



4.5. Análise estatística

As análises estatísticas do teste RING foram feitas através do *software GraphPad Prism 8.0.2* usando o teste *Two-way ANOVA* e o teste *Tukey's multiple comparisons* como *post hoc* após resultado positivo no teste de normalidade atestado pelo teste Shapiro-Wilk, através dos quais os dados foram considerados paramétricos (da Costa Silva JR *et al.*, 2022).

As análises do experimento de quantificação de β -amilóide também foram feitas com o *software GraphPad Prism 8.0.2* usando o teste *One-way ANOVA* através do Kruskal-Wallis e o *Dunn's multiple comparisons* como teste *post hoc*, após os dados serem considerados como não paramétricos pelo teste Shapiro-Wilk (Malta, 2022).

Foi considerado para ambas as análises * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5. Resultados

5.1 Ambos os modelos de DA desenvolvidos em *D. melanogaster* apresentaram lesões vacuolares no parênquima cerebral

A fim de avaliar o desempenho dos grupos modelo para DA a nível morfológico, foram avaliadas lâminas histológicas contendo cortes do plano horizontal do cérebro dos grupos Elav-Gal4>UAS-GFP, Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP e Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A nas idades de 2,5,10 e 15 d.p.e. Nos cortes foram analisadas

presença de vacúolo nos corpos de cogumelo e nos lobos oculares do cérebro desses insetos (Figura 7). Para possibilitar a comparação entre os grupos, cada imagem possui lado a lado as imagens histológicas dos grupos analisados e as respectivas idades de análise (Figura 8).

Figura 7- Anatomia do Sistema Nervoso da *Drosophila melanogaster*

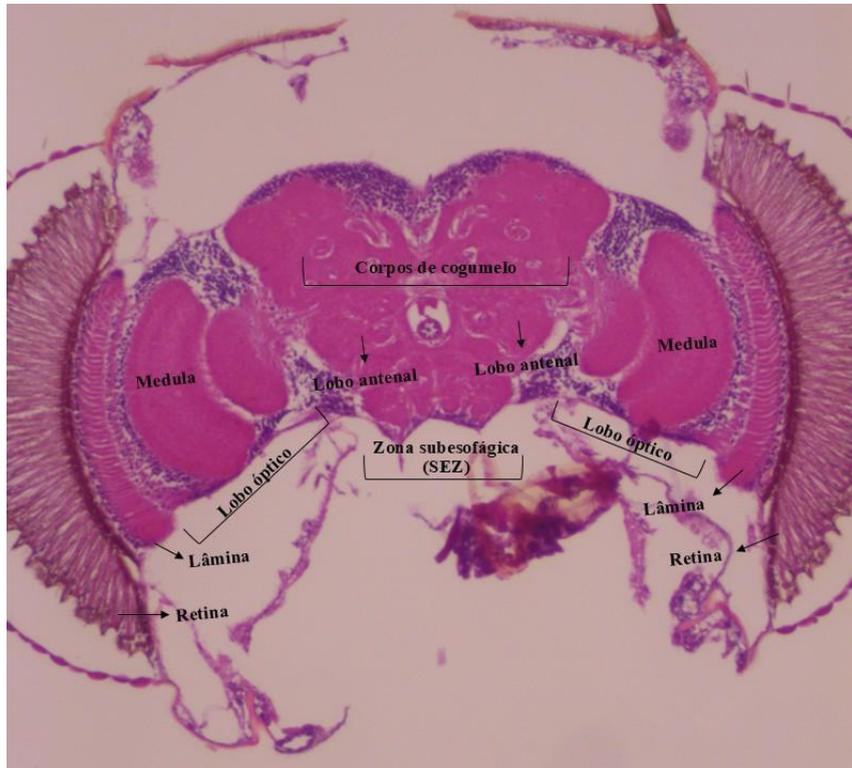
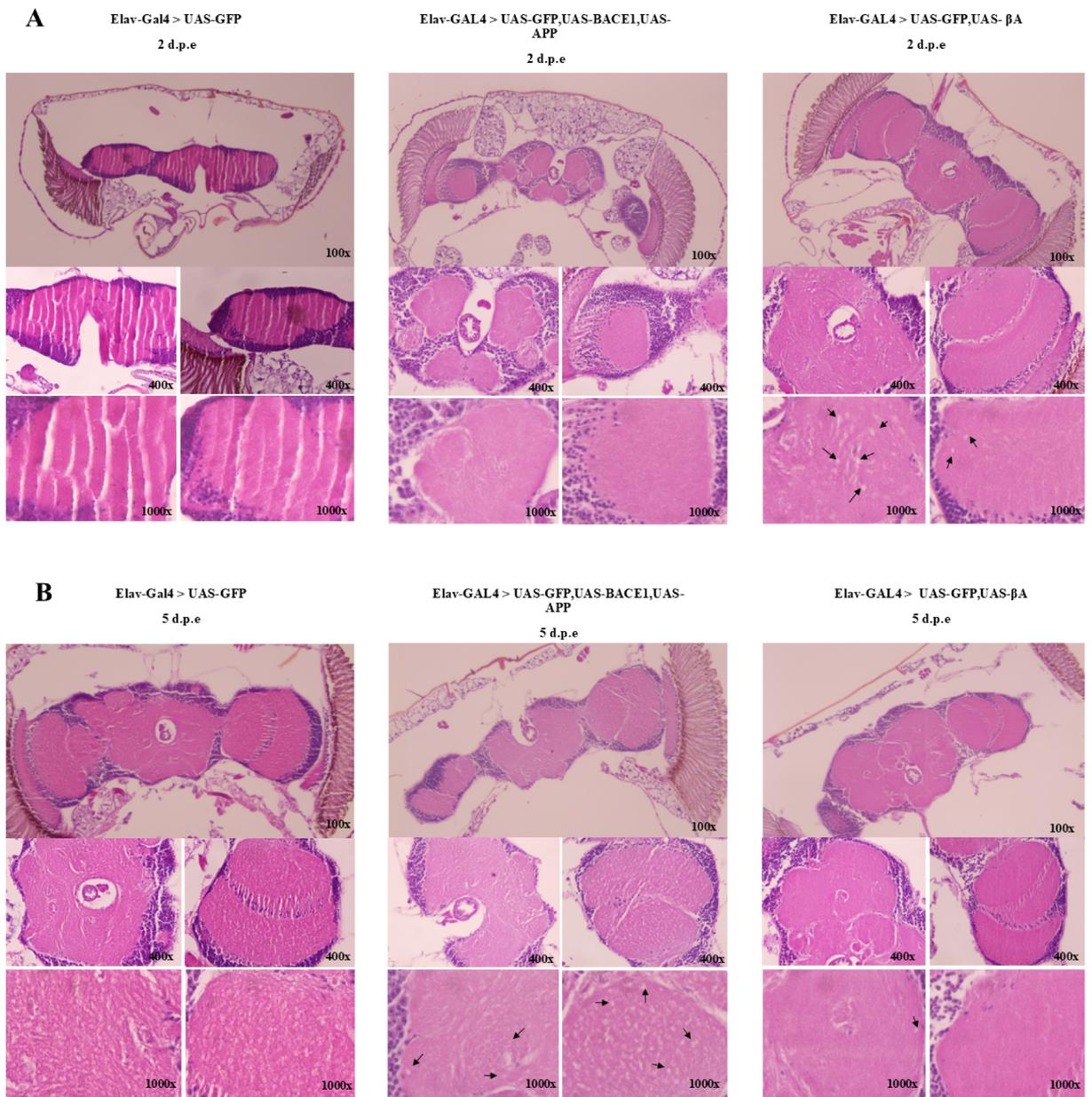
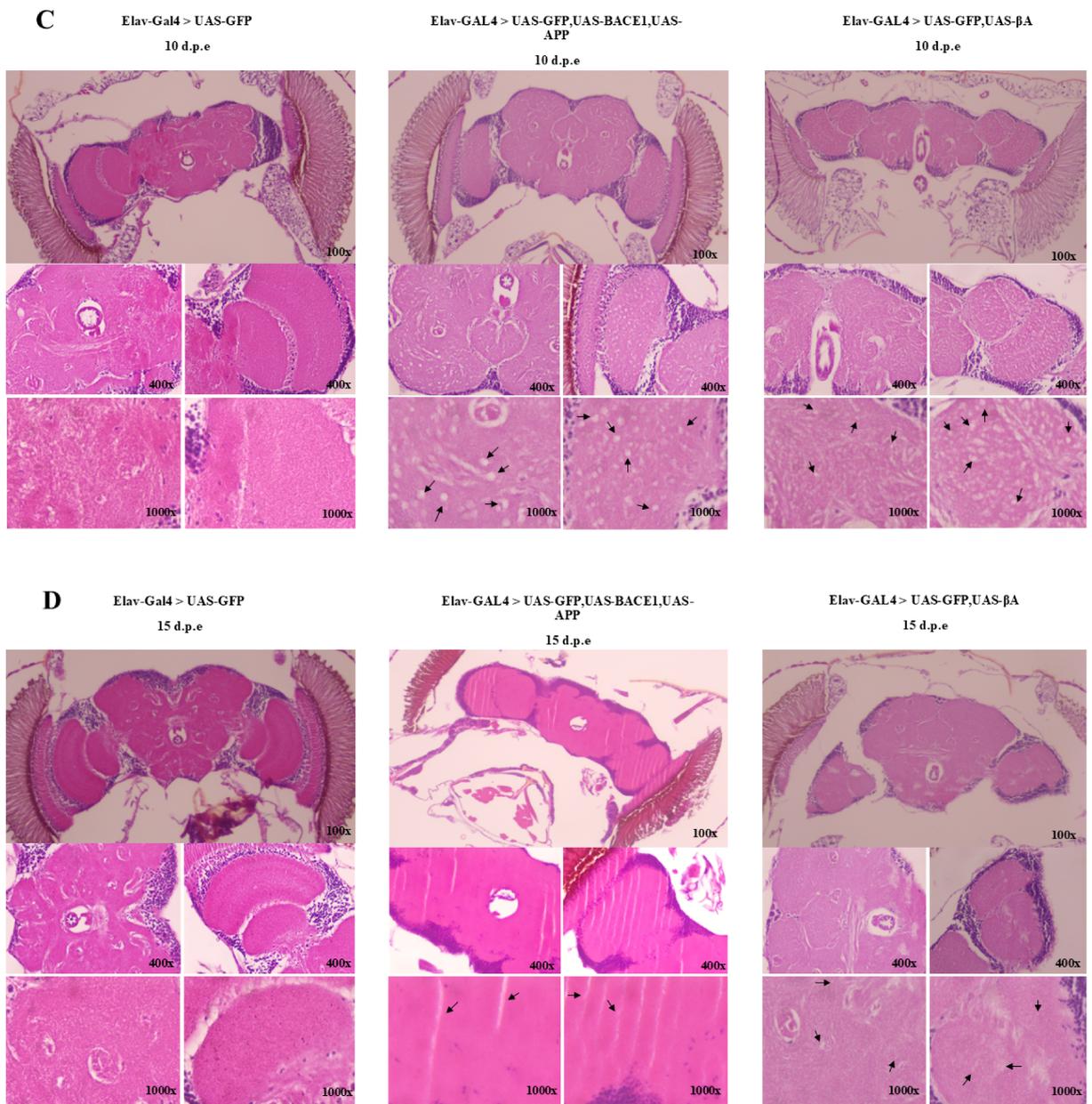


Figura 8 - Comparação de imagens histológicas do cérebro das moscas dos grupos *Elav-Gal4>UAS-GFP*, *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP* e *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA* em 2, 5, 10 e 15 d.p.e





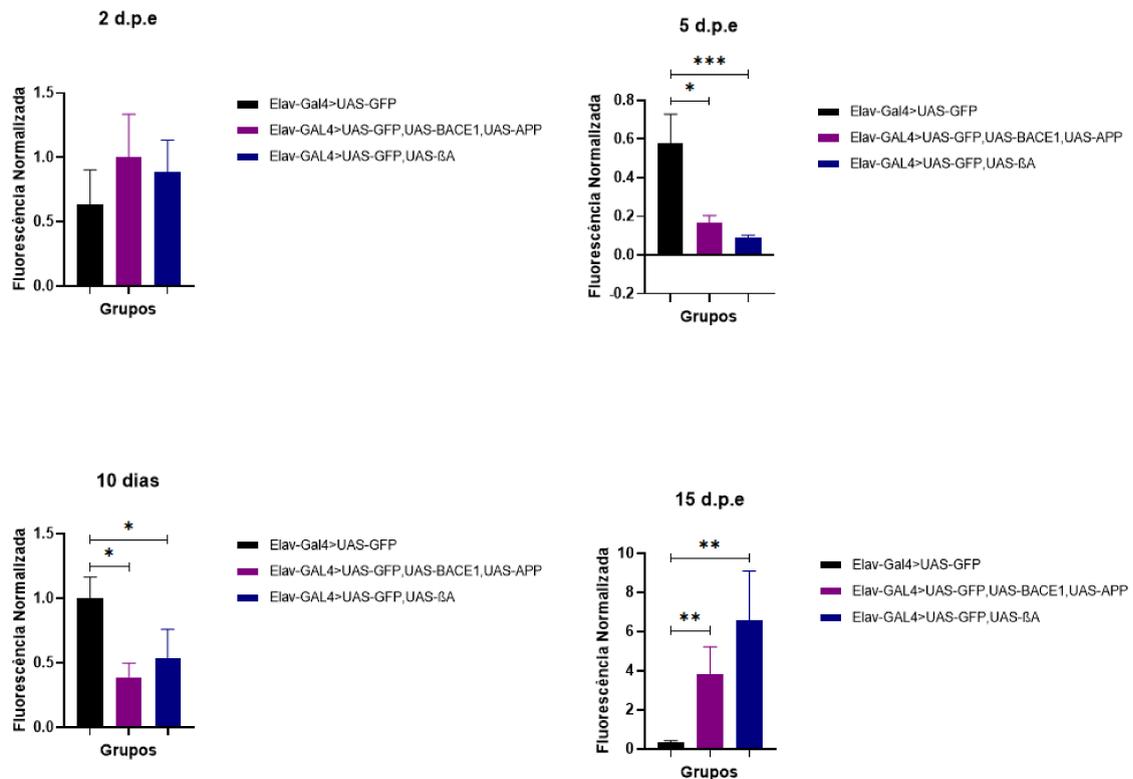
Legenda: As imagens histológicas foram agrupadas em trios seguindo a ordem grupos Elav-Gal4>UAS-GFP , Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP e Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA para comparação. (A) imagens das moscas com 2 d.p.e (B) 5 d.p.e (C) 10 d.p.e e (D) 15 d.p.e

Ambos os modelos de DA apresentaram vacúolos no lobo óptico e nos corpos de cogumelo, o que indica que os modelos de DA construídos em *D. melanogaster* são satisfatórios em manifestar uma importante característica associada a essa doença. Observou-se que os indivíduos que expressam peptídeo β A (grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A) têm degeneração precoce, já a 2 d.p.e, em relação aos indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP), o qual, visualmente, apresentou quantidade expressiva de vacúolos em 5 e 10 d.p.e. O grupo controle negativo (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP), como esperado, não apresentou vacúolos nas diferentes idades.

5.2 Ambos os modelos de DA desenvolvidos em *D. melanogaster* apresentaram aumento significativo da quantidade de peptídeo β A à 15 d.p.e

A fim de avaliar e comparar o desempenho dos organismos modelo da DA a nível molecular, foi feita a quantificação do peptídeo β A através do ensaio de fluorescência com ThT de amostras dos grupos Elav-Gal4>UAS-GFP, Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP e Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A nas idades de 2,5,10 e 15 d.p.e. Os dados foram plotados no *Graph Pad Prism* e a taxa de fluorescência normalizada foi avaliada (Figura 9).

Figura 9 - Quantificação de β -amilóide com ThT - One-Way ANOVA



Legenda: Quantificação de β -amilóide em pool de amostras dos diferentes grupos experimentais a 2, 5, 10 e 15 DPE. As barras representam Média \pm Erro Padrão. As barras pretas representam indivíduos saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, controle negativo). As barras roxas representam modelo de DA caracterizado pela expressão concomitante de BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP). As barras azuis se referem aos indivíduos que expressam peptídeo β A (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS- β A). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais à 2 d.p.e. O grupo controle apresentou aumento significativo de β A em comparação com os modelos de DA a 5 e a 10 d.p.e. Já a 15 d.p.e, houve aumento significativo de β A em ambos os modelos de DA comparado com o controle saudável. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$. d.p.e: Dias após a eclosão.

De acordo com esses resultados, é possível observar que a variação das médias de fluorescência foi alta, com valores para o grupo controle negativo acima do esperado, e quando se compara os dois grupos de organismos modelo de Alzheimer, o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP apresentou maior média de fluorescência nas idades de 2 e 5 d.p.e e o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A apresentou maior média nas idades de 10 e 15 d.p.e, conforme a Tabela 3. Foi possível observar diferença significativa na comparação do grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP ($p=0,0247$) e com o grupo

Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A ($p=0,0003$) na idade de 5 d.p.e, sendo que a fluorescência do grupo controle foi maior em ambas as comparações.

Também houve significância estatística na idade de 10 d.p.e na comparação do grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP ($p=0,0256$) e com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A ($p=0,0207$), repetindo o padrão da maior fluorescência no grupo controle. Na idade de 15 d.p.e, houve significância estatística na comparação do grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP ($p=0,0062$) e com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A ($p=0,0042$), mas com a fluorescência do grupo controle sendo notoriamente menor que a dos modelos de Alzheimer (Tabela 4).

Tabela 3 - Média \pm EPM (erro padrão médio) da quantificação de β -amilóide

Grupos experimentais F1	Idades			
	2 d.p.e	5 d.p.e	10 d.p.e	15 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP	0,63 \pm 0,26	0,57 \pm 0,15	1,00 \pm 0,16	0,33 \pm 0,09
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP	1,00 \pm 0,33	0,16 \pm 0,03	0,38 \pm 0,10	3,79 \pm 1,42
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS- β A	0,88 \pm 0,24	0,09 \pm 0,01	0,53 \pm 0,22	6,56 \pm 2,52

Legenda: Média \pm Erro padrão da quantificação de β A em pool de amostras de indivíduos saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP) e de dois modelos de DA, sendo: indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e indivíduos que expressam peptídeo β A (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS- β A). d.p.e = dias após a eclosão.

Tabela 4 - Valores de p para comparações da quantificação de β -amilóide entre os grupos avaliados por idades - One-way ANOVA

Comparativos entre os grupos experimentais F1	Idades			
	2 d.p.e	5 d.p.e	10 d.p.e	15 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP vs Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP	ns ($p = 0,7435$)	* ($p = 0,0247$)	* ($p = 0,0256$)	** ($p = 0,0062$)

Elav-Gal4>UAS-GFP vs	ns	***	*	**
Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA	($p = 0,6270$)	($p = 0,0003$)	($p = 0,0207$)	($p = 0,0042$)
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA				
CE1,UAS-APP vs	ns	ns	ns	ns
Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA	($p \geq 0,9999$)	($p = 0,4802$)	($p \geq 0,9999$)	($p \geq 0,9999$)

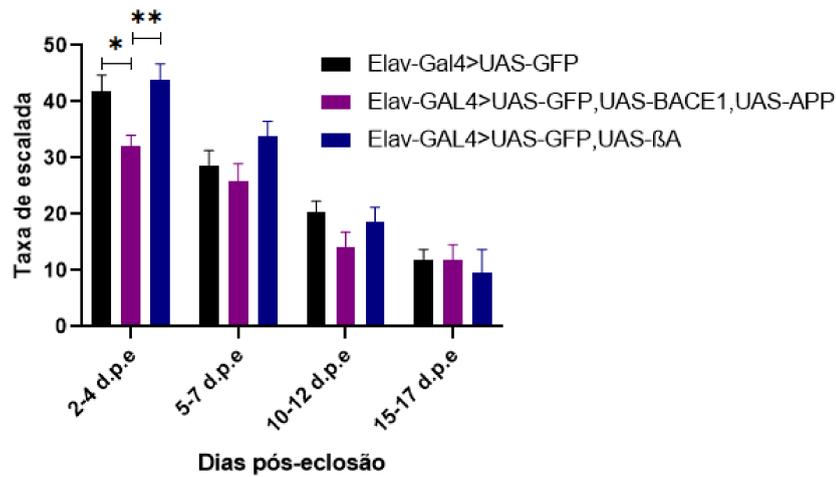
Legenda: Valores p da comparação da quantificação de βA em pool de indivíduos saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP) e de dois modelos de DA, sendo: indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e indivíduos que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA). d.p.e = dias após a eclosão. One-way ANOVA com pós-teste de Dunn. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e ns = não significativo

5.3 Indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas apresentaram diminuição significativa da taxa de escalada.

A fim de avaliar o desempenho dos grupos modelo para DA a nível comportamental, foram comparadas as taxas de escalada do grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP, a qual possui genes que codificam a enzima BACE humana e de seu substrato (APP), e do grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA, a qual possui o gene que codifica o peptídeo βA, entre si e com o grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, que representa o controle negativo. A comparação foi feita com moscas machos e fêmeas, nas idades de 2-4, 5-7, 10-12, 15-17 d.p.e, analisando 4 segundos e 18 segundos de escalada com o teste *Two-way* ANOVA de múltiplas comparações.

Na análise de 4 segundos (Figura 10), foi observado que o grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP teve maior média de escalada e dentre os modelos de alzheimer, o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP teve uma média menor de escalada quando comparado ao Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA, conforme a Tabela 5. Também foi possível observar uma diferença significativa na idade de 2-4 d.p.e, em que a taxa de escalada do grupo controle foi significativamente maior que o modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP ($p = 0,0101$). Houve significância estatística, também nessa idade, entre os dois modelos de Alzheimer, sendo que o modelo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP contou com menor taxa de escalada quando comparado ao Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA ($p = 0,0066$). Não houve diferença significativa entre as demais comparações, conforme a Tabela 6.

Figura 10- Taxas de escalada do grupo controle e modelos Alzheimer (4s)



Legenda: Taxas de escalada de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, controle negativo, representado em preto), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP, representado em roxo) e que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA, representado em azul). Observou-se diminuição significativa da taxa de escalada em indivíduos do grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP em comparação com os demais a 2-4 d.p.e. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas demais idades. As barras representam Média ± Erro Padrão. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$. d.p.e: Dias após a eclosão.

Tabela 5 - Média ± EPM (erro padrão médio) da taxa de escalada (4s)

Grupos experimentais F1	Idades			
	2-4 d.p.e	5-7 d.p.e	10-12 d.p.e	15-17 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP	41,76 ± 2,93	28,63 ± 2,66	20,45 ± 1,84	11,96 ± 1,77
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP	32,11 ± 1,91	25,92 ± 2,99	14,24 ± 2,58	11,85 ± 2,74
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-βA	43,93 ± 2,81	33,88 ± 2,62	11,85 ± 2,74	9,69 ± 4,02

Legenda: Média ± Erro padrão das taxas de escalada a 4 segundos de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, controle negativo), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA, representado em azul). d.p.e = dias após a eclosão.

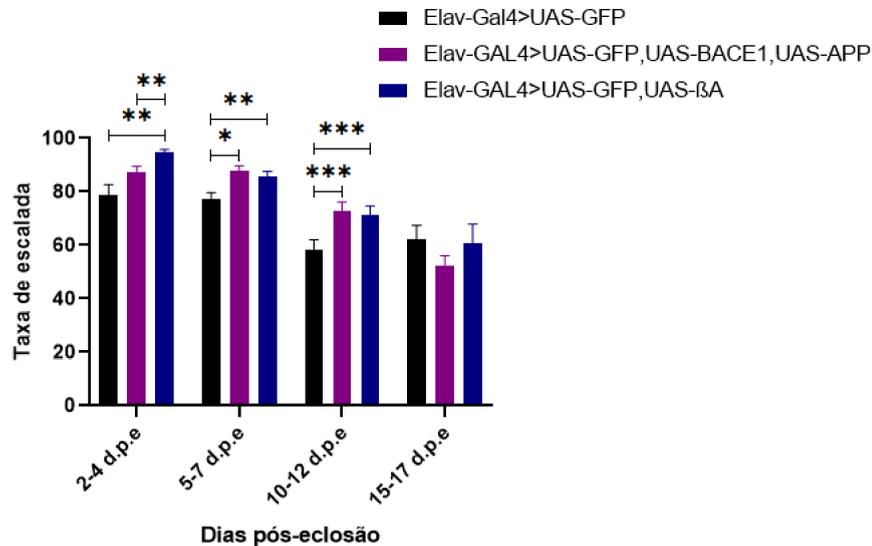
Tabela 6 - Valores de p para comparações de atividade locomotora entre os grupos avaliados por idades (4s) - Two-way ANOVA

Comparativos entre os grupos experimentais F1	Idades			
	2-4 d.p.e	5-7 d.p.e	10-12 d.p.e	15-17 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP vs Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP	*	ns	ns	ns
	(<i>p</i> = 0,0101)	(<i>p</i> = 0,7825)	(<i>p</i> = 0,0620)	(<i>p</i> = 0,9991)
Elav-Gal4>UAS-GFP vs Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA	ns	ns	ns	ns
	(<i>p</i> = 0,5931)	(<i>p</i> = 0,3333)	(<i>p</i> = 0,6952)	(<i>p</i> = 0,8485)
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP vs Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA	**	ns	ns	ns
	(<i>p</i> = 0,0066)	(<i>p</i> = 0,1975)	(<i>p</i> = 0,4939)	(<i>p</i> = 0,8789)

Legenda: Valores p da comparação das taxas de Escalada a 4 segundos de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, controle negativo), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA, representado em azul). DPE = dias após a eclosão. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * = *p* < 0,05, ** = *p* < 0,01 e ns = não significativo. d.p.e: Dias após a eclosão.

Na análise de 18s (Figura 11), o grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP teve uma taxa de escalada abaixo do esperado e dentre os grupos modelo de Alzheimer, o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP, assim como na análise de 4 segundos, contou com menores médias de escalada quando comparado com o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA, conforme a Tabela 7. Também foi possível observar diferenças significativas entre a taxa de escalada do grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP e do grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA em 2-4 d.p.e (*p*=0,0030), 5-7 d.p.e (*p*=0,0017) e 10-12 d.p.e (*p*=0,0006), sendo que o grupo controle negativo obteve menor taxa de escalada nessas idades. Além disso, houve diferença significativa entre o grupo controle negativo Elav-Gal4>UAS-GFP e o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP nas idades de 5-7 d.p.e (*p*=0,0169) e 10-12 d.p.e (*p*=0,0003) sendo que o grupo controle obteve menores taxas de escalada nessas idades. Entre os dois modelos de Alzheimer só houve diferença significativa na idade 2-4 d.p.e (*p*=0,0044), em que o grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP teve menores taxas de escalada. Não houve diferença significativa entre as demais comparações, conforme a Tabela 8.

Figura 11 - Taxas de escalada do grupo controle e modelos Alzheimer (18s)



Legenda: Taxas de escalada a 18 segundos de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, controle negativo, representado em preto), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP, representado em roxo) e que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA, representado em azul). Observou-se aumento significativo da taxa de escalada de ambos os modelos de DA em comparação com o controle a 2-4 d.p.e, 5-7 d.p.e e 10-12 d.p.e. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre três grupos experimentais a 15-17 d.p.e. Os dois modelos de Alzheimer apresentaram diferenças entre si apenas a 2-4 d.p.e; já nos demais intervalos, a comparação entre esses dois grupos, especificamente, não constatou diferenças estatisticamente significantes. As barras representam Média ± Erro Padrão. Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$. d.p.e: Dias após a eclosão.

Tabela 7- Média ± EPM (erro padrão médio) da taxa de escalada (18s)

Grupos experimentais	Idades			
	2-4 d.p.e	5-7 d.p.e	10-12 d.p.e	15-17 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP	78,66 ± 4,06	77,47 ± 2,15	58,20 ± 3,84	62,32 ± 5,14
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP	87,35 ± 2,09	87,99 ± 1,67	72,84 ± 3,29	52,07 ± 3,93
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-βA	94,83 ± 0,98	85,66 ± 1,91	71,12 ± 3,48	60,83 ± 7,13

Legenda: Média ± Erro padrão das taxas de escalada a 18 segundos de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e que expressam peptídeo βA (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-βA). d.p.e = dias após a eclosão.

Tabela 8 - Valores de p para comparações de atividade locomotora entre os grupos avaliados por idades (18s) - Two-way ANOVA

Comparativos entre os grupos experimentais	Idades			
	2-4 d.p.e	5-7 d.p.e	10-12 d.p.e	15-17 d.p.e
Elav-Gal4>UAS-GFP vs Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP	ns ($p = 0,1594$)	* ($p = 0,0169$)	*** ($p = 0,0003$)	ns ($p = 0,1645$)
Elav-Gal4>UAS-GFP vs Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS- β A	** ($p = 0,0030$)	** ($p = 0,0017$)	*** ($p = 0,0006$)	ns ($p = 0,9886$)
Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BA CE1,UAS-APP vs Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS- β A	** ($p = 0,0044$)	ns ($p = 0,7040$)	ns ($p = 0,8675$)	ns ($p = 0,6539$)

Legenda: Valores p da comparação das taxas de Escalada a 18 segundos de indivíduos da geração F1 saudáveis (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP), que expressam ambas BACE1 e APP humanas (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS-BACE1, UAS-APP) e que expressam peptídeo β A (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP, UAS- β A). Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e ns = não significativo. d.p.e: Dias após a eclosão.

6. Discussão

O presente estudo buscou validar modelos experimentais *in vivo* para o estudo da DA utilizando cruzamentos entre diferentes linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, analisou-se a atividade locomotora, as características estruturais do parênquima cerebral e a deposição de β A dos indivíduos F1 gerados a partir desses cruzamentos. A DA é uma injúria de prevalência crescente e, por isso, considerada prioridade de saúde pública pela OMS (*Alzheimer's Disease International; World Health Organization, 2022*). Por isso, a busca por modelos animais que permitam uma melhor compreensão de suas complexidades é de extrema relevância, especialmente quando construídos em *Drosophila*, organismo que oferece diversas vantagens, como a possibilidade de manipulações genéticas que simulam aspectos da patologia de interesse de forma mais controlada e econômica; e o ciclo de vida estreito, o que favorece análises de alterações ligadas ao envelhecimento em um curto período de tempo e, portanto, atrativo para estudos sobre injúrias neurodegenerativas (E. Bier, 2005).

A presença de lesões vacuolares no parênquima cerebral é um sinal de neurodegeneração na *D.melanogaster* (Ortiz GG *et al.*, 2015). Ainda que iniciando em diferentes idades, sendo o aparecimento precoce nos indivíduos que expressam peptídeos β A (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS- β A) em comparação aos indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP), o qual, visualmente apresentou maior presença de vacúolos a partir de 5 d.p.e, observou-se vacúolos no parênquima cerebral dos dois modelos de DA avaliados neste trabalho, o que mostra que os dois modelos são satisfatórios em reproduzir uma importante manifestação fenotípica associada à DA. Como esperado, indivíduos saudáveis (grupo controle negativo, Elav-Gal4>UAS-GFP), não apresentaram vacúolos em diferentes idades. Tal degeneração nos corpos de cogumelo e nos lobos ópticos da *Drosophila melanogaster* são de extrema importância para a fisiopatologia da DA, já que os corpos de cogumelo são estruturas associadas à memória e ao aprendizado e os lobos ópticos abrigam neurônios relacionados à visão (*Drosophila for Biology Courses*, 2021).

Durante o processamento das amostras para histologia, houve problemas com as amostras de Elav-Gal4>UAS-GFP com 2 d.p.e e com a coloração da amostra de Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP com 15 d.p.e. Tais problemas podem estar relacionados à temperatura da parafina no momento da inclusão, pois o tecido cerebral é particularmente sensível à desidratação térmica (Fischer, A. H., *et al.* 2008). Essa seria uma hipótese para explicar o problema somente nesses dois grupos, pois cada grupo foi incluído individualmente em blocos e uma vez que os passos iniciais não tenham sucesso, o tecido não reagirá bem às colorações como HE.

A ThT é um corante fluorescente amplamente utilizado para a detecção e quantificação de fibrilas com estrutura rica em folhas β , especialmente fibrilas amilóides, porém não é específica para o peptídeo β A (Matthew B., Shohei K., 2010). Neste estudo, ao observar as comparações entre os resultados com significância estatística da quantificação de β A entre os grupos, o grupo controle Elav-Gal4>UAS-GFP teve uma fluorescência maior do que os grupos modelos de DA, o que foi inesperado. Uma das possíveis explicações para esse fato é que a ThT não é um corante específico para peptídeo β A, ela pode se ligar a outras proteínas com estrutura de folhas β (Matthew B., Shohei K., 2010), o que seria uma possível explicação para a alta fluorescência do grupo controle.

Outro fator a ser considerado é a possível interferência de outros compostos presentes no ambiente celular que podem competir pela ligação com a ThT. O grupo controle, ao não

apresentar as mesmas condições patológicas, pode ter um ambiente mais favorável para a interação da ThT com as fibrilas de β A, resultando em maior fluorescência (Gao *et al.*, 2018). Nesse sentido, na idade de 15 d.p.e, com envelhecimento dos dois grupos, o grupo controle contou com uma fluorescência significativamente mais baixa que os grupos modelos de DA, indicando que após as alterações decorrentes do envelhecimento, houve uma melhor interação entre a ThT e os compostos fibrilares já organizados nos grupos modelos de DA. Com isso, foi possível observar uma maior fluorescência no grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A, indicando uma maior quantidade de peptídeo β A neste grupo, o que condiz com a fisiopatologia da doença humana, já que nas idades mais avançadas, a gravidade da DA aumenta, assim como seus efeitos, decorrentes do crescente acúmulo de peptídeo β A em placas e a consequente neurodegeneração, evidenciada também nas análises histopatológicas deste estudo.

Os dados obtidos com o ensaio de Geotaxia Negativa corroboram com estudos anteriores, como Costa Silva e colaboradores, 2022 e Malta e colaboradores, 2022): esses pesquisadores também observaram redução na média de escalada em indivíduos que expressam ambas BACE1 e APP humanas (neste trabalho, referido como grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP). Essa é uma característica intimamente relacionada à DA, já que a neurodegeneração leva a prejuízos na função locomotora e estes se tornam mais pronunciados com o acúmulo de placas senis (Novellino *et al.*, 2020). No entanto, os resultados do presente estudo apresentaram algumas divergências, como a redução estatisticamente significativa na taxa de escalada à 2-4 d.p.e na avaliação à 4s desse grupo quando comparado ao controle (grupo Elav-Gal4>UAS-GFP), sendo que nos estudos supracitados essa redução ocorreu de forma mais tardia, além de que usaram somente machos no ensaio. No entanto, não houve diferenças significativas em outras idades. Já na avaliação da escalada à 18s, esse mesmo grupo apresentou aumento significativo da taxa de escalada em comparação aos indivíduos do grupo controle para os intervalos 2-4, 5-7, e 10-12 d.p.e, e tal padrão também foi observado nos indivíduos que expressavam peptídeos β A (grupo Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS- β A) (da Costa Silva JR *et al.*, 2022; Malta *et al.*, 2022).

O fato da média de escalada do grupo controle ter sido menor pode ser explicado pelo uso de machos e fêmeas nesta pesquisa e somente de machos nos estudos anteriores, pois as fêmeas podem apresentar hormônios ou podem estar carregando uma prole, o que pode interferir no padrão de escalada (Ye Changtian, *et al.*, 2023). Isso posto, de modo geral, a redução da taxa de escalada dos modelos de *Drosophila* para DA é um análogo

comportamental de déficits motores e cognitivos observados em humanos com DA (Prüßing K, *et al.*, 2013)

Por fim, é válido ressaltar que o presente trabalho é o primeiro a comparar a atividade locomotora entre dois diferentes modelos de DA construídos em *D. melanogaster*, não tendo sido constatada diferenças estatisticamente significantes ao comparar a taxa de escalada do intervalo de 5-7 à 15-17 d.p.e em 4 ou 18 segundos desses indivíduos, o que indica que ambos os modelos podem ser aplicados na avaliação de fenótipo de redução da atividade locomotora apresentado na DA. À 2-4 d.p.e em 4 e em 18 segundos, entretanto, o grupo que expressa ambas BACE1 e APP humanas apresentou taxa de escalada significativamente menor em comparação ao modelo que expressa peptídeo β A, o que indica que a expressão concomitante de BACE1 e APP humanas em *D. melanogaster* está associada a déficit locomotor precoce e mais intenso.

A integração das análises morfológica, molecular e comportamental em diferentes idades do modelo neste estudo permitiu uma avaliação abrangente da progressão neurodegenerativa nos dois modelos transgênicos de *Drosophila melanogaster* para DA. As análises histológicas foram essenciais para o estudo ao evidenciar degeneração vacuolar no tecido cerebral dos grupos modelos, servindo como marcador morfológico da neurodegeneração. A quantificação molecular do peptídeo β A por meio da ThT possibilitou a detecção do acúmulo de agregados proteicos ricos em folhas β , característicos da via amiloidogênica, validando a presença do fenótipo molecular da doença. O teste RING corrobora esses achados ao identificar alterações no comportamento locomotor associadas à disfunção neuronal, revelando diferenças temporais e de intensidade entre os grupos, o que reflete o comprometimento motor observado clinicamente em pacientes com Alzheimer (Zidan, M, *et al.*, 2012).

A correlação entre os três níveis de análise fortalece a validade dos modelos utilizados, permitindo concluir que ambos reproduzem características fundamentais da patologia, ainda que com padrões distintos de início e progressão da toxicidade neuronal. Esse tipo de abordagem integrada é crucial, pois fornece múltiplas evidências convergentes sobre os mecanismos patológicos da DA, permitindo uma comparação mais robusta entre diferentes estratégias genéticas de indução da doença.

Possíveis passos futuros do presente estudo incluem testes como *life span* para análise de sobrevivência, testes estatísticos de regressão linear no ensaio RING para avaliar também a

velocidade da progressão da DA e ensaios de memória, como *Y-maze*, além de uma investigação de marcadores de estresse oxidativo. Também se sugere a padronização do uso de apenas um sexo ou a separação de machos e fêmeas nas análises, a fim de reduzir a variabilidade hormonal e reprodutiva observada, especialmente nas respostas locomotoras, e avaliar como o sexo influencia no fenótipo do modelo separadamente. A longo prazo, o desenvolvimento de análises comportamentais mais complexas e o uso de abordagens ômicas (transcriptômica e proteômica) poderão oferecer uma visão ainda mais detalhada dos efeitos sistêmicos da DA nos modelos transgênicos, contribuindo para a identificação de novos alvos terapêuticos e biomarcadores da doença. Assim, será possível avaliar o comportamento de compostos neuroprotetores ou inibidores da via amiloidogênica, utilizando os modelos validados como plataforma de triagem farmacológica.

7. Conclusão

O presente trabalho buscou validar e otimizar modelos transgênicos de *Drosophila melanogaster* como ferramentas alternativas no estudo da DA, diante da crescente demanda por modelos experimentais mais acessíveis, éticos e eficientes. A partir das análises comportamentais, histológicas e bioquímicas realizadas, foi possível observar que os dois modelos testados, *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA* e *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP*, apresentaram fenótipos compatíveis com manifestações características da DA, como comprometimento locomotor, degeneração vacuolar no tecido cerebral e grande quantidade do peptídeo βA.

Embora alguns resultados inesperados tenham sido observados, como a maior fluorescência da ThT no grupo controle em determinadas idades e maior taxa de escalada do grupo controle em algumas idades, esses achados foram discutidos à luz de variáveis experimentais relevantes, como a presença de agregados não fibrilares em estágios precoces da doença, que são menos detectáveis pela ThT e o uso de ambos os sexos. Tais fatores reforçam a complexidade da DA e evidenciam a necessidade de análises multifatoriais na validação de modelos experimentais.

De maneira geral, os dados obtidos indicam que os dois modelos são viáveis para estudos de DA em *Drosophila*, sendo o modelo *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP* mais sensível para avaliar o início precoce da disfunção locomotora, enquanto o modelo *Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-βA* demonstrou

um padrão mais precoce de degeneração morfológica, além de uma maior quantidade de peptídeo β A na maior idade avaliada. Assim, ambos os modelos podem ser utilizados de forma complementar a critério da exigência de cada pesquisa, pois o modelo $\text{Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-BACE1,UAS-APP}$ conta com a expressão de genes da enzima BACE humana e seu substrato, a APP, que será clivada de forma a produzir o peptídeo β A e o modelo $\text{Elav-GAL4>UAS-GFP,UAS-}\beta\text{A}$ conta com o gene do próprio peptídeo β A neurotóxico, portanto, ambos os modelos levam ao produto final da via amiloidogênica, porém de formas distintas. Tal fato contribui significativamente para o entendimento dos mecanismos envolvidos na DA, além de representar uma alternativa eficiente e economicamente viável para triagem de compostos terapêuticos.

9. Referências

- Alzheimer's Disease International. 2024. **World Alzheimer Report 2024: Global changes in attitudes to dementia.** Londres, Inglaterra. Disponível em: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2024/>. Acesso em: 13/10/2024
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ARAÚJO, Eduardo Gomes de. **Uso de *Rosmarinus officinalis* na Doença de Alzheimer: uma revisão da bibliografia.** 2021. 42 f. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2021.
- Ashburner, M., Golic, K. G., & Hawley, R. S. (2005). ***Drosophila: A Laboratory Handbook.*** Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BATISTA, L. L. et al. **Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease.** Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 11262, 27 maio 2021.
- BENTAHIR, M.; NYABI, O.; VERHAMME, J.; TOLIA, A.; HORRE, K.; WILTFANG, J.; ESSELMANN, H.; DE STROOPER, B. **Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms.** Journal of Neurochemistry, v. 96, p. 732–742, 2006. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x
- Bergkvist L, Sandin L, Kågedal K, Brorsson AC. **A β PP processing results in greater toxicity per amount of A β 1-42 than individually expressed and secreted A β 1-42 in *Drosophila melanogaster*.** Biol Open. 2016 Aug 15;5(8):1030-9. doi: 10.1242/bio.017194. PMID: 27387531; PMCID: PMC5004604.
- Brand AH, Perrimon N. **Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.** Development. 1993 Jun;118(2):401-15. doi: 10.1242/dev.118.2.401. PMID: 8223268.
- Centro de Estoque de *Drosophila* de Bloomington. **Preparação de comida para moscas.** Dept Biologia, Universidade de Indiana. Disponível em: <https://bdsc.indiana.edu/information/recipes/bloomfood.html>. Acesso em: 30 mar. 2025.
- Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, Paddock BE, Miller S, et al. (2011) **Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model: Pharmacological Rescue of Cognitive Defects.** PLoS ONE 6(6): e20799. doi:10.1371/journal.pone.0020799.

da Costa Silva JR, Fujimura PT, Batista LL, Malta SM, Filho RM, Silva MH, de Souza AG, Silva APM, Borges LDF, Bastos VAF, Cossolin JFS, Serrão JE, Bonetti AM, Júnior LCO, Ueira-Vieira C. **Differential gene expression by RNA-seq during Alzheimer's disease-like progression in the *Drosophila melanogaster* model.** *Neurosci Res.* 2022 Jul;180:1-12. doi: 10.1016/j.neures.2022.02.003. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35219723.

Drummond E, Wisniewski T. **Alzheimer's disease: experimental models and reality.** *Acta Neuropathol.* 2017 Feb;133(2):155-175. doi: 10.1007/s00401-016-1662-x. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28025715; PMCID: PMC5253109.

ESQUERDA-CANALS, G.; MONTOLIU-GAYA, L.; GUELL-BOSCH, J.; VILLEGAS, S. **Mouse models of Alzheimer's Disease.** *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 57, n. 4, p.1171-1183, 2012. DOI: 10.3233/JAD-170045.

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. **Paraffin embedding tissue samples for sectioning.** *CSH Protoc.* 2008 May 1;2008:pdb.prot4989. doi: 10.1101/pdb.prot4989. PMID: 21356832.

Ganguly, R. K., Midya, S., & Chakraborty, S. K. (2018). **Antioxidant and Anticancer Roles of a Novel Strain of *Bacillus anthracis* Isolated from Vermicompost Prepared from Paper Mill Sludge.** *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1073687>

Gao, Y., et al. (2018). **"Competitive binding of amyloid peptides affects the detection of amyloid aggregates."** *Biophysical Journal*, 114(6), 1331-1340.

Gargano JW, Martin I, Bhandari P, Grotewiel MS. **Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*.** *Exp Gerontol.* 2005 May;40(5):386-95. doi: 10.1016/j.exger.2005.02.005. Epub 2005 Mar 19. PMID: 15919590.

Govind, R. Chaudhary , Akanksha Pandey , Anjali Singh, Vaishali Yadav , Vasudha Dwivedi , Richa Arya* and S. C. Lakhotia*. **Rearing and handling of *Drosophila* – A primer for laboratory experiments.** In: ., S. C. Lakhotia; ., H. A. Ranganath. *Experiments with Drosophila for Biology Courses.* Indian Academy of Sciences, Bengaluru, India: [s. n.], Março 2021. cap. 1, ISBN 978-81-950664-2-1. Disponível em: https://bdsc.indiana.edu/pdf/Experiments_with_Drosophila_for_Biology_Courses.pdf. Acesso em: 30 mar. 2025.

Greeve I, Kretschmar D, Tschäpe JA, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R. **Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila***. J Neurosci. 2004 Apr 21;24(16):3899-906. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0283-04.2004. PMID: 15102905; PMCID: PMC6729409.

Hilsabeck, Robin C., e outros, '**Doença de Alzheimer**', em Robin C. Hilsabeck, e Gayle Y. Ayers (eds) , Demência (Nova Iorque, 2024; edição online, Oxford Academic , 1 de setembro de 2024), <https://doi.org/10.1093/med/9780197690024.003.0009> , acessado em 26 de março de 2025.

Hirth F. ***Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration**. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010 Aug;9(4):504-23. doi: 10.2174/187152710791556104. PMID: 20522007; PMCID: PMC2992341.

HUANG, J. **Doença de Alzheimer. Manual MSD: Versão para profissionais de saúde**. 2018a. Disponível em: <
<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/disturbios-neurologicos/delirio-e-demencia/doenca-de-alzheimer?query=doenca%20de%20alzheimer>> Acessado em 11/03/2025.

ITO, K.; SHINOMIYA, K.; IITO, M.; ARMSTRONG, D.; BOYAN, G.; HARTENSTEIN, V.; HARZSCH, S.; HEISENBERG, M.; HOMBERG, U.; JENETT, A.; KESHISHIAN, H.; RESTIFO, L. L.; ROSSLER, W.; SIMPSON, J. H.; STRAUSFELD, N. J.; STRAUSS, R.; VOSSHALL, L. B. **A systematic nomenclature for the insect brain**. Neuron, v. 81, n.4, p. 755-765, 2014. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.017.

Jonson, M., Pokrzywa, M., Starkenberg, A., Hammarstrom, P., Thor, S. (2015). **Análise sistemática de A β em *Drosophila* revela alta toxicidade para os peptídeos 1-42, 3-42 e 11-42, e enfatiza resíduos N- e C-terminais**. PLoS ONE 10(7) : e0133272.

Kelley AR, Perry G, Castellani RJ, Bach SB. **Laser-Induced In-Source Decay Applied to the Determination of Amyloid-Beta in Alzheimer's Brains**. ACS Chem Neurosci. 2016 Mar 16;7(3):261-8. doi: 10.1021/acschemneuro.5b00295. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26720297.

Lei P, Ayton S, Bush AI. **The essential elements of Alzheimer's disease**. J Biol Chem. 2021 Jan-Jun;296:100105. doi: 10.1074/jbc.REV120.008207. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33219130; PMCID: PMC7948403.

LYNCH, J. A.; EL-SHERIF, E.; BROWN, S. H. **Comparisons of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia* and *Tribolium***. Wiley Interdisciplinary Reviews Develoepmental Biology, v. 1, n. 1, p. 16-39, 2012. DOI: 10.1002/wdev.3

López, M. L., et al. (2017). "Oxidative stress in Alzheimer's disease: the role of amyloid β ." Current Alzheimer Research, 14(1), 29-42.

Malta, SM, Batista, LL, Silva, HCG et al. **Identificação de peptídeos bioativos de uma amostra de kefir brasileiro e seu potencial anti-Alzheimer em *Drosophila melanogaster*** . Sci Rep 12 , 11065 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15297-1>

Malta, SM, Batista, LL, Silva, HCG et al. **Identificação de peptídeos bioativos de uma amostra de kefir brasileiro e seu potencial anti-Alzheimer em *Drosophila melanogaster***. Sci Rep 12, 11065 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15297-1>

Matthew Biancalana, Shohei Koide. **Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, Volume 1804, Issue 7, 2010, Pages 1405-1412, ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.

McGurk L, Berson A, Bonini NM. ***Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease**. Genetics. 2015 Oct;201(2):377-402. doi: 10.1534/genetics.115.179457. PMID: 26447127; PMCID: PMC4596656.

MOREIRA, Marcos; MOREIRA, Shirlene Vianna. **O espectro clínico e laboratorial da doença de Alzheimer**. Revista Psicologia em Pesquisa, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 83- 110, 4 out. 2020.

Nguyen Trong Terça, Tran Quoc Dat, Luong Linh Ly, Vu Duc Anh, Hideki Yoshida. **Insights do modelo *Drosophila melanogaster* da doença de Alzheimer**. Frente. Biosci. (Landmark Ed) 2020, 25(1), 134–146. <https://doi.org/10.2741/4798>.

NILSBERTH, C.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; ECKMAN, C. B.; CONDRON, M. M.; AXELMAN, K.; FORSELL, C.; STENH, C.; LUTHMAN, J.; TEFLOW, D. B.; YOUNKIN, S. G.; NASLUND, J.; LANNFELT, L. **The ‘Arctic’ APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abetaprotofibril formation**. Nature Neuroscience, v. 4, p. 887–893, 2001.

NOVELLINO, F.; LÓPEZ, M. E.; VACCARO, M. G.; MIGUEL, Y.; DELGADO, M. L.; MAESTU, F. **Association between Hippocampus, Thalamus, and Caudate in Mild**

Cognitive Impairment APOE^ε4 Carriers: A Structural Covariance MRI Study. *Frontiers in Neurology*, v. 10, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fneur.2019.01303.

Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, González-Renovato ED, et al. (2015) **Aspectos genéticos, bioquímicos e histopatológicos da doença de Alzheimer familiar.** *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*. InTech. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/59809>.

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. **The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis.** *Alzheimers Dement.* 2013 Jan;9(1):63-75.e2. doi: 10.1016/j.jalz.2012.11.007. PMID: 23305823.

Prüßing K, Voigt A, Schulz JB. ***Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease.** *Mol Neurodegener.* 2013 Nov 22;8:35. doi: 10.1186/1750-1326-8-35. PMID: 24267573; PMCID: PMC4222597.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. **A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*.** *Genome Res.* 2001 Jun;11(6):1114-25. doi: 10.1101/gr.169101. PMID: 11381037; PMCID: PMC311089.

RÉUS, G. Z.; TITUS, E.; ABELAIRA, H. M.; FREITAS, S. M.; TUON, T.; QUEVEDO, J.; BUDNI, J. **Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases.** *Life Sciences*, v. 158, p. 121-129, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.06.027

Robinow, S. & White, K. **Caracterização e distribuição espacial da proteína ELAV durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*.** *J. Neurobiol.* 22 , 443–461, <https://doi.org/10.1002/neu.480220503> (1991).

Sereniki, A., & Vital, M. A. B. F.. (2008). **A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos.** *Revista De Psiquiatria Do Rio Grande Do Sul*, 30(1). <https://doi.org/10.1590/S0101-81082008000200002>.

SILVA, Matheus. **Estudo dos efeitos fisiopatológicos e moleculares do knockdown do gene CG15105 em cérebro de *Drosophila melanogaster*.** 2022. Pós- graduação em Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5039>. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/35272/5/EstudoEfeitosFisiopatol%3%b3gicos.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2023.

Stephenson R, Metcalfe NH. **Drosophila melanogaster: a fly through its history and current use.** J R Coll Physicians Edinb. 2013;43(1):70-5. doi: 10.4997/JRCPE.2013.116. PMID: 23516695.

SUNDMAN, M. H.; HALL, E. E.; CHEN N. **Examining the relationship between head trauma and neurodegenerative disease: a review of epidemiology, pathology and neuroimaging techniques.** Journal of Alzheimer's Disease and Parkinsonism, v. 4, p.1-47, 2014. DOI: 10.4172/2161-0460.1000137

SUZUKI, N.; CHEUNG, T. T.; CAI, X. D.; ODAKA, A.; OTVOS, L. JR.; ECKMAN, C.; GOLDE, T. E.; YOUNKIN, S. G. **An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.** Science, v. 264, n. 5163, p. 1336–1340, 1994. DOI: 10.1126/science.8191290.

Tan FHP, Azzam G. *Drosophila melanogaster*: **Deciphering Alzheimer's Disease.** Malays J Med Sci. 2017 Mar;24(2):6-20. doi: 10.21315/mjms2017.24.2.2. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28894399; PMCID: PMC5566057.

Trentini, C. M., & Gonçalves, M. T. A. (2009). **Os métodos de investigação na pesquisa junto a cuidadores de idosos com a doença de Alzheimer.** Psico, 40(3). Recuperado de <https://revistaseletronicas.pucrs.br/revistapsico/article/view/5506>

Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. **The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives.** Genet Med. 2016 May;18(5):421-30. doi: 10.1038/gim.2015.117. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26312828; PMCID: PMC4857183.

WALTERS, R.; MANION, J.; NEELY, G. G. **Dissecting motor neuron disease with *Drosophila melanogaster*.** Frontiers in Neuroscience, v; 13, artigo 331, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2019.00331.

Westfall, S., Lomis, N. & Prakash, S. **A novel synbiotic delays Alzheimer's disease onset via combinatorial gut-brain-axis signaling in *Drosophila melanogaster*.** PLoS ONE 14, e0214985 (2019).

Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B. e (2013), **O impacto econômico mundial da demência 2010.** Alzheimer's & Dementia, 9: 1-11.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.006>

Yamaguchi M, Yoshida H. ***Drosophila* as a Model Organism.** Adv Exp Med Biol. 2018;1076:1-10. doi: 10.1007/978-981-13-0529-0_1. PMID: 29951811.

Yan, R., & Vassar, R. (2014). **Visando a β secretase BACE1 para terapia da doença de Alzheimer.** *The Lancet Neurology* , 13(3), 319-329. doi :10.1016 /S1474 -4422 (13)70276 -X

Ye Changtian , Behnke Joseph A. , Hardin Katherine R. , Zheng James Q. ***Drosophila melanogaster* as a model to study age and sex differences in brain injury and neurodegeneration after mild head trauma.** *Frontiers in Neuroscience*, v.17, 2023. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2023.1150694>

.DOI:10.3389/fnins.2023.1150694. ISSN=1662-453X

Zidan, M., Arcoverde, C., Araújo, N. B. de ., Vasques, P., Rios, A., Laks, J., & Deslandes, A.. (2012). **Alterações motoras e funcionais em diferentes estágios da doença de Alzheimer.** *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 39(5), 161–165. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832012000500003>