

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO FENÓTIPO DA DOENÇA DE ALZHEIMER  
DEVIDO À EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO AMILOIDE A $\beta$ 1- 42 NOS OLHOS DE  
LINHAGEM DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ALEXANDRE SOUZA MARQUEZ

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO FENÓTIPO DA DOENÇA DE ALZHEIMER  
DEVIDO À EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO AMILOIDE A $\beta$ 1- 42 NOS OLHOS DE  
LINHAGEM DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ALEXANDRE SOUZA MARQUEZ

PROF. DR. CARLOS UEIRA-VIEIRA

MSc. SERENA MARES MALTA

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO FENÓTIPO DA DOENÇA DE ALZHEIMER  
DEVIDO À EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO AMILOIDE A $\beta$ 1- 42 NOS OLHOS DE  
LINHAGEM DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ALEXANDRE SOUZA MARQUEZ

PROF. DR. CARLOS UEIRA-VIEIRA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA - IBTEC

MSc. SERENA MARES MALTA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA - IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso de  
Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

PROF. DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO FENÓTIPO DA DOENÇA DE ALZHEIMER  
DEVIDO À EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO AMILOIDE A $\beta$ 1-42 NOS OLHOS DE  
LINHAGEM DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ALEXANDRE SOUZA MARQUEZ

Aprovado pela Banca Examinadora em:     /     /     Nota: \_\_\_\_\_

---

PROF. DR. CARLOS UEIRA-VIEIRA

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_.

*[...] Pois veem minha vitória em todos os sentidos*

*Aplausos sempre consentidos*

*Tipo Alexandre, lugares conquistados, não concedidos [...]*

*Esquimó - Djonga*

## LISTA DE TABELAS

1. Cruzamentos realizados para obtenção de F1 com fenótipos desejados.....	8
--	---

## LISTA DE FIGURAS

1. Esquema representando os cruzamentos que deram origem a <i>AD-like</i> e GMR-Gal4/+.....	9
2. Curva de sobrevivência dos grupos <i>AD-like</i> e GMR-Gal4/+.....	12
3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras <i>AD-like</i> e GMR-Gal4/+ com 1-2, 5-6 e 10-11 dias pós eclosão.....	14
4. Pontuação obtida no software <i>ImageJ</i> com o <i>plug-in Flynotyper</i> a partir da análise das imagens da microscopia eletrônica de varredura.....	14
5. Corte histológico de cabeça de <i>D. melanogaster</i> . Amostras <i>AD-like</i> e GMR-Gal4/+ com 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. Retina.....	16
6. Corte histológico de cabeça de <i>D. melanogaster</i> . Amostras <i>AD-like</i> e GMR/Gal4/+ com 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. Região de medula.....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. *AD-like* – mosca com fenótipo da Doença de Alzheimer
2. D.A – Doença de Alzheimer
3. d.p.e – dias pós eclosão
4. GMR-Gal4/+ – genótipo da mosca usada como controle negativo
5. MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura



## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Carlos e minha mãe Elcione, me orgulho imensamente de ser filho de vocês. Tudo que conquisto, independente do que for, é por vocês. São minha base e me ensinaram lições que nenhum professor me ensinaria tão bem: amor, humildade, respeito, sacrifício e dedicação. Que eu consiga devolver para vocês tudo o que me proporcionaram, seja material ou emocional.

Meus irmãos Eduardo e Vitor Hugo, foram e sempre serão as pessoas mais importantes da minha vida. Vitor, gostaria que estivesse aqui para participar de todas essas conquistas, no entanto, mesmo sem acreditar em céu ou qualquer coisa do tipo, te sinto comigo irmão. Dudu, obrigado pela nossa fraternidade, em toda minha vida em sempre reparei nas relações fraternas das outras pessoas, e eu digo com muita certeza de que igual a nossa não existe nenhuma, te amo meu irmão e conta comigo sempre para o resto de nossas vidas, minhas conquistas sempre serão suas também.

As minhas tias Sabrina e Carolina, que são como mães/irmãs para mim e com quem eu sempre sei que posso contar para desabafar conversando sobre meus problemas. Amo vocês infinito, me divirto sendo sobrinho/afilhado de vocês, obrigado por isso. A minha prima Lua por ser uma grande irmã. Amo vocês.

A minha avó Maria do Carmo, digo com toda certeza de que a senhora é a pessoa que eu mais gostaria que estivesse aqui para que eu pudesse receber um “Parabéns meu filho, vovó tem muito orgulho de você!”. Mas de qualquer forma, tenho a senhora em minhas memórias, sinto muito sua falta, mas te sinto em mim. A minha avó Marly, a senhora mais jovial que conheço, obrigado por ser uma avó tão alegre e divertida, você me ensina que apesar de difícil, a vida pode ser leve. Meus avôs Carlos e Sebastião, homens fortes e trabalhadores, sem minhas avós e vocês juntos, eu não estaria aqui.

Infelizmente não posso escrever 10 páginas de agradecimento, mas gostaria de citar alguns nomes de familiares, saibam que vocês fizeram sim grande parte da minha caminhada para chegar aonde eu estou: meus tios Alessandro, Ademir, Emerson e Elton. Minhas tias avós Célia, Helena, Fíinha e Ninica. Meus primos Gabriel, Gustavo e Aine. Meu sobrinho amado Pedro Vitor, uma parte importante de uma pessoa que me faz muita falta. E a todo o resto da minha família, que sem vocês eu jamais estaria aqui.

Tenho muito a agradecer a maior companheira que a vida me deu para dividir minhas conquistas e alegrias, mas que também faz questão de estar comigo nos meus piores momentos de tristeza, insegurança e medo. Tainá, você é com certeza um pilar muito importante em toda essa fundação que eu chamo de minha vida. Agradeço ao universo todos os dias por ter colocado uma mulher tão maravilhosa e inteligente como você na minha vida. Eu tenho muita sorte. Love you to the moon and back.

Não posso deixar de agradecer meus sogros Andrea e Marcel por serem tão acolhedores comigo, vocês tornaram meus domingos uma parte importante da minha semana.

Agradeço muito a minha coorientadora Serena por todo seu conhecimento transmitido para mim, por sua amizade e dedicação em me ensinar tudo o que sei, você é uma peça muito importante na minha graduação e sei que será por muito tempo nessa minha jornada, obrigado pela confiança, pela paciência e pelo reforço positivo. Tenho muito a agradecer ao professor Carlos que depositou muita confiança em mim, agradeço a paciência em me ensinar. Sou grato também pela equipe LabGen por todo apoio.

Quase por último, mas de extrema importância, sou muito grato pelos amigos que a vida me deu, Tiago, Hiago, Wellington e Samuel, que mesmo que distantes, sei que posso contar com vocês. A Turma 21 do Curso de Biotecnologia da UFU, especialmente os seguintes nomes: Thomas e Sabrinna, agradeço imensamente pela amizade de vocês e por fazer essa caminhada ser divertida, com muita cerveja barata e tinta azul e preto. Meus outros amigos que conheci também por conta da faculdade: Laura, Artur, Joyce, Dudão, Isabela e todo o resto que não é menos importante.

Por fim, a todos que não foram nomeados, tenho vocês em meu coração. Agradeço a CAPES, FAPEMIG, CNPq, FINEP e UFU pelo auxílio financeiro.

## Resumo

A Doença de Alzheimer é uma neuropatologia progressiva que atingiu cerca de 50 milhões de pessoas em 2018, sendo que a estimativa é de que até 2050 essa população afetada duplique na Europa e triplique no resto do mundo. Estudos sobre essa neuropatologia são importantes para a compreensão de seus mecanismos ocasionados devido a disfunções fisiológicas e falhas em vias metabólicas. A inviabilidade desse estudo em humanos impulsiona pesquisadores a procurarem por métodos alternativos, o que leva ao uso de organismos modelos como opção, e um deles é a *Drosophila melanogaster*. O uso de linhagens de moscas possibilita a investigação da progressão do fenótipo e suas consequências, sendo a hipótese amiloide o tema abordado no presente estudo, uma vez que a via amiloidogênica é a responsável por gerar peptídeos A $\beta$  que contribuem para o desenvolvimento e progressão do fenótipo de Alzheimer. Sendo assim, utilizando moscas com fenótipo da Doença de Alzheimer expressando principalmente o peptídeo A $\beta$ 1-42 nos olhos de *D. melanogaster* e as avaliando na idade de 1-2, 5-6 e 10-11 dias pós-eclosão, este trabalho avaliou a progressão do fenótipo dessa doença, por meio de um teste de sobrevivência para avaliar o tempo de vida das moscas, microscopia eletrônica de varredura e análise histopatológica para estudos sobre os danos causados pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 no tecido nervoso do aparelho ocular de moscas afetadas.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; *Drosophila melanogaster*; Peptídeo A $\beta$ 1-42;  
Neurodegeneração.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1. Linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7
3.2. Ensaio de sobrevivência.....	9
3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	10
3.4. Análise histopatológica.....	11
3.5. Análise estatística.....	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1. Ensaio de sobrevivência.....	12
4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	13
4.3. Análise histopatológica.....	15
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO.....	21
7. BIBLIOGRAFIA.....	22

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção da integridade funcional do tecido neural depende diretamente da eficiência dos processos metabólicos e da adequada perfusão sanguínea. Estudos demonstram que falhas nessas vias podem resultar em disfunções fisiológicas e metabólicas, que comprometem o equilíbrio homeostático (ARDANAZ; RAMÍREZ; SOLAS, 2022).

Disfunções fisiológicas referem-se a alterações em processos biológicos essenciais, enquanto disfunções metabólicas implicam perturbações nas reações químicas intracelulares que sustentam a atividade celular, podendo resultar em doenças metabólicas, genéticas e neurodegenerativas (TAN et al., 2021).

Algumas neuropatologias caracterizam-se pela degeneração progressiva das células nervosas, comprometendo funções cognitivas, motoras e comportamentais, com impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados e nos sistemas de saúde pública (KHAN et al., 2020). Assim, compreender os mecanismos que sustentam o funcionamento cerebral é fundamental para prevenir e tratar patologias associadas ao tecido neural.

Um exemplo comum de doença neurodegenerativa presente na população mundial é a Doença de Alzheimer (DA), caracterizada principalmente pela perda de memória,

funções motoras debilitadas, dificuldade com linguagens, e problemas na execução de tarefas básicas e complexas (KHAN; BARVE; KUMAR, 2020).

Uma das teorias associadas à causa da D.A é a hipótese da neurodegeneração relacionada ao acúmulo de peptídeos  $\beta$ -amiloide em várias regiões do cérebro. Os peptídeos amiloides solúveis são derivados da clivagem da proteína precursora de amiloide (APP) na porção C-terminal realizada pela enzima  $\gamma$ -secretase, que gera fragmentos de 89 ou 99 aminoácidos. Já os peptídeos insolúveis, principalmente os fragmentos A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42, são originados da clivagem da APP pela enzima  $\beta$ -secretase (BACE1), gerando fragmentos insolúveis em meio extracelular (PARONI et al., 2019).

Os fragmentos A $\beta$  em meio extracelular tendem a formar aglomerados neurotóxicos devido a sua insolubilidade, o que o impede de ser metabolizado, gerando um acúmulo que acarreta a formação de placas  $\beta$ -amiloides (PARONI et al., 2019). Essas placas, reconhecidas pelo sistema imunológico como corpos estranhos, desencadeiam uma resposta imunológica e inflamatória que leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias e à ativação de micróglia (SCHELTENS et al., 2021).

Embora a inflamação e o ataque do sistema imune a esses corpos estranhos sejam de caráter protetor, isso gera alguns efeitos prejudiciais às células do tecido. Uma das células que compõe o sistema imune neuronal são as micróglia, responsáveis pela função de fagocitose de corpos estranhos, assim como a liberação de citocinas pró-inflamatórias e agentes neurotóxicos (SCHELTENS et al., 2021). Este processo pró-inflamatório tem



como consequência, em um indivíduo que expresse a proteína mas neurotóxica A $\beta$ 1-42 em altos níveis, um agravamento no estado de saúde do tecido neuronal, contribuindo para a progressão do quadro de neurodegeneração do indivíduo, uma vez que as micróglia e outras células imunes identificam o peptídeo  $\beta$ -amiloide como algo anormal. De acordo com dados mais recentes, acredita-se que até 2050 a quantidade de indivíduos com demência, podendo ou não ser ocasionada pela D.A, duplicará na Europa e triplicará no resto do mundo, sendo que em 2018 a estimativa era de 50 milhões de pessoas por todo o mundo (SCHELTENS et al., 2021).

A expectativa de vida após o diagnóstico costuma ser relativamente baixa, tendo em vista que se trata de uma doença que progride de forma assintomática durante muito tempo, onde o diagnóstico precoce acontece a partir dos 65 anos de idade (DAMSGAARD et al., 2023). A estimativa para indivíduos diagnosticados com Alzheimer que possuem essa idade é de 10 anos de vida em um estágio pré-clínico, 4 anos para o estágio inicial e 6 anos para o estágio demencial, de acordo com um estudo realizado na Europa (SCHELTENS et al., 2021).

Em uma pesquisa realizada por Araújo et al., que analisou dados coletados entre os anos de 2013 até 2022 do Sistema de Informações Hospitalares e do Sistema de Informação sobre Mortalidade, ambos relacionados ao Departamento de Informática do SUS (DATASUS), houve um total de 14.024 internações de indivíduos com a D.A no Brasil, cuja faixa etária com maior entrada em hospitais foi principalmente de 80 anos ou

mais. Essa pesquisa também mostrou que pacientes do sexo feminino representam 65% dessa população (ARAÚJO et al., 2023). Além disso, entre 2013 e 2022 o Brasil gastou um total de R\$24.608.616,49 com a D.A, sendo 73% deste valor direcionado para a internação de pacientes em estado avançado da doença. Estes dados transparecem a importância de estudos sobre a D.A, uma vez que pesquisas relacionadas tanto com a vias de desenvolvimento de D.A como com a sua progressão, colaboram com a compreensão dessa patologia e permitem o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (ARAÚJO et al., 2023).

Em pesquisas sobre doenças genéticas humanas em geral, uma estratégia para estudos mais aprofundados é o uso de organismos modelo. Os organismos modelos são amplamente utilizados devido a suas ortologias genéticas quando comparados a outros indivíduos, como o ser humano por exemplo, sendo essas semelhanças fisiológicas e comportamentais (SUN; CHEN, 2015).

A *Drosophila melanogaster*, ou mosca da fruta como é popularmente conhecida, é um exemplo de organismo modelo que tem mostrado ser de grande utilidade para estudos na área de genética, uma vez que se trata de um organismo complexo (13.767 genes) que possui órtologos funcionais para 50 a 70% dos genes relacionados a doenças humanas. Desses 287 genes já identificados em *D. melanogaster*, sendo 38 genes relacionados a doenças neurológicas (FORTINI et al., 2000).

A *Drosophila melanogaster* possui sistema nervoso complexo, sendo possível analisar desde anomalias em vias metabólicas que afetem as células nervosas, como doenças neurodegenerativas, até alterações em comportamentos sociais do indivíduo, como a depressão (MOULIN et al., 2021).

Além disso, há também outras vantagens como o baixo custo, tanto de criação como de manutenção, e a facilidade do manejo desses seres, o que facilita seu uso em pesquisas (DOW et al., 2022). Sendo assim, a *Drosophila melanogaster* proporciona à ciência um leque de possibilidades, fazendo com que ela seja um membro essencial na classe de organismos modelos para estudos genéticos (SUN; CHEN, 2015).

A *Drosophila melanogaster* é comumente utilizada em estudos sobre a D.A por apresentar uma receptividade maior à métodos de transgenia que viabilizam o organismo para tais estudos. Algumas linhagens contam com o processo de “humanização”, onde ocorre a inserção de genes humanos em *D. melanogaster*, como por exemplo o gene Abeta1-42 que codifica o peptídeo  $\beta$ -amiloide A $\beta$ 1-42 na linhagem UAS-Abeta1-42 (BL#64216), carregando consigo o genótipo para D.A (MALTA et al., 2024).

Para o estudo de D.A utilizando *D. melanogaster*, o sistema GAL4/UAS é frequentemente utilizado para a construção do organismo transgênico. A obtenção do genótipo de interesse é obtida a partir do cruzamento entre uma linhagem *driver* e uma *responder*, resultando em uma prole que apresente de forma segura o fenótipo de interesse (LI et al., 2012). O componente *driver* é aquele que expressa o fator de transcrição GAL4,

sob o controle de um promotor específico, permitindo o direcionamento da expressão da proteína de interesse para um tecido específico. Já o componente responder, contém o gene de interesse sob controle do elemento UAS, que é o sítio de ligação para o fator GAL4. Dessa forma, esse gene só será transcrito quando GAL4 estiver presente (LI et al., 2012).

Para o estudo de D.A utilizando *D. melanogaster*, o sistema *driver-responder* GAL4-GMR/UAS-Abeta é utilizado para direcionar a expressão do peptídeo Aβ1-42 para o tecido ocular em desenvolvimento da mosca, sendo o gene GMR (*Glass Multimer Reporter*) um promotor específico para o tecido ocular de *D. melanogaster* e o gene Abeta1-42 o gene de interesse que codifica a expressão direta do peptídeo Aβ1-42 (MALTA et al., 2024).

Consequentemente, ao cruzar duas linhagens onde cada parental seja portador de um elemento do sistema bipartido GAL4-GMR/UAS-Abeta, a prole de *D. melanogaster* vai apresentar o fenótipo para D.A no tecido ocular (MALTA et al., 2024).

Assim sendo, o presente estudo aborda a importância da compreensão da progressão do fenótipo da D.A em *Drosophila melanogaster*, sendo ele relevante para a utilização adequada desse modelo para no estudo da DA.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar a progressão fenotípica da D.A em *Drosophila melanogaster* nas linhagens Gal4-nina\_E.GMR e UAS-Abeta.1-42.

## 2.2. Objetivos específicos

Analisar em moscas com fenótipo da D.A no tecido ocular:

- Avaliar o efeito da expressão de GMR-Gal4/UAS-Abeta1-42 no tempo de vida;
- Avaliar a morfologia externa dos olhos;
- Analisar a nível tecidual a presença de marcadores de neurodegeneração: presença de vacúolos na medula e espessura de retina.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Utilizou-se como organismo modelo, linhagens transgênicas de *Drosophila melanogaster*, importadas do Centro de Estoque Bloomington da Universidade de Indiana dos Estados Unidos, que compõem o estoque do Laboratório de Genética (LABGEN) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As linhagens foram mantidas em estufa incubadora BOD com fotoperíodo (12h/12h) a 25°C, seguindo um ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram alimentadas em regime *ad libitum* com meio de cultura de purê.

Para a obtenção das moscas com o fenótipo representativo da D.A, foram utilizadas as seguintes linhagens: UAS-Abeta.1-42 (BL#64216) e  $w^{1118}$  (BL#3605), em

conjunto com *ninaE.GMR—Gal4* (BL#1104). *UAS-Abeta.1-42* é uma linhagem transgênica com inserção de uma ORF codificante de peptídeo beta amiloide 1-42. Por outro lado, a linhagem *Gal4-ninaE.GMR* (BL#1104) possui um direcionador de expressão do gene *GAL4* para os olhos da *D. melanogaster* e ativa a transcrição do *reporter* *UAS-Abeta.1-42*. Empregou-se a linhagem  $w^{1118}$  como controle negativo, não expressando o peptídeo  $\beta$ -amiloide. Os cruzamentos entre as linhagens selecionadas foram realizados da seguinte forma:

CRUZAMENTOS	
MACHO	FÊMEA
$w^*/Y$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/ninaE.GMR-GAL4</i> ; +/+	$w^*/w^*$ , +/+; <i>UAS-Abeta.1-42/TM3, sb<sup>1</sup></i>
$w^*/w^*$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; <i>UAS-Abeta.1-42/+</i>	
$w^*/w^*$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; <i>TM3, sb<sup>1</sup>/+</i>	
$Y/w^*$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; <i>UAS-Abeta.1-42/+</i>	
$Y/w^*$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; <i>TM3, sb<sup>1</sup>/+</i>	
CRUZAMENTOS	
MACHO	FÊMEA
$w^*/Y$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/ninaE.GMR-GAL4</i> ; +/+	$w^{1118}/Y$ ; +/+; +/+
$w^{1118}/Y$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; +/+	
$w^*/Y$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; +/+	
$w^{1118}/w^*$ ; <i>ninaE.GMR-GAL4/+</i> ; +/+	

Tabela 1: Cruzamentos realizados para obtenção de F1 com fenótipos desejados.

Foram selecionadas as proles com base no genótipo desejado, considerando balanceadores com características fenotípicas dominantes que possibilitam uma

diferenciação morfológica entre aqueles que exibem o fenótipo de interesse. As moscas com fenótipo de Alzheimer GMR-Gal4/UAS-Abeta.1-42 são denominadas de “AD-like”, enquanto as moscas utilizadas como controle negativo foram nomeadas de acordo com o genótipo GMR-Gal4/+. Após a seleção fenotípica, as moscas foram separadas em grupos e avaliadas nas idades de 1-2, 5-6 e 10-11 dias pós-eclosão, em todos os experimentos.

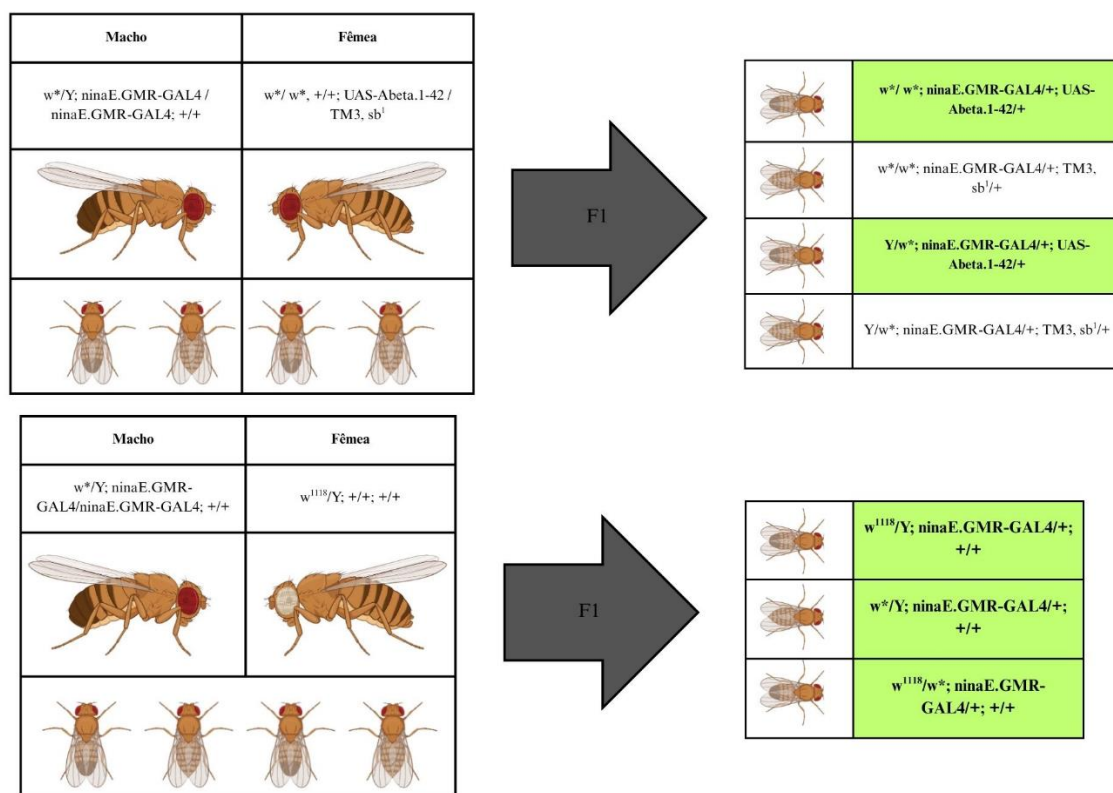


Figura 1: Esquema representando os cruzamentos que deram origem a AD-like e GMR-Gal4/+. Em verde são os genótipos de interesse, utilizados nos experimentos.

### 3.2 Ensaio de sobrevivência

Foi realizada uma avaliação da longevidade das moscas *AD-like*, e do *GMR-Gal4/+*. Para este propósito, foram utilizados 20 indivíduos por grupo seguindo a proporção de 10 indivíduos machos para 10 indivíduos fêmeas, onde os grupos foram divididos em *AD-like* (1,2 e 3) e *GMR-Gal4/+* (1,2 e 3), em triplicata, e mantidos em frascos contendo meio de purê (MEDHORA et al., 2011). Os de *AD-like* e *GMR-Gal4/+* foram mantidos no banco de *D. melanogaster* do Laboratório de Genética (LabGen) da UFU, onde foram acondicionadas em ciclo claro/escuro de 12 horas, em regime *ad libitum*.

### **3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Foi realizada uma avaliação da morfologia externa do tecido ocular das moscas *AD-like*, comparando com controle *GMR-Gal4/+* e analisadas as diferenças entre os fenótipos. Cada grupo foi composto por n=5 indivíduos, com idades de 1-2, 5-6, 10-11 dias após a eclosão. As cabeças de *AD-like* e *GMR-Gal4/+* foram cortadas, desidratadas em etanol absoluto por 48 horas e posteriormente submetidas a secagem em ponto crítico.

Posteriormente, as cabeças de moscas foram posicionadas em suportes de metal cobertos com fita condutora de carbono e revestidas com ouro. As imagens foram capturadas nos aumentos de 300, 550 e 1200 vezes, utilizando um microscópio eletrônico Tescan VEJA 3 LMU, e analisadas com o auxílio do software *ImageJ*, com a finalidade de quantificar o nível de desorganização dos omatídeos.



### **3.4 Análise Histopatológica**

Avaliou-se através de microscopia de luz, de forma qualitativa, os efeitos da neurodegeneração a nível tecidual.

Para isso, foram utilizadas 10 cabeças de moscas para cada grupo experimental avaliado, tendo elas as idades de 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. As cabeças de moscas divididas em grupos *AD-like* e *GMR-Gal4/+*, foram armazenadas imersas em solução Carnoy (etanol 99%, clorofórmio e ácido acético glacial) e mantidas até o seu processamento histológico.

Para análise da histologia dos tecidos, as amostras foram desidratadas em álcool etílico nas diluições 70%, 80%, 90%, álcool etílico absoluto e xilol, durante 15 minutos cada, e por fim parafina líquida 60% por 30 minutos. Após esse processo, as amostras foram emblocadas em parafina e seccionadas na espessura de 3 um em micrótomo semiautomático. (SLEE CUT5062). Por fim, As lâminas foram secas em estufa, reidratadas e coradas com hematoxilina-eosina. As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz e analisadas de forma qualitativa, com a finalidade de observar a formação da retina e medula do tecido ocular.

### **3.5 Análises Estatísticas**

O software Prism, na versão 8.0.2, foi empregado para analisar os dados obtidos no experimento de sobrevivência. Também foi utilizado o ImageJ acoplado ao plug-in Flynotyper para quantificar em escores o nível de desorganização presente nos omatídeos das moscas *AD-like* e *GMR-Gal4/+* fotografadas por MEV, e posteriormente foi empregado o Prism novamente para interpretar estatisticamente os escores obtidos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ensaio de sobrevivência

O ensaio de sobrevivência demonstrou que ao comparar os grupos *AD-like* e *GMR-Gal4/+*, que não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre as curvas de sobrevivência *AD-like* e *GMR-Gal4/+* como é possível observar na Figura 2.

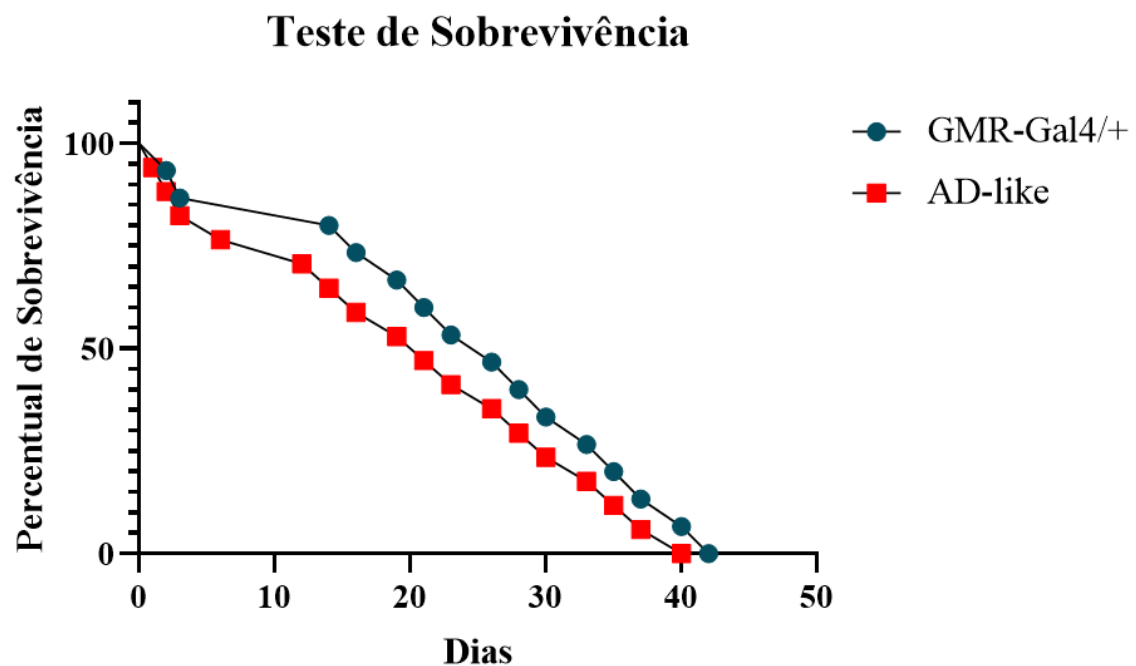


Figura 2: Curva de sobrevivência dos grupos *AD-like* e *GMR-Gal4/+*. (n= 30), sem diferença estatística significativa  $p= 0.3513$  (teste: Gehan-Breslow-Wilcoxon).

#### 4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram realizadas análises qualitativas e quantitativas das superfícies oculares das amostras *AD-like* e *GMR-Gal4/+*.

A análise qualitativa das imagens obtidas revelou diferenças na topografia ocular entre os grupos, evidenciando uma desorganização nos omatídeos das amostras *AD-like* em comparação com as do grupo controle *GMR-Gal4/+* (Figura 3).

A partir da análise do no ImageJ em conjunto com o Flynotyper, observou-se que os indivíduos do grupo afetado apresentaram pontuações significativamente superiores às do grupo controle nos períodos de 1-2 d.p.e (valor de  $p = 0,0360$ ) e 5-6 d.p.e (valor de  $p = 0,0461$ ). No entanto, no intervalo de 10-11 d.p.e (valor de  $p = 0,8730$ ), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos afetado e controle, podendo indicar que talvez seja apenas uma questão de aumento de n amostral dos grupos experimentais.

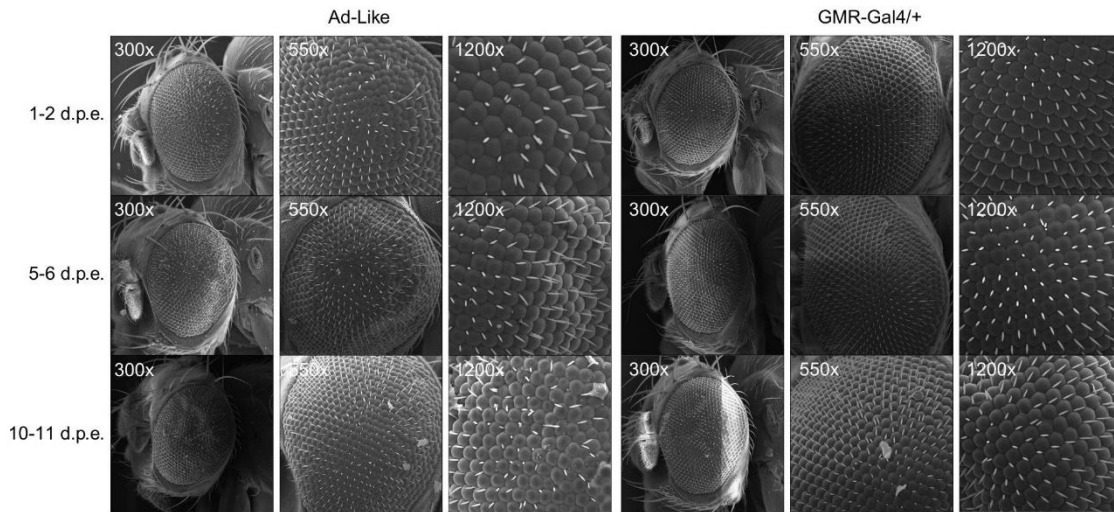


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras *AD-like* e *GMR-Gal4/+* com 1-2, 5-6 e 10-11 dias pós eclosão.

Os indivíduos *AD-like* dos grupos 1-2, 5-6 e 10-11 demonstraram desordem na formação dos omatídeos, como a figura 6 apresenta. Já o controle *GMR-Gal4/+* demonstrou que houve harmonia no arranjo dos omatídeos, sem evidências de má formação.

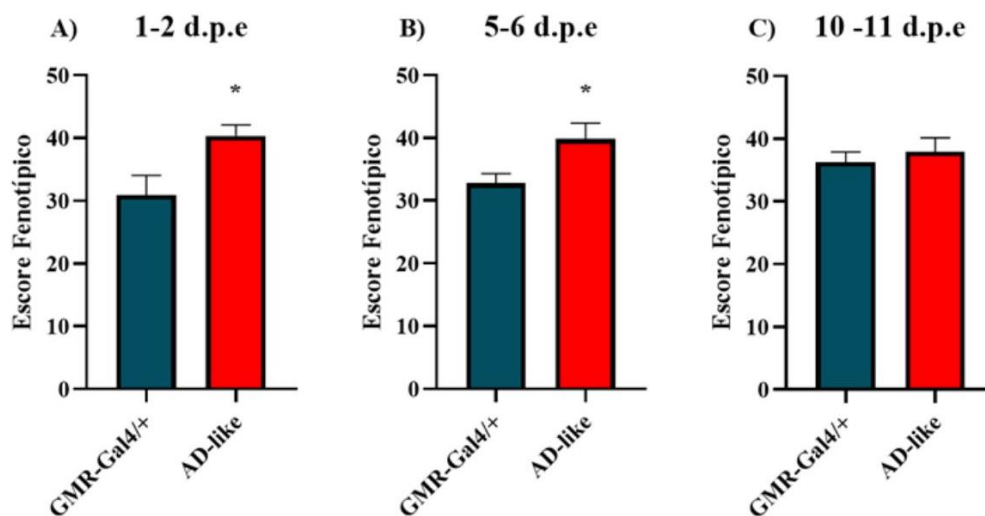


Figura 4: Pontuação obtida no *software ImageJ* com o *plug-in Flynotyper* a partir da análise das imagens da microscopia eletrônica de varredura. Gráficos: A) Escore fenotípico de de AD-*like* e GMR-Gal4/+ com 1-2 d.p.e; B) Escore fenotípico de de AD-*like* e GMR-Gal4/+ com 5-6 d.p.e; C) Escore fenotípico de de AD-*like* e GMR-Gal4/+ com 10-11 d.p.e. Valores de  $p(1-2) = 0,0360$ ;  $p(5-6) = 0,0461$ ;  $p(10-11) = 0,8730$  (teste: Mann Whitney).

Na Figura 4, é possível observar os gráficos contendo os escores fenotípicos obtidos através do ImageJ com o plug-in Flynotyper, apresentando os grupos AD-*like* e GMR-Gal4/+ nos intervalos de 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. Nos dias 1-2 e 5-6 d.p.e houve diferença significativa entre os indivíduos AD-*like* e GMR-Gal4/+, enquanto no dia 10-11 d.p.e não houve diferença significativa entre os indivíduos afetados e o controle.

### 4.3 Análise Histopatológica

Ao analisar as lâminas de histologia de forma qualitativa, observa-se que as das amostras de AD-*like* 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e, apresentaram uma retina menos espessa em relação ao grupo controle em suas respectivas idades. Observa-se também a presença evidente de vacúolos nas moscas Ad-like quando comparadas ao grupo controle GMR-Gal4/+. Além disso, ao comparar apenas o grupo AD-*like* em diferentes idades, nota-se uma diminuição da retina e aumento de vacúolos associados ao aumento da idade.

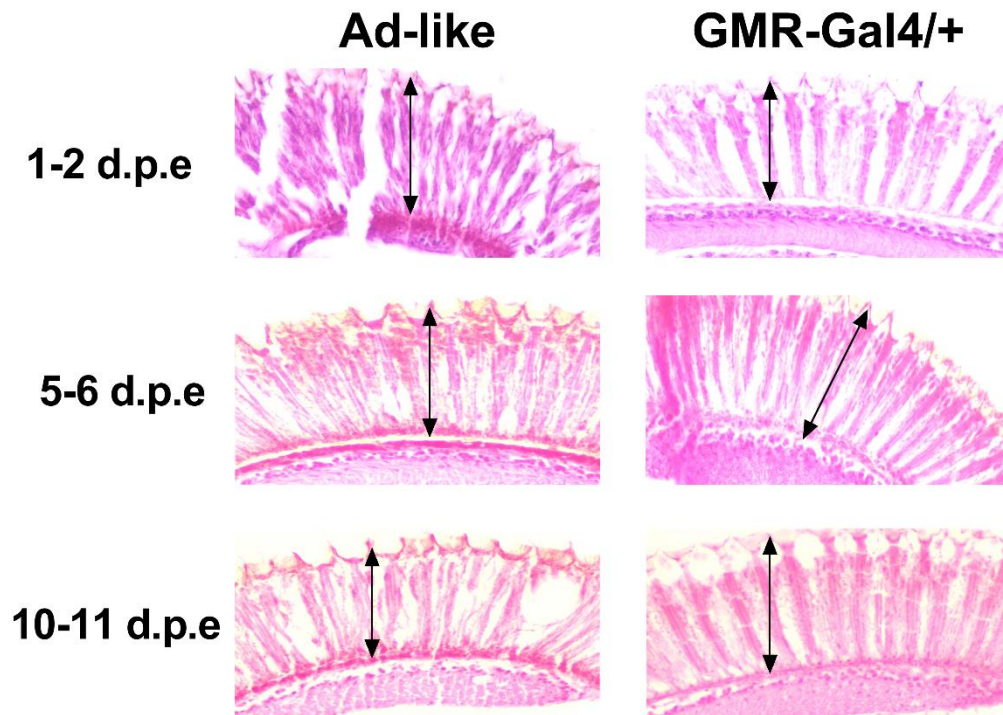


Figura 5: Corte histológico de cabeça de *D. melanogaster*. Amostras AD-like e GMR-Gal4/+ com 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. Retina. As setas apresentam a espessura da retina, sendo que em AD-like de 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e há a formação de uma retina menos espessa, enquanto em GMR-Gal4/+ 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e ocorre a formação de uma retina mais espessa.

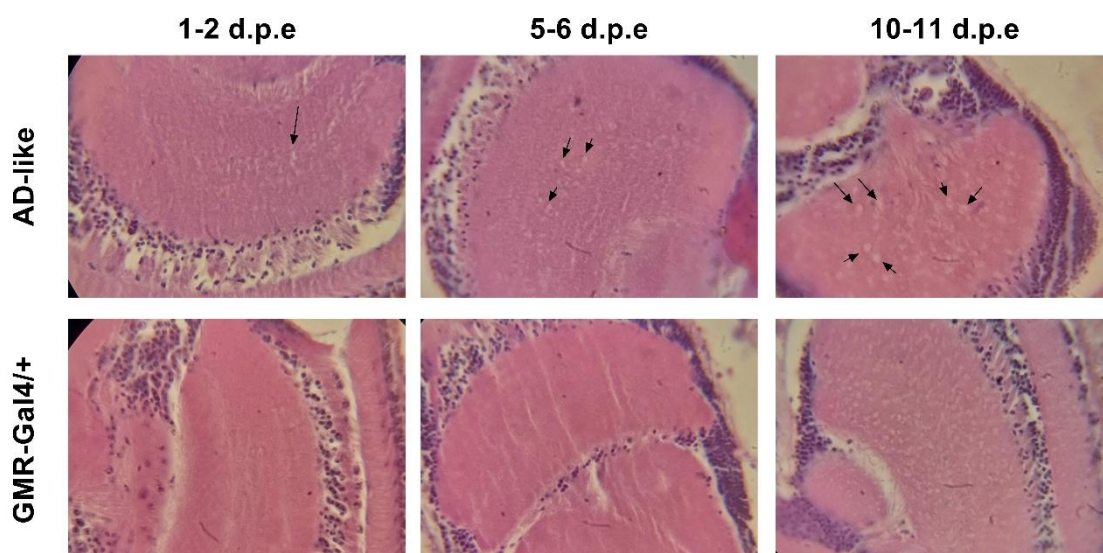


Figura 6: Corte histológico de cabeça de *D. melanogaster*. Amostras *AD-like* e *GMR-Gal4/+* com 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e. Região de medula. As setas indicam a formação de vacúolos em região de medula.

## 5. DISCUSSÃO

A ausência de diferença entre o perfil de sobrevivência entre *AD-like* e *GMR-Gal4/+* ( $p = 0,3513$ ) evidencia que mesmo com a expressão de A $\beta$ 1-42 o tempo de vida de *AD-like* segue um perfil semelhante ao do controle *GMR-Gal4/+*. A expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 no aparelho ocular de *D. melanogaster* não influencia de maneira significativa na fisiologia dos indivíduos afetados.

Em uma pesquisa feita em 2004 por IJIMA e colaboradores, que tinha como objetivo observar o fenótipo da expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 em cérebro de *D. melanogaster* utilizando o sistema binário *driver-responder* *elav-Gal4<sup>c155</sup>/UAS-Abeta1-42*, foi

comprovado em um teste de sobrevivência que as moscas afetadas pela expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 no cérebro apresentaram uma taxa de sobrevivência menor quando comparadas às moscas do grupo controle (IIJIMA et al., 2004).

Da mesma forma, em outra pesquisa também realizada em 2004, mas por FINELLI e colaboradores, os dados obtidos no experimento de teste de sobrevivência exibiram o mesmo padrão de baixa expectativa de vida em moscas *elav-Gal4<sup>c155</sup>/UAS-A $\beta$ 1-42* quando comparadas com o controle (FINELLI et al., 2004).

Entretanto, apesar do sistema GMR-Gal4/UAS-A $\beta$ 1-42 ser amplamente utilizado em pesquisas direcionadas a D.A em *D. melanogaster*, não foi possível encontrar trabalhos que apresentassem dados relacionados a testes de sobrevivência utilizando estas linhagens combinadas. Portanto, o presente trabalho apresenta um dado inédito, sendo o primeiro a comprovar que a expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 no aparelho ocular de *D. melanogaster* não afeta de forma significativa o tempo de vida dos indivíduos afetados.

Na microscopia eletrônica de varredura observamos desordem na estrutura externa dos olhos de moscas *AD-like*. Isso se deve ao fato de as células neuronais presentes no aparelho ocular das moscas *AD-like* apresentarem a expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42, que devido ao seu caráter tóxico, interfere na formação dos tecidos do aparelho ocular das moscas com D.A (PRÜSSING; VOIGT; SCHULZ, 2013).



Da mesma forma, ao utilizar as imagens de MEV no *software ImageJ* acoplado ao plug-in Flyntyper, observou-se que o escore fenotípico obtido a partir das imagens dos indivíduos AD-like de 1-2 e 5-6 d.p.e foi maior que dos indivíduos com genótipo GMR-Gal4/+ de 1-2 e 5-6, o que confirma os dados qualitativos observados nas imagens, portanto, isso confirma que, de fato, há uma desordem na estrutura dos omatídeos e na formação dos tecidos do aparelho ocular.

Estudos encontrados na literatura evidenciam o caráter progressivo do fenótipo da D.A em *D. melanogaster*, porém esses dados se divergem dependendo das linhagens utilizadas e idades analisadas. Além disso, não há consenso sobre em que momento o fenótipo atinge seu limiar de neurodegeneração (CUTLER et al., 2015; DESHPANDE et al., 2023; MCGURK; BERSON; BONINI, 2015).

No entanto, este trabalho demonstra que, o fato de apenas os grupos 1-2 e 5-6 d.p.e de AD-like apresentarem diferença visível nos escores obtidos nas imagens de MEV, possa ser um indício de que o fenótipo neurodegenerativo se agrave até a idade de 5-6 das moscas, atingindo um limiar de neurodegeneração e se estabilizando. Dessa forma, após essa idade, não haveria o agravamento das alterações no tecido ocular das moscas AD-like.

Os cortes histológicos de cabeças de moscas AD-like e GMR/Gal4/+ foram investigadas com foco em observar a espessura da retina e a formação de vacúolos na medula. Em AD-like é possível observar de forma qualitativa em todas as idades que

houve interferência por parte do peptídeo A $\beta$ 1-42 na espessura da retina. Essa influência também foi observada na formação de vacúolos na medula, presentes em maior número em indivíduos com idade de 10-11 d.p.e. No trabalho de MALTA (2024) e colaboradores, observou-se tanto o estreitamento da retina quanto a presença de vacúolo em região medular em moscas *AD-like* de 1-2 d.p.e, corroborando esses dados.

Da mesma forma como evidenciado no trabalho de MALTA (2024) e colaboradores, o controle negativo formou uma retina espessa e não houve evidências de vacúolos em região de medula, o que comprova que na ausência de A $\beta$ 1-42 sendo expresso nos olhos de *D. melanogaster*, os tecidos oculares se desenvolvem normalmente, sem diferença aparente em nenhuma das idades.

Portanto, a desordem causada nas estruturas da superfície ocular e a formação de vacúolo em região de medula, evidenciam a ação degenerativa do peptídeo A $\beta$ 1-42, sendo essas alterações consideradas marcadores de danos ao tecido ocular de moscas que possuem o genótipo GMR-Gal4 (DESHPANDE et al., 2023; MALTA et al., 2024).

Essa pesquisa visou avaliar a progressão do fenótipo da D.A no olho de *D. melanogaster* em idades 1-2, 5-6 e 10-11 d.p.e, sendo esse um dado inédito não relatado até então em outras pesquisas que utilizaram o sistema *driver-responder* GMR-Gal4/UAS-Abeta. Além disso, a análise de moscas em diferentes idades é de extrema importância para a compreensão da progressão do fenótipo, sendo essa também uma outra

abordagem não vista na literatura, permitindo o uso adequado desse modelo de DA em pesquisas científicas.

Considerando todos os resultados, é plausível alegar que o modelo *AD-like* utilizado no presente trabalho apresenta neurodegeneração progressiva no aparelho ocular, pois há a presença da toxicidade do peptídeo A $\beta$ 1-42 provocando desordem na formação dos omatídeos, e ocasionando a formação de vacúolos na região de medula dos olhos de *AD-like*.

No entanto, há a necessidade de experimentos adicionais para corroborar mais ainda a afirmativa de que há diferença fenotípica significativa entre as idades 1-2, 5,6 e 10-11 d.p.e. Um exemplo de metodologia a ser empregada é a análise quantitativa das imagens histológicas por meio do software imageJ, gerando um escore fenotípico que quantifica a área de vacúolos na medula de *AD-like* e GMR-Gal4/+.

Uma outra abordagem adicional seria a quantificação relativa de A $\beta$ 1-42 por tioflavina T, pois, é esperado que *AD-like* apresente maiores quantidades de A $\beta$ 1-42 conforme sua idade avance.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por meio dos experimentos de sobrevivência, MEV e análise histopatológica, pode-se afirmar que a o fenótipo degenerativo da expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 evolui sim de forma progressiva.

Apesar de a expressão do peptídeo A $\beta$ 1-42 não apresentar influência visível nos testes de sobrevivência, é possível observar sua ação neurodegenerativa nos olhos de moscas com D.A, que contribui para a má formação dos omatídeos. Consequentemente, ocorre a progressão da deterioração dos tecidos do aparelho ocular à medida que a idade das moscas avança, conforme demonstrado nas análises qualitativa e quantitativa das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, S. R. M. et al. Doença de Alzheimer no Brasil: uma análise epidemiológica entre 2013 e 2022. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e29412240345, 14 fev. 2023.

ARDANAZ, C. G.; RAMÍREZ, M. J.; SOLAS, M. **Brain Metabolic Alterations in Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 abr. 2022.

CUTLER, T. et al. Drosophila eye model to study neuroprotective role of CREB binding protein (CBP) in Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 14 set. 2015.

DAMSGAARD, L. et al. Healthcare utilization prior to a diagnosis of young-onset Alzheimer's disease: a nationwide nested case–control study. **Journal of Neurology**, v. 270, n. 12, p. 6093–6102, 1 dez. 2023.

DESHPANDE, P. et al. N-Acetyltransferase 9 ameliorates A $\beta$ 42-mediated neurodegeneration in the Drosophila eye. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 7, 1 jul. 2023.

DOW, J. A. T.; SIMONS, M.; ROMERO, M. F. **Drosophila melanogaster: a simple genetic model of kidney structure, function and disease.** *Nature Reviews Nephrology* Nature Research, , 1 jul. 2022.

FINELLI, A. et al. A model for studying Alzheimer's A $\beta$ 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 365–375, jul. 2004.

FORTINI, M. E. et al. **Analysis A Survey of Human Disease Gene Counterparts in the Drosophila Genome** *The Journal of Cell Biology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jcb.org>>.

IJIMA, K. et al. **Dissecting the pathological effects of human A40 and A42 in Drosophila: A potential model for Alzheimer's disease.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400895101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400895101)>.

KHAN, S.; BARVE, K. H.; KUMAR, M. S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 11, p. 1106–1125, 28 maio 2020.

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.

MALTA, S. M. et al. Brazilian kefir fraction mitigates the Alzheimer-like phenotype in *Drosophila melanogaster* with  $\beta$ -amyloid overexpression model. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 377–402, 1 out. 2015.

MEDHORA, A. et al. **Transposable element mariner in Drosophila species** *Technique Notes Dros. Inf. Serv.* [s.l.] American Society for Microbiology, 2011. Disponível em: <<http://stockcenter.ucsd.edu>>.

MOULIN, T. C. et al. The *Drosophila melanogaster* Levodopa-Induced Depression Model Exhibits Negative Geotaxis Deficits and Differential Gene Expression in Males and Females. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 17 maio 2021.

PARONI, G.; BISCEGLIA, P.; SERIPA, D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 68, n. 2, p. 493–510, 2019.

PRÜSSING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. **Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease** *Molecular Neurodegeneration*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.molecularneurodegeneration.com/content/8/1/35>>.

SCHELTENS, P. et al. **Alzheimer's disease**. *The Lancet* Elsevier B.V., , 24 abr. 2021.

SUN, M.; CHEN, L. **Studying tauopathies in Drosophila: A fruitful model**. *Experimental Neurology* Academic Press Inc., , 1 dez. 2015.

TAN, H. Y.; CHO, H.; LEE, L. P. **Human mini-brain models**. *Nature Biomedical Engineering* Nature Research, , 1 jan. 2021.