



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



**Aplicações translacionais de *Drosophila melanogaster* em neurociência:
mecanismos moleculares, modelos de doenças e investigação terapêutica**

Aluna: Serena Mares Malta

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia – MG

2026



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



**Aplicações translacionais de *Drosophila melanogaster* em neurociência:
mecanismos moleculares, modelos de doenças e investigação terapêutica**

Aluna: Serena Mares Malta

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**Tese apresentada à Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutora em
Genética e Bioquímica.**

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

M261 2026	<p>Malta, Serena Mares, 1996- Aplicações translacionais de <i>Drosophila melanogaster</i> em neurociência: mecanismos moleculares, modelos de doenças e investigação terapêutica. [recurso eletrônico] / Serena Mares Malta. - 2026.</p> <p>Orientador: Carlos Ueira-Vieira. Coorientador: Foued Salmen Espíndola. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. DOI http://doi.org/10.14393/ufu.te.2026.56 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética. I. Ueira-Vieira, Carlos, 1981-, (Orient.). II. Espíndola, Foued Salmen, 1957-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB.				
Data:	Vinte de fevereiro de dois mil e vinte e seis	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:28
Matrícula do Discente:	12213GBI004				
Nome do Discente:	Serena Mares Malta				
Título do Trabalho:	Aplicações translacionais de <i>Drosophila melanogaster</i> em neurociência: mecanismos moleculares, modelos de doenças e investigação terapêutica.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Produção de medicamentos Anti-Alzheimer a partir de biomoléculas de Kefir.				

Aos vinte dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e seis, às 14:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Google Meet*, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Dr^a. Ana Luiza Bossolani Martins, Dr^a. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas, Dr. Carlos Antônio Couto Lima, Dr^a. Rute Magalhães Brito e Dr. Carlos Ueira Vieira, como presidente da mesa e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Carlos Ueira Vieira apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata:

APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/02/2026, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rute Magalhães Brito, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/02/2026, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas, Usuário Externo**, em 20/02/2026, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Luiza Bossolani Martins, Usuário Externo**, em 20/02/2026, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Antonio Couto Lima, Usuário Externo**, em 20/02/2026, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6911275** e o código CRC **43AD7F26**.



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



**Aplicações translacionais de *Drosophila melanogaster* em neurociência:
mecanismos moleculares, modelos de doenças e investigação terapêutica**

Aluna: Serena Mares Malta

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente/Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Examinadores: Profa. Dra. Ana Luiza Bossolani Martins

Prof. Dr. Carlos Antônio Couto Lima

Dra. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas

Profa. Dra. Rute Magalhães Brito

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da Tese foram contempladas

Data da Defesa: 20/02/2026



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



Dedicatória

Esse trabalho é dedicado à Serena de 2014,
que sonhou em fazer um doutorado, e à sua
mãe, que foi fundamental para que esse
sonho acontecesse. Conseguimos!

Agradecimentos

À Deus, à minha família de sangue (Silézia e Rodolfo), à minha família de consideração (Rosa e Luiz) e à minha família de fé, Sônia e mais um monte de gente que não cabe o nome, que sempre foram meu sustento, amparo e referência. Sou grata pelo apoio de sempre, pelas orações constantes que me alcançaram nos momentos em que mais precisei, e por sempre se alegrarem com as minhas conquistas. Vocês são essenciais na minha vida e sem vocês, teria sido impossível.

No entanto....

Alguns agradecimentos careceriam de uma habilidade poética da qual me falta, mas farei uso das minhas simples palavras para agradecer minha base, meu fundamento, meu suporte, também conhecida como minha mãe. É impossível não olhar para tudo isso e não te enxergar em cada passo, se eu cheguei até aqui, certamente não foi sozinha, nem apenas por uma questão de mérito. Em nosso livro de referência, nossa bíblia, tem-se uma passagem dizendo que uma mulher sábia edifica sua casa, tu foste não apenas sábia, mas também corajosa, resiliente e exemplo. Tu edificaste tua casa e teus filhos com forças que ainda hoje me surpreendem e me tocam profundamente. Saiba que todas as minhas conquistas têm por trás a força do seu amor, seu apoio e suas orações. Meus sonhos se construíram e muitos deles foram edificados a partir dos seus esforços e suas abdições. Espero que um dia eu seja tão incrível e forte como tu. Meu amor por ti atravessa o continente.

À querida mãe científica de todos nós, Ana Maria Bonetti, pela sua presença constante e seu cuidado diário.

Ao meu coorientador Foued Espindola, agradeço o seu acolhimento e por sempre abrir as portas do Labibi, além de enriquecer todas as nossas conversas com ideias incríveis, leveza e boa vontade.

À Profa. Ana Mendes-Silva, por ter aberto as portas do MitoBrainLab, sou extremamente grata por essa experiência que literalmente mudou a minha vida, por ter vivido

um sonho nesse lugar e por ter tido o privilégio de ter trabalhado contigo nesse último ano. Você sempre foi um exemplo em diferentes aspectos, te admirar é naturalmente fácil.

Aos mestres e professores que sempre tiveram um papel importante nessa jornada, um agradecimento especial ao Ronaldo Naves, que foi o responsável pelo meu primeiro passo nesse caminho todo de UFU, e que como educador entendeu que é preciso se mover, criar oportunidades e garantir apoio. Como se não bastasse, ainda me deu de brinde uma querida para chamar de amiga. Obrigado por me apoiarem e acreditarem em mim.

À família LabGen, que me acolheu durante os últimos 10 anos. Posso dizer que dentro desse lab vivi dias incríveis e dias extremamente difíceis, mas as pessoas que estiveram comigo fizeram toda diferença. Dos membros dos primórdios, Tamiris, Leticia, Luiza e Lucas aos que vieram depois, Carola, Matheus e Táríka, foi incrível dividir esse espaço com vocês durante todo esse tempo. Cabe aqui uma menção especial à minha querida Jesga, ter tido você como minha primeira coorientadora me deu o tom sobre quão leve esse tipo de relação poderia ser. Saiba que guardo você e toda nossa história com muito carinho.

Aos meus alunos, que tive o privilégio e o desafio de coorientar, vocês me ajudaram a me tornar uma pesquisadora e uma orientadora melhor. Com vocês eu aprendi ainda mais sobre a importância da comunicação, do acolhimento e do incentivo. Vocês me desafiaram a criar, a solucionar problemas, a lidar com a diferença (as vezes bagunça) e com o inesperado (quase sempre um perrengue), e me fizeram perceber em mim forças e habilidades que eu não tinha consciência de ter. Eu costumo dizer que vocês também me fizeram pagar por todos os pecados que cometi contra Carlos Ueira (ele que sabe os estresses – coitado). Mas posso dizer que toda essa experiência foi fundamental na minha vida. À todos os meus alunos diretos e indiretos: Rafael Bernardes – meu primogênito, e a razão de alguns dos meus estresses (até hoje), e aos que se seguiram, Victoria, Luiz Fernando, Alexandre Marquez, Pedro Yuri, Kayllane Gomes, Mariana Lisboa e Joyce Pereira, saibam que conviver com vocês fizeram meus dias melhores, e tenho muito orgulho de todos.

Ao time inicial do MitoBrain: Matheus, Lucas e Pedro, compartilhar os perrengues canadenses com vocês tornaram a experiência mais leve e divertida, gratidão pelos momentos que vivemos juntos, nada como um frio de -20, uma pausa para o café e meia hora de risada

sincera. E aos que passaram e chegaram depois, agradeço por cada nova convivência que sempre me trouxe um novo aprendizado.

Aos meus amigos de vida que mesmo à distância, não soltaram a minha mão, se fizeram presentes e vibraram comigo as minhas conquistas. Lets, Lulu, Lu, Fer, Marcos e Isa, amo todos vocês.

Ao meu grande amigo Diego Avendaño, você sempre foi um grande apoiador dessa trajetória - não só acadêmica -, eu poderia escrever um capítulo inteiro sobre todas as discussões que tivemos, de assuntos profundos e filosóficos a questões supérfluas, e sobre como conviver com você e te humanizar é uma das coisas mais divertidas que se tem, mas eu vou deixar essa pauta para o nosso próximo cafezinho.

To my beloved Abe, I'm thankful that we found each other in this lifetime. Your daily support gave me the strength to keep going on days when all I wanted was to feel small. You became the place where my tears were welcome, where I was held with gentleness, and where a steady hand reminded me that I could rise and move forward. Even across the Pacific, your words and actions reached me, and your presence never faded. With you I feel loved, at home, and inspired to be better every day.

Por último, mas não menos importante,

Ao meu orientador Carlos Ueira-Vieira. Há quem diga que eu sou definitivamente uma cria sua, e como sua cria, tem muito de você refletido em mim, no meu estilo de trabalho, de orientação e de didática, mas como sua cria, tem também lados meus únicos e exclusivos, que só floresceram porque você sempre forneceu um ambiente que fosse propício a isso. Poder questionar, elaborar, criar, experimentar, e dizer “mas isso aqui não faz sentido, vamos de novo”, fez com que eu me sentisse confiante para desenvolver todas as habilidades que conquistei e livre para expressar todas as minhas ideias curiosas, além de alimentar meu amor por trabalhar com drosófilas. Aprendi não apenas como pensar e fazer pesquisa, mas também sobre a importância das relações políticas, e da força que o conhecimento científico e institucional tem sobre a nossa trajetória. Ter sido sua aluna durante todos esses anos foi um privilégio imenso, tu és de fato uma referência como orientador e pessoa, e eu sou muito grata de ter entrado na lista de pessoas que conviveram com você. Após todos esses anos, levo comigo algumas

palavras suas como “abre o *bloomington*”, “joga fora” e “olha só, sua teimosia deu certo”, sendo essa última a minha preferida, mas todas elas com significados que representam como essa convivência foi incrível, e como em nossa relação sempre houve espaço para aprender, questionar, refazer, desafiar, e se encantar com o novo. Te admiro muito.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido nos Laboratório de Genética e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Instituto de Biotecnologia, Laboratório Multiusuário, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia – Minas Gerais, Brasil), com o apoio da Universidade e das seguintes Agências de Fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior

(CAPES);

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Projeto APQ 04689-

22

1 Sm. 7:12 - Até aqui nos ajudou o Senhor.

Sumário

APRESENTAÇÃO	1
Capítulo I - Fundamentação teórica	3
1. ORGANISMO MODELO	4
2. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	7
2.1 HISTÓRICO	7
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS	8
2.3 CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA: <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> E <i>HOMO SAPIENS</i>	10
2.4 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2.4.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2.4.1.1 <i>Características gerais</i>	14
2.4.1.2 <i>Hipótese Amilóide</i>	15
2.4.1.3 <i>Componentes genéticos da Doença de Alzheimer</i>	17
2.4.2 MODELOS AMILOIDOGÊNICOS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	18
2.4.2.1 <i>Sistema UAS/GAL4</i>	19
2.4.2.2 <i>Modelo GMR; Aβ1-42</i>	21
2.5 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER	22
2.5.1 PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DE ALZHEIMER	23
2.5.1.1 <i>Kefir</i>	24
2.6 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO MODELO PARA NOCICEPÇÃO	25
2.6.1 DOR E NOCICEPÇÃO	25
2.6.1.1 <i>Conceitos fundamentais e processos neurais da nocicepção</i>	25
2.6.1.2 <i>Canais de sódio voltagem-dependente</i>	26
2.6.2 DOR CRÔNICA	28
2.6.3 NOCICEPÇÃO EM <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	29
2.6.3.1 <i>Canais de sódio voltagem-dependente em Drosophila melanogaster</i>	30
2.6.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA DOR CRÔNICA	31
2.6.4.1 <i>Canabidiol como potencial analgésico em dor crônica</i>	32
2.7 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO PLATAFORMA DE TRIAGEM DE FÁRMACOS	33
REFERÊNCIAS	35
Capítulo II - Artigo Científico 1	53
Capítulo III - Artigo Científico 2	xx

APRESENTAÇÃO

Drosophila melanogaster consolidou-se ao longo das últimas décadas como um dos principais organismo modelo no estudo de processos biológicos complexos, incluindo o funcionamento do sistema nervoso e suas disfunções. Entre as diversas aplicações desse modelo estão os estudos voltados para doenças neurodegenerativas e para os mecanismos de nocicepção e dor crônica. Processos como agregação proteica, disfunção sináptica, estresse oxidativo e alterações na excitabilidade neuronal podem ser reproduzidos e investigados em *Drosophila*, possibilitando a caracterização de eventos iniciais e progressivos da neurodegeneração. De forma complementar, a mosca também tem se mostrado um modelo robusto para o estudo da nocicepção, permitindo a investigação de circuitos sensoriais, canais iônicos e vias moleculares envolvidas na detecção e modulação de estímulos nocivos.

Além de seu valor como modelo mecanístico, *Drosophila melanogaster* destaca-se como uma ferramenta eficiente para a avaliação de intervenções terapêuticas e uma plataforma para triagem de biomoléculas com características bioativas. O interesse crescente por compostos derivados de produtos naturais reflete a busca por abordagens alternativas ou adjuvantes às terapias convencionais, especialmente em contextos nos quais há limitações de eficácia ou efeitos adversos relevantes. A utilização da *Drosophila melanogaster* permite a triagem funcional desses compostos e a análise de seus efeitos em múltiplos níveis biológicos, oferecendo subsídios importantes para estudos posteriores em modelos vertebrados.

Diante desse panorama, esta tese tem como objetivo geral explorar o potencial de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental para o estudo de fenótipos associados a doenças humanas, com ênfase em neurodegeneração e nocicepção, bem como na investigação de estratégias terapêuticas baseadas em biomoléculas naturais. O **Capítulo I** apresenta a fundamentação teórica, abordando os critérios para o uso da *Drosophila* como organismo modelo, seu histórico e características gerais, além de apresentar como é possível reproduzir fenótipos de doenças humanas, e a reprodução dos principais mecanismos envolvidos em neurodegeneração e dor. O **Capítulo II** corresponde a um artigo científico já publicado, cujo objetivo foi avaliar o efeito neuroprotetor de frações derivadas do kefir em um modelo amiloidogênico da Doença de Alzheimer em *Drosophila melanogaster*. O **Capítulo**

III corresponde a um artigo científico também publicado, cujo objetivo foi propor e validar um modelo genético de *Drosophila melanogaster* para o estudo da dor crônica, e analisar o potencial analgésico de canabidiol.

Capítulo I
Fundamentação Teórica

1. Organismo Modelo

De acordo com a definição da *Nature Education*, organismo modelo é um organismo adequado para estudar um traço específico, doença ou fenômeno (1). No contexto da pesquisa biológica é comum o uso de cultura de células, animais invertebrados e até mesmo animais vertebrados como ferramentas experimentais para explorar os processos biológicos associados a uma hipótese científica. No entanto, para ser considerado organismo modelo, este deve ser padronizado e otimizado de modo que as descobertas feitas a partir desse organismo possam ser generalizadas e aplicadas à outros grupos (2).

Para entender como esses organismos servem como modelo, é útil considerar duas dimensões críticas: o “escopo representacional” e o “alvo representacional”. O escopo representacional refere-se a extensão com que os resultados obtidos em um organismo experimental podem ser projetados para um grupo mais amplo, variando desde uma única espécie, como o *Homo sapiens*, grupos maiores como mamíferos ou animais em geral, ou até todos os seres vivos. A amplitude desse escopo está diretamente ligada aos critérios de seleção do organismo modelo e a questão científica a ser investigada. Em geral, a validade dessa projeção depende de pressupostos externos ao projeto, mas é um aspecto central para a pesquisa. (3). O alvo representacional por sua vez diz respeito aos fenômenos que se deseja investigar por meio do organismo experimental. Fenômenos, nesse contexto, são os conceitos e processos definidos pelos pesquisadores como objeto de estudo, podendo ser tanto observáveis quanto teóricos. Assim, qualquer processo biológico, como metabolismo ou expressão gênica, pode ser considerado um alvo representacional (3).

O conceito de organismo modelo considera também o grau de conservação evolutiva entre as espécies. Para que um conhecimento obtido a partir de algum organismo possa ser transferível a outro, principalmente se o outro for um organismo mais complexo, espera-se que vias biológicas subjacentes ao fenômeno estudado sejam, ao menos em parte, conservadas (4). O nível de conservação necessário e o quanto esses achados podem ser transpostos dependem diretamente da pergunta de pesquisa formulada.

Espera-se que os organismos definidos como modelo apresentem características como pequeno porte, alta fertilidade e ciclos reprodutivos de curta duração, além de serem passíveis de manipulação por abordagem genéticas diretas como alterações genômicas, e indiretas como os mecanismos de regulação da expressão genica (5). De modo geral, organismos modelo são

estáveis sob condições laboratoriais, podem ser categorizados em diferentes linhagens e possuem genomas bem caracterizados, o que os torna ferramentas viáveis e reprodutíveis para a pesquisa (6). Os critérios modernos de seleção de modelos incluem também uso de ferramentas genômicas e as possibilidades de edição gênica a partir de técnicas como RNAi, CRISPR, entre outras, que permitem a geração de modelos capazes de atender às demandas científicas específicas (7).

No entanto, os organismos modelos não atendem universalmente a todos esses critérios, a exemplo de primatas, que não necessariamente possuem pequeno porte ou curto tempo de geração, mas ainda assim ocupam um papel importante na pesquisa científica (8). Modelos vertebrados como primatas, roedores, e peixes-zebra apresentam maior complexidade do sistema nervoso e maior proximidade evolutiva com os seres humanos, incluindo características como maior diversidade neuronal, maior grau de regionalização encefálica, presença de estruturas homólogas a regiões cerebrais e conservação de vias de neurotransmissão (9).

Em contraste, modelos invertebrados como nematoides e insetos, oferecem vantagens experimentais, incluindo menor tamanho, ciclos de vida mais curtos e elevada maleabilidade genética, contudo, apresentam limitações importantes como menor número de neurônios, menor grau de regionalização do sistema nervoso central e circuitos neurais menos numerosos e com menor nível de integração, o que pode restringir a comparabilidade direta com o sistema nervoso de humanos. Ainda assim, invertebrados como insetos, planárias e moluscos tem sido amplamente utilizados na neurociência desde o início do século XX, por permitirem a identificação de genes e o estudo de circuitos neurais de forma mais acessível e controlada, frequentemente inviável em vertebrados de reprodução mais lenta (9,10).

E por fim, o conceito de organismo modelo passa também por uma camada adicional de complexidade: a validação. A validação de organismos modelos constitui princípio fundamental e transversal a diferentes áreas da pesquisa biomédica, no entanto, no campo da neurociência, especialmente na área de psiquiatria, esse processo assume particular relevância devido à complexidade dos fenótipos investigados. Validar um organismo significa avaliar o quanto ele realmente responde à pergunta de pesquisa proposta (11). Para isso, considera-se a capacidade do modelo de antecipar fenômenos esperados de uma patologia conhecida, sua utilidade prática para investigar processos biológicos, moleculares e comportamentais ligados ao problema em questão, e o grau de semelhança entre o modelo e o fenômeno real. Um organismo é considerado

adequado quando atende, ainda que parcialmente, a critérios como a reprodução do fenótipo de interesse, a correspondência entre os mecanismos biológicos do modelo e da condição estudada e a capacidade de prever resposta a intervenções (11,12).

A escolha do organismo a ser utilizado em uma pesquisa científica, vai além dos critérios biológicos. Importa também o alinhamento com princípios éticos fundamentais, entre os quais se destacam os 3Rs (*reduction, replacement and refinement*) em português: redução, substituição e refinamento – propostos por Russel e Burch em 1959 (13). A redução envolve o uso de estratégias experimentais e análises estatísticas que permitem otimizar o número de animais necessários, além de incentivar a divulgação de resultados negativos para evitar a repetição de experimentos desnecessários e promover o compartilhamento transparente de informações. A substituição refere-se à adoção de métodos alternativos, como testes *in vitro*, predições *in silico* ou o uso de organismos filogeneticamente mais simples, sempre que possível. Por fim, o refinamento diz respeito ao aprimoramento contínuo das técnicas e procedimentos, visando reduzir o desconforto, a dor e o estresse dos animais, garantindo o bem-estar e cuidados veterinários adequados (10).

Diversas legislações internacionais, como a Lei de Bem-Estar dos Animais de Laboratório e a Política de Saúde Pública dos Estados Unidos (14), a Lei de Animais e Procedimentos Científicos do Reino Unido (15) e a Diretiva 2010/63 da União Européia (16), estabelecem que os pesquisadores devem justificar o uso de animais, minimizar a dor e implementar critérios rigorosos de avaliação humanitária, garantindo o bem-estar animal. No Brasil, o órgão responsável por regulamentar, normatizar e fiscalizar o uso ético de animais em pesquisa científica e ensino é o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), que estabelece diretrizes nacionais, reconhece métodos alternativos e exige que todas as instituições mantenham comitês de ética para revisão e acompanhamento dos projetos (17).

Modelos vertebrados normalmente exigem revisão ética detalhada e licenças específicas, enquanto o uso de invertebrados costuma ser submetido a uma carga regulatória menor. Apesar do menor rigor legislativo para invertebrados, é fundamental que os pesquisadores sigam os princípios éticos na condução de seus trabalhos, assegurando respeito e responsabilidade em todas as etapas da pesquisa (16). Essa postura ética é especialmente relevante considerando que organismos modelos não são utilizados apenas para desvendar processos biológicos fundamentais, mas também desempenham papel central na investigação de doenças humanas

complexas e de relevância para a saúde pública, cujos mecanismos fisiopatológicos e abordagens terapêuticas ainda não estão completamente esclarecidos, como diversos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, e outras patologias crônicas (18).

Entre os principais organismos modelos validados, a *Drosophila melanogaster* emergiu como um dos sistemas experimentais mais versáteis, a partir do qual se obteve informações importantes sobre genética, neurociência e doenças humanas, com vantagens que vão desde os aspectos biológicos até as questões práticas de manutenção e manejo, e continua até os dias de hoje sendo aplicada em pesquisas biológicas (19).

2. *Drosophila melanogaster*

2.1 Histórico

O uso da *D. melanogaster* como organismo modelo em genética, teve início no começo do século XX. Em 1910 Thomas H. Morgan identificou o primeiro mutante de olhos brancos, e, em apenas cinco anos, seu grupo desenvolveu a teoria cromossômica da herança e elaborou os primeiros mapas genéticos ao analisar a segregação da prole (20) e demonstrar com esses trabalhos pioneiros que os genes estão localizados nos cromossomos. Posteriormente, em 1927, Hermann Muller comprovou que a exposição à raios-x pode induzir mutações hereditárias, um marco fundamental para a genética experimental, e em 1935, os mapas dos cromossômicos politênicos permitiram a localização citológica precisa dos genes, facilitando estudos de mapeamento genético (21). Essas descobertas foram reconhecidas internacionalmente, rendendo Prêmio Nobel a Morgan em 1933, a Muller em 1946, e mais tarde a Lewis, Nusslein-Volhard e Wieschaus em 1995, por suas contribuições na elucidação de genes homeóticos e mecanismos de padronização embrionária (22).

Além da genética, *D. melanogaster* tornou-se também um modelo fundamental para estudos em neurociências. Trabalhos clássicos de Chun-Fan Yin e colaboradores demonstraram que a proteína CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico), desempenha papel central na formação de memória de longo prazo em moscas, por meio de experimentos que envolveram tanto a inibição quanto o aumento de sua função, com efeitos diretos sobre o desempenho em testes de memória (23,24). Esses achados evidenciam que mecanismos moleculares essenciais para aprendizagem são conservados evolutivamente. Nesse contexto,

embora *D. melanogaster* seja considerada um organismo simples do ponto de vista anatômico e organizacional, apresenta complexidade suficiente em seus circuitos neurais e vias moleculares para permitir a investigação de processos cognitivos fundamentais. Essa combinação torna o modelo particularmente valioso, pois, possibilita a elucidação de princípios biológicos básicos em sistemas mais acessíveis, frequentemente investigados primeiro em organismos simples antes de serem estudados em modelos mais complexos, como os mamíferos (25).

A consolidação de mais de um século de estudos genéticos e moleculares em drosófila culminou com o sequenciamento completo de seu genoma (26) em 2000, um marco que validou a aplicação de estratégias de sequenciamento em organismos eucarióticos multicelulares (27). A identificação e anotação sistemática de seus genes estabeleceram a base para investigações em genética funcional, e um aprofundamento em biologia do desenvolvimento e neurociência. Mais recentemente, em 2024 a publicação do primeiro conectoma completo do cérebro adulto da mosca, descrevendo cerca de 140.000 neurônios e mais de 50 milhões de sinapses, ampliou esse potencial ao possibilitar a análise global de circuitos neurais, o mapeamento de vias sensoriais e motoras e a identificação de neurônios integrados de alta conectividade (*rich-club neurons*), permitindo a comparação de princípios organizacionais entre espécies (28).

2.2 Características gerais

Sua classificação taxonômica a posiciona no domínio Eukarya, caracterizando-se por possuir células eucarióticas sem parede celular; pertence ao reino Animalia, sendo capaz de perceber e responder a estímulos; integra a classe Insecta, ordem Diptera, família Drosophilidae, gênero *Drosophila* e espécie *Drosophila melanogaster* (29). Possui quatro pares de cromossomos ($2n = 8$), sendo o primeiro par os cromossomos sexuais, e os outros três cromossomos autossômicos (30). Tem seu genoma completamente sequenciado (26), e aproximadamente 14.000 genes codificantes de proteínas (31).

Tem um tamanho pequeno, (2-3 milímetros), três pares de patas, um par de asas, um par de halteres, olhos compostos com centenas de omatídios que garantem uma visão ampla e detecção rápida de movimento. Apresenta dimorfismo sexual visível em adultos, sendo possível a diferenciação entre machos e fêmeas a partir de características como tamanho, formato da porção terminal do abdômen, presença de apêndice sexual em machos e outros aspectos (32).

Outra característica importante, e que favorece seu uso em pesquisa é a facilidade de manutenção, incluindo um baixo custo, com dietas a base de fubá, purê de batata, banana e outros, e um alto rendimento na grande maioria das linhagens, nas quais fêmeas podem ovipor dezenas de ovos por dia (33). Possui um ciclo de vida curto, que favorece, entre tantas coisas, o estudo de aspectos relacionados ao envelhecimento e de patologias associadas a esse processo, além de gerar informações em um menor tempo. A duração do ciclo e desenvolvimento da mosca pode ser influenciado por condições ambientais principalmente por temperatura. Quando mantidas a 25 °C, 60% humidade e 12h ciclo de claro e escuro, apresentam em média um tempo de desenvolvimento de 10-12 dias, e sua expectativa de vida varia entre 60 e 90 dias após eclosão (após se tornar um indivíduo adulto) a depender também de seu *background* genético (34)

Durante seu desenvolvimento, a mosca passa por duas fases principais distintas com planos corporais completamente diferentes: a larva e o adulto (35) (Figura 1). O ciclo se inicia com o desenvolvimento embrionário que ocorre dentro da membrana do ovo após o processo de fertilização e formação do zigoto, que então posteriormente eclode em larva. O período larval se divide em três estágios L1, L2 e L3, seguido pela transformação em pupa, e após 3-4 dias emerge como adulto (36). Durante o desenvolvimento larval tem-se a diferenciação e separação dos discos imaginais, conjuntos de células que formarão estruturas específicas em adultos, como os discos de asa, olhos, e outros órgãos; a metamorfose ocorre na fase de pupa quando as estruturas larvais se desintegram e o corpo do adulto é construído a partir desses discos (37).

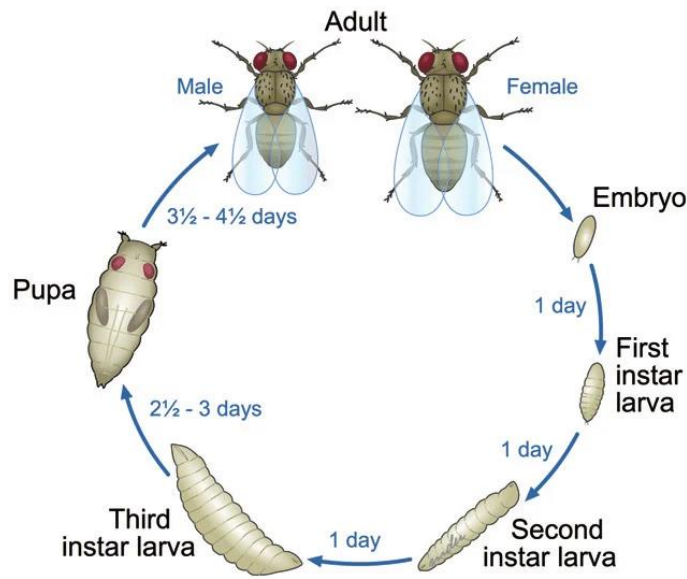


Figura 1. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Fonte: Ong *et. al.* (2015)(38).

Os estágios do desenvolvimento da mosca oferecem aplicações experimentais distintas. Embriões podem ser utilizados para estudos de desenvolvimento inicial, toxicidade e regulação gênica, além de ser uma etapa excelente para inserção de genes exógenos, e produção de organismos geneticamente modificados (OGMs). Já as larvas, especialmente no estágio L3, podem ser usadas para pesquisas em neurodesenvolvimento, metabolismo, toxicidade, favorecidos pela simplicidade de seus circuitos neuronais e a facilidade de manipulação. Pupas permitem o estudo de metamorfose, morte celular programada e remodelação tecidual, enquanto adultos são essenciais para investigação de envelhecimento, comportamentos relativamente mais complexos, doenças neurodegenerativas e toxicidade (39,40). A escolha do estágio e sua aplicação na pesquisa, vai depender do objetivo e da pergunta proposta.

2.3 Conservação biológica: *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*

É fato que existe uma grande diferença entre moscas e humanos que se dá inicialmente quanto ao filo (artrópodes x cordatas), porém, apesar disso, aspectos evolutivos são conservados entre os grupos, os quais se destaca o fato de que o sistema nervoso de ambos compartilha uma lógica organizacional conservada (41). Embora o sistema nervoso de drosófila seja anatomicamente e funcionalmente mais simples, esse sistema é subdividido em centros funcionais especializados, responsáveis por processamento de informações sensoriais, coordenação motora, regulação da memória e aprendizado associativo assim como em humanos (42).

Nas moscas, estruturas como lobo óptico, lobo antenal, corpos de cogumelo e complexo central fazem um paralelo com o sistema visual, olfativo, cognitivo e circuito motor encontrado em vertebrados (43) (Figura 2). Além do cérebro, a drosófila possui um cordão nervoso ventral (CNV), uma estrutura organizada de forma segmentar que funciona como um centro de integração motora e sensorial, servindo como um análogo funcional da medula espinhal humana

(44).

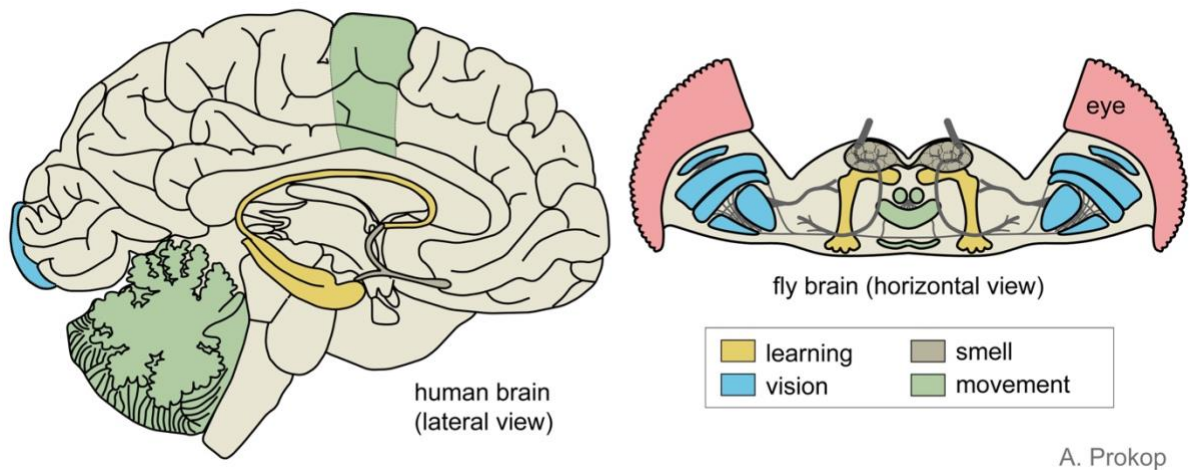


Figura 2. Representação comparativa do cérebro de *Homo sapiens* e *Drosophila melanogaster*. As cores evidenciam as estruturas com funções semelhantes. Fonte: <https://droso4schools.wordpress.com/organs/>.

O CNV contém gânglios segmentares fundidos que coordenam a locomoção, os reflexos e a integração sensório-motora por meio de motivos de circuitos conservados, incluindo geradores de padrões centrais (44). Semelhantemente, a medula espinhal humana é organizada em unidades segmentares repetidas associadas aos nervos espinhais e dermatômos, derivados da segmentação embrionária dos somitos (45) (Figura 3). Apesar das diferenças na anatomia externa, tanto moscas quanto humanos compartilham uma arquitetura neural interna regulada por uma rede de genes homólogos, com destaque para os genes *Hox*, que desempenham papel central no estabelecimento da identidade segmentar ao longo do eixo anteroposterior em ambos os grupos (46).

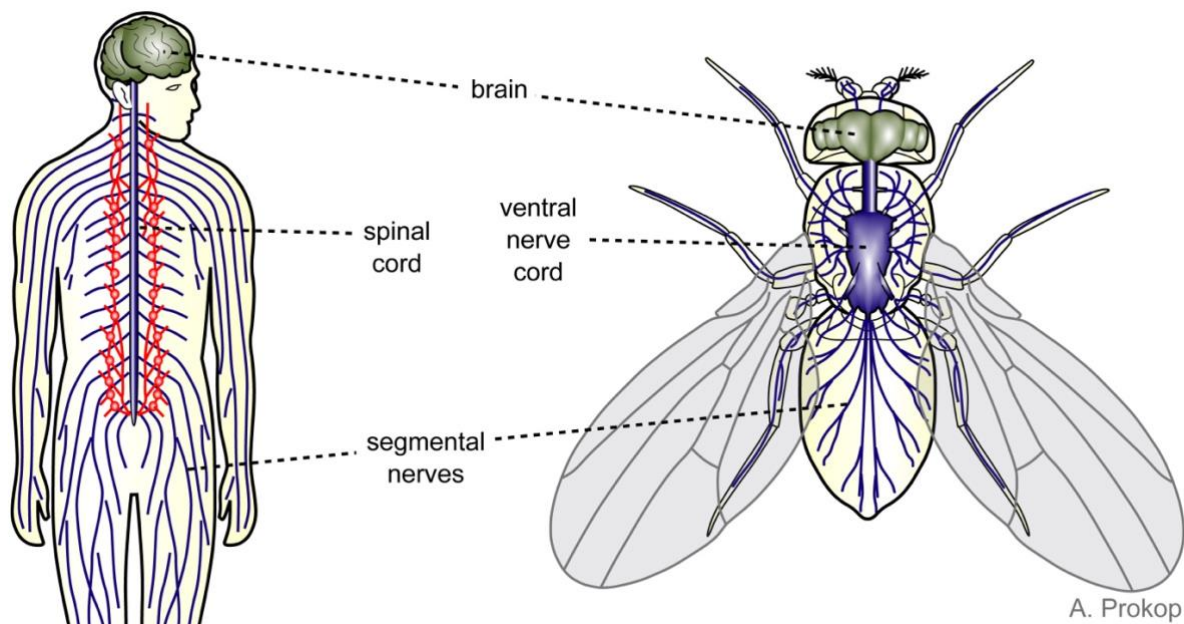


Figura 3. Representação comparativa do sistema nervoso de *Homo sapiens* e *Drosophila melanogaster*. Fonte: <https://droso4schools.wordpress.com/organs/>.

A nível celular e molecular, os mecanismos fundamentais que regulam a função e degeneração neuronal são altamente conservados entre as duas espécies (47,40). Processos essenciais como transmissão sináptica, geração de potencial de ação, transporte axonal, homeostase mitocondrial, homeostase de cálcio, autofagia e morte celular programada operam por meio de vias semelhantes em ambos os organismos (47,48). Além disso, o sequenciamento do genoma da *D.melanogaster*, revelou que aproximadamente 60-70% dos genes humanos associados a doenças, possuem ortólogos funcionais na mosca. Quanto a semelhança a nível proteico, a similaridade global de sequência de aminoácidos entre proteínas homólogas humanas e de moscas é em média em torno de 40%, mas esse número aumenta substancialmente quando se considera apenas os domínios funcionais conservados, atingindo cerca de 80-90% de similaridade (26).

Essa base biológica compartilhada permite que a *D. melanogaster* modele aspectos-chaves de distúrbios neurológicos humanos, abrangendo desde a neurodegeneração até disfunção locomotora, incluindo comprometimento da memória e déficit cognitivo. A aplicação de ferramentas genéticas para manipulação do genoma da mosca permite ampliar ainda mais a usabilidade de moscas na pesquisa (19).

As abordagens de engenharia genética como integração mediada por elemento P ou PhiC31, edição do genoma baseada em CRISPR/Cas9, RNAi (RNA de interferência) e mutações induzidas quimicamente, são exemplos de técnicas que permitem a inserção de genes humanos, reprodução de mutações associadas a doenças, silenciamento de genes endógenos das moscas, ou ainda, controle da expressão gênica de maneira temporal e espacial como por exemplo a partir do uso do sistema UAS-GAL4 (19). Essas técnicas permitem a geração de modelos genéticos altamente controlados que contenham aspectos chaves de patologias humanas como, distrofia muscular (49), câncer (50), epilepsia (51), esclerose lateral amiotrófica (52), doença de Huntington (53), doença de Parkinson (54), diabetes (55), obesidade (56), doença de Alzheimer (57) e até mesmo dor (58) entre outro, fornecendo informações importantes para a compreensão e elaboração de tratamentos.

Apesar disso, é preciso reconhecer limitações importantes ao translacionarmos achados em *D. melanogaster* para humanos. A mosca não possui um córtex estratificado, apresenta um número muito menor de neurônios e possui um cérebro mais compacto e especializado, sem a extensa integração multimodal característica dos sistemas mamíferos (28). Conseqüentemente, certos processos cognitivos, emocionais e sociais não podem ser totalmente replicados em insetos, e distúrbios humanos complexos que envolvem redes corticais superiores excedem a capacidade de representação do sistema nervoso da mosca (59,47).

Isso não desqualifica a *D. melanogaster* como um excelente organismo modelo, considerando que é uma plataforma altamente eficiente para triagem experimental e expressão gênica, permitindo a manipulação precisa e a dissecação de mecanismos moleculares e circuitos neurais conservados, envolvidos na função neural e em doenças. Nesse contexto, seu uso pode ser ainda mais amplificado quando associados a modelos vertebrados complementares, que permitem capturar níveis adicionais de complexidade estrutural e comportamental do cérebro humano, ampliando o potencial translacional dos achados obtidos em sistemas mais simples (60).

2.4 *Drosophila melanogaster* como modelo de doença de Alzheimer

2.4.1 Doença de Alzheimer

2.4.1.1 Características gerais

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais prevalente de demência, sendo responsável por aproximadamente 60-70% dos casos em todo o mundo, e um grande desafio de saúde pública devido ao seu impacto social e econômico com gastos estimados em 1,3 trilhões de dólares anuais em 2020, com projeções de aumento significativo nas próximas décadas (61). Trata-se de uma patologia neurodegenerativa, progressiva e multifatorial, fortemente associada ao envelhecimento e caracterizada por alterações neuropatológicas, e sua forma mais comum e prevalente atinge indivíduos com mais de 65 anos e é chamada de tardia (62).

Apesar da idade ser um fator de risco associado ao desenvolvimento da doença, a DA também pode acontecer em sua forma precoce, também conhecida como familiar, atingindo pessoas entre 40 – 60 anos de idade e responsável por 10% dos casos (63). Essa forma patológica é principalmente determinada por fatores genéticos, em que os pacientes afetados normalmente têm ao menos um familiar de primeiro grau também afetado e hereditariedade autossômica dominante presente, atingindo gerações sucessivas de uma família (63,64).

Estima-se que existem mais de 32 milhões de pessoas diagnosticadas com DA no mundo (65), com projeções de crescimento desse número associado ao aumento da expectativa de vida, podendo atingir 78 milhões de indivíduos em 2030 (66). No Brasil, os números também são expressivos, 8,5% dos idosos com 60 anos ou mais apresentam algum tipo de demência, e 60-70% desses casos são DA (67).

O desenvolvimento da DA inicia-se com alterações moleculares e celulares assintomáticas que precedem os sintomas clássicos (62). O estágio clínico inicial é geralmente caracterizado pela perda de memória recente, com evolução atingindo funções cognitivas como fala, atenção, perda de habilidade espacial, déficit motor e capacidade de utilização de objetos diários. Além disso pode apresentar também alterações comportamentais e de humor como agressividade, irritabilidade, alucinações, hiperatividade, apatia e retraimento social (62,68).

A DA é caracterizada pela redução de sinapses e perda expressiva de neurônios em regiões como córtex cerebral e hipocampo, regiões essenciais para funções cognitivas como linguagem e memória (69). Além disso, a doença é marcada por neuroinflamação, um processo

que envolve a ativação prolongada de micróglia e astrócitos, que passam a liberar citocinas pro-inflamatórias e mediadores oxidativos (70). Essa resposta inflamatória não é apenas uma consequência da patologia, mas também um fator contribuinte para a sua progressão.

Paralelamente, o aumento do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial também atuam nesse cenário patológico (71). A redução da produção de ATP e falhas nos sistemas de controle mitocondrial tornam as células cerebrais mais vulneráveis, intensificando ambos, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo, esse último se dá pelo desequilíbrio redox e tem como consequência o dano a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, favorecendo a morte neuronal (71,62).

Devido a sua complexidade, diversas hipóteses foram propostas para explicar a fisiopatologia da Doença de Alzheimer (72), entre elas se destacam a hipótese colinérgica (73), hipótese glutamatérgica (74), e as pioneiras: hipótese tau (75), que enfatiza a formação de emaranhados neurofibrilares decorrentes da hiperfosforilação da proteína tau, e a hipótese amiloide (76), que descreve a formação de placas senis a partir do processamento da proteína precursora amiloide (APP).

2.4.1.2 Hipótese Amilóide

Historicamente, a hipótese amilóide é uma das precursoras para explicar a cascata patogênica da DA, sugerindo que a deposição de peptídeos β -amilóide ($A\beta$) desempenha um papel iniciador em parte substancial dos casos, influenciando etapas subsequentes como disfunção sináptica, alterações gliais e neurodegeneração (77). Essa hipótese tem como centro o processamento da APP, uma glicoproteína transmembranar do tipo I, e com funções fisiológicas como atuação no crescimento e diferenciação neuronal, adesão celular, neuroplasticidade e manutenção da homeostase (78).

A proteína APP é codificada pelo gene *APP*, e possui três isoformas de diferentes tamanhos (APP770, APP751 e APP695). A isoforma APP695 é encontrada principalmente no cérebro, mais especificamente em neurônios, enquanto as outras isoformas são encontradas em menor nível e localizadas majoritariamente em astrócitos e células periféricas (79). Essa proteína é inicialmente sintetizada no retículo endoplasmático e posteriormente transportada para o complexo de Golgi, onde ocorre sua maturação antes de ser direcionada para a membrana citoplasmática ou para compartimentos endossomais (80)

O processamento da APP pode se dar por duas vias: a não amiloidogênica e a amiloidogênica (80). Na via não amiloidogênica, a APP é inicialmente clivada pela enzima α -secretase na posição do aminoácido 17, gerando os fragmentos sAPP α e o C-terminal (C83). O fragmento C83 é posteriormente clivado pelo complexo γ -secretase, originando peptídeos não patogênicos (P3) e o domínio intracelular AICD (APP *intracelular domain*) (81)

Já na via amiloidogênica, a primeira clivagem é realizada pela enzima β -secretase (BACE), gerando os fragmentos sAPP- β e C99. O fragmento C99 é subsequentemente clivado por γ -secretase, clivagem essa que pode ocorrer em mais de um sítio, e tem como resultado os chamados peptídeos β -amilóide, além do fragmento AICD (81). Devido a possibilidade de clivagem do C99 em diferentes sítios, tem-se a formação de peptídeos A β com variações de tamanho, no entanto as formas A β ₄₀ e A β ₄₂ são as mais abundantes (79). Entre essas, a forma A β ₄₂ é a mais hidrofóbica e apresenta maior propensão a oligomerização. O acúmulo extracelular de A β ₄₂ leva à formação das placas senis, induzem neurotoxicidade e promovem disfunção sináptica além de ativação de micróglia e da resposta imune (82) (Figura 4).

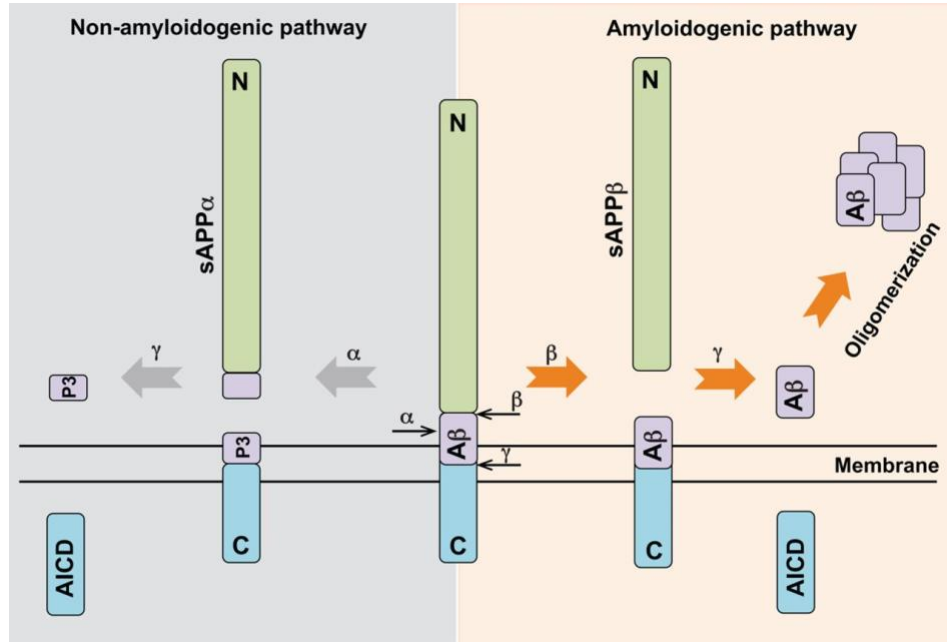


Figura 4. Representação esquemática das duas principais vias de processamento da APP. À esquerda, a via não amiloidogênica demonstra a clivagem da APP pela α -secretase dentro da região do peptídeo A β , gerando os fragmentos sAPP α e C83, posteriormente processado pela γ -secretase em P3 e AICD. À direita, a via amiloidogênica ilustra a clivagem inicial pela β -secretase, formando sAPP β e

C99, seguida pela ação da γ -secretase, que gera os peptídeos β -amiloide ($A\beta_{40}/A\beta_{42}$) e o domínio intracelular AICD. Fonte: Nicolas & Hassan (2014) (83).

2.4.1.3 Componentes genéticos da Doença de Alzheimer

Evidências apontam um componente genético relevante na suscetibilidade à DA, embora fatores ambientais e estilo de vida também contribuam para o risco (84). O Alzheimer familiar/precoce está associado a mutações autossômicas dominante nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*. O gene *APP* se encontra localizado no braço longo do cromossomo 21 e codifica a proteína precursora de amiloide (APP). Já os genes *PSEN1* e *PSEN2* localizados nos cromossomos 14 e 1 respectivamente, codificam subunidades catalíticas do complexo γ -secretase, enzima responsável pela clivagem final da APP na via amilodogênica (85).

As principais mutações patogênicas em *APP* geralmente ocorrem em regiões próximas ao sítio de clivagem das secretases. A mutação clássica KM670/671NL, é uma mutação missense, localizada no éxon 16 e próxima ao sítio de clivagem da β -secretase, promove o aumento da eficiência dessa clivagem inicial, elevando a quantidade total de substrato disponível para a γ -secretase, e conseqüentemente a produção global de $A\beta$ (86,87). Já mutações como V717, localizada no domínio transmembrana próximo ao sítio de clivagem da γ -secretase, alteram a orientação da APP dentro do sítio catalítico, deslocando o ponto de clivagem e favorecendo a geração de $A\beta_{42}$ em razão de $A\beta_{40}$ (88).

Os genes *PSEN1* e *PSEN2* também são importantes no processo patológico da DA. Esses genes codificam as proteínas presenilina-1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) respectivamente, que fazem parte do núcleo catalítico do complexo γ -secretase (89). As presenilinas possuem múltiplos domínios transmembrana e contém resíduos catalíticos de ácido aspártico que formam o sítio ativo da enzima, de modo que as proteínas não apenas participam estruturalmente do complexo mas também são importantes para determinar a posição e eficiências das clivagens realizadas dentro do domínio transmembrana da APP (89,90).

Mutações patogênicas nos genes *PSEN1* e *PSEN2* prejudicam a estabilidade conformacional do complexo γ -secretase-substrato, reduz a eficiência de clivagem e como consequência, provocam a liberação antecipada do peptídeo em sua forma prematura, e com maiores comprimentos como $A\beta_{1-42}$ e $A\beta_{1-43}$, espécies com maior hidrofobicidade como anteriormente mencionado (89).

Além das formas familiares associadas a mutações raras de alta penetrância, a Doença de Alzheimer esporádica, particularmente a de início tardio, apresenta uma base genética mais complexa e multifatorial. Nesse contexto, o gene *APOE* constitui o principal fator genético de risco conhecido. Localizado no cromossomo 19, o *APOE* codifica a proteína APOE (apolipoproteína E) envolvida no transporte e metabolismo de lipídios no sistema nervoso central, sendo expressa predominantemente em astrócitos e, em menor grau, em micróglia, onde desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase neuronal (91,92).

O gene APOE apresenta três alelos principais na população humana ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$), os quais diferem entre si por substituições de aminoácidos que resultam em alterações estruturais e funcionais da proteína. O alelo $\epsilon 4$ está fortemente associado ao aumento do risco para DA e à antecipação da idade de início da doença, enquanto o alelo $\epsilon 2$ pode exercer efeito parcialmente protetor. Importante destacar que a presença do alelo $\epsilon 4$ não é determinística, mas atua como um fator de susceptibilidade (91,92).

Do ponto de vista mecanístico, as diferentes isoformas de APOE modulam múltiplos processos centrais à fisiopatologia da DA. Evidências indicam que a isoforma APOE4 está associada a menor eficiência na depuração de peptídeos β -amiloides, favorecendo sua agregação e deposição no parênquima cerebral. Adicionalmente, diferenças conformacionais entre as isoformas afetam a interação com receptores lipoproteicos, a plasticidade sináptica, a integridade da barreira hematoencefálica e a resposta inflamatória mediada por células gliais, contribuindo para um ambiente cerebral mais vulnerável à neurodegeneração (93).

Dessa forma, enquanto mutações em *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* atuam diretamente na produção do peptídeo β -amiloide nas formas familiares da doença, o *APOE* tem papel predominante como um modulador de risco na DA de início tardio, influenciando a dinâmica de agregação, *clearance* e toxicidade do A β , bem como processos neuroinflamatórios e metabólicos (91,94).

2.4.2 Modelos amiloidogênicos de *Drosophila melanogaster*

A utilização de *D. melanogaster* como organismo modelo em estudos relacionados a Doença de Alzheimer (DA), consolidou-se nas últimas décadas principalmente devido a combinação entre conservação evolutiva, facilidade de manipulação e reprodutibilidade experimental. Embora a mosca não desenvolva espontaneamente a patologia, é possível

reproduzir com certa fidelidade mecanismos centrais da neurodegeneração associada a DA, como agregação proteica, estresse oxidativo, alterações sinápticas e morte neuronal progressiva associada ao envelhecimento, o que com seu curto ciclo de vida, a torna ainda mais favorável para esse tipo de estudo (95,96).

Considerando as duas hipóteses iniciais da fisiopatologia de DA, hipótese tau e hipótese amiloide, é possível reproduzir recortes de ambas em moscas de formas separadas ou conjunta. A expressão de tau (MAPT) humana em drosófila provou-se suficiente para induzir neurodegeneração progressiva, demonstrando que a toxicidade tau-associada pode ocorrer independentemente da formação de placas amilóides (97). Além disso, estudos em moscas, permitiram a elucidação do papel das quinases como a GSK-3beta, na hiperfosforilação de tau e na modulação de sua toxicidade (98).

Os modelos amiloidogênicos baseiam-se na expressão de elementos-chave associados à via amiloidogênica da DA. Os principais são construídos a partir da inserção da proteína precursora de amiloide (APP) e da enzima β -secretase (BACE), ou ainda pela expressão direta do peptídeo A β 1-42 (99,100,101). Apesar da drosófila possuir um gene ortólogo endógeno de APP, chamado *Appl* (APP-like), cuja função está relacionada ao crescimento axonal e plasticidade sináptica, ainda assim, não produz naturalmente o peptídeo A β , isso porque além de não possuir um equivalente de BACE, a sequência de APP e APPL divergem-se nas posições que constituem os peptídeos A β (95). Sendo assim a forma mais eficiente de produzir um modelo para estudos dessa via é a partir da construção de transgênicos, inserindo sequências dos genes humanos. Quando se expressa a combinação APP + BACE, o processamento da APP ocorre inicialmente pela BACE transgênica, e em seguida, pela γ -secretase endógena, que é capaz de realizar a ação catalítica no sítio correspondente (99), sendo esse um modelo que permite não apenas modelar a via amiloidogênica mas também, testar compostos com potencial terapêutico com diferentes alvos. Já os modelos que expressam A β 42 constituem um modelo mais direto, mas em ambos os casos, usa-se frequentemente o sistema UAS/GAL4 para a construção (102).

2.4.2.1 Sistema UAS/GAL4

O sistema UAS-GAL4 foi originalmente descoberto em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (103) mas expresso em drosófila pela primeira vez em 1993 (104). Trata-se de um

sistema binário no qual o fator de transcrição GAL4 reconhece e ativa sequências regulatórias UAS (*Upstream Activating Sequence*) posicionadas a montante do gene alvo (105).

Em *D. melanogaster* modelo de DA, esses elementos são mantidos inicialmente separados, de modo que seja possível manter linhagens com genes cujos produtos podem ser letais, tóxicos ou que reduzem a viabilidade da mosca quando expresso (106). Linhagens contendo GAL4 são chamadas de *driver* e podem expressá-lo sob o controle de promotores tecido-específicos ou estágio dependentes, enquanto linhagens *responder* carregam o gene de interesse sob controle do UAS (107). O cruzamento dessas linhagens resulta na ativação dos genes de interesse apenas nas células onde o driver estiver ativo, permitindo uma modelagem precisa (Figura 5).

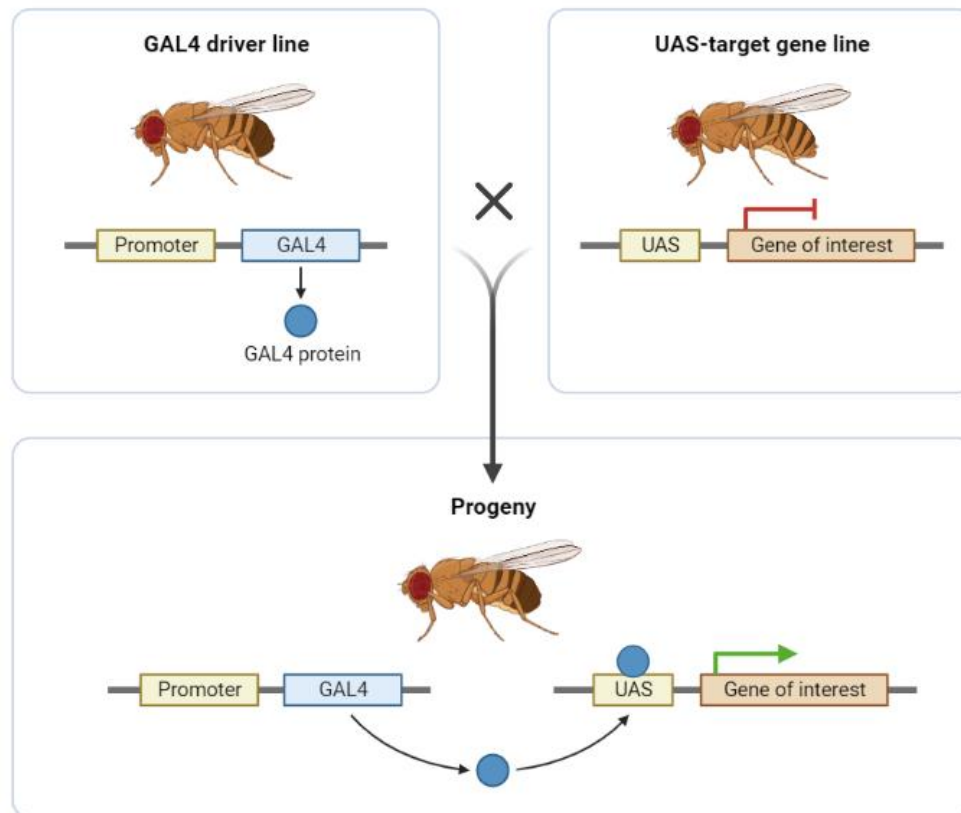


Figura 5. Representação esquemática do sistema UAS/GAL4 em *Drosophila melanogaster*. O cruzamento entre uma linhagem driver (GAL4) e uma linhagem responder (UAS-gene de interesse) resulta em progênie com expressão tecido-específica do gene de interesse mediada pela interação entre GAL4 e a sequência UAS. Fonte: Kim, S (2026) BioRender (108).

Frequentemente nos modelos de DA, as linhagens *responders* possuem UAS-BACE, UAS-APP ou UAS-A β 1-42, enquanto os drivers mais comuns são elav-Gal4 (pan-neuronal), e GMR-GAL4 (olho) (102). A escolha do driver e do responder e qual a combinação a ser utilizada, depende diretamente do objetivo da pesquisa. Diferentes combinações podem gerar fenótipos e possibilidades de análises distintas, que variam entre foco em análise estrutural, comportamental, além de considerar os aspectos de reprodutibilidade e letalidade/toxicidade (109).

2.4.2.2 Modelo GMR; A β 1-42

Embora a DA afete primariamente o sistema nervoso central, diversos modelos de drosófila utilizam o olho composto como tecido-alvo para a expressão de A β 1-42 (102), por meio do driver GMR-GAL4. O elemento GMR (*Glass Multiple Reporter*) é um componente regulatório constituído por múltiplos sítios de ligação para o fator de transcrição Glass. O gene *glass* codifica uma proteína do tipo *zinc-finger* que atua como regulador terminal do desenvolvimento do olho em drosófila, sendo essencial para a diferenciação e manutenção da identidade neuronal dos fotorreceptores durante a formação do epitélio ocular (110).

Durante o desenvolvimento do disco imaginal ocular, o fator Glass é expresso predominantemente em fotorreceptores e células associadas, onde ativa programa gênicos necessários para a organização dos omatídios e a maturação funcional do tecido neuronal do olho (110). A partir desse princípio, o drive GMR-GAL4 foi construído ao acoplar o fator de transcrição Gal4 à sequências regulatórias responsivas a Glass, resultando em expressão robusta ao epitélio neuronal do olho, especialmente os fotorreceptores (102,111).

O cruzamento de GMR-GAL4 com uma linhagem UAS- A β 1-42 gera então uma prole cuja expressão de A β 1-42 está sob controle de GAL4 e com direcionamento ao tecido ocular, resultando em fenótipos chamados de “*rough eye*” ou olho enrugado, caracterizado pela desorganização omatídica, fusão estrutural, perda de simetria e formação de vacúolos como sinais de neurodegeneração (95). Esse modelo oferece vantagens metodológicas importantes como facilidade de análises quantitativas de expressão do peptídeo β -amilóide, e possibilidade de análise de fenótipo com adultos a partir do primeiro dia pós eclosão (112,113).

Esse modelo, no entanto, não tem o foco primário de reproduzir déficits cognitivos, mas reproduz mecanismos celulares fundamentais da neurotoxicidade associada ao A β como

agregação proteica e degeneração neuronal (114). O epitélio ocular atua como um bioensaio neuronal informativo permitindo a avaliação dos efeitos moduladores de intervenções experimentais como possíveis tratamentos, em um tecido acessível e não essencial a sobrevivência (47). Além das alterações observadas na retina, modelos GMR;A β 1-42 apresentam sinais de neurodegeneração em outras áreas como lobo óptico, particularmente na região medular (113). Isso se dá pela organização do sistema visual da mosca, os fotorreceptores localizados na retina projetam seus axônios para regiões mais profundas do cérebro estabelecendo sinapses com neurônios pós-sinápticos do lobo óptico.

Dessa forma, retina, lamina e medula constituem um circuito neuronal contínuo, funcional e anatomicamente integrado (115,116). A presença de vacúolos na medula reflete processos neurodegenerativos anterógrados e disfunção do transporte axonal, fenômenos descritos em modelos de neurodegeneração e consistentes com eventos iniciais observados em DA, no qual a perda sináptica precede a morte neuronal (117). As avaliações fenotípicas nesse modelo incluem, portanto, quantificação do nível organizacional dos omatídios na estrutura externa, quantificações de vacúolos, quantificação de peptídeos A β , avaliação de níveis de expressão gênica, entre outros (113).

2.5 Abordagens terapêuticas na Doença de Alzheimer

Tradicionalmente, os tratamentos para a DA se concentra em sintomáticos, medicações como os inibidores de colinesterase, Donezepil, Rinvastigmina e Galantamina, e os antagonistas do receptor NMDA como a memantina são alguns dos exemplos (118,119). Apesar desses medicamentos proporcionarem benefícios na cognição e funcionamento diário dos pacientes, não são capazes de modificarem o processo neurodegenerativo subjacente (120). Com os avanços das pesquisas, na última década, observou-se uma mudança nas abordagens terapêuticas que se voltaram para o desenvolvimento de modificadores patológicos, particularmente aqueles direcionados a via amiloide (119,121). Paralelamente, estratégias não farmacológicas como estimulação cognitiva, atividade física, apoio psicossocial, são amplamente recomendadas para melhorar a qualidade de vida (122)

As terapias direcionadas a via amiloidogênica visam reduzir a carga cerebral de peptídeos A β , seja diminuindo sua produção, impedindo sua agregação, ou facilitando sua eliminação (123). Os anticorpos monoclonais anti-A β , como o Aducanumab, o Lecanemab e o

Donanemad foram projetados para se ligarem seletivamente a espécies agregadas de A β , incluindo oligômeros e fibrilas, facilitando sua remoção por meio da fagocitose mediada pela micróglia (124,125,126). Inibidores de β -secretase também foram desenvolvidos focados em reduzir a produção de A β , no entanto a falha em ensaios clínicos de fase avançada e a eficácia limitada levantaram algumas preocupações (127).

O Aducanumab foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2021 após demonstrar redução de placas amiloides em ensaios de fase 3, no entanto os benefícios clínicos continuam controversos (128). O Lecanemab foi capaz de diminuir significativamente o declínio cognitivo e funcional em pacientes com DA precoce (129), e o Donanemab desacelerou a progressão da doença também em pacientes com sintomas precoces e comprometimento cognitivo leve (130). No entanto, essas terapias foram associadas a anormalidade de imagem relacionadas ao amiloide, incluindo edema vasogênico e micro-hemorragias, exigindo monitoramento cuidadoso (131,132).

2.5.1 Probióticos no tratamento de Alzheimer

Além das terapias convencionais e direcionadas à via amilodogênica, destaca-se também o potencial dos probióticos como tratamentos adjuvantes para a DA (133), principalmente por meio da modulação do eixo intestino-cérebro. Esse eixo representa uma via bidirecional de comunicação que envolve mecanismos celulares e moleculares e alterações na composição da microbiota intestinal podem influenciar a neuroinflamação, o estresse oxidativo, e a integridade da barreira hematoencefálica no contexto de doenças neurodegenerativas (134).

Nesse contexto, os probióticos podem atuar por múltiplos mecanismos. Entre eles, destacam-se a modulação da resposta imune, a produção de metabólitos microbianos, como ácidos graxos de cadeia curta, que exercem efeitos neuroprotetores e regulam a função da barreira hematoencefálica; e a influência sobre a permeabilidade intestinal, contribuindo para a manutenção da homeostase sistêmica. Além disso, evidências sugerem que a microbiota pode modular a sinalização neural por meio do nervo vago, impactando diretamente a função cerebral (135,136).

Estudos clínicos e pré-clínicos indicam que a suplementação probiótica, particularmente com cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, melhoram o desempenho cognitivo, reduzem as citocinas inflamatórias e aumentam a capacidade antioxidante em pacientes com DA leve a

moderada (137,133,138,139,140,141). Além de mostrar que animais e pacientes que receberam probióticos, apresentaram sinais de melhoras nos parâmetros avaliados tais como diminuição da agregação de placas senis e restauração de vias proteolíticas neuronais, promovendo uma atenuação dos níveis de declínio cognitivo (142).

2.5.1.1 Kefir

Entre os probióticos conhecidos e com ampla aceitabilidade, tem-se o Kefir, e popularmente conhecido como uma bebida fermentada. Kefir é uma colônia de bactérias e leveduras que vivem em simbiose formando uma estrutura com aspecto granuloso, e que quando ambientada em leite ou água executam o processo de fermentação gerando então a bebida que pode ser utilizada no dia a dia. Sua composição pode ser alterada por fatores ambientais, porém, diferentes estudos indicam que em sua composição, predominam bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* e leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* (143). As bactérias presentes no Kefir desempenham um importante papel no processo de fermentação, e a depender de seu substrato, pode gerar como produtos proteínas e peptídeos bioativos com funções biológicas distintas (144,145,146).

Trabalhos como o de Batista *et. al* (147) descreve como o Kefir *in natura* e suas frações metabólicas atenuam o fenótipo de Alzheimer, e de modo complementar o trabalho de Malta *et. al* (146) apresenta resultados semelhantes, porém, investigando o efeito de frações peptídicas, ambos em moscas modelo de Alzheimer construídas a partir do cruzamento de elavGal4 x UAS-BACE,UAS-APP, incluindo a predição do potencial de interação desses peptídeos com alvos relevantes da via amiloidogênica, como a BACE1, peptídeo A β e enzima acetilcolinesterase. Em conjunto esses estudos compõe a base experimental desta linha de pesquisa, e evidenciam uma progressão metodológica de abordagens computacionais à validação em modelos *in vivo* de produtos derivados do kefir.

Para além de suas características como modulador da microbiota, o kefir e seus derivados apresentam capacidade antioxidante e anti-inflamatória, o que reforça ainda mais sua aplicação mesmo que como estratégia coadjuvante, em tratamentos para a Doença de Alzheimer (148). Uma abordagem baseada no uso de frações e moléculas específicas oriundas do kefir, em preferência ao uso *in natura*, constitui uma escolha pertinente que permite uma melhor

reprodutibilidade experimental, reduz variações de composição e pode facilitar o processo de dosagem (144,143).

Embora ensaios clínicos de larga escala ainda sejam necessários para padronização de formulação, dosagem e avaliação de eficácia a longo prazo, estratégias baseadas em probióticos representam intervenções auxiliares acessíveis, de baixo custo e biologicamente seguras, sem relatos consistentes de efeitos colaterais, além de sustentarem uma abordagem multimodal para o tratamento da Doença de Alzheimer (133).

2.6 *Drosophila melanogaster* como modelo para nocicepção

2.6.1 Dor e Nocicepção

2.6.1.1 Conceitos fundamentais e processos neurais da nocicepção

Dor é classificada como uma experiência sensorial e emocional subjetiva resultante da atividade neural e desencadeada por estímulos potencialmente prejudiciais, e nocicepção se refere aos processos fisiológicos responsáveis pela detecção, transdução e transmissão desses estímulos (149,150). Essa distinção é importante para compreensão de que nocicepção pode ocorrer sem percepção de dor, e dor pode surgir na ausência de lesão tecidual detectável. A intensidade da percepção da dor depende não apenas de nociceptores, mas também dos sistemas moduladores descendentes e das redes límbicos-corticais que integram emoção, expectativa e memória, que são bases que fundamentam a analgesia placebo e a hiperalgesia impulsionada emocionalmente (151).

Os processos fisiológicos da nocicepção iniciam-se com a detecção de um estímulo nocivo a partir dos nociceptores periféricos, que são neurônios sensoriais primários localizados na raiz dorsal e nos gânglios trigeminais, com terminações nervosas livres nos tecidos como epitelial, muscular, e também presente nas articulações, ossos e vísceras (152). Estruturalmente, são divididos em fibras A- δ (delta) e A- β (beta) mielinizadas, responsáveis por mediar a dor rápida e aguda, e fibras C não mielinizadas, que medeiam a dor lenta, ardente e difusa (153). Funcionalmente, os nociceptores podem ser diferencialmente subdivididos a depender do tipo de informação que transmitem, como mecanorreceptores de alto limiar (estimulação mecânica intensa), receptores térmicos, químicos, polimodais (respondem a mais de um tipo de estímulo lesivo) e receptores silenciosos. Em condições inflamatórias, a especificidade modal pode ser alterada, e pode ocorrer a amplificação sensorial e a hipersensibilidade (154).

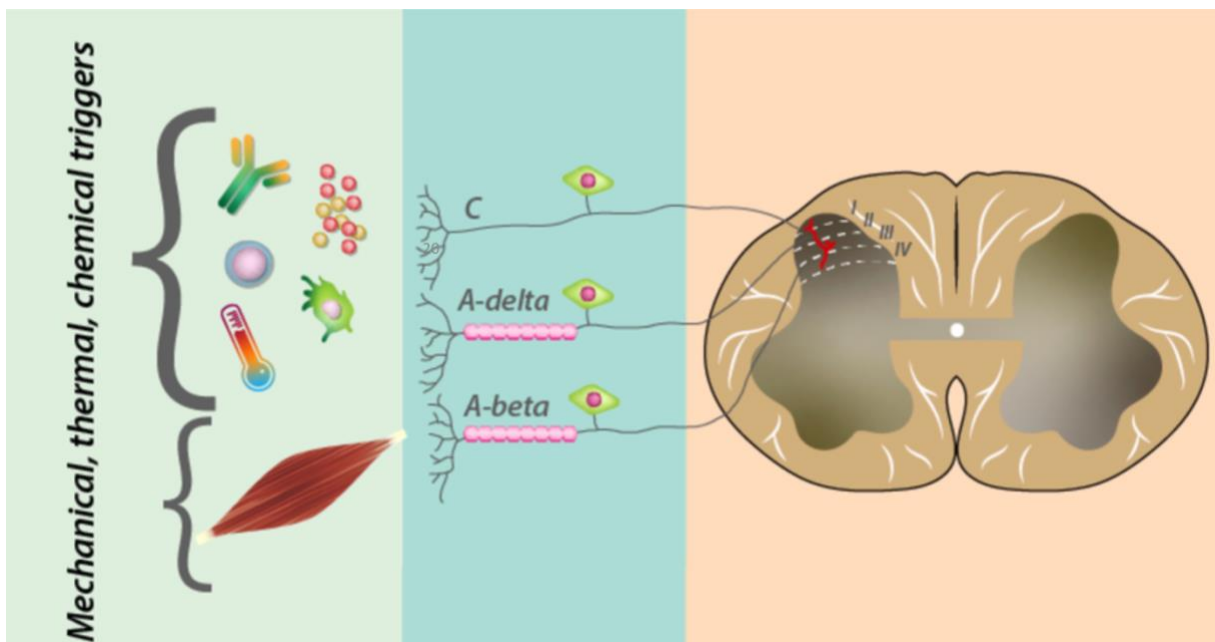


Figura 6. Representação esquemática das vias de transmissão sensorial periférica para a medula espinhal. Diferentes estímulos periféricos, incluindo sinais mecânicos, térmicos, químicos e desencadeados por lesão tecidual, são detectados por fibras aferentes sensoriais do tipo C, A δ e A- β , que diferem em diâmetro, mielinização e velocidade de condução. Essas fibras projetam-se para diferentes lâminas do corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre o processamento inicial das informações sensoriais e nociceptivas. Fonte: Sunzini et. al (2023) (155), com modificações.

A detecção inicial ocorre quando estímulos mecânicos, térmicos ou moleculares ativam receptores específicos na membrana do nociceptor. (71). Uma vez detectado o estímulo, segue-se para a etapa de transdução onde canais sensoriais como TRPV (que detectam estímulos térmicos e químicos), convertem a energia do estímulo recebido em correntes elétricas despolarizante, permitem a entrada de cátions e geram um potencial receptor que, se atingem o limiar de excitação, ativam os canais de sódio voltagem-dependentes e geram um potencial de ação aferente (150) . Quando o limiar é atingido, o potencial de ação propaga-se ao longo das fibras A- δ e C até a medula espinhal, caracterizando a etapa de transmissão.

2.6.1.2 Canais de sódio voltagem-dependente

A geração e propagação de potenciais de ação são essenciais para a transmissão de sinais nociceptivos e dependem dos canais de sódio voltagem-dependentes (Nav). Existem nove

subtipos de canais de sódio conhecidos, e entre eles, os canais Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 tem um papel preponderante na sinalização nociceptiva (156).

O Nav1.7, é um canal codificado pelo gene *SCN9A* que é expresso predominantemente em neurônios nociceptivos periféricos como os presentes nos gânglios da raiz dorsal, gânglios trigeminais, epitélio olfativo e neurônios do sistema simpático (157). Sua principal função é regular o limiar dos potenciais de ação, tornando os neurônios mais propensos a dispararem sinais elétricos quando submetidos a estímulos de baixa intensidade (158). A presença de Nav1.7 nos nociceptores está diretamente associada à percepção da dor e alterações genéticas no *SCN9A* afetam diretamente a sensibilidade dessa percepção. Mutações de ganho de função podem resultar em quadros de dor espontânea ou crises intensas, como ocorre em quadros de eritromelalgia e neuropatia de pequenas fibras, já mutações de perda de função que reduzem ou eliminam a função do Nav1.7 levam a incapacidade de sentir dor, embora ainda seja possível a percepção de tato e pressão (159,160).

Nav1.8 é codificado pelo gene *SCN11A* e é fundamental na transmissão dos sinais nociceptivos, diferentemente do Nav1.7 que também atua no sistema nervoso central, o Nav1.8 não participa de funções centrais, e é expresso principalmente em neurônios sensoriais periféricos, como gânglios de raiz dorsal e neurônios nodais (161,162). Quando os canais de sódio se abrem nos neurônios sensoriais primários, ocorre um grande influxo de íons de sódio, que levam à despolarização da membrana e contribuem para a geração e manutenção dos potenciais de ação, enquanto o Nav1.7 regula o limiar para o disparo desses potenciais, o Nav1.8 influencia principalmente a fase ascendente e a amplitude do sinal elétrico, e mutações de ganho de função em Nav1.8 estão associadas a hiperexcitabilidade e dores neuropáticas (161,163).

Por fim, o canal Nav1.9, tem sua unidade funcional codificada por *SCN11A*, e é expresso principalmente em nociceptores sensoriais de músculos e vísceras, além de neurônios nos gânglios de raiz dorsal e trigeminais como os anteriores (164,165), porém, diferente de Nav1.7 e Nav1.8, o Nav1.9 apresenta uma ativação e desativação mais lenta, e gera correntes de sódio prolongadas além de não estar diretamente envolvido na etapa de despolarização do potencial de ação (166). O fluxo de íons sódio mediado por esse canal atua na amplificação de estímulos abaixo do limiar, e exerce uma função fundamental de regulação do repouso celular. Apesar de ainda existirem debates sobre o papel exato do Nav1.9, tem-se o consenso sobre a importância do mesmo para o início dos sinais nociceptivos e desenvolvimento da hiperexcitabilidade,

principalmente em processos inflamatórios (156). Mutações em SCN11A estão relacionadas a diferentes distúrbios hereditários como dor episódica familiar, insensibilidade congênita a dor e neuropatia hereditária, especificamente mutações de ganho de função podem acarretar excitabilidade neuronal anormal e descargas dolorosas excessivas (167).

2.6.2 Dor crônica

A dor crônica, definida como dor persistente ou recorrente por mais de três meses (168), é reconhecida como uma patologia e não apenas como um sintoma. É altamente prevalente em adultos, mas também pode afetar outros grupos populacionais (169). Sua fisiopatologia envolve a sensibilização periférica persistente, na qual nociceptores permanecem ativados por longos períodos, levando à expressão sustentada de canais pró-nociceptivos que aumentam a excitabilidade neuronal. Essa ativação contínua pode ser desencadeada por lesões, inflamações ou alterações metabólicas, resultando em uma resposta exacerbada (alodinia) e aumento da intensidade da dor (hiperalgesia) (170). Os canais de sódio Nav1.7 representam um ponto central nesse processo, principalmente por serem altamente expressos nos neurônios periféricos e pelo papel fundamental que exercem no disparo e na propagação dos potenciais de ação (171).

O processo fisiopatológico envolve também a remodelação duradoura tanto na medula espinhal quanto em regiões supra medulares (172). A sensibilização central é caracterizada pelo aumento da transmissão sináptica excitatória, associada a uma maior liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato, concomitante ao enfraquecimento do tônus inibitório e redução da ação de neurotransmissores inibitórios como GABA e glicina (173,174). Além disso, ocorre a ativação da micróglia e astrócitos, que passam a liberar mediadores como o fator neurotrófico derivado do cérebro, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que atuam alterando a plasticidade sináptica e favorecendo a manutenção do estado persistente de hiperexcitabilidade neuronal (175).

Além das alterações periféricas e centrais que sustentam a dor crônica, há paralelamente uma disfunção progressiva dos sistemas inibitórios descendentes, cuja função é atuar na modulação e supressão da transmissão nociceptiva à medula espinhal (176). O eixo formado pela substância cinzenta periaquedutal (SCP) e pelo bulbo rostral ventromedial (RVM – *Rostral Ventromedial Medulla*), tem papel central nesse processo, pois, em condições fisiológicas, essas estruturas liberam neurotransmissores como opioides endógenos, serotonina e noradrenalina,

com o objetivo de reduzir a excitabilidade nos neurônios do corno dorsal e limitar a percepção dolorosa (177,178).

No entanto, no contexto patológico da dor, o eixo SCP-RVM pode sofrer uma mudança funcional, deixando de ser predominantemente inibitório e atuando como facilitador, podendo amplificar a transmissão nociceptiva, aumentando a sensibilidade a dor e contribuindo para estados persistentes (179,180). Essa alteração do eixo está associada à ativação de circuitos neuronais e gliais, a liberação de mediadores pró nociceptivos, e à redução da eficácia dos mecanismos endógenos de analgesia (181).

2.6.3 Nocicepção em *Drosophila melanogaster*

Nocicepção é a capacidade de detectar e responder a estímulos potencialmente danosos. Em moscas, a nocicepção medeia comportamentos de fuga, com estereotípias associadas a diferentes fases do desenvolvimento. A resposta fenotípica difere entre adultos e larvas, mas os processos mecanísticos são consistentes (182,183). Em larvas, a nocicepção envolve uma sequência organizada de detecção periférica, transdução eletrofisiológica, transmissão dependente de canais de sódio e integração central, que resulta em uma resposta motora adaptativa (184). Os comportamentos de fuga mediados por nocicepção incluem rotação (*rolling*), flexão do corpo ou contração das extremidades quando submetidas a situações de calor, frio, pressão ou substâncias químicas nocivas, podendo um comportamento ser mais ou menos ativado a depender do estímulo (183).

Larvas de terceiro instar (L3) possuem um sistema nervoso simples, com neurônios sensoriais multidendríticos (md) sob a cutícula e um conjunto relativamente pequeno de interneurônios no cordão nervoso ventral. Os neurônios md são categorizados em quatro classes (I-IV) e o envolvimento desses neurônios também depende do tipo de estímulo recebido, se mecânico, térmico ou químico, e podem ter níveis de ativação distintos a depender da condição. Em condição de estímulo químico nocivo, todos os tipos de md são necessários para gerar uma resposta completa, no entanto, os md de classe IV são mais fortemente ativados na presença de estímulos químicos como ácidos a exemplo do ácido clorídrico (HCl) (185,186,184).

A transmissão e processamento de um estímulo nocivo inicia-se com a detecção do estímulo. Em drosófila um estímulo químico ativa os canais sensoriais como TRPA1, que permite a entrada de cátions e gera potenciais de receptor nas terminações dendríticas. Estes

potenciais graduados precisam então ser amplificados e convertidos em potenciais de ação, processo que depende dos canais de sódio voltagem-dependentes (187,188). Nos nociceptores mdIV, correntes de Na^+ são necessárias para que o sinal se propague ao longo do axônio até o sistema nervoso central, onde esses neurônios fazem sinapses principalmente com interneurônios no CNV. A partir dessa integração central, a informação nociceptiva é retransmitida para circuitos motores descendentes, culminando na ativação coordenada da musculatura corporal e na execução de respostas comportamentais estereotipadas de escape (189,190)

2.6.3.1 Canais de sódio voltagem-dependente em *Drosophila melanogaster*

Os canais de sódio voltagem-dependente são componentes importantes da excitabilidade neuronal, sendo responsáveis pela propagação dos potenciais de ação em neurônios periféricos e centrais. Diferente de vertebrados que apresentam uma família expandida de genes codificantes desses canais, em drosófila tem-se apenas o gene *paralytic*, conhecido como *para* (191).

O gene *para* codifica a subunidade alfa de um canal de sódio-voltagem dependente funcionalmente análogo aos canais Na_v de vertebrados (191). Estruturalmente, o canal Para apresenta a arquitetura clássica altamente conservada, composta por quatro domínios homólogos (DI-DIV), cada um contendo seis segmentos transmembranares (S1-S6). Os segmentos S4 atuam como sensores de voltagem, enquanto os segmentos S5-S6 formam o poro seletivo ao Na^+ (192) (Figura 7).

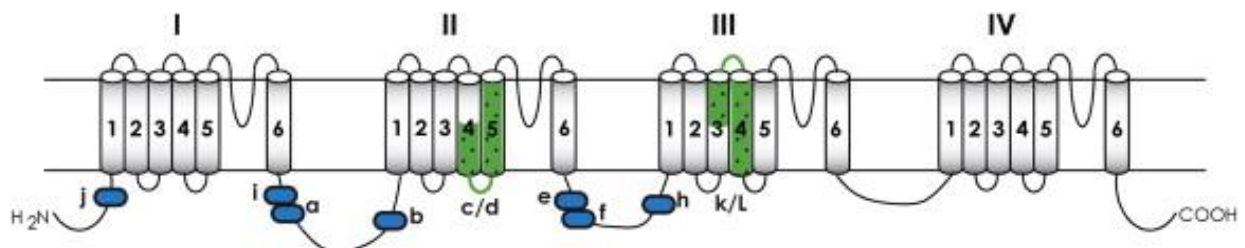


Figura 7. Representação esquemática do canal de sódio voltagem dependente em *Drosophila melanogaster*. Em algarismos romanos estão representados os domínios de I – IV e em números indo-arábicos estão representados os segmentos transmembranares. Fonte: Dong *et. al.* (2014) (193).

Funcionalmente, o canal Para desempenha papel essencial tanto no sistema nervoso periférico quanto central. Em neurônios sensoriais, como os nociceptores mdIV, a atividade dos canais de sódios é importante para conversão dos potenciais receptores graduados em potenciais de ação propagantes, e no sistema nervoso central, Para sustenta a transmissão sináptica eficiente, a integração de circuitos e a coordenação de comportamentos complexos (194).

Do ponto de vista translacional, o gene *para* é amplamente utilizado como modelo funcional para o estudo de canalopatias humanas associadas à canais de sódio, incluindo epilepsia e distúrbio de excitabilidade neuronal (195). Mutantes clássicos como *para^{bssl}*, carregam mutação de ganho de função que aumentam a excitabilidade neuronal, reduzem o limiar de disparo e conferem fenótipos comportamentais como hipersensibilidade e comportamento *bang-sensitive* em moscas adultas (195). Essas alterações mimetizam, em nível funcional, mutações descritas em canais humanos como Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 frequentemente associadas a síndromes de dor crônica e epilepsias genéticas (196,195).

2.6.4 Tratamentos farmacológicos para dor crônica

Devido as complexidades que envolvem a fisiopatologia da dor crônica, abordagens terapêuticas costumadamente não se limitam a uma única classe de medicamento, o manejo multimodal pode incluir diferentes estratégias farmacológicas que vão atuar em diferentes alvos biológicos e pode combinar também estratégias não farmacológicas como fisioterapia, psicoterapia e técnicas de reabilitação a depender da área afetada, visando a melhora da qualidade de vida do individuo afetado (197).

Entre as principais classes de medicamentos prescritos, tem-se os anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs), utilizados principalmente em dores de origem inflamatória, mas cuja eficácia é relativamente limitada e o uso prolongado pode causar efeitos adversos gastrointestinais, renais e cardiovasculares. Os medicamentos como antidepressivos tricíclicos e inibidores de receptação de serotonina e noradrenalina, podem ser indicados em casos de dores neuropáticas e nociplásticas, atuando na modulação descendente da dor (197,198).

Além disso, medicamentos com propriedades anticonvulsivas e opioides fazem parte das possíveis indicações. Anticonvulsivantes como Gabapentina, Pregabalina agem reduzindo a excitabilidade neuronal assim como a Carbamazepina, um medicamento de primeira linha para neuralgia do trigêmeo, mas que também é empregado em outras condições de dor neuropática

(199,200). No entanto, o uso desses fármacos está associado a uma carga significativa de efeitos colaterais que incluem sedação e tontura, o que pode ser um limitante na tolerabilidade e adesão ao tratamento (201,202).

Os opioides por sua vez, não são opções primárias devido ao risco de dependência, tolerância e efeitos adversos, sendo comumente prescrito para condições de dor refrataria e tratamentos oncológicos, mas ainda enfrenta controvérsias sobre seus benefícios (197). Dado esse cenário, nos últimos anos tem havido um crescente interesse em abordagens alternativas e adjuvantes para o tratamento de dor. Terapias baseadas em produtos naturais, compostos com vias alternativas de atuação se tornaram o centro de investigação e desenvolvimento, incluindo abordagens não convencionais como uso de canabidiol e outros derivados de cannabis. No entanto, as evidências sobre eficácias ainda precisam ser mais elucidadas (203).

2.6.4.1 Canabidiol como potencial analgésico em dor crônica

O Canabidiol (CBD) é um composto não psicoativo presente na planta *Cannabis*, incluindo variedades tradicionalmente classificadas como *Cannabis sativa* e *Cannabis indica*, e tem ganhado destaque como uma alternativa terapêutica potencial, sobretudo diante das limitações e efeitos adversos associados à medicamentos tradicionais, como opioides e AINEs (204). Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o CBD pode exercer ação analgésica ao modular indiretamente o sistema endocanabinoide, uma vez que apresenta baixa afinidade direta pelos receptores CB1 e CB2, mas influencia sua sinalização por meio do aumento da disponibilidade de endocanabinoides, principalmente pela inibição de sua degradação e receptação (205).

Além disso, o CBD atua sobre alvos moleculares não canônicos como canais TRPs e vias mediadas por receptores de adenosina, ampliando seus efeitos neuromodulatórios. Esses mecanismos contribuem para a redução da excitabilidade neuronal, modulação da transmissão nociceptiva e atenuação de processos inflamatórios, fatores centrais no desenvolvimento e manutenção da dor crônica (205). Ademais, o CBD apresenta propriedades antioxidantes e ansiolíticas, que podem atuar de forma complementar na diminuição da percepção dolorosa, especialmente em quadros neuropáticos (205,206).

Uma revisão sistemática conduzida por Mohammed *et al* (2024) analisou 15 estudos clínicos envolvendo pacientes com diferentes tipos de dor crônica, como fibromialgia, dor

neuropática, condições musculoesqueléticas e doenças reumatológicas. A maior parte dos trabalhos avaliados relatou melhora significativa da dor, com reduções variando entre cerca de 42 – 66% após o uso de CBD isolados ou associado ao tetrahydrocannabinol (THC). Apesar das diferenças metodológicas entre os estudos e das limitações decorrentes de amostras pequenas, os autores apontam que o CBD demonstra potencial terapêutico relevantes, embora reforcem a necessidade de cautela na interpretação dos resultados devido ao número ainda reduzido de ensaios clínicos robustos (204).

O CBD também se destaca por apresentar um perfil de segurança considerado favorável quando comparado com analgésicos convencionais. Os efeitos adversos relatados tendem a ser leves ou moderados, como sonolência, fadiga, alterações gastrointestinais e mudanças no apetite, e eventos graves são raros. Diferentemente dos opioides, o CBD não está associado a risco elevado de dependência, depressão respiratória ou overdose, o que reforça seu potencial como opção complementar ou alternativa no manejo de dor (207). Apesar disso, questões como padronização de doses, formas de administração, biodisponibilidade e possíveis interações medicamentosas permanecem pouco esclarecidas, que são lacunas importantes que ainda precisam ser resolvidas (208).

2.7 *Drosophila melanogaster* como plataforma de triagem de fármacos

Para além de suas vantagens genéticas e experimentais já estabelecidas, drosófila destaca-se como uma plataforma robusta para triagem de fármacos ao permitir a avaliação integrada de eficácia e toxicidade em um organismo inteiro, preservando interações celulares e sistêmicas ausentes em modelos *in vitro* (209). A administração simples de compostos, associados à possibilidade de ensaios em média e alta escala, favorece a identificação precoce de candidatos terapêuticos com melhor perfil farmacológico, reduzindo custos e taxas de falha em etapas posteriores do desenvolvimento pré-clínico (210). Esse aspecto é particularmente relevante em triagem de fármacos para doenças complexas e multifatoriais como a Doença de Alzheimer e a dor crônica (211,212).

Nesse contexto, a *D. melanogaster* tem sido amplamente empregada como uma plataforma no *pipeline* translacional que faz a ponte entre achados em cultura de células e ensaios em mamíferos, conectando e contribuindo com descobertas mecanísticas iniciais, prévias a validação pré-clínica em organismos mais complexos. Essa aplicabilidade é ampliada

pelo uso estratégico de diferentes estágios do ciclo de vida, com larvas e adultos oferecendo janelas experimentais complementares. Ensaio em larva podem favorecer a detecção rápida de efeitos agudos, enquanto os adultos são excelentes plataformas para análise de exposição crônica, fenótipo progressivo e desfechos dependentes da idade (18,213,214).

Referências

- [1] **model organism / model genetic organism | Learn Science at Scitable.** Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/definition/model-organism-model-genetic-organism-139/>>. Acesso em: 27 dez. 2025.
- [2] ATHÉA, H.; HECK, N. Climbing the validity ladder: a multi-criteria framework for evaluating model organisms. **Synthese**, v. 207, n. 1, p. 9, 17 dez. 2025.
- [3] ANKENY, R. A.; LEONELLI, S. What's so special about model organisms? **Studies in History and Philosophy of Science Part A**, Model-Based Representation in Scientific Practice. v. 42, n. 2, p. 313–323, 1 jun. 2011.
- [4] BERTILE, F. et al. Diversifying the concept of model organisms in the age of -omics. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1062, 19 out. 2023.
- [5] **What Are Model Organisms and Why Do We Use Them in Biology Research?** Disponível em: <<https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2025.1491979>>. Acesso em: 28 dez. 2025.
- [6] **2.3: Model Organisms Facilitate Genetic Advances.** Disponível em: <https://bio.libretexts.org/Courses/Monterey_Peninsula_College/BIOL_30%3A_Genetics/02%3A_Mendelian_Genetics/2.03%3A_Model_Organisms_Facilitate_Genetic_Advances>. Acesso em: 28 dez. 2025.
- [7] BRUTER, A. V. et al. Genetically modified mice as a tool for the study of human diseases. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 135, 18 jan. 2024.
- [8] GARBARINI, N. Primates as a model for research. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 1–2, p. 15–19, 14 jan. 2010.
- [9] ROMANOVA, E. V.; SWEEDLER, J. V. Animal Model Systems in Neuroscience. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1869–1870, 15 ago. 2018.
- [10] NEZIRI, S. et al. Animal models in neuroscience with alternative approaches: Evolutionary, biomedical, and ethical perspectives. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 7, n. 6, p. 868–880, 7 out. 2024.
- [11] BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 1, n. 1, p. 9, 2011.

- [12] SESIA, T. et al. Editorial: Animal models of neuropsychiatric disorders: validity, strengths, and limitations. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 17, 12 maio 2023.
- [13] RUSSELL W.M.S, B. R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London, Uk: Methuen & Co Ltd., 1959.
- [14] **Animal Welfare Act | National Agricultural Library**. Disponível em: <<https://www.nal.usda.gov/animal-health-and-welfare/animal-welfare-act>>. Acesso em: 29 dez. 2025.
- [15] **Animals in Science Regulation Unit**. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/collections/animals-in-science-regulation-unit>>. Acesso em: 29 dez. 2025.
- [16] **Directive - 2010/63 - EN - EUR-Lex**. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>>. Acesso em: 29 dez. 2025.
- [17] **Decreto nº 6899**. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm>. Acesso em: 29 dez. 2025.
- [18] PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, jun. 2011.
- [19] VICTOR ATOKI, A. et al. Exploring the versatility of *Drosophila melanogaster* as a model organism in biomedical research: a comprehensive review. **Fly**, v. 19, n. 1, p. 2420453, 31 dez. 2025.
- [20] GREEN, M. M. 2010: A Century of *Drosophila* Genetics Through the Prism of the white Gene. **Genetics**, v. 184, n. 1, p. 3–7, jan. 2010.
- [21] MARKOW, T. A. The secret lives of *Drosophila* flies. **eLife**, v. 4, p. e06793, [s.d.].
- [22] HUNTER, P. The paradox of model organisms. The use of model organisms in research will continue despite their shortcomings. **EMBO Reports**, v. 9, n. 8, p. 717–720, ago. 2008.
- [23] YIN, J. C. et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. **Cell**, v. 79, n. 1, p. 49–58, 7 out. 1994.
- [24] YIN, J. C. et al. CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 107–115, 7 abr. 1995.

- [25] YIN, J. C.; TULLY, T. CREB and the formation of long-term memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 264–268, abr. 1996.
- [26] ADAMS, M. D. et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 24 mar. 2000.
- [27] SHIRRAS, A. Drosophilagenome sequence. **Genome Biology**, v. 1, n. 1, p. reports038, 11 maio 2000.
- [28] DORKENWALD, S. et al. Neuronal wiring diagram of an adult brain. **Nature**, v. 634, n. 8032, p. 124–138, out. 2024.
- [29] **Taxonomy Browser**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=7227>>. Acesso em: 29 dez. 2025.
- [30] KAUFMAN, T. C. A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. **Genetics**, v. 206, n. 2, p. 665–689, 1 jun. 2017.
- [31] **UniProt**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000803>>. Acesso em: 15 jan. 2026.
- [32] JÜRGENS, K. J.; DRECHSLER, M.; PAULULAT, A. An anatomical atlas of *Drosophila melanogaster*— the wild-type. **GENETICS**, v. 228, n. 2, p. iyae129, 7 out. 2024.
- [33] VIJAYAN, V. et al. An internal expectation guides *Drosophila* egg-laying decisions. **Science Advances**, v. 8, n. 43, p. eabn3852, 28 out. 2022.
- [34] STOCKER, H.; GALLANT, P. Getting Started: An Overview on Raising and Handling *Drosophila*. Em: DAHMANN, C. (Ed.). **Drosophila**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. v. 420p. 27–44.
- [35] TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. Endocrine Insights into the Evolution of Metamorphosis in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 467–500, jan. 2002.
- [36] GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153–188, jan. 1984.
- [37] BEIRA, J. V.; PARO, R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. **Chromosoma**, v. 125, n. 4, p. 573–592, set. 2016.
- [38] ONG, C. et al. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 3 abr. 2015.

- [39] ASHBURNER, M.; GOLIC, K. G.; HAWLEY, R. S. **Drosophila: a laboratory handbook**. 2. ed ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- [40] BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 514–522, jul. 2010.
- [41] LESSING, D.; BONINI, N. M. Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from Drosophila melanogaster mutants. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 6, p. 359–370, jun. 2009.
- [42] ROBINSON, J. W. et al. The Drosophila adult brain: short overview of structure, function, and resources Graphical Review Paper. **Current Research in Insect Science**, v. 7, p. 100113, 2025.
- [43] STRAUSFELD, N. J.; HIRTH, F. Deep Homology of Arthropod Central Complex and Vertebrate Basal Ganglia. **Science**, v. 340, n. 6129, p. 157–161, 12 abr. 2013.
- [44] COURT, R. et al. A Systematic Nomenclature for the Drosophila Ventral Nerve Cord. **Neuron**, v. 107, n. 6, p. 1071- 1079.e2, set. 2020.
- [45] GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 6th ed ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2000.
- [46] PEARSON, J. C.; LEMONS, D.; MCGINNIS, W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 12, p. 893–904, dez. 2005.
- [47] SANG, T.-K.; JACKSON, G. R. Drosophila models of neurodegenerative disease. **NeuroRX**, v. 2, n. 3, p. 438–446, jul. 2005.
- [48] BIER, E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 1, p. 9–23, jan. 2005.
- [49] ZHAO, Y. et al. Drosophila melanogaster: A Model Organism in Muscular Dystrophy Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 4, p. 1459, 10 fev. 2025.
- [50] MIRZOYAN, Z. et al. Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 51, 1 mar. 2019.
- [51] FISCHER, F. P. et al. Drosophila melanogaster as a versatile model organism to study genetic epilepsies: An overview. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, p. 1116000, 16 fev. 2023.

- [52] LAYALLE, S. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Genes in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 904, 18 jan. 2021.
- [53] KRENCH, M.; LITTLETON, J. T. Modeling Huntington disease in *Drosophila*: Insights into axonal transport defects and modifiers of toxicity. **Fly**, v. 7, n. 4, p. 229–236, 30 out. 2013.
- [54] FEANY, M. B.; BENDER, W. W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 394–398, mar. 2000.
- [55] GRAHAM, P.; PICK, L. *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. Em: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 121p. 397–419.
- [56] BAENAS, N.; WAGNER, A. E. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism for Obesity and Type-2 Diabetes Mellitus by Applying High-Sugar and High-Fat Diets. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 307, 14 fev. 2022.
- [57] ALVES, S. D. M. et al. Alzheimer's disease and gut-brain axis: *Drosophila melanogaster* as a model. **Frontiers in Neuroscience**, v. 19, p. 1543826, 4 fev. 2025.
- [58] JANG, W. et al. *Drosophila* pain sensitization and modulation unveiled by a novel pain model and analgesic drugs. **PLOS ONE**, v. 18, n. 2, p. e0281874, 16 fev. 2023.
- [59] FORTINI, M. E.; BONINI, N. M. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 4, p. 161–167, abr. 2000.
- [60] GIANANTI, M. G.; FRAPPAOLO, A.; PIERGENTILI, R. *Drosophila melanogaster*: How and Why It Became a Model Organism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 15, p. 7485, 2 ago. 2025.
- [61] **Dementia**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 31 dez. 2025.
- [62] SAFIRI, S. et al. Alzheimer's disease: a comprehensive review of epidemiology, risk factors, symptoms diagnosis, management, caregiving, advanced treatments and associated challenges. **Frontiers in Medicine**, v. 11, 16 dez. 2024.
- [63] DAI, M.-H. et al. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. **Oncotarget**, v. 9, n. 19, p. 15132–15143, 13 mar. 2018.

- [64] CACACE, R.; SLEEGERS, K.; VAN BROECKHOVEN, C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 12, n. 6, p. 733–748, jun. 2016.
- [65] GUSTAVSSON, A. et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, n. 2, p. 658–670, fev. 2023.
- [66] **ADI - Dementia statistics**. Disponível em: <<https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>>. Acesso em: 31 dez. 2025.
- [67] **Relatório Nacional sobre a Demência estima que cerca de 8,5% da população idosa convive com a doença**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/relatorio-nacional-sobre-a-demencia-estima-que-cerca-de-8-5-da-populacao-idosa-convive-com-a-doenca>>. Acesso em: 31 dez. 2025.
- [68] FORLENZA, O. V. Transtornos depressivos na doença de Alzheimer: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 2, p. 87–95, jun. 2000.
- [69] MARTÍNEZ-SERRA, R. et al. Emerging insights into synapse dysregulation in Alzheimer's disease. **Brain Communications**, v. 4, n. 2, p. fcac083, 1 mar. 2022.
- [70] HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, abr. 2015.
- [71] MISRANI, A.; TABASSUM, S.; YANG, L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, p. 617588, 18 fev. 2021.
- [72] FALCO, A. D. et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015.
- [73] TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 821–827, set. 2003.
- [74] MARAGOS, W. F. et al. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. **Trends in Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 65–68, fev. 1987.
- [75] LIU, P.-P. et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 1, p. 29, 23 ago. 2019.

- [76] BEHL, C. In 2024, the amyloid-cascade-hypothesis still remains a working hypothesis, no less but certainly no more. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 16, 4 set. 2024.
- [77] HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 10 abr. 1992.
- [78] GRALLE, M.; FERREIRA, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 1, p. 11–32, maio 2007.
- [79] ENGELHARDT, E.; RESENDE, E. D. P. F.; GOMES, K. B. Physiopathological mechanisms underlying Alzheimer's disease: a narrative review. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 18, p. e2024VR01, 2024.
- [80] THINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29615–29619, out. 2008.
- [81] HAMPEL, H. et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 10, p. 5481–5503, out. 2021.
- [82] BENILOVA, I.; KARRAN, E.; DE STROOPER, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 349–357, mar. 2012.
- [83] NICOLAS, M.; HASSAN, B. A. Amyloid precursor protein and neural development. **Development**, v. 141, n. 13, p. 2543–2548, 1 jul. 2014.
- [84] SAMPATAKAKIS, S. N. et al. Advances in Genetic Risk Scores for Alzheimer's Disease and Dementia: A Systematic Review. **Neurology International**, v. 17, n. 7, p. 99, 26 jun. 2025.
- [85] XIAO, X. et al. APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, p. 695808, 18 jun. 2021.
- [86] SCHEUNER, D. et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. **Nature Medicine**, v. 2, n. 8, p. 864–870, ago. 1996.
- [87] SHIN, J.-Y. et al. Swedish mutation within amyloid precursor protein modulates global gene expression towards the pathogenesis of Alzheimer's disease. **BMB Reports**, v. 43, n. 10, p. 704–709, 31 out. 2010.

- [88] MURATORE, C. R. et al. The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 13, p. 3523–3536, 1 jul. 2014.
- [89] DE STROOPER, B.; IWATSUBO, T.; WOLFE, M. S. Presenilins and -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. a006304–a006304, 1 jan. 2012.
- [90] ZHANG, S. et al. Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. **Translational Neurodegeneration**, v. 2, n. 1, p. 15, dez. 2013.
- [91] **Alzheimer's Disease Genetics Fact Sheet**. Disponível em: <<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-causes-and-risk-factors/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>>. Acesso em: 22 jan. 2026.
- [92] RAULIN, A.-C. et al. ApoE in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic strategies. **Molecular Neurodegeneration**, v. 17, n. 1, p. 72, 8 nov. 2022.
- [93] JACKSON, R. J.; HYMAN, B. T.; SERRANO-POZO, A. Multifaceted roles of APOE in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 20, n. 8, p. 457–474, ago. 2024.
- [94] BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I.; AYTON, S. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: molecular insights and therapeutic opportunities. **Molecular Neurodegeneration**, v. 20, n. 1, p. 47, 24 abr. 2025.
- [95] MOLONEY, A. et al. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 228–235, 1 abr. 2010.
- [96] BOULEAU, S.; TRICOIRE, H. *Drosophila* Models of Alzheimer's Disease: Advances, Limits, and Perspectives. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 45, n. 4, p. 1015–1038, 13 abr. 2015.
- [97] GISTELINCK, M. et al. *Drosophila* Models of Tauopathies: What Have We Learned? **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–14, 2012.
- [98] CHATTERJEE, S. et al. Dissociation of tau toxicity and phosphorylation: role of GSK-3 β , MARK and Cdk5 in a *Drosophila* model. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 1, p. 164–177, 1 jan. 2009.
- [99] FOSSGREEN, A. et al. Transgenic *Drosophila* expressing human amyloid precursor protein show γ -secretase activity and a blistered-wing phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13703–13708, 10 nov. 1998.

- [100] CROWTHER, D. C. et al. Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 123–135, jan. 2005.
- [101] DEOLANKAR, S. C. et al. A β 42 Expressing *Drosophila melanogaster* Model for Alzheimer's Disease: Quantitative Proteomics Identifies Altered Protein Dynamics of Relevance to Neurodegeneration. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 26, n. 1, p. 51–63, 1 jan. 2022.
- [102] JACKSON, G. R. Guide to Understanding *Drosophila* Models of Neurodegenerative Diseases. **PLoS Biology**, v. 6, n. 2, p. e53, 26 fev. 2008.
- [103] GINIGER, E.; VARNUM, S. M.; PTASHNE, M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Cell**, v. 40, n. 4, p. 767–774, abr. 1985.
- [104] BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401–415, 1 jun. 1993.
- [105] CAYGILL, E. E.; BRAND, A. H. The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. Em: DAHMANN, C. (Ed.). **Drosophila**. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 1478p. 33–52.
- [106] DUFFY, J. B. GAL4 system in *drosophila* : A fly geneticist's swiss army knife. **genesis**, v. 34, n. 1–2, p. 1–15, set. 2002.
- [107] COOK, K. R. et al. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. **Fly**, v. 4, n. 1, p. 88–91, jan. 2010.
- [108] KIM, S. **Drosophila GAL4/UAS System**. Disponível em: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-61f0176673c37900a1786189-drosophila-gal4uas-system/?source=gallery>>. Acesso em: 15 maio. 2026.
- [109] JEON, Y. et al. Phenotypic differences between *Drosophila* Alzheimer's disease models expressing human A β 42 in the developing eye and brain. **Animal Cells and Systems**, v. 21, n. 3, p. 160–168, 17 maio 2017.
- [110] MOSES, K.; RUBIN, G. M. Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. **Genes & Development**, v. 5, n. 4, p. 583–593, abr. 1991.
- [111] LI, W.-Z. et al. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1997–2002, 2012.

- [112] PRÜSSING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 35, 22 nov. 2013.
- [113] MALTA, S. M. et al. Brazilian kefir fraction mitigates the Alzheimer-like phenotype in *Drosophila melanogaster* with β -amyloid overexpression model. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 25474, 26 out. 2024.
- [114] HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 504–523, ago. 2010.
- [115] CHOTARD, C.; SALECKER, I. Glial cell development and function in the *Drosophila* visual system. **Neuron Glia Biology**, v. 3, n. 1, p. 17–25, fev. 2007.
- [116] TAKEMURA, S.; LU, Z.; MEINERTZHAGEN, I. A. Synaptic circuits of the *Drosophila* optic lobe: The input terminals to the medulla. **Journal of Comparative Neurology**, v. 509, n. 5, p. 493–513, 10 ago. 2008.
- [117] BERTONI-FREDDARI, C. et al. Neuronal Death versus Synaptic Pathology in Alzheimer's Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, n. 1, p. 635–638, dez. 2003.
- [118] Cholinesterase inhibitors and memantine for dementia. Em: **Dementia: Assessment, management and support for people living with dementia and their carers**. [s.l.] National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2018.
- [119] XIAO, D.; ZHANG, C. Current therapeutics for Alzheimer's disease and clinical trials. **Exploration of Neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 255–271, 27 jun. 2024.
- [120] HANSEN, R. A. et al. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 2, p. 211–225, jun. 2008.
- [121] XING, H. et al. Recent Advances in Drug Development for Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, p. 3905, 21 abr. 2025.
- [122] Alzheimer's disease: Learn More – Non-drug interventions for Alzheimer's disease. Em: **InformedHealth.org [Internet]**. [s.l.] Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2022.
- [123] ZHANG, J. et al. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 211, 23 ago. 2024.

- [124] SHI, M. et al. Impact of Anti-amyloid- β Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 870517, 12 abr. 2022.
- [125] RAMANAN, V. K. et al. Anti-amyloid Monoclonal Antibody Therapy for Alzheimer Disease: Emerging Issues in Neurology. **Neurology**, v. 101, n. 19, p. 842–852, 7 nov. 2023.
- [126] AVGERINOS, K. I. et al. Critical assessment of anti-amyloid- β monoclonal antibodies effects in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis highlighting target engagement and clinical meaningfulness. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 25741, 28 out. 2024.
- [127] GHOSH, A. K. BACE1 inhibitor drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Lessons learned, challenges to overcome, and future prospects[†]. **Global Health & Medicine**, v. 6, n. 3, p. 164–169, 30 jun. 2024.
- [128] RAHMAN, A. et al. Aducanumab for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review. **Psychogeriatrics**, v. 23, n. 3, p. 512–522, maio 2023.
- [129] ARROYO-PACHECO, N. et al. Monoclonal therapy with lecanemab in the treatment of mild Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 104, p. 102620, 1 fev. 2025.
- [130] RASHAD, A. et al. Donanemab for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials. **Healthcare**, v. 11, n. 1, p. 32, 22 dez. 2022.
- [131] DAS, B.; YAN, R. A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. **CNS Drugs**, v. 33, n. 3, p. 251–263, mar. 2019.
- [132] IRAM, F. et al. Navigating the Maze of Alzheimer's disease by exploring BACE1: Discovery, current scenario, and future prospects. **Ageing Research Reviews**, v. 98, p. 102342, jul. 2024.
- [133] NAOMI, R. et al. Probiotics for Alzheimer's Disease: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 20, 22 dez. 2021.
- [134] CHEN, C. et al. Microbiota–gut–brain axis in neurodegenerative diseases: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Molecular Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 64, 15 set. 2025.
- [135] YANG, J. et al. The Gut Microbiota Modulates Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Elucidating Crucial Factors and Mechanistic Underpinnings. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 30, n. 10, p. e70091, out. 2024.

- [136] QIN, R. et al. Microbiome-targeted Alzheimer's interventions via gut-brain axis. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1729708, 5 dez. 2025.
- [137] KAUR, H. et al. Effects of Probiotic Supplementation on Short Chain Fatty Acids in the App NL-G-F Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 76, n. 3, p. 1083–1102, 1 jan. 2020.
- [138] HSU, Y.-C. et al. Efficacy of Probiotic Supplements on Brain-Derived Neurotrophic Factor, Inflammatory Biomarkers, Oxidative Stress and Cognitive Function in Patients with Alzheimer's Dementia: A 12-Week Randomized, Double-Blind Active-Controlled Study. **Nutrients**, v. 16, n. 1, p. 16, 20 dez. 2023.
- [139] LOH, J. S. et al. Microbiota–gut–brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 37, 16 fev. 2024.
- [140] S, S. et al. Exploring the potential of probiotics in Alzheimer's disease and gut dysbiosis. **IBRO Neuroscience Reports**, v. 17, p. 441–455, dez. 2024.
- [141] CALZADA-GONZALES, N. et al. Efficacy and safety of probiotic supplements on cognitive function: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 25, n. 1, p. 432, 25 nov. 2025.
- [142] TANURE, Y. C. B. et al. Potential benefits of kefir and its compounds on Alzheimer's disease: A systematic review. **Brain Behavior and Immunity Integrative**, v. 10, p. 100115, abr. 2025.
- [143] KURNIAWAN; MILANDA, T.; KUSUMA, S. A. F. Kefir as a functional probiotic: microbial composition and health effects. **Frontiers in Food Science and Technology**, v. 5, 7 jan. 2026.
- [144] AZIZI, N. F. et al. Kefir and Its Biological Activities. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 6, p. 1210, 27 maio 2021.
- [145] ELLATIF, S. A. et al. Immunomodulatory Efficacy-Mediated Anti-HCV and Anti-HBV Potential of Kefir Grains; Unveiling the In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Wound Healing Activities. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 2016, 21 mar. 2022.
- [146] MALTA, S. M. et al. Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-Alzheimer potential in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11065, 30 jun. 2022.
- [147] 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.

- [148] PAPAPOULOU, D. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of water kefir microbiota and its bioactive metabolites for health promoting bio-functional products and applications. **AIMS Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 756–811, 5 set. 2024.
- [149] RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, set. 2020.
- [150] ARMSTRONG, S. A.; HERR, M. J. Physiology, Nociception. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [151] OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 1 nov. 2010.
- [152] **Pain Principles (Section 2, Chapter 6) Neuroscience Online: An Electronic Textbook for the Neurosciences | Department of Neurobiology and Anatomy - The University of Texas Medical School at Houston**. Disponível em: <<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s2/chapter06.html#:~:text=Nociceptors%20are%20sensory%20receptors%20that,spinal%20cord%20and%20makes%20a>>. Acesso em: 8 jan. 2026.
- [153] MIDDLETON, S. J. et al. Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. **Brain**, v. 144, n. 5, p. 1312–1335, 22 jun. 2021.
- [154] KENDROUD, S. et al. Physiology, Nociceptive Pathways. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [155] SUNZINI, F. et al. The Biology of Pain: Through the Rheumatology Lens. **Arthritis & Rheumatology**, v. 75, n. 5, p. 650–660, maio 2023.
- [156] CHEN, R. et al. Sodium channels as a new target for pain treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, p. 1573254, 26 mar. 2025.
- [157] TOLEDO-ARAL, J. J. et al. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 4, p. 1527–1532, 18 fev. 1997.
- [158] CUMMINS, T. R.; HOWE, J. R.; WAXMAN, S. G. Slow Closed-State Inactivation: A Novel Mechanism Underlying Ramp Currents in Cells Expressing the hNE/PN1 Sodium Channel. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9607–9619, 1 dez. 1998.
- [159] MEENTS, J. E. et al. The role of Nav1.7 in human nociceptors: insights from human induced pluripotent stem cell-derived sensory neurons of erythromelalgia patients. **Pain**, v. 160, n. 6, p. 1327–1341, jun. 2019.

- [160] DRISSI, I.; WOODS, W. A.; WOODS, C. G. Understanding the genetic basis of congenital insensitivity to pain. **British Medical Bulletin**, v. 133, n. 1, p. 65–78, 15 maio 2020.
- [161] WAXMAN, S. G.; ZAMPONI, G. W. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 153–163, fev. 2014.
- [162] WOOD, J. N. et al. Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. **Novartis Foundation Symposium**, v. 241, p. 159–168; discussion 168-172, 226–232, 2002.
- [163] FABER, C. G. et al. Gain-of-function Na_v 1.8 mutations in painful neuropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 47, p. 19444–19449, 20 nov. 2012.
- [164] CONTIJOCH ROQUETA, C.; IZQUIERDO, M. F.; ARRABAL SOLANO, L. Neuropatía de fibras pequeñas: una revisión. **Medicina de Familia. SEMERGEN**, v. 46, n. 4, p. 277–282, 1 maio 2020.
- [165] BRACKX, W. et al. Understanding the physiological role of NaV1.9: Challenges and opportunities for pain modulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 245, p. 108416, 1 maio 2023.
- [166] DIB-HAJJ, S. D.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. NaV1.9: a sodium channel linked to human pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 511–519, set. 2015.
- [167] LEIPOLD, E. et al. Cold-aggravated pain in humans caused by a hyperactive NaV1.9 channel mutant. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 10049, 8 dez. 2015.
- [168] STRETANSKI, M. F. et al. Chronic Pain. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [169] MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, ago. 2019.
- [170] CAO, B. et al. Pathology of pain and its implications for therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 155, 8 jun. 2024.
- [171] SCHUG, S. A.; DALY, H. C. S.; STANNARD, K. J. D. Pathophysiology of Pain. Em: FITRIDGE, R.; THOMPSON, M. (Eds.). **Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists**. Adelaide (AU): University of Adelaide Press, 2011.

- [172] WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3, p. S2–S15, mar. 2011.
- [173] LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, set. 2009.
- [174] KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, nov. 2010.
- [175] COULL, J. A. M. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 1017–1021, dez. 2005.
- [176] OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive & Palliative Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, jun. 2014.
- [177] MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.
- [178] HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, abr. 2009.
- [179] DE PRETER, C. C.; HEINRICHER, M. M. The ‘in’s and out’s’ of descending pain modulation from the rostral ventromedial medulla. **Trends in Neurosciences**, p. S016622362400064X, maio 2024.
- [180] DOGRUL, B. N. et al. Descending facilitation from rostral ventromedial medulla mu opioid receptor-expressing neurons is necessary for maintenance of sensory and affective dimensions of chronic neuropathic pain. **Pain**, v. 166, n. 1, p. 153–159, jan. 2025.
- [181] VAN STRIEN, W. W. J.; HOLLMANN, M. W. Pain Perception and Modulation: Fundamental Neurobiology and Recent Advances. **European Journal of Neuroscience**, v. 62, n. 8, p. e70275, out. 2025.
- [182] XU, S. Y. et al. Thermal nociception in adult *Drosophila* : behavioral characterization and the role of the *painless* gene. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. 8, p. 602–613, nov. 2006.
- [183] BORJON, L. J.; MAUTHNER, S. E.; TRACEY, W. D. Nociception in *Drosophila* Larvae. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2025, n. 4, p. pdb.top108172, abr. 2025.

- [184] HE, J. et al. *Drosophila* as a Model to Study the Mechanism of Nociception. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 854124, 28 mar. 2022.
- [185] GRUEBER, W. B. et al. Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. **Development**, v. 134, n. 1, p. 55–64, 1 jan. 2007.
- [186] OHYAMA, T. et al. High-Throughput Analysis of Stimulus-Evoked Behaviors in *Drosophila* Larva Reveals Multiple Modality-Specific Escape Strategies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71706, 20 ago. 2013.
- [187] TRACEY, W. D. et al. *painless*, a *Drosophila* Gene Essential for Nociception. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 261–273, abr. 2003.
- [188] KANG, K. et al. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 597–600, mar. 2010.
- [189] RAVENSCROFT, T. A. et al. The Voltage-Gated Sodium Channel in *Drosophila*, *Para*, Localizes to Dendrites As Well As Axons in Mechanosensitive Chordotonal Neurons. **eNeuro**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2023.
- [190] YOSHINO, J. et al. Neural Circuitry that Evokes Escape Behavior upon Activation of Nociceptive Sensory Neurons in *Drosophila* Larvae. **Current Biology**, v. 27, n. 16, p. 2499–2504.e3, ago. 2017.
- [191] LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1143–1154, 22 set. 1989.
- [192] CATTERALL, W. A. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13–25, abr. 2000.
- [193] DONG, K. et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 50, p. 1–17, jul. 2014.
- [194] RAVENSCROFT, T. A. et al. *Drosophila* Voltage-Gated Sodium Channels Are Only Expressed in Active Neurons and Are Localized to Distal Axonal Initial Segment-like Domains. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 42, p. 7999–8024, 14 out. 2020.
- [195] KROLL, J. R.; SARAS, A.; TANOUYE, M. A. *Drosophila* sodium channel mutations: Contributions to seizure-susceptibility. **Experimental Neurology**, v. 274, p. 80–87, dez. 2015.
- [196] PARKER, L. et al. *Drosophila* as a Model for Epilepsy: *bss* Is a Gain-of-Function Mutation in the *Para* Sodium Channel Gene That Leads to Seizures. **Genetics**, v. 187, n. 2, p. 523–534, 1 fev. 2011.

- [197] WANG, J.; DOAN, L. V. Clinical pain management: Current practice and recent innovations in research. **Cell Reports Medicine**, v. 5, n. 10, p. 101786, out. 2024.
- [198] RAHMAN, S. et al. Clinical Diagnosis and Treatment of Chronic Pain. **Diagnostics**, v. 13, n. 24, p. 3689, 18 dez. 2023.
- [199] **Dor crônica generalizada (centralizada) - Distúrbios neurológicos**. Disponível em: <[https://www.msmanuals.com/pt/profissional/distúrbios-neurológicos/dor/dor-crônica-generalizada-centralizada](https://www.msmanuals.com/pt/profissional/disturbios-neurológicos/dor/dor-crônica-generalizada-centralizada)>. Acesso em: 22 jan. 2026.
- [200] MAYORAL, V. et al. Pregabalin vs. gabapentin in the treatment of neuropathic pain: a comprehensive systematic review and meta-analysis of effectiveness and safety. **Frontiers in Pain Research**, v. 5, p. 1513597, 7 jan. 2025.
- [201] ZHAO, X.; GE, S. The efficacy and safety of gabapentin vs. carbamazepine in patients with primary trigeminal neuralgia: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Neurology**, v. 14, p. 1045640, 2 maio 2023.
- [202] SOLIMAN, N. et al. Pharmacotherapy and non-invasive neuromodulation for neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 24, n. 5, p. 413–428, maio 2025.
- [203] BOYAJI, S. et al. The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic Pain Management: An Assessment of Current Evidence. **Current Pain and Headache Reports**, v. 24, n. 2, p. 4, fev. 2020.
- [204] MOHAMMED, S. Y. M. et al. Effectiveness of Cannabidiol to Manage Chronic Pain: A Systematic Review. **Pain Management Nursing**, v. 25, n. 2, p. e76–e86, abr. 2024.
- [205] MLOST, J.; BRYK, M.; STAROWICZ, K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8870, 23 nov. 2020.
- [206] COELHO, C. D. F. et al. The Impact of Cannabidiol Treatment on Anxiety Disorders: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. **Life**, v. 14, n. 11, p. 1373, 25 out. 2024.
- [207] HUESTIS, M. A. et al. Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 974–989, 13 set. 2019.
- [208] MOORE, A. et al. Cannabidiol (CBD) Products for Pain: Ineffective, Expensive, and With Potential Harms. **The Journal of Pain**, v. 25, n. 4, p. 833–842, abr. 2024.

- [209] SU, T. T. Drug screening in *Drosophila*; why, when, and when not? **Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology**, v. 8, n. 6, p. e346, nov. 2019.
- [210] DELORIEA, J.; MILLET-BOUREIMA, C.; GAMBERI, C. Protocol to build a drug-testing pipeline using large populations of *Drosophila melanogaster*. **STAR Protocols**, v. 4, n. 4, p. 102747, dez. 2023.
- [211] TUE, N. T. et al. Insights from *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer's disease. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 25, n. 1, p. 134–146, 1 jan. 2020.
- [212] MANEV, H.; DIMITRIJEVIC, N. Fruit flies for anti-pain drug discovery. **Life Sciences**, v. 76, n. 21, p. 2403–2407, abr. 2005.
- [213] GASQUE, G. et al. Small molecule drug screening in *Drosophila* identifies the 5HT2A receptor as a feeding modulation target. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. srep02120, 2 jul. 2013.
- [214] FISCHER, F. P. et al. The fruit fly *Drosophila melanogaster* as a screening model for antiseizure medications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 10 dez. 2024.

Capítulo II
Artigo Científico 1



OPEN **Brazilian kefir fraction mitigates the Alzheimer-like phenotype in *Drosophila melanogaster* with β -amyloid overexpression model**

Serena Mares Malta¹✉, Tamiris Sabrina Rodrigues¹, Matheus Henrique Silva¹, Alexandre Souza Marquez¹, Rafael Bernardes Ferreira¹, Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas², Renata Graciele Zanon², Lucas Matos Martins Bernardes¹, Letícia Leandro Batista³, Murillo Néia Thomaz da Silva⁴, Débora de Oliveira Santos⁵, Ana Carolina Costa Santos¹, Ana Paula Mendes-Silva⁶, Foued Salmen Spindola¹ & Carlos Ueira-Vieira¹✉

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative condition and the primary form of dementia among elderly people. The amyloidogenic hypothesis is the main theory that explains this phenomenon and describes the extracellular accumulation of amyloid beta (A β) peptides. Model organisms such as *Drosophila melanogaster* have been utilized to improve the understanding of this disease and its treatment. This study evaluated the effects of peptide and metabolic fractions of Brazilian kefir on a strain of *D. melanogaster* that expresses human A β peptide 1–42 in the eye. The parameters assessed included ommatidial organization, vacuole area, retinal thickness, and A β peptide quantification. The present study revealed that the fractions, particularly the peptidic fraction, significantly reduced the vacuole area and increased the retina thickness in treated flies, indicating an improvement in neurodegeneration phenotype. The peptidic fraction was also found to alter A β aggregation dynamics, inhibiting A β fibril formation, as revealed by dynamic light scattering. This study demonstrated that kefir fractions, particularly the peptidic fraction < 10 kDa, have the potential to regulate A β aggregation and alleviate neurodegeneration in a *Drosophila melanogaster* AD-like model. These findings suggest that kefir fractions could be viable for the bioprospection of novel drug prototypes for AD treatment, providing valuable insights into strategies targeting A β aggregation and neurodegeneration in AD.

Keywords Alzheimer's disease, *Drosophila melanogaster*, Kefir fractions

Alzheimer's disease (AD) is known to be a progressive neurodegenerative pathology associated with aging¹. Among the various hypotheses and mechanisms that explain this phenomenon, the amyloidogenic pathway hypothesis is one of the most recognized². This pathway describes the processing of the amyloid-beta precursor protein (APP), which, when cleaved by the enzyme β -secretase (BACE) followed by γ -secretase, produces peptide fragments of 40 and 42 amino acids³ that accumulate extracellularly, contributing to the formation of so-called amyloid plaques^{4,5}. This process is also associated with inflammatory processes⁶ and is responsible for the disruption of synapses and neuronal loss⁷.

In addition to amyloid plaque formation, tau aggregation plays a key role in the pathogenesis of Alzheimer's disease⁸. Tau proteins regulate the function of microtubules in neurons and typically contain 2 to 3 moles of phosphates per mole of protein, but in AD brains they are found to be elevated². When hyperphosphorylated,

¹Laboratory of Genetics, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Acre Street, 2E building, room 230, Uberlândia, MG 38405-319, Brazil. ²Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. ³Institute of Developmental Biology and Neurobiology, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany. ⁴Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. ⁵Faculty of Odontology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. ⁶Department of Psychiatry, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada. ✉email: serena@ufu.br; ueira@ufu.br

it can form neurofibrillary tangles in neurons, leading to dysfunction and cell death, and is correlated with cognitive decline in Alzheimer's patients².

Due to its high incidence in the population and its devastating effects on affected patients⁹, ways to mitigate these losses and symptoms have been constantly sought. One approach to better understand the underlying AD mechanisms and test potential drugs is the use of model organisms¹⁰. Several organisms can be used, including invertebrates, fish, and mammals^{11–13}, but the advantages of *Drosophila melanogaster* are well known, ranging from ease of genetic manipulation and phenotypic inference^{14–16}. The modeling of neurodegenerative diseases has been carried out using eye-directed expression drivers, which offer a range of possibilities for analysis related to neurodegeneration¹⁷. Considering that one of the main features of AD is the production and extracellular accumulation of amyloid beta (A β), the overexpression of these human peptides in fruit flies allows the study and screening of compounds¹⁸ that can alleviate the tissue damage, memory deficits, and other behavioral outcomes caused by A β .

Several compounds and their effects have been investigated in studies of AD to understand how they can be applied to the treatment of the disease^{19–22}. When utilizing *D. melanogaster*, the first way to identify the therapeutic potential of a compound is based on its ability to modify the neurodegenerative phenotype presented in the model organism^{16,23}, and in previous studies, kefir and its compounds have been shown to have this capacity^{24,25}. Kefir has gained prominence in the literature due to its health benefits. As a probiotic, it may help modulate the intestinal microbiota, which directly impacts neurodegenerative and inflammatory processes through the gut-brain axis^{26,27}. Studies in human and animal models have shown beneficial effects of kefir in several forms: *in natura*^{28,29}, in its cell-free fraction^{30,31}, in its metabolic²⁴ and peptide fractions²⁵ and its purified peptides^{32,33}.

In our previous studies, Batista et al. (2021)²⁴ treated flies with kefir *in natura* and metabolic fractions. The author also describes obtaining the metabolic fraction from filtrations and using organic solvents in a liquid-liquid partition to separate compounds of increasing polarity, as well as identifying these metabolites produced during fermentation and identifying the main microorganisms present, based on a metabolome analysis and 16 S sequencing. The author describes the presence of compounds with antioxidant, anti-inflammatory, and anti-BACE activity in all metabolic fractions which would explain the improvements seen in the AD-like characteristics evaluated.

Meanwhile, Malta et al. (2022)²⁵ executed physical separation processes to obtain a fraction rich in peptides, which were confirmed by a proteopeptidomic analysis. In this work, identification of peptides sequences and *in silico* analysis were performed to predict the interaction of these peptides with the main targets present in the model used: BACE, APP and Acetylcholinesterase enzyme (AChE).

The fractions obtained in both works were tested and were able to reduce the AD-like phenotype in flies overexpressing both human BACE and APP^{24,25}. Here, we investigate the effect of peptide and metabolic fractions on the neurodegenerative phenotype of *D. melanogaster* that overexpress the human A β 1–42 peptide in the eye. The effects were analyzed through morphological and quantitative indicators, demonstrating that these fractions may interact directly with A β 1–42 and can improve the AD-like phenotype.

Results

Model validation (scanning electron microscopy and quantitative analysis, histopathological analysis and relative amyloid beta quantification)

First, the model was validated by comparing control (GMR-Gal4/+ and UAS-A β /+) and AD-like (GMR-Gal4/+;UAS-A β /+) genotypes. Morphological and quantitative analyses of the ocular surface (Fig. 1a–d), histopathological analyses of the medulla (Fig. 1e–h) and retina (Fig. 1i–k), and relative quantification of beta-amyloid (Fig. 1l) were performed to validate the model.

The qualitative analysis was performed using images obtained by scanning electron microscopy (SEM) at 1200x magnification. A uniform distribution pattern of ommatidia was observed in the controls (Fig. 1a–b), whereas this was not observed in the GMR-Gal4;UAS-A β genotype (Fig. 1c). To quantify the level of disorder, two hundred ommatidia per image were analyzed at 550x magnification, and the results revealed a significantly higher level of disorder in the AD-like model (GMR-Gal4;UAS-A β) than in the GMR-Gal4/+ ($p < 0.0001$) and UAS-A β /+ ($p = 0.0004$) controls (Fig. 1d). The score obtained by the control groups shows normal ommatidial organization, while the AD-like model has an equivalent to subtle rough, according to Iyer et al. (2016)³⁴. This result showed that the overexpression of A β peptide has a negative effect on ommatidium formation and organization. Additionally, there was no significant difference between the negative controls, therefore subsequent analyses were conducted using only GMR-Gal4/+ for comparison.

The histopathological analysis of retina and medulla sections from flies at 1–2 days post-eclosion (d.p.e.) confirmed the results obtained with SEM. Vacuolar lesions and retinal integrity are considered markers for neurodegeneration tissue damage in models using GMR-Gal4 as a driver strain. Therefore, the total area of vacuoles in the medulla region (Fig. 1f–g) and the retinal thickness (Fig. 1i–j) were quantified. The GMR-Gal4;UAS-A β flies exhibited more severe tissue damage, represented by a larger total vacuole area than the control flies ($p = 0.008$) (Fig. 1h) and a decrease in retinal thickness (Fig. 1k) ($p = 0.0009$), potentially indicating a neurodegenerative phenotype.

Using the Thioflavin T (ThT), the relative levels of A β were further quantified in flies at 1–2 d.p.e. (Fig. 1l), and the results showed that the AD-like model flies exhibited a greater amyloid content compared to the control flies ($p < 0.0001$). Taken together, these results suggest that the overexpression of the A β peptide in *D. melanogaster* eyes promotes a neurodegenerative phenotype.

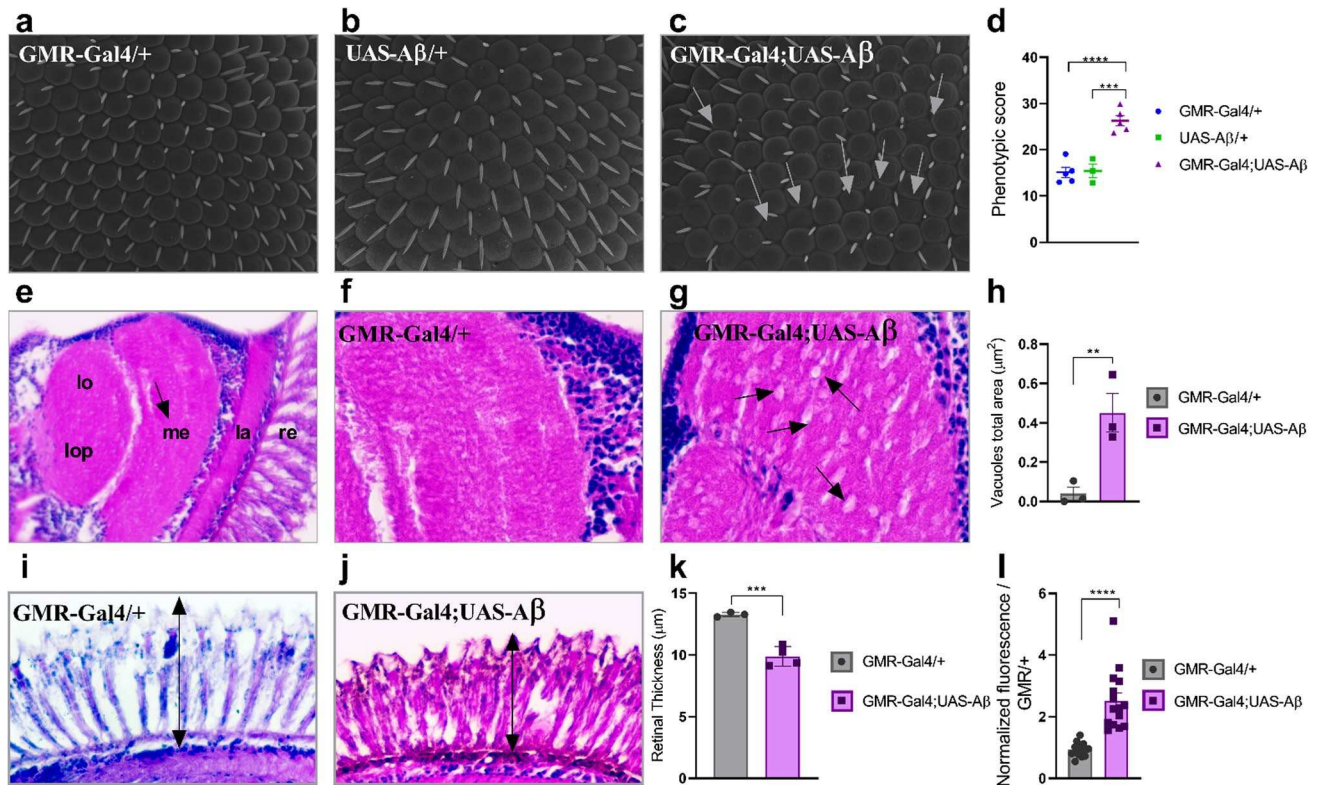


Fig. 1. Flies with the genotype GMR-Gal4/+;UAS-Aβ/+ showed a degenerative phenotype. Representative SEM images obtained at 1200x magnification. (a) GMR-Gal4/+ (b) UAS-Aβ/+ (c) GMR-Gal4;UAS-Aβ; white arrows indicate disordered ommatidia (d) Phenotypic score determined through quantitative analyses using the Flyntyper plugin on ImageJ, flies GMR-Gal4;UAS-Aβ presented a higher score than both the GMR-Gal4/+ and UAS-Aβ/+ controls ($p < 0.0001$ and $p = 0.0004$, respectively) $n \geq 3$. e) Representative 3- μ m paraffin sections of the fly head GMR-Gal4/+, 40x magnification indicating the different parts of the visual system in the optic lobe: retina (re), lamina (la), medulla (me), lobe (lo), and lobe plate (lop); the black arrow indicates the regions analyzed for vacuolar lesions. f) GMR-Gal4/+ at 100x magnification. g) GMR-Gal4/+;UAS-Aβ/+ at 100x magnification; the black arrows indicate vacuolar lesions. h) Total vacuole area. There was a greater area of vacuoles in the GMR-Gal4;UAS-Aβ fly than in the control genotype ($p = 0.0083$) $n = 3$. i) Representative retinal thickness of GMR-Gal4/+, 100x magnification; the black arrow indicates the measured region. j) Representative retinal thickness of GMR-Gal4/+;UAS-Aβ/+, 100x magnification; the black arrow indicates the measured region. k) Retinal thickness quantification. The GMR-Gal4;UAS-Aβ flies presented a thinner retina than the genotype control ($p = 0.0009$) $n = 3$. l) Relative amyloid content in the GMR-Gal4;UAS-Aβ flies presented a greater amyloid content than the GMR/+ flies ($p < 0.0001$) triplicate of pool with 10 heads in each. All data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (two-tailed ANOVA and unpaired t test) and all images are of flies at 1–2 days post-eclosion (d.p.e.).

Treatments

Toxicity assay (metabolite and peptidic fractions)

The toxicity of the fractions on the embryos and their effect on hatching rate were evaluated before parameters related to the neurodegeneration phenotype were studied. The groups ($n = 100$ / group) were divided into the untreated (receiving water), vehicle group (receiving Tween 80 at 0.01%) and embryos treated with each fraction (< 10 kDa, EtAOc, DCM, Hex and, ButOH). The average hatching rate was 79.94% and analysis performed using the Chi-Square test, showed no significant difference ($p > 0.5$) between the groups treated with the fractions and the untreated controls and the healthy model group (GMR-Gal4/+).

Effects of the peptidic fraction from kefir on AD-like flies

To investigate the effects of kefir peptidic fraction < 10 kDa treatment on the AD-like model (GMR-Gal4/+; UAS-Aβ/+), we initially evaluated the external structure of the eye (organization of ommatidia) in adult AD-model flies treated with and without peptide fraction. No significant differences were detected ($p = 0.8799$) (Fig. 2a).

However, the histological analysis of the group treated with the < 10 kDa fraction showed a significant decrease in the vacuole area ($p = 0.009$) compared to the untreated control (Fig. 2b). Additionally, a significant increase in retinal thickness ($p = 0.005$) was observed despite no difference in external morphology (Fig. 2c).

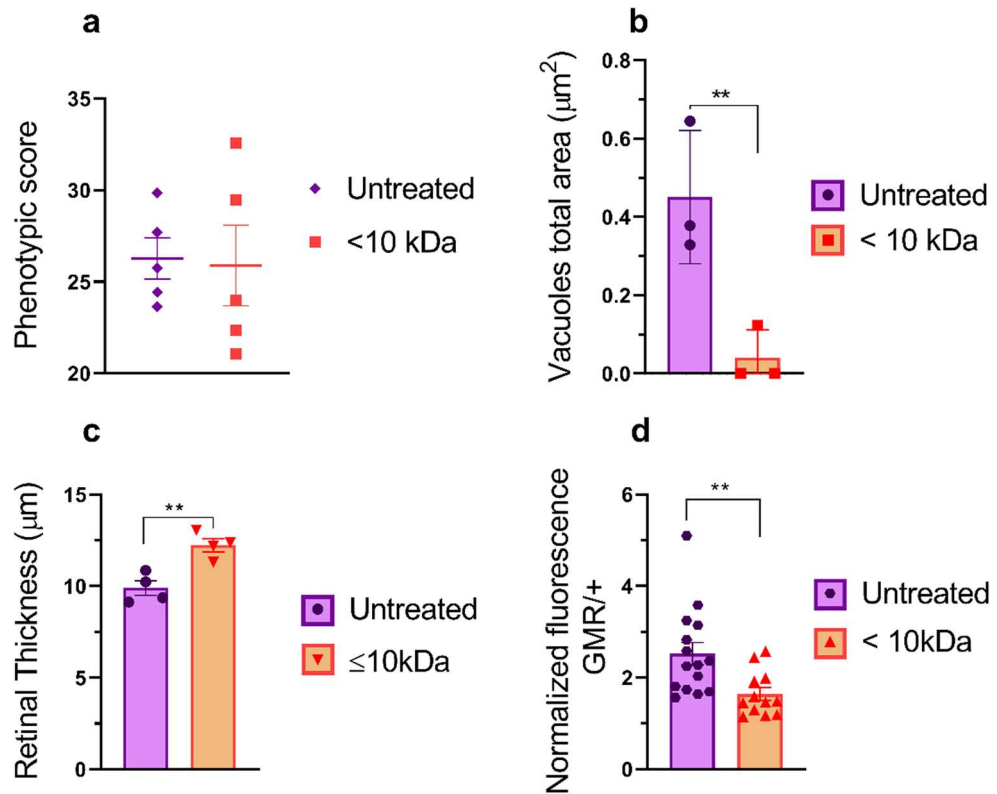


Fig. 2. Quantitative analysis of GMR-Gal4/+; UAS-A β /+ flies treated with the peptidic fraction. (a) Phenotypic score determined through quantitative analyses using the Flyntyper plugin on ImageJ. Flies treated with the fraction < 10 kDa did not present any significant difference compared with untreated controls ($p > 0.5$) $n = 5$. (b) Total vacuole area. Flies treated with the < 10 kDa presented a significantly reduced total area of damage ($p = 0.009$) compared to control group $n = 3$. (c) Retinal thickness. Flies treated with the < 10 kDa fraction presented a greater retinal thickness ($p = 0.005$) than did control flies $n = 3$. (d) Relative amyloid quantification through a thioflavin assay. Flies treated with the < 10 kDa fraction presented a lower amyloid content than did untreated flies ($p = 0.008$) triplicate of pool with 10 heads in each. The data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (unpaired t test).

Treatment with kefir peptide fraction < 10 kDa also significantly decreased the amyloid content ($p = 0.008$) compared to that in the untreated control group (Fig. 2d), indicating the potential of this fraction to interact with A β peptides. Representative images of flies for all analyses are shown in Supplementary Figure (S1).

Metabolic fractions in eye structure and integrity

Histopathological analyses were conducted to assess eye structure and integrity. Phenotypic comparisons of the external structure of the compound eye and the level of ommatidial organization showed no significant difference among the four groups treated with metabolic fractions (EtOAc, DCM, Hex and ButOH), compared to the control group treated with the vehicle. ($p = 0.1010$) (Fig. 3a).

Another characteristic evaluated was the total vacuole area. Compared to the vehicle group, only the group treated with the EtOAc fraction showed a significant reduction ($p = 0.023$) potentially indicating a higher integrity (Fig. 3b). Moreover, no significant differences in retinal thickness were found between the treated and untreated control groups (Fig. 3c) ($p = 0.8415$).

Relative A β quantification through thioflavin assay showed that only the group treated with the EtOAc fraction exhibited significantly greater relative levels of A β ($p < 0.0001$) compared to the untreated group (Fig. 3d).

Representative images of flies for all analyses are shown in Supplementary Figure (S1).

The < 10 kDa and EtAOc fractions alters the dynamic aggregation of A β peptides

The dynamics of A β peptide aggregate formation were analyzed at 0, 3, 6, and 24 h by analysis of the hydrodynamic radius using dynamic light scattering (DLS). At three hours, a peak corresponding to the formation of nanostructures in the 10,000 nm region was identified. By 6 h, nanostructures with sizes equal to or larger than 5,000 nm were observed, without a decrease in size up to the maximum size analyzed. At 24 h, the disappearance of nanostructures between 5,000 nm and 10,000 nm was noted, with the formation of nanostructures above 11,000 nm indicating the aggregation of A β fibrils (Fig. 4a-d).

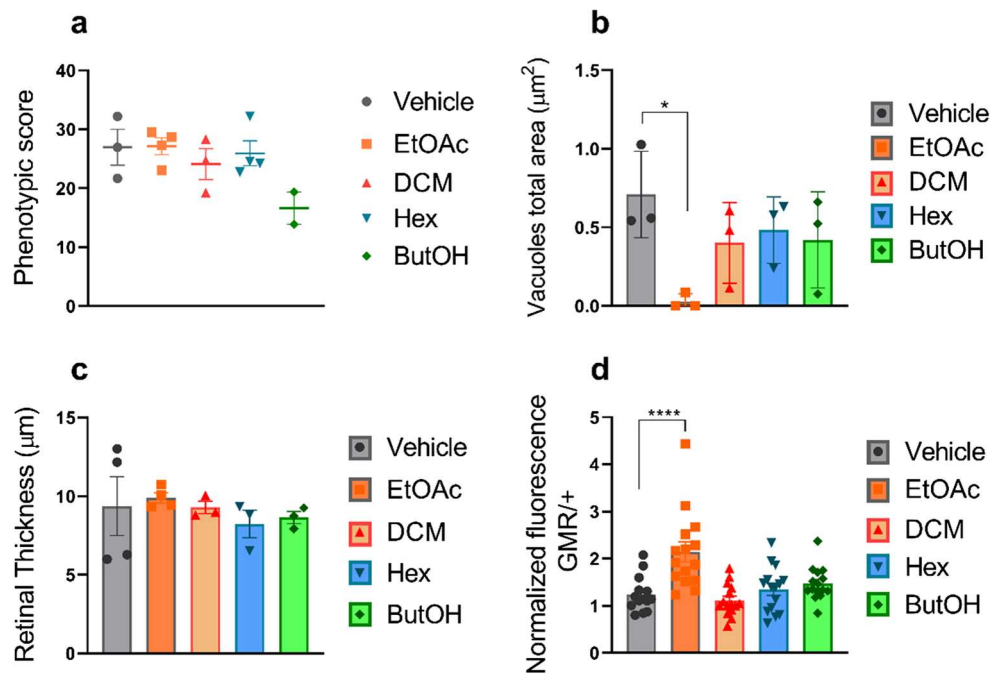


Fig. 3. Quantitative analysis of metabolic fraction-treated flies. **(a)** Phenotypic score determined through quantitative analyses using the Flynotyper plugin on ImageJ. None of the treatment groups presented significant differences compared with the control group (vehicle) ($p > 0.5$) $n \geq 3$. **(b)** Total vacuole area. Compared with control flies, only flies treated with the EtOAc fraction presented a reduced total area of vacuoles ($p = 0.023$) $n = 3$. **(c)** Retinal thickness. None of the treatment groups presented significant differences compared with the control group (vehicle) ($p > 0.5$) $n = 3$. **(d)** Relative amyloid quantification through ThT assay; only flies treated with the EtOAc fraction presented a greater amyloid content than did the control group ($p < 0.0001$) triplicate of of pool with 10 heads in each. The data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (unpaired t test).

When A β peptides were incubated with the < 10 kDa fraction, the compounds in this fraction modified the dynamics of A β aggregate formation. At 3 h, the peak in the 10,000 nm region was not observed in the spectra of the treated samples. At 24 h, the < 10 kDa fraction led to a reduction in the amount of A β nanostructures, starting from the 11,000 nm region (untreated) to the 7,000 nm region in the treated samples (Fig. 4a-d).

Neurocytotoxicity of peptide fractions < 10 kDa and EtOAc

The effects of peptide fractions < 10 kDa and EtOAc on SHSY5Y cell viability were assessed. The peptide fraction < 10 kDa demonstrated significant neurotoxicity at the highest concentration tested 0.5 mg/mL ($p = 0.0099$), with no significant effects observed at concentrations 0.25 and 0.1 mg/mL in comparison with the untreated group ($p = 0.1360$ and $p = 0.1548$ respectively) (Fig. 5). In contrast, the EtOAc fraction significantly reduced cell viability at the two highest concentrations tested 0.5 and 0.25 mg/mL, ($p = 0.0013$ and $p = 0.0071$ respectively), whereas the lowest concentration (0.1 mg/mL) did not produce a significant effect in viability ($p = 0.1232$) compared to untreated group (Fig. 5).

Preventive effect of kefir fractions < 10 kDa and EtOAc on Alzheimer's disease-like culture cell model

As a control, an A β -only group compared to an untreated group showed a significant decrease in viability ($p = 0.0101$). The peptide fraction < 10 kDa showed no potential to inhibit A β peptide aggregation at either concentration tested ($p > 0.5$) (Fig. 6). However, the kefir fraction EtOAc showed inhibitory potential against A β peptide aggregation at both concentrations tested: 0.25 mg/mL treatment resulted in an 18% increase in viability ($p = 0.0044$) and 0.1 mg/mL resulted in a 20% increase in viability ($p = 0.0007$) compared to the cell group treated with A β alone (Fig. 6).

Effects of kefir fractions < 10 kDa and EtOAc on Alzheimer's disease-like culture cell model (treatment)

The < 10 kDa peptide fraction showed the potential to reverse established senile plaques at both concentrations tested. Cells treated with the 0.25 mg/mL concentration increased cell viability by 15% ($p = 0.0017$) and those treated with the 0.1 mg/mL concentration increased cell viability by 7% ($p = 0.0116$), both compared to the control group treated with A β peptide alone. As for the treatment with the EtOAc fraction, cells treated at a concentration of 0.25 showed no significant difference compared to the control group ($p = 0.2594$), while treatment at a concentration of 0.1 mg/mL significantly increased cell viability compared to the control group treated with the A β peptide alone ($p = 0.0033$) (Fig. 7).

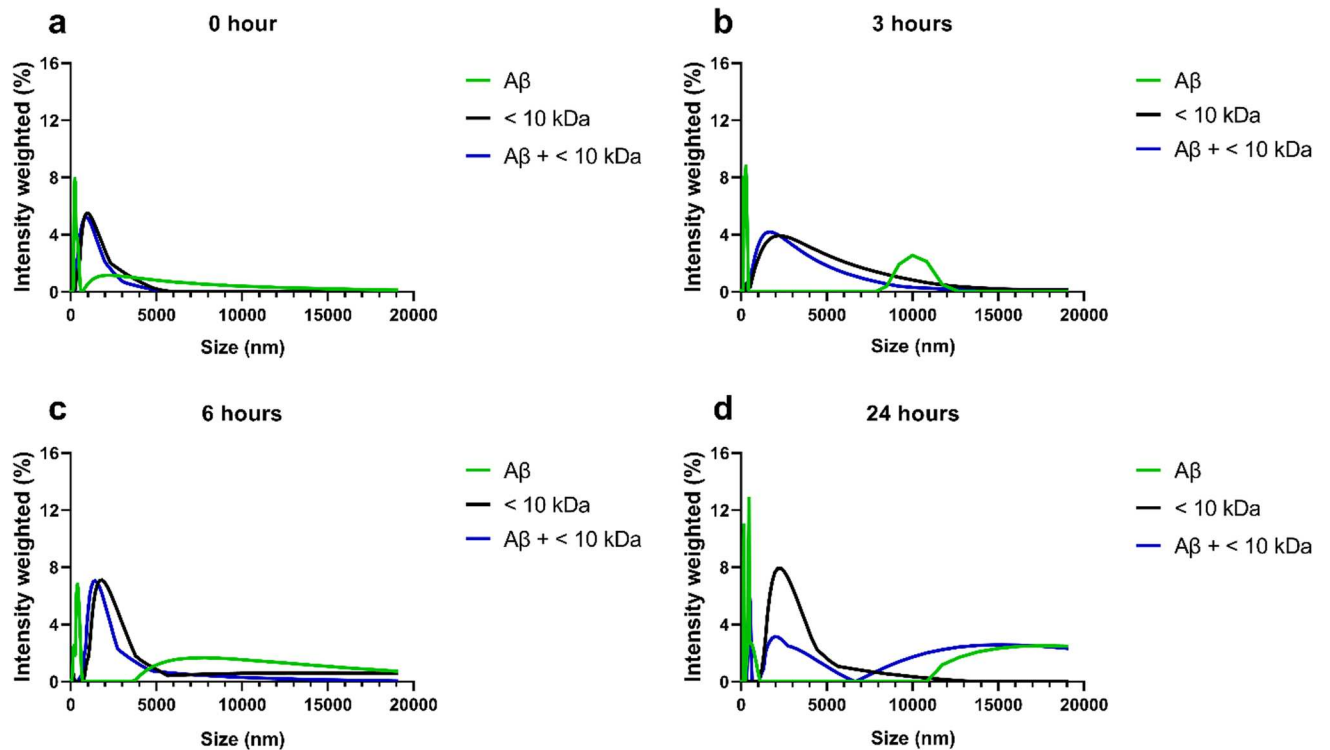


Fig. 4. DLS measurements of A β aggregation. At the initial stage, minimal A β peptide aggregation is evident at (a) 0 h, with the appearance of initial oligomers at (b) 3 h, characterized by an intensity peak at 10,000 nm exclusive to the A β -only solution. This trend continued at approximately (c) 6 h, when A β aggregates started to form but remained absent in the A β + <10 kDa solution. However, at (d) 24 h, a visible change occurs with the emergence of an intensity peak in the A β + <10 kDa solution. This peak is shifted to the left compared to that of the A β -only solution, indicating smaller oligomer sizes despite the presence of aggregation.

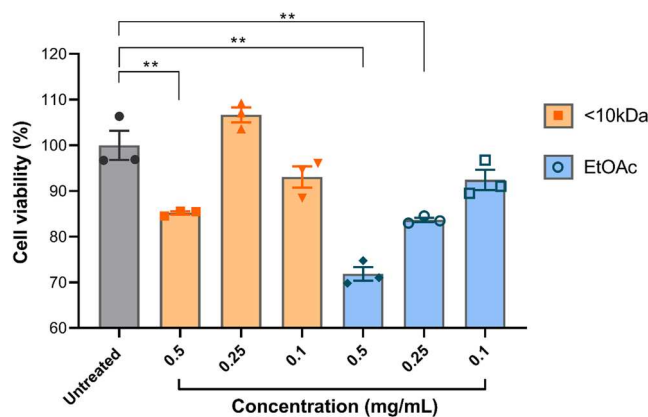


Fig. 5. Cell viability of human neurons treated with EtOAc and <10kDa fractions. Fraction <10 kDa at concentration of 0.5 mg/mL significantly reduces viability compared to the untreated group ($p = 0.0099$). The EtOAc fraction at a concentration of 0.5 and 0.25 mg/mL also significantly reduces the viability ($p = 0.0013$ and $p = 0.0071$ respectively). The data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (unpaired t test).

Discussion

The beneficial health effects promoted by kefir have been demonstrated in the literature across various applications due to its biological activities^{35,36}. Kefir's use ranges from treating and recovering from dysbiosis on its own³⁷ to serving as an adjuvant in the treatment of related diseases, including inflammatory³⁸, neurodegenerative³⁹ and metabolic syndrome⁴⁰. The benefits of kefir have been demonstrated in both animal models⁴¹ and humans^{42–47}. In previous works, our group demonstrated the positive effects of metabolic²⁴ and peptide²⁵ fractions in

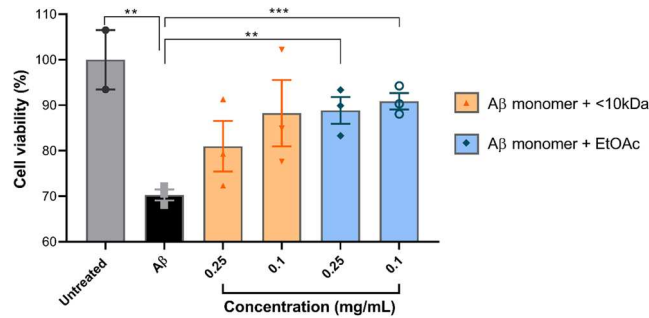


Fig. 6. Cell viability of human neurons co-treated with EtOAc and < 10 kDa peptidic fraction from kefir and synthetic A β . Group that received A β significantly decreased the cell viability compared to the untreated group ($p = 0.0101$). Only the treatments of synthetic peptide A β pre-incubated with EtOAc fraction at the concentration of 0.25 and 0.1 mg/mL showed an increased viability compared to the A β group ($p = 0.0044$ and $p = 0.0007$ respectively). The data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (unpaired t test).

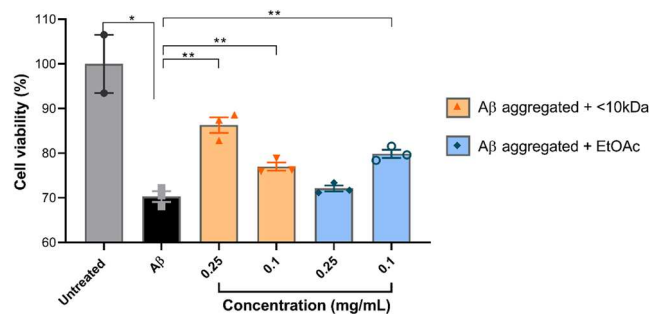


Fig. 7. Cell viability of human neurons stimulated with synthetic A β aggregates then treated with EtOAc and < 10 kDa peptidic fraction from kefir. Cell incubated with A β aggregates for 48 h then treated with < 10 kDa fraction at concentrations of 0.25 and 0.1 mg/mL had an increased in viability ($p = 0.0017$ and $p = 0.0116$ respectively) compared to the A β group. Cells treated with EtOAc fraction at 0.1 mg/mL also had an increase in viability over the A β group ($p = 0.0033$). The data are shown as individual values, the mean \pm S.E.M. (unpaired t test).

Alzheimer's model flies overexpressing both human BACE and APP. In the present study, these findings were investigated in a *Drosophila melanogaster* model in which only A β 1–42 was expressed.

Only the fractions and concentrations that showed the best results for the parameters evaluated in our previous works were selected. As summarized by Batista et al. 2021²⁴, the chosen metabolic fractions at the selected concentrations had the highest capacity to reduce neurodegeneration indices, while Malta et al. 2022²⁵ identified peptide sequences and predicted their interaction with β -secretase, A β peptide, and acetylcholinesterase. Considering these possible interactions, a *Drosophila melanogaster* model with overexpression of the A β 1–42 peptide was chosen to validate these fractions against exclusively the human A β peptide expressed in this model, as the strain used lacks β -secretase, reducing potential interaction targets.

Alzheimer's disease has been extensively studied in *D. melanogaster* model^{15,48–50}. By using an eye driver (GMR-Gal4) to express the human A β 1–42 peptide, a complex yet accessible model can be created³⁴. The model is easy to handle and phenotype, allowing for precise quantitative analysis of phenotypic parameters associated with neurodegeneration processes^{51–53}.

First, the model was validated by crossing flies containing the UAS-A β 1–42 peptide with an eye driver (GMR-Gal4). Other studies have also demonstrated similar alterations in neurodegeneration using an eye driver^{18,54–56}, but relating our data to the findings in the literature was challenging due to the large number of drivers and responders inserted in different positions in the genome, resulting in different phenotypes⁵⁷.

The peptidic fraction < 10 kDa improved all evaluated parameters except the organizational level of ommatidia, confirming the *in silico* prediction of Malta et al. (2022)²⁵ that showed peptides in this fraction can interact with A β plaques. As previously shown, this fraction contains many peptides that can interact with more than one element of the amyloidogenic pathway. The fly model analyzed in this work infers that the interaction between the fraction and A β peptides occurs and can alter the phenotype.

According to Batista et al. (2021)²⁴, in the APP-BACE expression model in the brain, all metabolic kefir's fractions decrease the neurodegeneration index (vacuole area). In this present study, only the EtOAc fraction reduced the total area of vacuoles. The lack of similarity in results between both studies may be due to the difference in the fly models used⁵⁷. This result shows that only the EtOAc can interact with beta-amyloid peptides, while the other ones probably could inhibit the activity of beta-secretase enzyme or interact with the APP.

The DLS measurements underscore the inhibitory effect of the <10 kDa fraction on A β aggregation, confirming our previous *in silico* findings²⁵. In this work, we provide the first experimental evidence that the <10 kDa fraction can interact with A β plaques to promote dynamic aggregation changes. The DLS has been used in studies of dynamic aggregation (or anti-aggregation) of A β ^{58,59}. However, additional pharmacological investigations are necessary to confirm this inference.

As a proof of concept for the dynamic anti-aggregation effects of synthetic A β peptide by kefir fractions, a human neuron cell culture Alzheimer's-like model was employed. For preventive purposes, kefir fractions were incubated with synthetic A β peptide monomers. In the treatment evaluation, synthetic A β peptide monomers were first allowed to aggregate over 48 h, followed by their introduction to the neuron culture and a subsequent 48-hour incubation to induce senile plaque formation. Post plaque formation, kefir fractions were administered to assess their potential in mitigating plaque-induced toxicity. The results from the neuron cell culture experiments agree with the dynamic light scattering (DLS) analysis and align with our previous findings in a *D. melanogaster* model²⁵.

To date, our research group has conducted *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies, with the latter limited to invertebrate models. For the first time, we have extended our analyses to a human neuron culture model. While the results suggest positive effects of the kefir fractions tested, further research is warranted, especially in a murine model of Alzheimer's disease. It is also notable that, although DLS provided valuable insights into particle size, aggregation, and sample homogeneity, it did not identify which species of A β 42 kefir fractions stabilizes. A more detailed characterization of these structures could provide valuable insights and should be addressed in future research. Furthermore, it would be beneficial to investigate the biological pathways associated with A β 42 through techniques such as Western blot and immunostaining. This could elucidate whether kefir peptides interact directly with A β 42 or influence distinct pathways.

In conclusion, the outcomes of this study are consistent with previous findings reported by our research group, further substantiating the interaction between peptides and amyloid beta. The evaluated kefir fractions represent prospective candidates for the development of prototypes aimed at modulating amyloidogenic processes in drug discovery.

Methods

Drosophila stock

The *Drosophila* strains used in this study included *w*¹¹¹⁸ (BL#3605), UAS-A β (UAS-A.beta1-42 BL#64216), and GMR-Gal4 (GAL4-ninaE. GMR BL#1104) strains obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. The flies were maintained on Bloomington standard culture media at 25 °C under a 12:12 h light/dark cycle during the expansion period.

To obtain flies with the desired genotype, virgin females from the UAS-A β strain were crossed with GMR-Gal4 males. The pairs were placed in an egg-laying medium, and the embryos were collected after 8 h of oviposition. Parental controls were obtained from the crosses GMR-Gal4 with *w*¹¹¹⁸ as well as with UAS-A β x *w*¹¹¹⁸ following the same procedures.

Treatment

For the treatment, kefir fractions were used with the same sample previously isolated as described by Malta et al. 2022²⁵ and Batista et al. 2021²⁴. The concentrations used were based on the best results of our previous work and are: kefir peptide fraction <10 kDa at a concentration of 0.25 mg/mL and kefir metabolic fractions at the following concentrations: Hex (hexane) 0.1 mg/mL, DCM (dichloromethane) 0.25 mg/mL, EtOAc (ethyl acetate) 0.25 mg/mL, and ButOH (N-butanol) 0.25 mg/mL. After collection, the embryos were placed in vials containing 1 g of enriched mashed potato medium and hydrated with 5 mL of treatment solution, along with a group receiving the vehicle (Tween 80 0.01%) and untreated control (received medium with water only). After 48 and 72 h, 100 μ L of treatment solution was added to the medium surface. Upon eclosion, flies aged 0–1 d.p.e. (days post eclosion) were collected, phenotypically separated, and maintained in untreated media for 24 h for subsequent analyses.

Eclosion assay

The eclosion assay was adapted from Rand et al. 2014⁶⁰. Approximately 100 embryos from the performed crosses were placed in a medium containing treatment solution, along with an untreated control group, and 48 and 72 h later, 100 μ L of treatment solution was added to the medium surface. After 12 days, the number of emerged adults in each vial was counted, and the eclosion percentage was calculated.

SEM – Scanning electron microscopy

Flies at 1–2 d.p.e. from all treatments and the control were euthanized, dehydrated in absolute ethanol for 48 h, and then subjected to the critical point drying process. The samples were mounted on metal stubs covered with carbon-conductive tape and coated with gold. Images were acquired at magnifications of 300, 550, and 1200x using a Tescan VEGA 3 LMU electron microscope. The obtained images were analyzed using the Flynotyper plugin, available at flynotyper.sourceforge.net, and integrated with ImageJ software for the quantification of the organizational level of ommatidia, represented as a phenotypic score that ranges from 0 to 100, with higher scores indicating more severe disorganization and damage.

Histopathological analysis

For histological analysis, five adult flies of the GMR-Gal4;UAS-A β strain 1–2 days post eclosion were collected from each control/treatment group, anesthetized with ethyl ether and fixed in Carnoy solution (6: 3: 1, 99% ethanol, chloroform and glacial acetic acid) for 24 h and processed in 70% ethyl alcohol (2x), 80% ethyl alcohol

(2x), 90% ethyl alcohol (2x), absolute ethyl alcohol (2x), and xylol (2x) for 15 min in each repetition and 60% liquid paraffin (2x) for 30 min. The fly heads were embedded in paraffin, and the blocks were sectioned at 3 μm thickness using a semiautomatic microtome (SLEE CUT5062).

The sections were hydrated, stained with hematoxylin and eosin, mounted and photographed with a light photomicroscope. Medulla (optic lobe) of three or more adult flies was used to calculate the neurodegeneration index and area of vacuolar lesions using the ImageJ software.

Relative quantification of A β using ThT

To confirm the amyloidogenic pathway in AD-like model, relative amyloid levels were measured using Thioflavin T (ThT), a benzothiazole dye that shows increased fluorescence when it binds to amyloid fibrils⁶¹. The relative quantification of A β using ThT was previously standardized in^{25,62}. Flies aged 1–2 d.p.e. were collected from all treatments and controls, euthanized in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until the next steps. On the day of the experiment, the heads were collected and homogenized in 1X PBS, and this entire process was carried out on ice. The homogenate was then centrifuged for 2 min at 10,000 $\times g$ at 4 °C, and the supernatant was collected and used for total protein quantification by the Bradford method; amyloid quantification was performed using thioflavin T (ThT). A 2 μL sample was incubated in a 96-well black plate with 198 μL of 10 μM ThT filtered solution for 20 min under agitation. Fluorescence was measured at 450 nm excitation and 482 nm emission and normalized in several steps. First, the autofluorescence of ThT in the absence of protein homogenate was subtracted as background. Then, the total fluorescence was adjusted according to the protein content of each sample (μg). Finally, the fluorescence values were normalized to the GMR-Gal4/+ control group, which does not express A β 42, by dividing the fluorescence of each sample by the average fluorescence of the control group. For this assay, 3 pools of 10 heads for each group were made and a quintuplicate technique was performed.

Synthetic A β preparation

The A β peptide was synthesized by AminoTech (Brazil) with a purity of 95%. Following the protocol described by Ryan et al. (2013)⁵⁸, the synthetic peptide was first dissolved in 10% ammonium hydroxide (w/v) at a concentration of 0.5 mg/mL. It was then incubated at room temperature for 10 min, sonicated for 5 min, aliquoted, and lyophilized. The lyophilized peptide was reconstituted in 60 mM NaOH, resulting in a stock solution with a final concentration of 886 μM , and stored at -20 °C.

Dynamic light-scattering (DLS) measurement

The size of the A β aggregates generated in the presence or absence of the < 10 kDa was measured using a dynamic light scattering instrument (Litesizer™ 500, Anton Paar).

All measurements were conducted at 25 °C with a detection angle of 90°. For this purpose, 1 μM A β 1–42 in 1 \times PBS was incubated either alone or with 0.25 mg/mL of the < 10 kDa fraction, and a solution containing only the < 10 kDa fraction at 0.25 mg/mL was used as a control. All samples were filtered through a 0.22 μm Millipore filter.

These three preparations were analyzed for their particle size at different time points (0, 3, 6, and 24 h). For the readings, 2 mL of each sample was used, and the samples were kept at rest between measurements. The intensity of the size distribution was obtained through analysis in Kalliope software.

Human cell culture

The cell line of human neuroblastoma was used, SH-SY5Y, donation from University of Siena, Italy, was maintained at 37 °C in a humidified atmosphere, with 5% CO₂. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cultilab[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab[®]) and 1% antibiotic (Vitrocell[®]).

Treatment

Kefir fractions < 10 kDa and ethyl acetate (EtOAc) were diluted in 3 different concentrations (0.5, 0.25, 0.1 mg/mL) and filtered through a 0.22 μm Millipore filter.

Human neurotoxicity

Cells were plated in a 96-well plate at 10,000 cells per well in 100 μL DMEM and kept in an incubator for 24 h for adherence. At the end of this period, the treatments (kefir fractions) were added to the cells and each group was treated at one concentration. Controls consist of untreated cells as a negative control group and positive controls as treatment with 0.2% Triton-x.

At the end of the treatment period, cells were evaluated for cell viability using the AlamarBlue assay (Invitrogen[®]) by incubation with 10% (10 μL) resazurin at 37 °C for approximately 3 h. Resazurin is a non-fluorescent blue dye that can be reduced intracellularly to resorufin, which has a highly fluorescent pink color and is detected by colorimetric reading (absorbance at 570 and 600 nm).

Cell culture Alzheimer-like model (preventive)

The synthetic A β peptide (stock solution 886 μM) was first diluted to a final concentration of 1 μM and then filtered through a 0.22 μm Millipore filter. To evaluate the efficacy of the treatment in inhibiting A β peptide aggregation, the kefir fractions were mixed with the A β peptide and incubated at 37 °C for 48 h. Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 5,000 cells per well, supplemented with 100 μL DMEM/well and incubated for 24 h to allow for cell attachment. Subsequently, A β peptide and kefir fractions were applied to the cells, and incubated for an additional 48 h, resulting in a total incubation time of 96 h. To ensure accurate comparisons, a

positive control group consisting of untreated cells, a negative control group consisting of dead cells in DMEM with 0.2% Triton-X, and a control group of untreated A β peptide were included.

Cell culture Alzheimer-like model (treatment)

Amyloid-beta peptide (886 μ M) was diluted to a final concentration of 1 μ M, filtered through a 0.22 μ m membrane for sterilization, and incubated at 37 °C for 48 h to induce peptide aggregation. Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 5,000 cells per well in 100 μ L DMEM and incubated for 24 h. After incubation, A β peptide was then added to the cell culture, followed by an additional 48-hour incubation to facilitate the formation of senile plaques.

After this second incubation period, the cells were treated with kefir fractions at the most effective concentrations, and the incubation was extended for an additional 24 h to assess the potential of these treatments to reverse pre-established senile plaques.

Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism 10. The normality of the data was assessed using the D'Agostino and Pearson test. For normally distributed data, groups were compared using a t-test, and for comparisons involving more than two groups, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used. For data that did not follow a normal distribution, non-parametric tests such as the Mann-Whitney U test (for two groups) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (for more than two groups) were applied. A significance level of $p < 0.05$ was established for all tests.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 20 May 2024; Accepted: 15 October 2024

Published online: 26 October 2024

References

- Kumar, A., Singh, A. & Ekavali A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep.* **67**, 195–203 (2015).
- Agarwal, M., Alam, M. R., Haider, M. K., Malik, M. Z. & Kim, D. K. Alzheimer's Disease: an overview of Major hypotheses and Therapeutic options in Nanotechnology. *Nanomaterials*. **11**, 59 (2020).
- Gu, L. & Guo, Z. Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* **126**, 305–311 (2013).
- Seeman, P. & Seeman, N. Alzheimer's disease: β -amyloid plaque formation in human brain. *Synapse*. **65**, 1289–1297 (2011).
- Walker, L. C. A β plaques. *Free Neuropathol.* **1**, 31–31 (2020).
- Madnani, R. S. Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician. *Front. Neurol.* **14**, 1–7 (2023).
- Bayer, T. A. & Wirths, O. Intracellular accumulation of amyloid-beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **2**, 1359 (2010).
- Van Der Kant, R., Goldstein, L. S. B. & Ossenkoppele, R. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 21–35 (2020).
- McGirr, S., Venegas, C. & Swaminathan, A. Alzheimers Disease: a brief review. *J. Exp. Neurol.* **1**, 89–98 (2020).
- Chavan, R. S., Supalkar, K. V., Sadar, S. S. & Vyawahare, N. S. Modelos Animais Da doença de Alzheimer: uma origem de tratamentos inovadores e uma visão da etiologia da doença. *Brain Res.* **1814**, 148449 (2023).
- Ribeiro, F. M., Camargos, E. R., Souza, S. & Teixeira, A. L. da L. C. de Animal models of neurodegenerative diseases. *Braz. J. Psychiatry* **35**, S82–S91 (2013).
- Saraceno, C., Musardo, S., Marcello, E., Pelucchi, S. & Diluca, M. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front. Pharmacol.* **4**, 77 (2013).
- Saleem, S. & Kannan, R. R. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell. Death Discov.* **4**, 1–13 (2018).
- Jeon, Y., Lee, J. H., Choi, B., Won, S. Y. & Cho, K. S. Genetic dissection of Alzheimer's Disease using Drosophila models. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 884 (2020).
- Prüßing, K., Voigt, A. & Schulz, J. B. Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **8**, 35 (2013).
- Sekiya, M. & Iijima, K. M. Phenotypic analysis of a transgenic Drosophila model of Alzheimer's amyloid- β toxicity. *STAR Protoc.* **2**, 100501 (2021).
- Hirth, F. Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol. Disord Drug Targets.* **9**, 504–523 (2010).
- Cutler, T. et al. Drosophila Eye Model to study neuroprotective role of CREB binding protein (CBP) in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **10**, e017691 (2015).
- Tundis, R. et al. Chapter 3 - Natural Compounds and Their Derivatives as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer Disease. in *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products* (ed. Brahmachari, G.) 63–102 (Elsevier, 2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809593-5.00003-3>
- Cheng, X., Song, C., Du, Y., Gaur, U. & Yang, M. Pharmacological treatment of Alzheimer's Disease: insights from Drosophila melanogaster. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4621 (2020).
- Storr, T. Multifunctional compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Can. J. Chem.* **99**, 1–9 (2021).
- Liu, J. et al. Exploring the therapeutic potential of natural compounds for Alzheimer's disease: mechanisms of action and pharmacological properties. *Biomed. Pharmacother.* **166**, 115406 (2023).
- Lenz, S., Karsten, P., Schulz, J. B. & Voigt, A. Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **127**, 453–460 (2013).
- Batista, L. L. et al. Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **11**, 11262 (2021).
- Malta, S. M. et al. Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-alzheimer potential in Drosophila melanogaster. *Sci. Rep.* **12**, 11065 (2022).
- Westfall, S., Lomis, N. & Prakash, S. A novel polyphenolic prebiotic and probiotic formulation have synergistic effects on the gut microbiota influencing Drosophila melanogaster physiology. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **46**, 441–455 (2018).
- Tan, F. H. P. et al. Lactobacillus probiotics improved the gut microbiota profile of a Drosophila melanogaster Alzheimer's disease model and alleviated neurodegeneration in the eye. *Benef. Microbes.* **11**, 79–89 (2020).

28. Anwar, M. M., Ali, O. S. M. & Eltablawy, N. A. R. L. A., M, B. A. The effect of using kefir grains and mesenchymal stem cells in LPS-induced Alzheimer's disease neuroinflammatory model. *Rev. ENeurobiología* **10**, NA (2019).
29. Vasquez, E. C., Aires, R., Ton, A. M. M. & Amorim, F. G. New insights on the Beneficial effects of the Probiotic Kefir on Vascular Dysfunction in Cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* **26**, 3700–3710 (2020).
30. Kim, D. H. et al. Antimicrobial activity of kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Food Sci. Anim. Resour.* **36**, 787–790 (2016).
31. Riaz Rajoka, M. S. et al. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains. *J. Funct. Foods.* **63**, 103588 (2019).
32. Miao, J. et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. *Food Control.* **65**, 63–72 (2016).
33. Kaur, H. et al. Effects of Probiotic supplementation on short chain fatty acids in the App NL-G-F Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **76**, 1083–1102 (2020).
34. Kasanin, J. et al. Studying Alzheimer's Disease using *Drosophila melanogaster* as a powerful Tool. *Advan Alzheimers Dis.* **11**, 23-37 (2022).
35. Azizi, N. F. et al. Kefir and its biological activities. *Foods Basel Switz.* **10**, 1210 (2021).
36. Gupta, V. K. et al. Safety, feasibility, and impact on the gut microbiome of kefir administration in critically ill adults. *BMC Med.* **22**, 80 (2024).
37. Zeynep, Y. & Mert Sudagidan. A medical and molecular approach to kefir as a therapeutic agent of human microbiota: A review: *Int J Vitamin Nutr Res.* **94**, 71 - 80 (2024).
38. Yilmaz, İ., Dolar, M. E. & Özpınar, H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: a randomized controlled trial. *Turk. J. Gastroenterol.* **30**, 242–253 (2019).
39. Pereira, T. M. C. et al. The emerging scenario of the gut-brain Axis: the therapeutic actions of the new actor kefir against neurodegenerative diseases. *Antioxidants.* **10**, 1845 (2021).
40. Bellikci-Koyu, E. et al. Effects of regular kefir consumption on gut microbiota in patients with metabolic syndrome: a Parallel-Group, Randomized, controlled study. *Nutrients.* **11**, 2089 (2019).
41. Albuquerque Pereira, M., de Albuini, F. M., Gouveia Peluzio, M. F. do C. Anti-inflammatory pathways of kefir in murine model: a systematic review. *Nutr. Rev.* **82**, 210–227 (2024).
42. Ostadrahimi, A. et al. Effect of Probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid Profile in type 2 Diabetic patients: a Randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iran. J. Public. Health.* **44**, 228–237 (2015).
43. Peluzio, M., Dias, C. G., de Martinez, M. & Milagro, F. I. do, J. A. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. *Front. Nutr.* **8**, 638740 (2021).
44. Salari, A. et al. Effect of kefir beverage consumption on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Complement. Ther. Clin. Pract.* **44**, 101443 (2021).
45. Bellikci-Koyu, E. et al. Probiotic kefir consumption improves serum apolipoprotein A1 levels in metabolic syndrome patients: a randomized controlled clinical trial. *Nutr. Res.* **102**, 59–70 (2022).
46. Yilmaz, I. & Arslan, B. The effect of kefir consumption on the lipid profile for individuals with normal and dyslipidemic properties: a randomized controlled trial. *Rev. Nutr.* **35**, e210098 (2022).
47. Bessa, M. K., Bessa, G. R. & Bonamigo, R. R. Kefir as a therapeutic agent in clinical research: a scoping review. *Nutr. Res. Rev.* **37**, 79–95 (2023).
48. Moloney, A., Sattelle, D. B., Lomas, D. A. & Crowther, D. C. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 228–235 (2010).
49. Shulman, J. M. et al. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates tau-mediated mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 870–877 (2014).
50. Hwang, S. et al. Low-dose ionizing radiation alleviates A β 42-induced cell death via regulating AKT and p38 pathways in *Drosophila* Alzheimer's disease models. *Biol. Open.* **8**, bio036657 (2019).
51. Diez-Hermano, S., Valero, J., Rueda, C., Ganfornina, M. D. & Sanchez, D. An automated image analysis method to measure regularity in biological patterns: a case study in a *Drosophila* neurodegenerative model. *Mol. Neurodegener.* **10**, 9 (2015).
52. Iyer, J. et al. Quantitative Assessment of Eye Phenotypes for Functional Genetic studies using *Drosophila melanogaster*. *G3 GenesGenomesGenetics.* **6**, 1427–1437 (2016).
53. Nitta, Y. & Sugie, A. Studies of neurodegenerative diseases using *Drosophila* and the development of novel approaches for their analysis. *Fly. (Austin).* **16**, 275–298 (2022).
54. Ghosh, S. & Feany, M. B. Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in *Drosophila* models of human neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2011–2018 (2004).
55. McGurk, L., Berson, A. & Bonini, N. M. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics.* **201**, 377–402 (2015).
56. Deshpande, P. et al. N-Acetyltransferase 9 ameliorates A β 42-mediated neurodegeneration in the *Drosophila* eye. *Cell. Death Dis.* **14**, 1–18 (2023).
57. Jeon, Y. et al. Phenotypic differences between *Drosophila* Alzheimer's disease models expressing human A β 42 in the developing eye and brain. *Anim. Cells Syst.* **21**, 160–168 (2017).
58. Ryan, T. M. et al. Ammonium hydroxide treatment of A β produces an aggregate free solution suitable for biophysical and cell culture characterization. *PeerJ.* **1**, e73 (2013).
59. Valls-Comamala, V. et al. The antigen-binding fragment of human gamma immunoglobulin prevents amyloid β -peptide folding into β -sheet to form oligomers. *Oncotarget* **8**, 41154–41165 (2017).
60. Rand, M. D., Montgomery, S. L., Prince, L. & Vorojeikina, D. Developmental Toxicity Assays Using the *Drosophila* Model. *Curr. Protoc. Toxicol. Editor. Board Mahin Maines Ed.--Chief* **A59**, 1.12.1–1.12.20 (2014).
61. Khurana, R. et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**, 229–238 (2005).
62. Da Costa Silva, J. R. et al. Differential gene expression by RNA-seq during Alzheimer's disease-like progression in the *Drosophila melanogaster* model. *Neurosci. Res.* **180**, 1–12 (2022).

Acknowledgements

We are thankful to the Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM-UFU) for the infrastructure and Scanning Electron Microscopy, and to the Pathology Laboratory of the Faculty of Odontology from Federal University of Uberlândia for the microscope sections. And we acknowledge that stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study.

Authors' contributions

S.M.M. Conception, design, development of methodology, analysis and interpretation of data, writing and revision of the manuscript. T.S.R DLS performance, histological analysis, and interpretation of data. M.H.S, A.S.M and R.B.F *Drosophila melanogaster* handling and experimental procedures. F.N.A.d.P.M and R.G.Z cell culture experiments and data analysis. L.M.M.B DLS analysis and interpretation. L.L.B production of metabolic frac-

tions. M.N.T.d.S SEM performance. D.d.O.S performed the microscopy sections for histopathological analysis. A.C.C.S and A.P.M.S. Data interpretation and technical support. F.S.E Revision, technical and material support. C.U.V. Conception, design, writing and revision of the manuscript, technical and material support.

Funding

This project was funded by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG APQ-02766-17, APQ-00269-22) and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, grant number: 403193/2022-2), FAPEMIG (grant number: CBB-APQ-03613-17) for INCT -TeraNano and FSE received scholarship grants CNPq (PQ-Research productivity, process no.312812/2021-3).

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76601-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.M. or C.U.-V.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.






Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Capítulo III
Artigo Científico 2

ORIGINAL ARTICLE OPEN ACCESS

The *para^{bss1}* *Drosophila melanogaster* as Model for Chronic Nociception: Insights Into Cannabidiol Analgesic Effects

Serena Mares Malta^{1,2}  | Lucas Ian Veloso Correia³ | Alexandre Souza Marquez¹ | Lucas Matos Martins Bernardes^{1,2}  | John George Howland⁴  | Ana Paula Mendes-Silva^{2,4}  | Foued Salmen Espíndola⁵  | Carlos Ueira-Vieira¹

¹Laboratory of Genetics, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil | ²Department of Psychiatry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada | ³Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil | ⁴Department of Anatomy, Physiology and Pharmacology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada | ⁵Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Correspondence: Serena Mares Malta (serena@ufu.br) | Carlos Ueira-Vieira (ueira@ufu.br)

Received: 21 June 2025 | **Revised:** 19 December 2025 | **Accepted:** 16 January 2026

Keywords: cannabidiol | chronic pain model | *Drosophila melanogaster* | nociception | *para^{bss1}* mutant

ABSTRACT

Background: Chronic pain, which is often unrelated to ongoing injury, is poorly understood and difficult to treat. Genetic studies have identified voltage-gated sodium (Na_v) channels, particularly gain-of-function mutations such as L858F and R1150W in human Na_v1.7, as involved in the development of chronic pain.

Methods: A chronic pain model was proposed in *Drosophila* using the *para^{bss1}* mutant. Behavioural chemical nociceptive assay was conducted, and sensitivity was pharmacologically tested with carbamazepine and cannabidiol to assess the model's validity for analgesic screening.

Results: Sequence alignment and 3D structural modelling revealed strong homology between human Na_v1.7 and the *para* gene, though no structural alterations were observed between the *parabss1* allele and the wild-type allele. Functionally, *para^{bss1}* larvae exhibited enhanced sensitivity to chemical, nociceptive stimuli compared to *w¹¹¹⁸* larvae. Furthermore, carbamazepine increased response latency in *w¹¹¹⁸*; however, *para^{bss1}* showed a time and dose-dependent response to this treatment. Oral administration of cannabidiol significantly increased latency to chemical stimuli in both genotypes, supporting cannabidiol's modulatory role in nociceptive circuits. These findings validate the *para^{bss1}* mutant as a tractable in vivo platform for chronic nociception studies and pharmacological screening.

Conclusions: The *para^{bss1}* mutant demonstrates heightened chemical nociception, resistance to carbamazepine and sensitivity to cannabidiol, thereby validating it as a pertinent *Drosophila* model for chronic pain. This model facilitates the screening of candidate analgesics targeting sodium channel dysfunctions in an in vivo setting, thereby demonstrating translational potential.

Significance Statement: This study proposes the *Drosophila melanogaster para^{bss1}* mutant as a valid and manageable in vivo model for chronic nociception. By exhibiting selective hypersensitivity, resistance to conventional treatment and sensitivity to cannabidiol, this model provides a cost-effective and ethically favourable platform for the preclinical screening of novel analgesics that target sodium channel dysfunctions. This study opens a new avenue for translational pain research and aligns with the ongoing demand for alternative animal models in pain therapeutic development.

Serena Mares Malta and Lucas Ian Veloso Correia contributed equally to the work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2026 The Author(s). *European Journal of Pain* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of European Pain Federation - EFIC®.

1 | Introduction

Pain is a complex and multidimensional phenomenon. The International Association for the Study of Pain (IASP) defines it as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage” (Treede 2018). This definition distinguishes pain, a conscious perspective, from nociception, which is the neural process that detects and transmits potentially harmful stimuli (Ang et al. 2017; Mitsi and Zachariou 2016). Nociceptors, specialized peripheral neurons, initiate this process by detecting noxious mechanical, thermal or chemical inputs, and two main fibre types are involved: thinly myelinated fibres, which convey sharp and localised pain rapidly, and unmyelinated C fibres, which transmit dull and diffuse pain more slowly (Basbaum et al. 2009; Campbell and Meyer 2006; Tracey 2017).

Chronic pain, defined as persisting beyond 3 months, affects up to 70% of older adults and often emerges independently of ongoing tissue injury (Bennett et al. 2019; Breivik et al. 2006; Patel et al. 2013). Its pathophysiology remains incompletely understood, encompassing complex interactions between peripheral and central sensitization, neuroimmune processes and individual genetic predisposition. Several genes implicated in neurotransmission and immune response are associated with chronic pain susceptibility, including those encoding ion channels such as voltage-gated sodium (Na_v) and calcium channels (Ca_v), and mutations in these genes can alter nociceptor excitability, contributing to development of chronic pain through channelopathies (Bamps et al. 2021; Dohrn et al. 2019; Stenz et al. 2022).

Among sodium channels, $\text{Na}_v1.7$ (encoded by SCN9A) plays a central role in human pain physiology. Gain-of-function mutations in $\text{Na}_v1.7$ are associated with inherited erythromelalgia and paroxysmal extreme pain disorder, whereas loss-of-function mutations result in congenital insensitivity to pain (Cox et al. 2006; Dib-Hajj et al. 2005). Because of this dual relevance, $\text{Na}_v1.7$ is considered a key molecular determinant of nociception and a major target for analgesic development.

Despite the availability of Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), antidepressants, anticonvulsants and opioids to alleviate pain, their efficacy is limited in chronic conditions (Cohen et al. 2021; Park and Moon 2010). Carbamazepine, for instance, is prescribed for trigeminal neuralgia and other neuropathic conditions but is associated with notable adverse effects (Guo et al. 2024; Wiffen et al. 2014).

These therapeutic limitations underscore the need for alternative strategies (Mohammed et al. 2024). Cannabidiol (CBD), a non-psychoactive phytocannabinoid, has been reported to have analgesic, anti-inflammatory and neuroprotective properties (Mohammed et al. 2024). Preclinical and clinical studies suggest its potential, but further investigation is necessary to clarify its mechanisms and therapeutic value (Schwan et al. 2019).

To address both the need for reliable experimental models and the exploration of novel treatments, we propose a *Drosophila melanogaster* model of chronic nociception using the *para*^{bss1} mutant. In flies, the *para* gene encodes the principal voltage-gated sodium channel, functionally analogous to vertebrate

Na_v channels. Two sodium-channel genes exist in the fly genome: Na_v1 , the predominant neuronal isoform and Na_v2 , which remains poorly characterised (Liebeskind et al. 2011; Zakon 2012). The *para*^{bss1} mutant (L1699F) carries a gain-of-function substitution that enhances neuronal excitability, lowers the seizure threshold and leads to the classical bang-sensitive phenotype in adults (Kroll et al. 2015; Loughney et al. 1989; Parker et al. 2011). This mutation also leads to hypersensitivity and resistance to classical Na^+ channel blockers such as carbamazepine (Ganetzky 2000; Kroll et al. 2015; Parker et al. 2011). Electrophysiological recordings from *Xenopus oocytes* expressing the mutant channel confirmed altered inactivation dynamics consistent with sodium-channel hyperactivity (Parker et al. 2011). Due to the evolutionary conservation of sodium channels between insects and mammals, this model represents a promising platform for screening compounds that modulate nociceptive pathways, especially those targeting persistent pain states.

In this study, we aim to establish a model of chronic nociception by integrating behavioural, pharmacological and comparative structural analyses. We evaluate whether the gain of function mutation in the *para* channel enhances nociceptive sensitivity and whether pharmacological agents such as carbamazepine and cannabidiol modulate this response. Moreover, through sequence and 3D structure analyses, we compare *Drosophila para* with human $\text{Na}_v1.7$ to assess their evolutionary and translational relevance. As proof of concept, we also assess the effects of CBD, providing initial insights into potential analgesic. While the primary focus is the proposal of an in vivo platform for studying nociception, the inclusion of CBD tests may contribute to expanding pharmacological perspectives for pain management.

2 | Methods

2.1 | Flies Stock

The *para*^{bss1} *D. melanogaster* strain was kindly provided by Dr. Tanouye (University of California, Berkeley). The w¹¹¹⁸ (BL #3605) was obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. The flies were fed with standard cornmeal food (Bloomington) *ad libitum* and kept at 25°C on a 12-h dark/light cycle.

2.2 | Comparison of Human and Fly Sodium Channels Using BLASTp

To explore the evolutionary relationship and structural conservation between human and *Drosophila melanogaster* sodium channels, particularly those involved in pain perception, BLASTp alignments were performed to identify potential homologous regions. The human proteins analysed were SCN9A ($\text{Na}_v1.7$) (access number NP_002968.1), SCN10A ($\text{Na}_v1.8$) (access number NP_001280235.2) and SCN11A ($\text{Na}_v1.9$) (access number NP_001336182.1), all from the current genome version GRCh38.p13.

The protein encoded by the *para* gene from *Drosophila melanogaster* (access number NP_001188627.1) current genome version

6.32 was aligned against human protein using Protein BLAST: Align two or more sequences using BLAST.

2.3 | Prediction of 3D Proteins Structures and Alignments

To investigate whether specific gain-of-function mutations in human and *Drosophila melanogaster* sodium channels result in structural changes that could explain variations in channel activity, we performed comparative protein modeling and structural alignment. The 3D structure models were predicted using Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>). Following the upload of protein sequences, the program conducted a search for 3D templates. The best templates were used for building 3D models. UCSF Chimera was used to visualise and analyse the molecular structures (Pettersen et al. 2004). The RaptorX was used for alignment of predicted 3D structures (Wang et al. 2011, 2013) and assess potential conformational differences between the wild-type and mutant channels.

2.4 | Chemical Nociception Test

The nociception test was adapted from Lopez-Bellido et al. (2019). Solutions of HCl were generated ranging from 0.5% to 9% (vol/vol) from HCl stock (Sigma: 37%) diluted in Milli-Q water. Third instar larvae ($n \geq 15$) were collected and placed in a glass petri dish and allowed to explore for approximately 10s. They were then exposed to a given solution by pipetting 1.5 μ L onto the posterior end of the larvae. Larvae behavior was recorded and analysed using QuickTime Player 10.5 version. A complete roll of 360° along the body axis within 10s of exposure was scored as an aversive behavior. Other characteristic behaviors were not categorised.

2.5 | Carbamazepine Treatment

Third instar larvae were exposed to a preparation of instant mashed potato (Yoki) hydrated with 2mL solution of Carbamazepine at concentrations of 3 or 6 mg/mL.

Carbamazepine (300 mg) was first dissolved in 1 mL of absolute ethanol then diluted in distilled H₂O to 3 or 6 mg/mL. Two mL of each solution at the final concentration were mixed with 2 mg of instant mashed potato (Yoki) and placed in a petri dish. The control group was fed with a preparation containing only water, while the treatment group received the Carbamazepine-enriched solution; third instar larvae were added in the center of the preparations and kept at 25°C. The larvae were then tested for chemical nociception using 2% HCl as the noxious stimulus ($n \geq 15$ per group) after 1 and 6 h of exposure to the treatment.

2.6 | Cannabidiol (CBD) Treatment

Third instar larvae were collected and fed a hydrated instant mashed potato medium (Yoki) supplemented with CBD

(Mahara, Brazil) at a final concentration of 0.1 mg/mL, prepared in a 3% PEG400 solution (vehicle). Control larvae were fed with a solution containing only vehicle and food colouring, while the treatment group received the CBD-enriched solution. Both groups were maintained at 25°C and allowed to feed for 1h. After feeding, larvae were tested for chemical nociception using 2% HCl as a noxious stimulus ($n \geq 15$ per group).

2.7 | Statistical Analysis

The D'Agostino and Pearson test was used for normality distribution. Groups were compared by *t*-test (parametric) or Kruskal Wallis test (non-parametric) with an established significance level of $p \leq 0.05$. Two-way and one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc correction was used for multiple group comparisons. All analyses were performed using the software GraphPad Prism 8.

3 | Results

3.1 | Comparison Mutation in Na_v Proteins Human and *Drosophila melanogaster*

To identify potential structural similarities between human pain-related sodium channels and the *Drosophila para* channel, we first compared their protein sequences and modelled their structures. This analysis aimed to support the translational relevance of using *para* mutants to study Na_v-dependent nociception.

The sequence of human proteins Na_v1.7, Na_v1.8 and Na_v1.9 was compared to *D. melanogaster* by BLASTp to assess structural changes in human and *D. melanogaster* Na_v proteins. All identified mutations described in Table 1 promote a gain of function in the protein and are associated with inherited pain syndromes or other neurological conditions. While Na_v1.8 and Na_v1.9 did not exhibit a conserved motif associated with *para*^{bss1}, Na_v1.7 displayed the highest query coverage with the *para* gene fly (95%). Therefore, Na_v1.7 and *para*^{bss1} were selected for the prediction of 3D protein structures in *D. melanogaster*.

The Na_v1.7 had 78.51% identity with the human sodium channel protein type 2 subunit alpha PDB 6j8e.1.B. These templates were used to predict the 3D model of *para* and *para*^{bss1} for *D. melanogaster* and Na_v1.7 wild type, as well as two distinct models for the mutation R1150W and L858F. The analysis of the overlap among human 3D structures showed that the R1150W mutation promotes a conformational change in a cytoplasmic domain (Figure 1A–C).

Specifically, our analysis indicates that this change involves a structural rearrangement in cytoplasmic loops, which span residues mainly SER490–SER695 and SER1004–THR1145. The R1150W mutation, located adjacent to this region, appears to alter the spatial orientation of the C-terminal portion of this loop, leading to its more exposed conformation in the mutant channel. To support these structural comparisons, we calculated the Root-Mean-Square Deviation (RMSD) between the models (Table 2). This analysis confirms that while the overall fold between human Na_v1.7 and *Drosophila para*

TABLE 1 | Comparative analysis of voltage-gated sodium channels (Nav) in *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster*.

Organism	Sodium Channel	Gene	Mutation	Blast P against <i>para</i> <i>D. melanogaster</i>	
				Query cover	Identity
<i>Homo sapiens</i>	Na _v 1.7	SCN9A	Q10R I136V S211P F216S I234T S241T I245V N395K V400M G616R L823R L848T G856D L858H L858F A863P V872G Q875E L955Del P1308L V1316A F14449V W1538R A1632T A1746G	95%	43.85%
	Na _v 1.8	SCN10A	L554P M650K A1304T G1662S I1706V	78%	47.83%
	Na _v 1.9	SCN11A	R222H R222S R225C I381T G699R A808G L811P L1158P N1169S V1184A I1293V L1302F	80%	43.92%
<i>Drosophila melanogaster</i>	Na _v 1.1	<i>para</i>	L1699F or L1678F	100%	100%

Note: Human genes *SCN9A*, *SCN10A*, and *v* encode Na_v1.7, Na_v1.8, and Na_v1.9 channels, respectively, all implicated in nociception and chronic pain. The *Drosophila* homologue is the *para* gene, encoding the para sodium channel. Listed mutations represent known pathogenic or functionally relevant variants. BLASTp alignment scores indicate the degree of sequence similarity between each human channel and the *Drosophila* para channel, expressed as query cover and identity percentage. The *para*^{bss1} mutation (L1699F or L1678F) is also noted.

is conserved, the L1699F mutation in *para* does not induce a major structural alteration (RMSD = 0.0 Å), unlike the human R1150W mutation.

In contrast, the L858F mutation did not promote any conformational changes (Figure 1A,G,E). For *D. melanogaster*, the overlap of predicted 3D structures of the proteins from *para* (wild-type) and *para*^{bss1} showed that there are no structural differences between them.

3.2 | Validation of Chemical Nociception in *D. melanogaster* *w*¹¹¹⁸

Before testing mutant strains, we confirmed a reliable chemical nociception assay in reference strain *w*¹¹¹⁸. This step aimed to define stimulus conditions that evoke nocifensive rolling responses.

Our results showed that third instar larvae are very sensitive to treatment with 9% HCl compared to 2% and 1% HCl ($p < 0.0001$), while no difference was found between treatment with 2% and 1% HCl ($p = 0.0798$) (Figure 2). One hundred percent of larvae responded within 3 s, whereas only 50% responded by 6 s following treatment with 2% and 1% of HCl.

3.3 | *para*^{bss1} is More Sensitive to Chemical Nociception Than *w*¹¹¹⁸

To determine whether the gain-of-function mutation in the *para* gene affects chemical nociception, we next compared the behavioural responses of *w*¹¹¹⁸ and *para*^{bss1} larvae to noxious HCl. This experiment tested the hypothesis that increased sodium channel excitability enhances sensitivity to chemical stimuli.

The *para*^{bss1} mutant third instar larvae, when exposed to the noxious chemical stimulus, had a response time below 5 s and

significantly lower than *w*¹¹¹⁸ flies ($p < 0.0001$ for 1% HCl and $p = 0.0008$ for 2% HCl) (Figure 3A).

The accumulated response in percentage analyses (Figure 3B) showed that 60% of the *para*^{bss1} third instar larvae tested showed completed a 360° roll in 3 s, while none of the *w*¹¹¹⁸ larvae had the same behaviour at the same time ($p < 0.0001$) when both strains were treated with 1% HCl. When exposed to 2% HCl, *para*^{bss1} larvae reached 60% response at 4 s, while *w*¹¹¹⁸ required 6.5 s to reach the same threshold ($p = 0.0008$ one-way ANOVA analysis). Significant differences were found through two-way ANOVA analysis, at 5 s ($p = 0.0026$), 6, 7 and 8 s ($p < 0.0001$) when comparing only *w*¹¹¹⁸. When *para*^{bss1} was compared across time points, no significant differences were observed ($p > 0.05$).

3.4 | Differential Sensitivity of *para*^{bss1} and *w*¹¹¹⁸ Larvae to Na⁺ Channel Blocker

To evaluate whether the *para*^{bss1} mutation alters sensitivity to sodium-channel blockade, both genotypes were treated with carbamazepine (CBZ) and subsequently challenged with 2% HCl in the chemical nociception assay (Figure 4A–D).

After 1 h of exposure (Figure 4A), *w*¹¹¹⁸ larvae treated with CBZ 3 mg/mL and 6 mg/mL showed an increase in latency compared with untreated controls ($p = 0.0048$) and ($p = 0.0060$), respectively; as determined by one-way ANOVA: $F(2, 55)$ with Tukey's post hoc test. The treatment groups exhibited mean latencies of 14.89 ± 8.46 s (3 mg/mL), 14.08 ± 8.60 s (6 mg/mL) and 6.00 ± 1.62 s (untreated), with no significant difference between concentrations of CBZ ($p > 0.9999$). When exposure was extended to 6 h (Figure 4B), *w*¹¹¹⁸ larvae treated with 6 mg/mL of CBZ showed a significant increase in latency compared with the untreated group ($p = 0.0032$) while no significant difference was detected between untreated and 3 mg/mL group ($p = 0.0929$), or between the two CBZ concentrations ($p = 0.6473$) Kruskal-Wallis $H(2) = 9.305$ with Dunn's post hoc test.

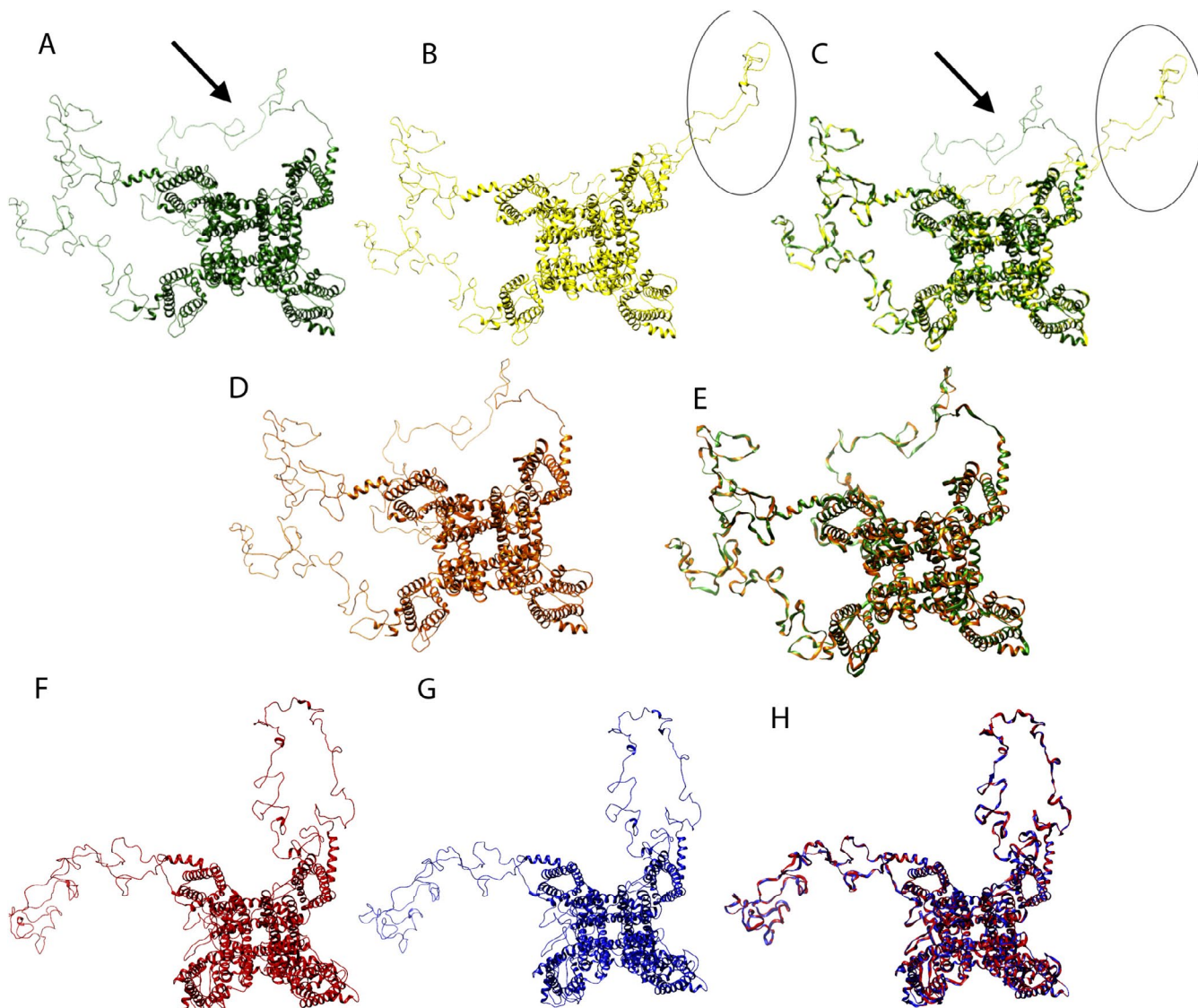


FIGURE 1 | Predicted 3D models for Sodium channel. (A) Na_v 1.7 human wild type. (B) mutant Na_v 1.7 human (R1150W). (C) overlay between Na_v 1.7 wild type (green) and mutant (R1150W) (yellow). (D) mutant Na_v 1.7 human (L858F). (E) overlay between Na_v 1.7 wild type (green) and mutant (L858F) (orange). (F) 3D models of wild type *para*^{bss1} *Drosophila melanogaster* sodium channel. (G) model for *para*^{bss1} mutant of *D. melanogaster* (L1678F). Arrow and circles in A–C shows conformational differences.

TABLE 2 | Descriptive comparison between human Na_v1.7 and *Drosophila para* channel structures.

Structure alignment	Root-mean-square deviation (RMSD)
Human Na _v 1.7 × <i>para</i> wild type	4.57
Human Na _v 1.7 × <i>para</i> mutant bss	4.49
<i>para</i> Wild Type × <i>para</i> mutant bss	0.0
Human Na _v 1.7 × <i>para</i> wild type × <i>para</i> mutant bss	3.91

Note: RMSD values were calculated to assess the structural similarity between the human Na_v1.7 channel and *Drosophila para* channels (wild type and mutant *para*^{bss1}). Lower RMSD values indicate higher structural similarity. The *para* wild type and mutant *para*^{bss1} structures showed complete overlap (RMSD=0.0), while both displayed moderate deviations when compared to human Na_v1.7.

In contrast, *para*^{bss1} larvae exhibit a distinct temporal profile. After 1 h of CBZ exposure (Figure 4C) the 3 mg/mL group showed a significant increase in latency compared with untreated controls ($p=0.0021$), whereas 6 mg/mL did not differ from untreated ($p>0.9999$) Kruskal-Wallis $H(2)=11.37$ and Dunn's post hoc test. Mean latencies were 4.42 ± 2.15 s (untreated), 5.58 ± 2.34 s (3 mg/mL) and 4.73 ± 1.92 s (6 mg/mL). However, after 6 h of exposure (Figure 4D), *para*^{bss1} larvae treated with 6 mg/mL CBZ exhibited a significant increase in latency compared with both untreated and 3 mg/mL-treated groups ($p=0.0011$ and $p=0.0024$, respectively), and no difference was detected between untreated and 3 mg/mL groups ($p>0.9999$) according to one-way ANOVA, $F(2,63)=6.92$ and Bonferroni's post hoc test. The mean latencies were 2.81 ± 0.83 s (untreated), 3.10 ± 2.05 s (3 mg/mL) and 5.50 ± 2.13 s (6 mg/mL).

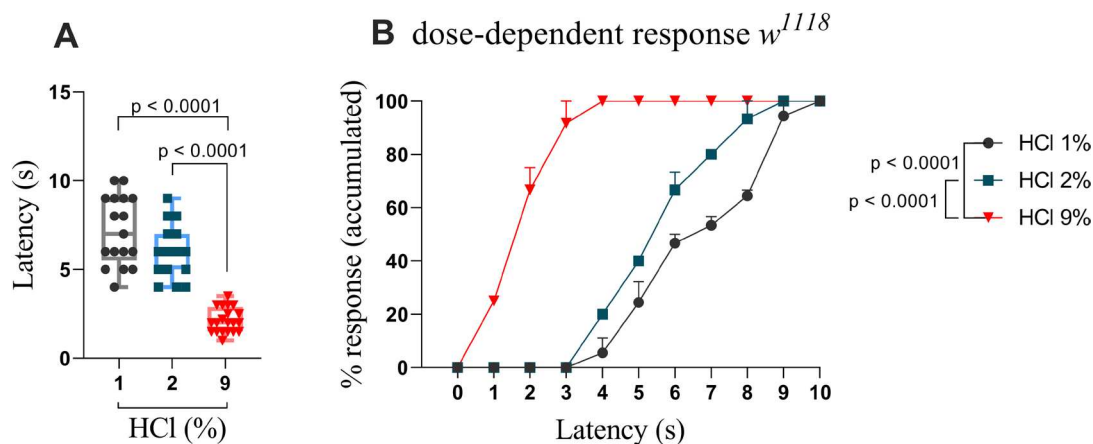


FIGURE 2 | Validation of a chemical nociception assay using different concentrations of hydrochloric acid in *Drosophila melanogaster* larvae. (A) w^{1118} larvae treated with 9% HCl showed significantly increased responsiveness compared to those treated with 2% or 1% HCl ($p < 0.0001$). No significant difference was observed between the 1% and 2% HCl groups ($p = 0.0798$). One-way ANOVA test was performed. (B) Accumulated dose-dependent HCl response. Boxes represent the interquartile range, with the horizontal line indicating the mean. The whiskers represent the minimum and maximum values, respectively. Data are presented as individual data points for each group ($n \geq 15$ larvae per group).

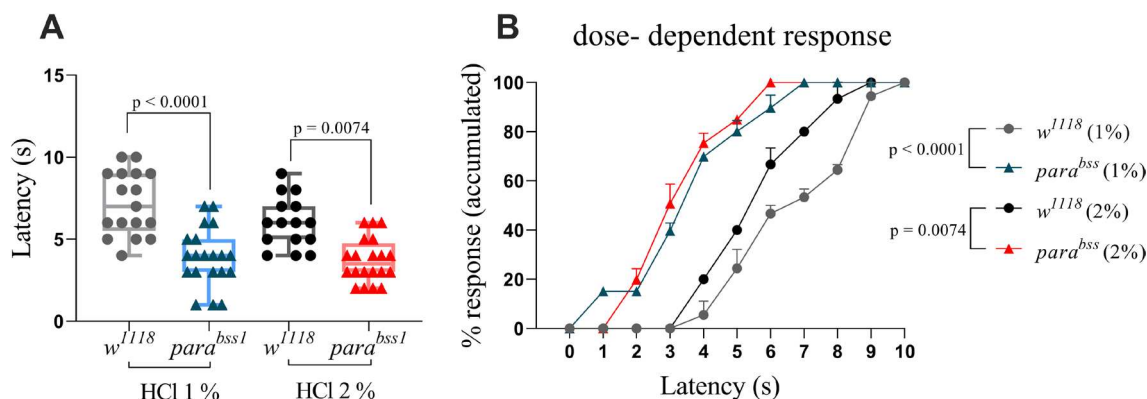


FIGURE 3 | $para^{bss1}$ exhibit increased sensitivity to chemical nociception compared to w^{1118} . (A) Mean response times to 1% and 2% HCl were significantly shorter in third-instar $para^{bss1}$ larvae compared to w^{1118} . Statistical analysis using two-way ANOVA revealed $p < 0.0001$ for 1% HCl and $p = 0.0008$ for 2% HCl. (B) Cumulative percentage of larvae displaying a full 360° nociceptive rolling response over time. When exposed to 1% HCl, 60% of $para^{bss1}$ larvae responded within 3 s, whereas w^{1118} larvae showed no response at this time point ($p < 0.0001$). Under 2% HCl exposure, 60% of the $para^{bss1}$ responded within 4 s, while w^{1118} larvae only reached that threshold by 6.5 s ($p = 0.0008$). Each box represents the interquartile range, with the horizontal line indicating the mean. The whiskers represent the minimum and maximum values, respectively. Data are presented as individual data points ($n \geq 15$ larvae per group).

3.5 | Cannabidiol (CBD) Significantly Increased Chemical Nociception Latency in w^{1118} and $para^{bss1}$ Mutant

Finally, to explore whether cannabidiol (CBD) could attenuate chemical nociception in flies, we tested both genotypes under CBD exposure. After 1 h of treatment, both w^{1118} and $para^{bss1}$ larvae treated with CBD increased the latency time compared to vehicle. In w^{1118} larvae, CBD treatment significantly increased the nociceptive latency compared to the vehicle group ($p = 0.0007$ unpaired t -test), with an average latency of 6.63 ± 3.83 s versus 2.57 ± 1.47 s in the control group. This represents a 2.58-fold increase, or a 158% increase in latency time. Similarly, $para^{bss1}$ larvae response increased in latency ($p < 0.0001$ Mann Whitney test), from 3.46 ± 1.67 s in the vehicle group to 12.26 ± 5.49 s in the CBD group, equivalent to a 3.54-fold increase and a 254% increase (Figure 5A,B).

4 | Discussion

The study of pain in animals raises ethical, philosophical and technical challenges. Ethically because the animal must be tested awake and is subject to discomfort; philosophically, pains as a subjective experience cannot be fully captured in non-human organisms, given that its emotional dimension is uniquely human. In animal models, we can only evaluate the nociceptive response (Le Bars et al. 2001), the neural process that detects and reacts to potentially harmful stimuli. Some reviews have discussed the large number of animals used as models for chronic pain (Coderre and Laferrière 2020; Mogil 2009), mainly focusing on mammalian systems. Few reviews have addressed invertebrate models (Abboud et al. 2021; Burrell 2017).

In this study, we propose the $para^{bss1}$ mutant as a promising genetic model for investigating nociceptive sensitization in

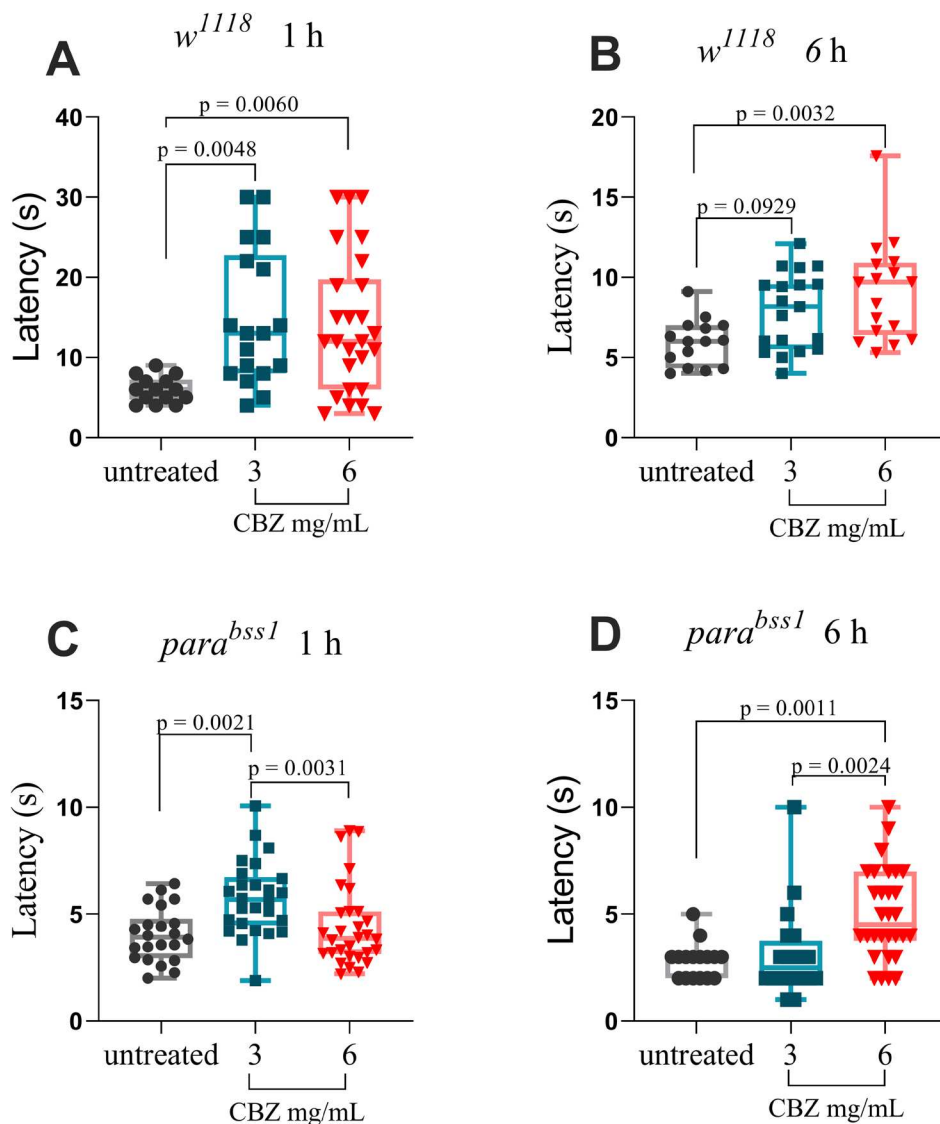


FIGURE 4 | Time- and dose-dependent effects of carbamazepine on chemical nociception in *w¹¹¹⁸* and *para^{bss1}* larvae. (A) In *w¹¹¹⁸* third-instar larvae, exposure to carbamazepine (CBZ) at concentrations of 3 mg/mL and 6 mg/mL for 1 h significantly increased nociceptive response latency compared to untreated controls ($p = 0.0048$ and $p = 0.0060$, respectively; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). No significant difference was observed between concentrations ($p > 0.9999$). (B) After 6 h of exposure, only the 6 mg/mL group remained significantly different from controls ($p = 0.0032$; Kruskal-Wallis test), while the 3 mg/mL group showed no significant change ($p = 0.0929$). (C) In *para^{bss1}* larvae, treatment for 1 h with 3 mg/mL CBZ significantly increased latency compared to untreated controls ($p = 0.0021$), whereas 6 mg/mL had no effect ($p > 0.9999$); latency at 3 mg/mL was higher than at 6 mg/mL ($p = 0.0031$) (Kruskal-Wallis test). (D) After 6 h, the 6 mg/mL treatment significantly increased latency compared to both untreated ($p = 0.0011$) and 3 mg/mL groups ($p = 0.0024$) one-way ANOVA. Each box represents the interquartile range, with the horizontal line indicating the mean; whiskers show the minimum and maximum values. Data are presented as individual data points ($n \geq 10$ larvae per group).

Drosophila melanogaster. A comparative analysis of human sodium channels ($\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ and $\text{Na}_v1.9$) and the *para* gene in flies revealed a high degree of homology with $\text{Na}_v1.7$, which is strongly associated with human pain syndromes (Cox et al. 2006). Three-dimensional structural modelling further demonstrated that the human $\text{Na}_v1.7$ R1150W mutation induces conformational changes, while no such structural alteration was observed in *para^{bss1}*, suggesting that its gain of function mechanism occurs through altered channel dynamics rather than major folding changes. Although our behaviour assays addressed acute responses, the persistent hyperexcitability of *para^{bss1}* closely parallels mechanisms underlying chronic

nociception. Behaviorally, *para^{bss1}* larvae exhibited increased sensitivity to chemical stimuli but not thermal ones, compared to *w¹¹¹⁸*. When treated with CBZ, a sodium-channel blocker, *w¹¹¹⁸* had an increased nociceptive latency after 1 and 6 h of treatment with both tested concentrations, and *para^{bss1}* larvae displayed a biphasic response: a mild increase in latency after 1 h at 3 mg/mL but not at 6 mg/mL, followed by the opposite pattern after 6 h, when only the higher dose produced a significant effect. This temporal inversion likely reflects the altered kinetics of sodium-channel inactivation previously described for *para^{bss1}* (Parker et al. 2011). Similarly, CBD significantly prolonged latency in both strains, supporting its analgesic potential and

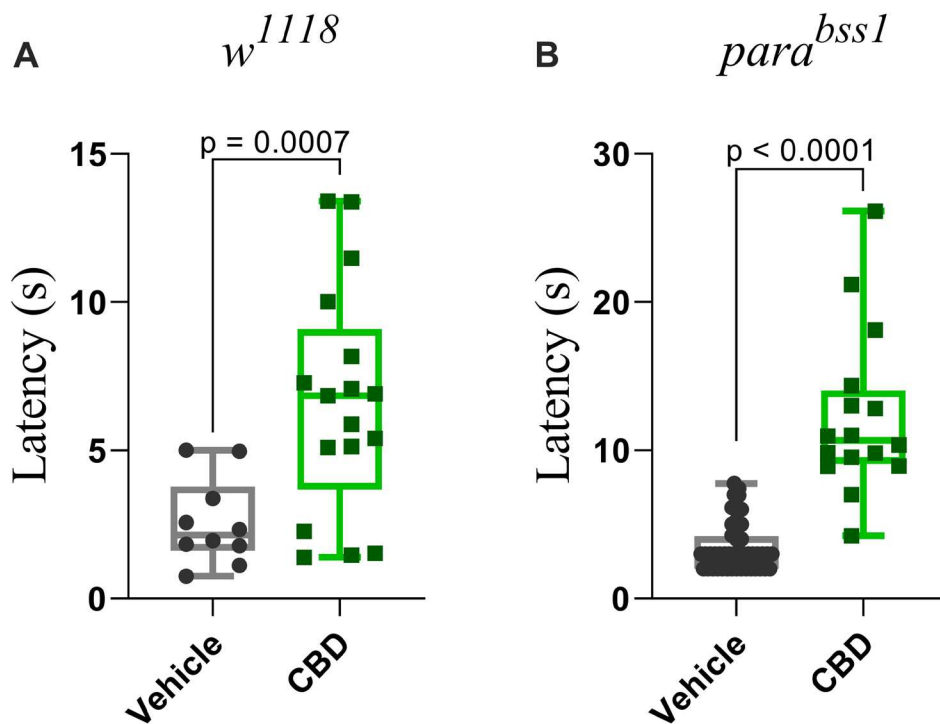


FIGURE 5 | Cannabidiol (CBD) increases chemical nociception latency in both w^{1118} and $para^{bss1}$ larvae. (A) w^{1118} third-instar larvae treated with CBD for 1 h showed a significant increase in latency of nociceptive responses compared to vehicle controls ($p = 0.0007$; unpaired t-test). (B) $para^{bss1}$ larvae treated with CBD showed a robust increase in response latency ($p < 0.0001$; Mann Whitney test). Each box represents the interquartile range, with the horizontal line indicating the mean. The whiskers represent the minimum and maximum values, respectively. Data are presented as individual data points ($n \geq 10$ larvae per group).

further validating the model for the pharmacological screening of candidate analgesics.

Drosophila melanogaster is a well characterised model for nociception studies. The anatomical and physiological aspects of class I-IV neurons are well described (Karim and Moore 2011) and these neurons are responsible for mediating nociception in larvae (Cheng et al. 2010; Xiang et al. 2010; Yan et al. 2013). The first gene related to nociception in *D. melanogaster* was named *painless* and characterised in 2003, which encodes a non-selective cation channel in the TRPA family that is responsible for thermal and mechanical nociception (Tracey et al. 2003). Its human orthologue, TRPA1, is likewise a key pain mediator (Souza Monteiro De Araujo et al. 2020).

Another important class of channels related to pain is the Na^+ channel family, and to our knowledge, there is no previous information about the modulation of nociception by Na^+ channels in *D. melanogaster*, supporting the novelty of our findings.

Drosophila melanogaster has two genes encoding Na^+ channels (Na_v1 and Na_v2) in its genome, each in single copy (Liebeskind et al. 2011). There is little information in the literature about Na_v2 in invertebrates. Thus, Na_v1 is the predominant sodium channel gene in invertebrates (*para* gene in *D. melanogaster*), and the orthologous Na_v channel in vertebrates is Na_v1 (Zakon 2012).

In the human genome, 9 different genes encode Na_v1 channels. The genes SCN1A to SCNA5A encode Na_v1 to $Na_v1.5$,

and the genes SCN8A to SCN11A encode $Na_v1.6$ to $Na_v1.19$, respectively (Catterall 2014). Of particular interest are $Na_v1.7$ (SCN9A), $Na_v1.8$ (SCN10A), and $Na_v1.9$ (SCN11A), which are predominantly expressed in peripheral sensory neurons and are directly associated with inherited human pain syndromes. Gain-of-function mutations in $Na_v1.7$ have been implicated in inherited erythromelalgia, causing severe burning pain in the extremities (Dib-Hajj et al. 2005). Similarly, mutations in $Na_v1.8$ have been identified in patients with painful neuropathy and shown to increase sensory neuron excitability (Faber et al. 2012). $Na_v1.9$ mutations have been linked to familial episodic pain syndromes characterised by recurrent episodes of intense pain (Halbritter et al. 2013). The human $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ and $Na_v1.9$ proteins were analysed in this work for comparison with *para* in *D. melanogaster* because variants in these genes have been associated with human Mendelian pain disease (Bennett et al. 2019).

In our work, we found that the molecular 3D models proposed in this work show no difference between protein from wild type allele (*para*) compared to mutant *para*^{bss1}. We found similar results for human mutant $Na_v1.7$ (L858F) compared to human wild type $Na_v1.7$, though the same mutational change of L to F the position on the protein is different. This human mutation (dbSNP rs80356476) has an autosomal dominant pattern of inheritance which is a gain of function and it promotes a hyperpolarizing shift in channel activation and an increase in the amplitude of the response to slow, small depolarizations (Han et al. 2006) similar to *para*^{bss1} on electrophysiology (Parker et al. 2011) and 3D modelling.

The human mutant Na_v 1.7 (R1150W) is encoded by the *SCN9A* gene with mutation (dbSNP rs6746030) and it has an autosomal dominant pattern of inheritance with gain of function. This analysis was included in the present work due to its high frequency in the population (5.24% to 15.17%) according to PHARMAGKB (<https://www.pharmgkb.org/>, accessed in May 2021). This variation promotes a problem in the inactivation of Na_v 1.7v(R1150W) compared to the wild type and its mutation is related to more pain sensitivity in osteoarthritis, postamputation and sciatica (Reimann et al. 2010). Here, we demonstrate that the mutation R1150W in Na_v1.7 3D provokes a conformational change in the 3D model structure, and it could be related to the increase in pain sensitivity.

After predicting the 3D protein structures, we validate the reproducibility of the chemical nociception assay using *w¹¹¹⁸*, the reference strain most widely used in *D. melanogaster* research (Ferreiro et al. 2018). The responses of third instar larvae exposed to HCl solution were consistent with those previously reported (Lopez-Bellido et al. 2019). However, responses of *para^{bss1}* larvae displayed markedly enhanced sensitivity to the same chemical stimulus compared to *w¹¹¹⁸*, which carries the wild type of *para* allele. This hypersensitive phenotype is consistent with the well-characterised gain of function mutation in the *para* sodium channel (L1699F) (Parker et al. 2011). The *para^{bss1}* mutation (L1699F) was originally characterised as a gain of function variant that enhances neuronal excitability and lowers the seizure threshold (Kroll et al. 2015; Loughney et al. 1989). Parker (Parker et al. 2011) demonstrated that flies carrying the Na_v1-1L1699F transgene exhibited increased recovery time (from 38 to 49s) and reduced seizure threshold (from 19.1 to 12.1 V) compared with controls, confirming that the L1699F substitution drives the hyperexcitable *para^{bss1}* phenotype.

It is important to note that, although the *para^{bss1}* mutation is best known for producing seizure-like activity and bang-sensitive paralysis in adult flies (Parker et al. 2011; Song and Tanouye 2006), such phenotypes have not been observed in larvae under standard laboratory conditions. In our assays, *para^{bss1}* larvae exhibited normal locomotion prior to stimulation and consistently performed the characteristic nocifensive rolling behaviour in response to chemical stimuli, a rapid, coordinated 360° rotation mediated by class IV multidendritic nociceptors (Babcock et al. 2009; Tracey et al. 2003). This rolling response is highly stereotyped (Boivin et al. 2023; Sulkowski et al. 2011) and distinct from the spasmodic convulsions and transient paralysis reported in adult bang-sensitive mutants, indicating that the behavioural responses described here reflect nociceptive activation rather than seizure activity.

The resulting neuronal hyperexcitability likely underlies the increased responsiveness of *para^{bss1}* larvae to noxious chemical stimuli. Although the *para^{bss1}* mutation is located at a different site from human Na_v1.7 variants (Cox et al. 2006; Dib-Hajj et al. 2005; Faber et al. 2012), these mutations share a common outcome: increased sodium channel activity and heightened sensory excitability. The *para* gene, orthologous to mammalian *SCN1A–SCN9A* genes, has been implicated in both seizure and nociceptive pathways, reinforcing its relevance as a model for sodium channel-driven sensory dysfunction. Our approach thus

represents a mutant-based, rather than humanised model, that captures the shared pathophysiological principle of ion-channel hyperexcitability. Future genetic engineering targeting residues homologous to Na_v1.7L858 or R1150 could further refine this system into a more precise model of human pain-related sodium channelopathies.

Carbamazepine (CBZ) is a Na⁺ channel blocker (Kennebäck et al. 1995) widely used in the treatment of epilepsy (Beydoun et al. 2020) and chronic pain (Szok et al. 2019). As expected, CBZ modulated nociception in the *w¹¹¹⁸* strain in 1 h of treatment. However, CBZ was already tested in the *para^{bss1}* strain at the concentrations of 0.002–0.1 mg/mL and showed no results in altering the seizure phenotype (Reynolds et al. 2004), and therefore, *para^{bss1}* was treated as a refractory treatment strain. Because of this, we tested doses higher than those previously reported in a short time (1 and 6 h) to avoid toxicity. The *para^{bss1}* larvae responded to the lower concentration after 1 h of treatment, and after 6 h, only the highest concentration promoted some significant effect in increasing the latency, however, the delayed and dose-dependent response to carbamazepine in *para^{bss1}* does not undermine the model's validity; rather, it mirrors the pharmacoresistance observed in human sodium-channel gain-of-function disorders such as SCN9A-linked erythromelalgia and neuropathic pain (Baker and Nassar 2020; Dib-Hajj et al. 2013; Fischer et al. 2009). We propose the use of this compound as a positive control in experiments with *para^{bss1}* strain as a chronic nociception model for screening of new drugs.

Cannabidiol (CBD) has recently gained significant attention in pain management, leading to a growing body of research focused on cannabis-based medical treatments. It is known that CBD promotes inactivation of the Na_v1.7 channels (human) (Huang et al. 2023). Oral administration of CBD oil significantly increased response latency in both *D. melanogaster* models evaluated, indicating a reduction in nociceptive sensitivity. These findings suggest that CBD may modulate nociceptive pathways involving *para* channels, supporting the suitability and efficacy of the fruit fly models employed in this study for investigating CBD-mediated pain mechanisms.

Although *Drosophila melanogaster* lacks clear orthologs of the canonical cannabinoid receptors CB1 and CB2 found in mammals, several studies suggest that phyto cannabinoids such as cannabidiol (CBD) can modulate neuronal activity through alternative mechanisms (Candib et al. 2024; Clarke et al. 2021). In the absence of classical endocannabinoid signalling, CBD may exert its effects by interacting with other molecular targets, including voltage-gated sodium channels, transient receptor potential (TRP) channels, and regulators of oxidative or inflammatory homeostasis. Notably, *para* encodes the sole voltage-gated sodium channel in *Drosophila*, which shares functional and pharmacological similarities with mammalian Na_v channels (BSC1A family) (Ravenscroft et al. 2023; Tapia et al. 2021). Thus, it is plausible that CBD's antinociceptive effects in *para^{bss1}* mutants arise from its capacity to modulate sodium channel activity, either directly or indirectly, rather than through canonical cannabinoid receptors pathways. Consistent with this view, endocannabinoid-related compounds have been reported to influence sodium channel function and excitability in *Drosophila* and other models (Jacobs and Sehgal 2020), supporting a

noncanonical route through which CBD may regulate nociceptive responses.

In this work, we provide functional and pharmacological evidence supporting the use of the *D. melanogaster para^{bss1}* mutant as a model for chronic nociception. Building on previous electrophysiological characterizations of the para channel (Parker et al. 2011), our results expand its application beyond seizure susceptibility, demonstrating that the same gain of function mutation confers enhanced chemical nociceptive sensitivity. The increased responsiveness to noxious stimuli, combined with the delayed effect of carbamazepine and the modulation by cannabidiol, highlight the translational potential of this model for exploring sodium channel related pain mechanisms.

Despite the relevance of these findings, this study has limitations. Our comparative and structural analyses revealed a strong sequence and domain conservation between para and human Na_v1.7. However, we acknowledge that functional electrophysiological validation was not performed in this study. Demonstrating that human Na_v1.7 can rescue para mutant phenotypes would indeed provide direct evidence of functional equivalence. Future work incorporating electrophysiological and genetic rescue approaches will be critical to further validate para mutants as translational models for human pain-related sodium channelopathies.

Second, the focus on a single nociceptive assay may limit the generalizability of the model to other pain modalities. The effects of CBD are promising; however, the mechanism by which it modulates the para channel in flies requires further investigation. Although our study focused on the behavioural manifestations of para hyperactivity in nociceptive contexts, employing targeted RNAi in pan-neuronal or sensory-neuron drivers (e.g., elav-Gal4, ppk-Gal4) will be instrumental in refining circuit-specific contributions to nociceptive hypersensitivity in *para^{bss1}* larvae. Finally, even though *para^{bss1}* serves as an effective model for gain-of-function channelopathy, future studies employing site-directed mutagenesis (e.g., via CRISPR/Cas9) to create mutations in *Drosophila* that directly correspond to residues associated with human pain, such as L858F and R1150W in Na_v1.7, would represent a powerful next step in creating even more accurate, translatable models of specific human pain syndromes.

In conclusion, our data supports the use of *para^{bss1}* as a genetic model for chronic nociception in *D. melanogaster*. The model is sensitive to chemical stimuli, resistant to conventional sodium channel blockers and responsive to cannabidiol, offering a robust in vivo platform for screening novel analgesics targeting sodium channel dysfunction.

Author Contributions

S.M.M. and L.I.V.C. Conception, design, development of methodology, analysis and interpretation of data, and writing of the manuscript. A.S.M. Experimental execution and data analysis. L.M.M.B. Manuscript writing. A.P.M.-S. and J.G.H. provided support in writing and manuscript revision. F.S.E. Manuscript revision, technical and material support. C.U.-V. Conception and design of the study, supervision, writing and revision of the manuscript, technical and material support.

Acknowledgements

We are thankful to Dr. Mark Tanouye (University of California, Berkeley) for generously providing the *para^{bss1}* *Drosophila melanogaster* strain. We also acknowledge the use of stocks obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537), which supported this study.

Funding

F.S.E. is financially supported by the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG, Grants APQ-02185-24 and APQ-05981-24). A.P.M.-S. is supported by the Department of Psychiatry, College of Medicine, at the University of Saskatchewan. C.U.-V is financially supported by the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG, Grants APQ 04689-22, APQ-02766-17 and APQ-00269-22) and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, grant number: 403193/2022-2), FAPEMIG (grant number: CBB-APQ-03613-17) for INCT-TeraNano.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abboud, C., A. Duveau, R. Bouali-Benazzouz, et al. 2021. "Animal Models of Pain: Diversity and Benefits." *Journal of Neuroscience Methods* 348: 108997. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108997>.
- Ang, S. T., M. Z. Ariffin, and S. Khanna. 2017. "The Forebrain Medial Septal Region and Nociception." *Neurobiology of Learning and Memory* 138: 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.017>.
- Babcock, D. T., C. Landry, and M. J. Galko. 2009. "Cytokine Signaling Mediates UV-Induced Nociceptive Sensitization in *Drosophila* Larvae." *Current Biology* 19, no. 10: 799–806. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.062>.
- Baker, M. D., and M. A. Nassar. 2020. "Painful and Painless Mutations of SCN9A and SCN11A Voltage-Gated Sodium Channels." *Pflügers Archiv / European Journal of Physiology* 472, no. 7: 865–880. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02419-9>.
- Bamps, D., J. Vriens, J. De Hoon, and T. Voets. 2021. "TRP Channel Cooperation for Nociception: Therapeutic Opportunities." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 61, no. 1: 655–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023238>.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius. 2009. "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain." *Cell* 139, no. 2: 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- Bennett, D. L., A. J. Clark, J. Huang, S. G. Waxman, and S. D. Dib-Hajj. 2019. "The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling." *Physiological Reviews* 99, no. 2: 1079–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>.
- Beydoun, A., S. DuPont, D. Zhou, M. Matta, V. Nagire, and L. Lagae. 2020. "Current Role of Carbamazepine and Oxcarbazepine in the Management of Epilepsy." *Seizure* 83: 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.10.018>.
- Boivin, J.-C., J. Zhu, and T. Ohyama. 2023. "Nociception in Fruit Fly Larvae." *Frontiers in Pain Research* 4: 1076017. <https://doi.org/10.3389/fpain.2023.1076017>.
- Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen, and D. Gallacher. 2006. "Survey of Chronic Pain in Europe: Prevalence, Impact on Daily Life, and Treatment." *European Journal of Pain* 10, no. 4: 287. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009>.
- Burrell, B. D. 2017. "Comparative Biology of Pain: What Invertebrates Can Tell us About How Nociception Works." *Journal of Neurophysiology* 117, no. 4: 1461–1473. <https://doi.org/10.1152/jn.00600.2016>.

- Campbell, J. N., and R. A. Meyer. 2006. "Mechanisms of Neuropathic Pain." *Neuron* 52, no. 1: 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.021>.
- Candib, A., N. Lee, N. Sam, et al. 2024. "The Influence of Cannabinoids on *Drosophila* Behaviors, Longevity, and Traumatic Injury Responses of the Adult Nervous System." *Cannabis and Cannabinoid Research* 9, no. 3: e886–e896. <https://doi.org/10.1089/can.2022.0285>.
- Catterall, W. A. 2014. "Sodium Channels, Inherited Epilepsy, and Antiepileptic Drugs." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54, no. 1: 317–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232>.
- Cheng, L. E., W. Song, L. L. Looger, L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 2010. "The Role of the TRP Channel NompC in *Drosophila* Larval and Adult Locomotion." *Neuron* 67, no. 3: 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.004>.
- Clarke, T. L., R. L. Johnson, J. J. Simone, and R. L. Carlone. 2021. "The Endocannabinoid System and Invertebrate Neurodevelopment and Regeneration." *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 4: 2103. <https://doi.org/10.3390/ijms22042103>.
- Coderre, T. J., and A. Laferrière. 2020. "The Emergence of Animal Models of Chronic Pain and Logistical and Methodological Issues Concerning Their Use." *Journal of Neural Transmission* 127, no. 4: 393–406. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02103-y>.
- Cohen, S. P., L. Vase, and W. M. Hooten. 2021. "Chronic Pain: An Update on Burden, Best Practices, and New Advances." *Lancet* 397, no. 10289: 2082–2097. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00393-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00393-7).
- Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, et al. 2006. "An SCN9A Channelopathy Causes Congenital Inability to Experience Pain." *Nature* 444, no. 7121: 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>.
- Dib-Hajj, S. D., A. M. Rush, T. R. Cummins, et al. 2005. "Gain-of-Function Mutation in Nav1.7 in Familial Erythromelalgia Induces Bursting of Sensory Neurons." *Brain* 128, no. 8: 1847–1854. <https://doi.org/10.1093/brain/awh514>.
- Dib-Hajj, S. D., Y. Yang, J. A. Black, and S. G. Waxman. 2013. "The Nav1.7 Sodium Channel: From Molecule to Man." *Nature Reviews Neuroscience* 14, no. 1: 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrn3404>.
- Dohrn, M. F., A. Lampert, N. Üçeyler, and I. Kurth. 2019. "Neuropathic Pain Syndromes and Channelopathies." *Der Internist* 60, no. 1: 90–97. <https://doi.org/10.1007/s00108-018-0535-x>.
- Faber, C. G., G. Lauria, I. S. J. Merkies, et al. 2012. "Gain-of-Function Na_v 1.8 Mutations in Painful Neuropathy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 47: 19444–19449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216080109>.
- Ferreiro, M. J., C. Pérez, M. Marchesano, et al. 2018. "*Drosophila melanogaster* White Mutant w1118 Undergo Retinal Degeneration." *Frontiers in Neuroscience* 11: 732. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732>.
- Fischer, T. Z., E. S. Gilmore, M. Estacion, et al. 2009. "A Novel Nav1.7 Mutation Producing Carbamazepine-Responsive Erythromelalgia." *Annals of Neurology* 65, no. 6: 733–741. <https://doi.org/10.1002/ana.21678>.
- Ganetzky, B. 2000. "Genetic Analysis of Ion Channel Dysfunction in *Drosophila*." *Kidney International* 57, no. 3: 766–771. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00913.x>.
- Guo, M., W. Shen, M. Zhou, et al. 2024. "Safety and Efficacy of Carbamazepine in the Treatment of Trigeminal Neuralgia: A Metanalysis in Biomedicine." *Mathematical Biosciences and Engineering* 21, no. 4: 5335–5359. <https://doi.org/10.3934/mbe.2024235>.
- Halbritter, J., A. A. Bizet, M. Schmidts, et al. 2013. "Defects in the IFT-B Component IFT172 Cause Jeune and Mainzer-Saldino Syndromes in Humans." *American Journal of Human Genetics* 93, no. 5: 915–925. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.012>.
- Han, C., A. M. Rush, S. D. Dib-Hajj, et al. 2006. "Sporadic Onset of Erythromelalgia: A Gain-of-Function Mutation in Na_v 1.7." *Annals of Neurology* 59, no. 3: 553–558. <https://doi.org/10.1002/ana.20776>.
- Huang, J., X. Fan, X. Jin, et al. 2023. "Cannabinoid Inhibits Nav Channels Through Two Distinct Binding Sites." *Nature Communications* 14, no. 1: 3613. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39307-6>.
- Jacobs, J. A., and A. Sehgal. 2020. "Anandamide Metabolites Protect Against Seizures Through the TRP Channel Water Witch in *Drosophila melanogaster*." *Cell Reports* 31, no. 9: 107710. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107710>.
- Karim, M. R., and A. W. Moore. 2011. "Morphological Analysis of *Drosophila* Larval Peripheral Sensory Neuron Dendrites and Axons Using Genetic Mosaics." *Journal of Visualized Experiments* 57: 3111. <https://doi.org/10.3791/3111>.
- Kenneback, G., L. Bergfeldt, and T. Tomson. 1995. "Electrophysiological Evaluation of the Sodium-Channel Blocker Carbamazepine in Healthy Human Subjects." *Cardiovascular Drugs and Therapy* 9, no. 5: 709–714. <https://doi.org/10.1007/BF00878554>.
- Kroll, J. R., A. Saras, and M. A. Tanouye. 2015. "*Drosophila* Sodium Channel Mutations: Contributions to Seizure-Susceptibility." *Experimental Neurology* 274: 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.018>.
- Le Bars, D., M. Gozariu, and S. W. Cadden. 2001. "Animal Models of Nociception." *Pharmacological Reviews* 53, no. 4: 597–652.
- Liebeskind, B. J., D. M. Hillis, and H. H. Zakon. 2011. "Evolution of Sodium Channels Predates the Origin of Nervous Systems in Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 22: 9154–9159. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106363108>.
- Lopez-Bellido, R., N. J. Himmel, H. B. Gutstein, D. N. Cox, and M. J. Galko. 2019. "An Assay for Chemical Nociception in *Drosophila* Larvae." *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences* 374, no. 1785: 20190282. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0282>.
- Loughney, K., R. Kreber, and B. Ganetzky. 1989. "Molecular Analysis of the Para Locus, a Sodium Channel Gene in *Drosophila*." *Cell* 58, no. 6: 1143–1154. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90512-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90512-6).
- Mitsi, V., and V. Zachariou. 2016. "Modulation of Pain, Nociception, and Analgesia by the Brain Reward Center." *Neuroscience* 338: 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.017>.
- Mogil, J. S. 2009. "Animal Models of Pain: Progress and Challenges." *Nature Reviews Neuroscience* 10, no. 4: 283–294. <https://doi.org/10.1038/nrn2606>.
- Mohammed, S. Y. M., K. Leis, R. E. Mercado, M. M. S. Castillo, K. J. Miranda, and R. R. Carandang. 2024. "Effectiveness of Cannabidiol to Manage Chronic Pain: A Systematic Review." *Pain Management Nursing* 25, no. 2: e76–e86. <https://doi.org/10.1016/j.pmn.2023.10.002>.
- Park, H. J., and D. E. Moon. 2010. "Pharmacologic Management of Chronic Pain." *Korean Journal of Pain* 23, no. 2: 99–108. <https://doi.org/10.3344/kjp.2010.23.2.99>.
- Parker, L., M. Padilla, Y. Du, K. Dong, and M. A. Tanouye. 2011. "*Drosophila* as a Model for Epilepsy: *Bss* Is a Gain-of-Function Mutation in the Para Sodium Channel Gene That Leads to Seizures." *Genetics* 187, no. 2: 523–534. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.123299>.
- Patel, K. V., J. M. Guralnik, E. J. Dansie, and D. C. Turk. 2013. "Prevalence and Impact of Pain Among Older Adults in the United States: Findings From the 2011 National Health and Aging Trends Study." *Pain* 154, no. 12: 2649–2657. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.029>.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, et al. 2004. "UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry* 25, no. 13: 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

- Ravenscroft, T. A., A. Jacobs, M. Gu, D. F. Eberl, and H. J. Bellen. 2023. "The Voltage-Gated Sodium Channel in *Drosophila*, Para, Localizes to Dendrites as Well As Axons in Mechanosensitive Chordotonal Neurons." *eNeuro* 10, no. 6: ENEURO.0105-23. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0105-23.2023>.
- Reimann, F., J. J. Cox, I. Belfer, et al. 2010. "Pain Perception is Altered by a Nucleotide Polymorphism in *SCN9A*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 11: 5148–5153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913181107>.
- Reynolds, E. R., E. A. Stauffer, L. Feeney, E. Rojahn, B. Jacobs, and C. McKeever. 2004. "Treatment With the Antiepileptic Drugs Phenytoin and Gabapentin Ameliorates Seizure and Paralysis of *Drosophila* Bang-Sensitive Mutants." *Journal of Neurobiology* 58, no. 4: 503–513. <https://doi.org/10.1002/neu.10297>.
- Schwan, J., J. Sclafani, and V. L. Tawfik. 2019. "Chronic Pain Management in the Elderly." *Anesthesiology Clinics* 37, no. 3: 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2019.04.012>.
- Song, J., and M. A. Tanouye. 2006. "Seizure Suppression by *shakB*², a Gap Junction Mutation in *Drosophila*." *Journal of Neurophysiology* 95, no. 2: 627–635. <https://doi.org/10.1152/jn.01059.2004>.
- Souza Monteiro De Araujo, D., R. Nassini, P. Geppetti, and F. De Logu. 2020. "TRPA1 as a Therapeutic Target for Nociceptive Pain." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 24, no. 10: 997–1008. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1815191>.
- Stenz, L., J. L. Carré, F. Luthi, et al. 2022. "Genome-Wide Epigenomic Analyses in Patients With Nociceptive and Neuropathic Chronic Pain Subtypes Reveals Alterations in Methylation of Genes Involved in the Neuro-Musculoskeletal System." *Journal of Pain* 23, no. 2: 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.09.001>.
- Sulkowski, M. J., M. S. Kurosawa, and D. N. Cox. 2011. "Growing Pains: Development of the Larval Nocifensive Response in *Drosophila*." *Biological Bulletin* 221, no. 3: 300–306. <https://doi.org/10.1086/BBLv221n3p300>.
- Szok, D., J. Tajti, A. Nyári, L. Vécsei, and L. Trojano. 2019. "Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain." *Behavioural Neurology* 2019: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/8685954>.
- Tapia, A., C. N. Giachello, M. Palomino-Schätzlein, R. A. Baines, and M. I. Galindo. 2021. "Generation and Characterization of the *Drosophila melanogaster* paralytic Gene Knock-Out as a Model for Dravet Syndrome." *Life* 11, no. 11: 1261. <https://doi.org/10.3390/life11111261>.
- Tracey, W. D. 2017. "Nociception." *Current Biology* 27, no. 4: R129–R133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037>.
- Tracey, W. D., R. I. Wilson, G. Laurent, and S. Benzer. 2003. "Painless, a *Drosophila* Gene Essential for Nociception." *Cell* 113, no. 2: 261–273. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00272-1).
- Treede, R.-D. 2018. "The International Association for the Study of Pain Definition of Pain: As Valid in 2018 as in 1979, but in Need of Regularly Updated Footnotes." *PAIN Reports* 3, no. 2: e643. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000643>.
- Wang, S., J. Ma, J. Peng, and J. Xu. 2013. "Protein Structure Alignment Beyond Spatial Proximity." *Scientific Reports* 3, no. 1: 1448. <https://doi.org/10.1038/srep01448>.
- Wang, S., J. Peng, and J. Xu. 2011. "Alignment of Distantly Related Protein Structures: Algorithm, Bound and Implications to Homology Modeling." *Bioinformatics* 27, no. 18: 2537–2545. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr432>.
- Wiffen, P. J., S. Derry, R. A. Moore, and E. A. Kalso. 2014. "Carbamazepine for Chronic Neuropathic Pain and Fibromyalgia in Adults." *Cochrane Database of Systematic Reviews* no. 4: CD005451. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005451.pub3>.
- Xiang, Y., Q. Yuan, N. Vogt, L. L. Looger, L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 2010. "Light-Avoidance-Mediating Photoreceptors Tile the *Drosophila* Larval Body Wall." *Nature* 468, no. 7326: 921–926. <https://doi.org/10.1038/nature09576>.
- Yan, Z., W. Zhang, Y. He, et al. 2013. "*Drosophila* NOMPC is a Mechanotransduction Channel Subunit for Gentle-Touch Sensation." *Nature* 493, no. 7431: 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature11685>.
- Zakon, H. H. 2012. "Adaptive Evolution of Voltage-Gated Sodium Channels: The First 800 Million Years." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. supplement_1: 10619–10625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201884109>.