

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ALINE DA SILVA GOULART**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE OS  
COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS A NEURODEGENERAÇÃO EM *Drosophila  
melanogaster***

**URUGUAIANA  
2020**

**ALINE DA SILVA GOULART**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE OS  
COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS A NEURODEGENERAÇÃO EM *Drosophila  
melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Zilda  
Ceolin Colpo

**URUGUAIANA  
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

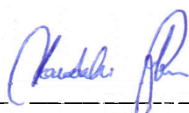
G694 Goulart, Aline da Silva  
Avaliação dos efeitos de uma dieta rica em sacarose sobre  
os comportamentos associados a neurodegeneração em *Drosophila  
melanogaster* / Aline da Silva Goulart.  
70 p.  
  
Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2020.  
"Orientação: Vanderlei Folmer".  
  
1. Dieta hiperglicídica. 2. Dieta líquida. 3. Doenças  
neurodegenerativas. 4. Mosca da fruta. 5. Síndrome metabólica.  
I. Título.

**ALINE DA SILVA GOULART**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE OS  
COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS A NEURODEGENERAÇÃO EM *Drosophila  
melanogaster***

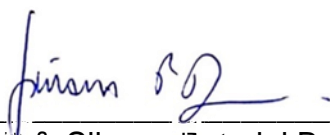
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra.

Dissertação de Mestrado defendido e aprovado em: 21, dezembro de 2020.  
Banca examinadora:



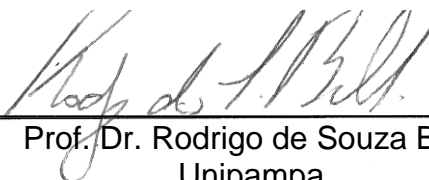
---

Prof. Dr. Vanderlei Folmer  
Orientador, PPG Bioquímica – Unipampa



---

Prof.ª Dr.ª Silvana Peterini Boeira  
PPG Bioquímica, Unipampa



---

Prof. Dr. Rodrigo de Souza Balk  
Unipampa

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*Marthin Luther King*

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

*George Bernard Shaw*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa

### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM SACAROSE SOBRE OS COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS A NEURODEGENERAÇÃO EM *Drosophila melanogaster***

AUTORA: Aline da Silva Goulart

ORIENTADOR: prof. Dr. Vanderlei Folmer

COORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Zilda Ceolin Colpo

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 21 de dezembro de 2020.

Disfunções associadas a dietas com alimentos ultra processados, ricas em carboidratos e biologicamente inadequadas são cada vez mais evidenciadas na literatura. Obesidade, síndrome metabólica e Diabetes mellitus tipo II estão entre as alterações metabólicas mais recorrentes e comprometedoras. O DM é um fator de risco para o desenvolvimento de alterações neurológicas, como o mal de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Diversos modelos animais têm sido utilizados para se estudar os mecanismos envolvidos em síndromes metabólicas e comprometimentos neurodegenerativos. Dentre esses modelos citamos a *Drosophila melanogaster*, conhecida como a mosca da fruta. Esse animal tem se destacado pela semelhança existente entre o seu sistema endócrino com o dos mamíferos. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de uma dieta rica em sacarose sobre o comportamento associado a neurodegeneração em moscas. Para isso, as moscas foram alimentadas com uma dieta padronizada, em diferentes concentrações de sacarose, sendo: 5% sacarose (controle), 10%, 20% e 40% sacarose. Foi ofertada 300µl diariamente da dieta durante cinco dias, usando o método de alimentação *Continuous Liquid Feeding* (CLF). Os dados demonstraram que as moscas expostas a dieta hiperglicídica tiveram redução no tempo de vida. Em relação ao parâmetro de peso as moscas não tiveram nenhuma alteração. A dieta causou o aumento dos níveis de glicose e triglicerídeos, no corpo

inteiro das moscas e também na hemolinfa e carcaça dos animais. Ainda, as moscas que foram alimentadas com as concentrações de 40% sacarose apresentaram os níveis de estresse oxidativo elevado. Essa alteração também foi acompanhada pela a depleção significativa dos níveis de dopamina da cabeças desses animais. Nosso estudo também demonstrou que as moscas expostas a dieta nas concentrações mais altas se sacarose apresentavam déficits de comportamento locomotor e exploratório. Assim, consideramos que, as alterações metabólicas, como aumento dos níveis de glicose e triglicerídeos, ocasionam o acréscimo dos níveis de estresse oxidativo, que por sua vez levam a depleção dos níveis de dopamina, também acreditamos que a redução dos níveis de dopamina possivelmente precede os danos locomotores observados. A partir do exposto, nossa pesquisa contribui com outros estudos no intuito de compreender o envolvimento da síndrome metabólica e o surgimento das doenças neurológicas. Afim de elucidar essa questão, temos como perspectiva futuras, 1: avaliar alguns genes que estejam envolvidos na sinalização da insulina como os *dilps* (2, 3 e 5), *CHICO*, *Inr*; 2: avaliar a toxicidade da dieta hiperglicídica sobre marcadores inflamatórios em *Drosophila melanogaster* e 3: avaliar o reposicionamento de fármacos no tratamento do DM tipo II.

Palavras-Chave: Dieta hiperglicídica; Dieta líquida, Doenças neurodegenerativas; Mosca da fruta; Síndrome metabólica.

**ABSTRACT**

Masters dissertation

Post-Graduate Course in Biochemistry

Federal University of Pampa

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF A SUCROSE-RICH DIET ON BEHAVIOR ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATION IN *Drosophila melanogaster***

AUTHOR: Aline da Silva Goulart

ADVISOR: Vanderlei Folmer

CO-SUPERVISOR: Ana Zilda Ceolin Colpo

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, December 21, 2020.

The dysfunctions caused by the excessive consumption of hyperglycemic and / or biologically distorted diets in the long term promote the development of obesity, characterized as excessive accumulation of fat in the body and is related to the appearance of the metabolic syndrome and type II Diabetes mellitus (DM). DM is a risk factor for the development of other pathologies, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Several animal models have been used to study the mechanisms involved in metabolic syndromes and neurodegenerative diseases. Among these models we mention *Drosophila melanogaster*, known as the fruit fly. This animal has stood out due to the similarity between its endocrine system and that of mammals. Thus, this study aimed to evaluate the effects of a diet rich in sucrose on the behavior associated with neurodegeneration in flies. For this, the flies were fed a standardized diet, in different concentrations of sucrose, being: 5% sucrose (control), 10%, 20% and 40% sucrose. 300µl of the diet was offered daily for five days, using the Continuous Liquid Feeding (CLF) method. The data demonstrated that flies exposed to a high-glycemic diet had a reduced life span. Regarding the weight parameter, the flies had no changes. The diet caused an increase in the levels of glucose and triglycerides, in the whole body of the flies and also in the hemolymph and carcass of the animals. Also, the flies that were fed with concentrations of 40% sucrose showed high levels of oxidative stress. This change was also accompanied by significant depletion of dopamine levels in the heads of these animals. Our study also showed that flies exposed to the diet in the highest

concentrations had sucrose deficits in locomotor and exploratory behavior. Thus, we consider that metabolic changes, such as increased levels of glucose and triglycerides, cause an increase in oxidative stress levels, which in turn lead to depletion of dopamine levels in the head of flies. We also believe that the reduction in dopamine levels possibly precedes the observed locomotor damage. Based on the above, our research contributes to other studies in order to understand the involvement of the metabolic syndrome and the emergence of neurological diseases. In order to elucidate this issue, we have the future perspective, 1: to evaluate some genes that are involved in insulin signaling, such as dilps (2, 3 and 5), CHICO, Inr; 2: to evaluate the toxicity of the hyperglycemic diet on inflammatory markers in *Drosophila melanogaster* and 3: to evaluate the repositioning of drugs in the treatment of type II DM.

Keywords: Hyperglycemic diet; Liquid diet, Neurodegenerative diseases; Fruit fly; Metabolic syndrome.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida <i>Drosophila melanogaster</i> .....	25
Figura 2 – Aparato do método CLF .....	28

## MANUSCRITO

Figure – Graphic summary .....	36
Figure 1 – Evaluation of the survival parameters of <i>D. melanogaster</i> .....	42
Figure 2 – Evaluation of body weight parameters in <i>D. melanogaster</i> .....	43
Figure 3 – Analysis of glucose levels in the body of <i>D. melanogaster</i> .....	44
Figure 4 – Analysis of glucose levels in hemolymph the of <i>D. melanogaster</i> .....	44
Figure 5 – Analysis of glucose levels in the carcass of <i>D. melanogaster</i> .....	45
Figure 6 – Analysis of triglyceride levels in the body of <i>D. melanogaster</i> .....	46
Figure 7 – Analysis of triglyceride levels in the hemolymph of <i>D. melanogaster</i> .....	46
Figure 8 – Analysis of triglyceride levels in the carcass of <i>D. melanogaster</i> .....	47
Figure 9 – Evaluation of dopamine levels in <i>D. melanogaster</i> .....	48
Figure 10 – Evaluation of levels TBARS in <i>D. melanogaster</i> .....	48
Figure 11 – Evaluation of Open Field in <i>D. melanogaster</i> .....	49
Figure 12 – Negative geotaxis rating in <i>D. melanogaster</i> .....	50
Figure 13 – Analyze thermal tolerance in <i>D. melanogaster</i> .....	51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Riscos de fatores acerca da Síndrome metabólica .....	18
Tabela 2 – Características da DA e DP sob aspectos humano e animal .....	29
Tabela 3 – Principais radicais livres e radicalares .....	31

**MANUSCRITO**

Tabela 1 – Tabela Nutricional.....	38
------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CLF – Continuous Liquid Feeding
- DA – Dopamina
- DM – Diabetes mellitus
- DNs – Doenças neurodegenerativas
- DP – Doença de Parkinson
- EO – Estresse oxidativo
- EROs – Espécies reativas do oxigênio
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- HO<sub>2</sub>• – Radical hidroperóxil
- HOCl – Ácido Hipocloroso
- MDA – malondialdeído
- NTF – Neurofibrilares
- O<sub>2</sub>•- – Ânion superóxido
- OH• – Radical hidroxil
- RI – Resistência à insulina
- RL – Radicais livres
- RO<sub>2</sub>• – Radical peróxil
- SM – Síndrome metabólica
- SNC – Sistema nervoso central
- TBA – Teste do ácido tiobarbitúrico
- TBARS– Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	12
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 JUSTIFICATIVA .....	14
3 OBJETIVOS .....	15
3.1 GERAL .....	15
3.2 ESPECÍFICOS .....	15
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
4.1 DIETAS E DESORDENS METABÓLICAS .....	15
4.1.1 DIETA HIPERGLICÍDICA .....	16
4.1.2 SÍNDROME METABÓLICA.....	17
4.1.3 <i>DIABETES MELLITUS</i> .....	19
4.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS .....	20
4.2.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	21
4.2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	22
4.3 MODELO EXPERIMENTAL <i>Drosophila melanogaster</i> .....	24
4.3.1 DIETA LÍQUIDA OFERTADA PARA <i>Drosophila melanogaster</i> .....	26
4.3.2 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO EM <i>Drosophila melanogaster</i> .....	27
4.4 AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS .....	29
4.4.1 MARCADORES DE METABOLISMO.....	29
4.5 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	30
4.5.1 DOPAMINA .....	31
5 RESULTADOS .....	33
5.1 MANUSCRITO .....	33
6 CONCLUSÕES .....	59
7 PERSPECTIVAS .....	60
8 REFERÊNCIAS.....	61

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem essa dissertação apresentam-se divididos em três partes. A parte I, item **introdução** está descrita uma revisão sucinta acerca dos temas trabalhados nesta dissertação, assim como a justificativa e objetivos.

Na parte II encontram-se os resultados que fazem parte desta dissertação sob a forma de **Manuscrito** que abrangem as seguintes seções: introdução, métodos, resultados, discussão, considerações finais e bibliografia. A seção considerações finais e bibliografia referem-se apenas ao manuscrito.

Na parte III, está contida as seções: **conclusões** e **referências**. Esses dois itens referem-se as conclusões gerais da dissertação bem como, as citações utilizadas no referencial teórico que compõe o item introdução dessa dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos nocivos de dietas hiperglicídicas tem sido um fator preocupante para a qualidade de vida, uma vez que estimula o desenvolvimento de síndromes metabólicas. A exemplo disso, o sobrepeso e a obesidade, ainda, o consumo de dietas hiperglicídicas estão associadas a outras disfunções, dentre elas destaca-se o *Diabetes mellitus* (DM).

Dos tipos de diabetes existente o mais comum é o DM tipo II, uma síndrome metabólica multifatorial caracterizada por um quadro de hiperglicemia, no qual a insulina não é capaz de conter o aumento dos níveis de glicose e está associada ao “desenvolvimento de várias complicações a curto e longo prazo (SALGUEIRO et al., 2016).

A insulina desempenha inúmeras funções fisiológicas e patofisiológicas no sistema nervoso central (SNC) e sua insuficiência compromete o funcionamento adequado desse sistema. O dano cerebral pode resultar em falhas cognitivas, como a concentração, autocontrole e seletividade de estímulos (LOPES et al., 2011), sendo estas características de doenças neurodegenerativas.

Similar ao que acontece em humanos, animais utilizados como modelos experimentais, quando alimentados com dietas hiperglicídicas, apresentam quadros parecidos com DM, como a resistência à insulina (FOLMER et al., 2002). No entanto, ensaios com modelos animais vertebrados têm um elevado custo além de restrições relacionadas aos comitês de ética animal. Sendo assim, existe uma necessidade de modelos experimentais complementares.

Nesta vertente, surge como modelo alternativo a *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca da fruta. Esse modelo experimental tem baixo custo econômico, alta taxa de reprodução e fácil manuseio (DOKE e DHAWAL, 2015). A *D. melanogaster* foi utilizada pela primeira vez em 1900 por Charles W. Woodworth para estudos genéticos. Ainda, é considerada um modelo prático para avaliar os distúrbios do metabolismo, pois apresenta funções metabólicas semelhantes à dos mamíferos, incluindo a capacidade de manter a homeostase da glicose (COLPO et al., 2018).

Além disso, mosca da fruta tem sido utilizada com sucesso em pesquisas que envolvem alterações metabólicas desencadeadas por dietas, com elevadas

concentrações de frutose (LUSHCHAK et al., 2011) e sacarose (MORRIS et al., 2012; ROVENKO et al., 2015). Também é um modelo utilizado em estudo entre a área da nutrição e os mecanismos envolvendo doenças em humanos (ECKER, 2014). Ao considerarmos as doenças neurológicas humanas, as moscas compartilham inúmeros genes responsáveis pela evolução destas desordens, apresentando neurônios dopaminérgicos que, quando lesados, ocasionam o desenvolvimento de características observadas em doenças neurodegenerativas (SOARES et al., 2017). Com base no exposto, o objetivo desse projeto é investigar os efeitos de uma dieta rica em sacarose sobre o comportamento da *Drosophila melanogaster* associados a Doenças neurodegenerativas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o DM tipo II é um distúrbio metabólico crônico, cada vez mais prevalente na sociedade moderna, o que pode levar a altos custos econômicos para seu tratamento e controle. Ainda, esse distúrbio pode ocasionar o desenvolvimento de outras enfermidades, devido as suas complicações de curto a longo prazo, como exemplo, o surgimento de doenças neurodegenerativas, dentre essas o mal de Alzheimer e a doença de Parkinson.

Da mesma forma, sabe-se da ampla utilização da *Drosophila melanogaster* como modelo experimental para os estudos da compreensão envolvendo as alterações da síndrome metabólica desencadeada por dietas com alto teor de sacarose. Esse modelo também tem sido bastante utilizado para estudar os mecanismos envolvendo as doenças neurodegenerativas. Esse uso decorre, por se tratar de um modelo que compartilha de inúmeros genes análogos aos dos mamíferos e apresentar as mesmas características observadas em doenças neurodegenerativas.

Sendo assim, o desenvolvimento desse estudo se justifica pelo fato da *D. melanogaster* ser uma ótima ferramenta para auxiliar a compreensão de mecanismos envolvidos na gênese de doenças relacionadas ao metabolismo, favorecendo o desenvolvimento de estratégias que contrariem os efeitos danosos do alto consumo de carboidratos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 - GERAL

➤ Analisar os efeitos de uma dieta rica em sacarose sobre o comportamento da *D. melanogaster*.

#### 3.2 - ESPECÍFICOS

➤ Verificar os efeitos da dieta sobre os parâmetros de sobrevivência das *D. melanogaster*;

➤ Analisar os efeitos bioquímicos (glicose e triglicerídeos) das dietas nas *D. melanogaster*;

➤ Avaliar os níveis de marcadores oxidativos de uma dieta hiperglicídica em *D. melanogaster*;

➤ Mensurar os danos causados pela dieta hiperglicídica sobre a rota dopaminérgica em *D. melanogaster*;

➤ Determinar as implicações da dieta hiperglicídica sobre o comportamento locomotor, em *D. melanogaster*.

### 4 REVISÃO DE LITERATURA

#### 4.1 DIETAS E DESORDENS METABÓLICAS

A população em geral do Brasil tem consumido 50% a mais de açúcar do que o recomendado. Ainda, o Brasil está em 4º lugar em consumo de alimentos com alto teor de açúcar. Dos 10% de consumo recomendado de açúcar, o brasileiro tem consumido 16,3% (OMS, 2019). E o consumo exacerbado de dietas com alto teor de sacarose tem ocasionado no processo de desequilíbrio nutricional, como a alterações metabólicas devido ao aumento dos índices glicêmicos (SARTORELLI e CARDOSO, 2006).

Nos últimos anos, estudos tem demonstrado que muitas doenças crônicas podem ser evitadas se tivermos uma alimentação equilibrada. A alimentação adequada é caracterizada por conter concentração balanceada de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros componentes essenciais. Em contrapartida, o consumo de alimentos com alto teor calórico e glicídico está relacionado diretamente no desenvolvimento de doenças crônicas, como obesidade, doenças

cardiovasculares, intolerância à glicose e diabetes (SCHUSTER, OLIVEIRA e BOSCO, 2015).

O alto consumo de uma dieta hiperlipídica gera o acúmulo de ácidos graxos, em decorrência a esse excesso pode promover o aumento do peso corporal (LACERDA, BOCK e FUCHAL, 2015). Assim como, as exacerbadas ingestas de alimentos hiperglicêmicos ocasionam a resistência à insulina (SANTOS et al., 2006). Ligados a esses fatores, evidências apontam que perfil nutricional pode ocasionar mudanças no metabolismo celular, incluindo a modulação dos genes que equilibram a estrutura, função e sobrevivência (SCHWENK et al., 2013).

#### **4.1.1 DIETA HIPERGLICÍDICA**

Dieta hiperglicídica é caracterizada pelo aumento excessivo de carboidratos. Como descrito na literatura, os carboidratos são essenciais para a produção de energia para o organismo e quantidade adequada de glicose no sangue. No entanto, o consumo exagerado leva o alto índice glicêmico, sendo prejudicial à saúde (LEMAN, 2006).

Vários estudos mostraram os efeitos negativos de uma dieta com alto teor calórico, especialmente ao consumo de alimento com elevados índices glicêmicos (FOLMER et al., 2002; MORRIS et al., 2012). O consumo excessivo de açúcar pode levar ao desenvolvimento do desequilíbrio nutricional e ainda, contribui para o desenvolvimento acentuado de alterações metabólicas, entre estas o sobrepeso, obesidade, dislipidemia e DM (ROSINI et al., 2012).

Já se sabe que o sobrepeso e a obesidade são em grandes proporções ocasionados pela alta ingestão de dietas hipercalóricas e hiperglicídicas. O acúmulo de tecido adiposo ocorre através da lipogênese. Quando há uma quantidade alta de glicose no sangue o fígado exerce a função de captar esse excesso e estocar em forma de glicogênio. Quanto maior for o acúmulo de glicogênio no fígado maior será a transformação em ácidos graxos e assim o armazenamento nos adipócitos em forma de gordura (POLACOW e JUNIOR, 2006).

Por sua vez, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, pois tem função de produzir substâncias endócrinas, que regulam o balanço energético tendo uma repercussão nas funções corporais (PRADO et al., 2009). Nesse viés,

muitos estudos estão sendo realizados para investigar os efeitos de dietas com alto teor de sacarose sobre os parâmetros metabólicos dos seres vivos MORRIS et al., 2012; ROVENKO et al., 2015).

#### 4.1.2 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica (SM) é um grupo de anormalidades metabólicas que se caracterizam por fatores de risco cardiovasculares, associadas à resistência à insulina, DM, e aumento da medida circunferência abdominal (NEVES e MESQUITA, 2018). A SM está ligada diretamente às principais complicações ocasionadas pelo acúmulo de tecidos adiposos (HOFFMAN et al., 2015). Ainda, a SM é considerada uma “constelação de fatores de risco metabólicos” (GRUNDY,2004). Esses fatores são mostrados na tabela abaixo:

**Tabela 1:** Mostra os fatores de riscos acerca da SM

<b>Fator de risco da síndrome metabólica</b>	
➤	Circunferência abdominal elevada:
➤	Elevações nos níveis de triglicerídeos
➤	Alta densidade nos níveis de LDL
➤	Baixa densidade nos níveis HDL
➤	Pressão arterial elevada
➤	Glicose elevada

**Fonte:** Autor. Embasado em GRUNDY, 2004

Segundo os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) já está bem estabelecido que a Síndrome Metabólica ocorre quando uma pessoa apresenta pelo menos três dos cinco critérios abaixo:

- Obesidade central - circunferência da cintura superior a 88 cm na mulher e 102 cm no homem;

- Hipertensão Arterial - pressão arterial sistólica  $\geq$  130 e/ou pressão arterial diastólica  $\geq$  85 mmHg;
- Glicemia alterada (glicemia  $\geq$  110 mg/dl) ou diagnóstico de Diabetes;
- Triglicérides  $\geq$  150 mg/dl;
- HDL colesterol  $\leq$  40 mg/dl em homens e  $\leq$  50 mg/dl em mulheres

A SM tem como base a resistência à ação da insulina (hiperinsulinemia). A insulina é um hormônio polipeptídico responsável por captar a glicose do sangue e direcionar para as células do organismo, e também exerce ações no metabolismo de gordura. A produção e a liberação desse hormônio ocorrem nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta aos níveis de glicose elevados no sangue. A função principal da insulina é equilibrar a glicemia em situações de “hiperglicemia”. Esse hormônio promove uma ação que aumenta a captação da glicose sanguínea pelas células de diferentes tecidos (MOREIRA, 2011).

A liberação da insulina ocorre quando está junta ao receptor que se encontra na subunidade  $\alpha$ , causando ativação da proteína tirosina quinase da subunidade  $\beta$ . Por meio da fosforilação, inúmeras proteínas substratos do receptor de insulina são sendo ativadas, impulsionando a cascata de sinalização como fosfatidilinositol 3-quinase, que modulam a ação da insulina (OLIVEIRA et al., 2020).

A sinalização deste hormônio promove o movimento das vesículas que contém a proteína transportador de glicose, denominado GLUT-4, o qual é dependente de insulina (OLIVEIRA et al., 2020). Assim, o transporte de glicose é acionado pela insulina nos tecidos musculares e adiposo pelo acréscimo de GLUT-4, nas membranas plasmáticas (de MARIA, 2011).

A alteração na função da insulina pode estar relacionada a diversos fatores, entre esses destacamos a obesidade causada por excesso de alimentos hipercalóricos e hiperglicídicos. O fator de obesidade faz com que a sinalização de insulina seja comprometida, sendo que os mediadores endógenos (citocinas pró inflamatórias) produzidos pelo tecido adiposo atuam negativamente a ação de insulina (de MARIA, 2011).

As citocinas são capazes de diminuir a fosforilação dos substratos de insulina e os altos níveis de ácidos graxos também são capazes de afetar negativamente a ação da insulina. Quando se tem níveis altos de ácidos graxos

eles ativam proteínas plasmáticas, conhecidas como TLR-4 (*toll like receptor*), ocasionando a ativação das vias de inflamação, em decorrência a este fato a captação da glicose é comprometida (OLIVEIRA et al.,2020), devido à resistência à insulina (RI) gerada.

A RI corresponde a essa dificuldade do hormônio insulina em exercer suas funções. A RI é caracterizada pela diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos musculares, hepáticos e adiposos. A RI também está relacionada com o surgimento do DM, uma vez que é influenciada por fatores genéticos e ambientais, a exemplo disso, a obesidade (de MARIA, 2011).

#### **4.1.3 DIABETES MELLITUS**

O DM, é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que tem por base a hiperglicemia como característica comum, essa desordem também é considerada um fator de risco para patologias cardiovasculares, além da intolerância à glicose, a hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão (FOLMER, 2004). Essa enfermidade é causada pela deficiência na produção pancreática de insulina, afetando o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios.

Segundo os dados da Sociedade Brasileira de Diabetes, estima-se que o número de pessoas com diabetes chegará a 642 milhões de pessoas até 2040. Dos tipos de diabetes existente o mais comum é o tipo II, que ocorre em cerca dos 90% dos casos diagnosticados (ADA, 2018). Ocorre geralmente em pessoas em com quadro de obesidade e com mais de 40 anos, sendo esse, o fator determinante para o seu desencadeamento (FOLMER, 2004). Cabe ressaltar que atualmente o diabetes tem acometido uma grande porcentagem de jovens (ADA, 2018).

A patogênese do DM tipo II está relacionada à resistência à insulina, ocasionada pela falha de reconhecimento da mesma em níveis de receptores nos tecidos alvos. Esta condição da resistência à insulina faz com que a produção de insulina pelo pâncreas seja aumentada na fase inicial desse distúrbio metabólico (SALGUEIRO, 2013). Esse aumento decorre devido a diminuição da capacidade do hormônio atuar nos tecidos alvos como músculos, fígado e tecidos adiposos (VIEIRA, ALVAREZ, SILVA e 2017).

O DM está relacionado com surgimento de várias complicações de curto e longo prazo, devido a sua incapacidade da utilização adequada da insulina produzida (SALGUEIRO et al., 2016). Ainda, as elevadas concentrações de glicose são capazes de alterar outras disfunções metabólicas, podendo causar a oxidação de biomoléculas como proteínas, DNA e lipídios, levando ao dano celular (SALGUEIRO, 2013), e desencadear manifestações de outras enfermidades.

## **4.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

Doenças neurodegenerativas (DNs) é o termo genérico usado para designar patologias que afetam os neurônios do cérebro humano. As DNs são caracterizadas pela perda progressiva e irreversível dos neurônios. Causam efeitos negativos de movimentos como ataxias e da função mental como demência. Ainda, as DN são relacionadas ao distúrbio metabólico ou tóxico (DUGGER e DICKSON, 2017).

As DNs são classificadas de acordo com suas características, a exemplo de distúrbios cognitivos e comportamentais. Esses distúrbios compartilham de inúmeros processos fundamentais, dos quais estão ligados a disfunções dos neurônios, estresse oxidativo e morte celular (DUGGER e DICKSON, 2017; APPOLINÁRIO et al., 2011).

Entre as DNs mais comuns estão a Doença de Alzheimer (DA), que é ocasionada quando ocorre a neurodegeneração dos neurônios que se encontram no córtex cerebral (SERENIKI e VITAL, 2008). E a Doença de Parkinson (DP), que é acometida pela progressão ou morte dos neurónios numa zona do cérebro chamada de substância nigra (SOUZA et al., 2011).

As influências ambientais parecem desempenhar um papel importante no desencadeamento dessas doenças. Estudos observacionais têm demonstrado que a composição da dieta é extremamente importante para a prevenção ou surgimento de doenças como DA e DP. Nesse sentido, dietas ricas em açúcares e gorduras são fatores que comprometem o funcionamento normal do SNC, contribuindo para o desenvolvimento dessas doenças (COMPTA et al., 2014; IRWIN et al., 2013).

### 4.2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817 (GOETZ, 2011), e caracteriza-se por ser um distúrbio do SNC, sendo a segunda doença mais frequente depois da DA. Essa doença afeta aproximadamente 2% da população, com mais de 60 anos (TRAN, ANASTACIO e BARDY, 2020). O diagnóstico em pessoas antes dos 40 anos é denominado de parkinsonismo, estágio inicial da doença (BARBOSA e SALLEM, 2005).

A DP é marcada pela perda progressiva dos neurônios produtores de dopamina e pelos aparecimentos dos seguintes sinais: rigidez muscular, bradicinesia (lentidão nos movimentos), tremores e perda de equilíbrio postural (SOUZA et al., 2011), assim como, sintomas não motores, por exemplo, decréscimo cognitivo e demência (LIGAARD, SANNAES e PIHLSTROM, 2019).

A morte dos neurônios ocorre na parte compacta da substância *nigra* do cérebro. Essa perda é irreversível e resulta na diminuição de dopamina (BARBOSA e SALLEM, 2005). A morte desses neurônios leva a perda dos terminais dopaminérgicos do estriado, das regiões dos gânglios basais e corticais. Em conjunto a este fato, ocorre a despigmentação da melanina. Assim, quanto mais clara estiver a substância *nigra* maior será a perda de dopamina (SOUZA et al., 2011; PRZEDBORSKI, 2005). Com a despigmentação, ocorre a diminuição de dopamina, assim, ocasionando a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, no qual se projetam para o estriado, que por sua vez são críticos para o controle de processamento de informações, ocasionando a diminuição dos movimentos voluntários (SOUZA et al., 2011).

A substância *nigra* é uma porção heterogênea situada no mesencéfalo, na qual tem o papel pela produção de neurotransmissor dopamina no cérebro, a mesma é subdividida em duas porções a porção compacta e a porção reticular. Essas estruturas têm função como, a diminuição do tônus musculares e inibição da atividade muscular, bem como a coordenação dos movimentos (BEAR et al., 2012).

No entanto, existem outras características comuns da DP que incluem acumulação generalizada da proteína intracelular  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn) e a presença de corpos de Lewy (BRAAK et al., 2003; ATHAUDA e FOLTYNIE, 2016). Ocorre a deposição de  $\alpha$ -Syn no citoplasma de certos neurônios em várias regiões

cerebrais diferentes. Os corpos de Lewy são amplamente constituídos por  $\alpha$ -Syn agregado. A patologia de Lewy ocorre inicialmente em neurônios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco cerebral e em neurônios do sistema olfatório, mas também é encontrada em regiões cerebrais límbicas e neocorticais com a progressão da doença (DICKSON, 2018; BALESTRINO e SHAPIRA, 2019).

As características das doenças de Alzheimer e Parkinson podem ser estudadas no modelo experimental *Drosophila melanogaster*, pois, esses animais apresentam SNC que também é responsável pelo seu sistema locomotor. As moscas também apresentam genes semelhantes aos genes envolvidos na DP, um exemplo,  $\alpha$ -sinucleína. LIMA e MIESENBOCK, 2005).

Entretanto, em *Drosophila* parece não ter ortólogo do gene  $\alpha$ -Syn, mas as mutações contribuem para a expressão da  $\alpha$ -Syn e o aumento desse gene mostraram características dominantes de parkinsonismo. *D. melanogaster* transgênica com  $\alpha$ -Syn expressada no cérebro apresentam danos nos neurônios. Estes genes também geram agregados parecidos com corpos de Lewy, causando a perda de neurônios dopaminérgicos e causando disfunções motoras remetendo as características da DP (WHITWORTH, WES e PALLANCK, 2006; FEANY e BENDER, 2000).

#### 4.2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

Estima-se que mais de 45 milhões de pessoas estão vivendo com demência, e esse número pode dobrar a cada vinte anos, segundo o Instituto Alzheimer Brasil (IAB) (2019). O mal de Alzheimer é o tipo mais frequente de enfermidade acometida pela demência. Acredita-se que atualmente no Brasil mais de 29 milhões de pessoas acima dos 60 anos tem demência (IBGE, 2019).

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que acomete os idosos. Sua manifestação compromete o sistema colinérgico, o que leva a perda neuronal seletiva em diversas áreas do SNC, ocorrendo a perda progressiva a memória, alterações das funções cognitivas e da personalidade (CHOI ET AL., 2014; SALVADOR e HENQUIQUES, 2004).

Dentre as múltiplas causas associadas ao aparecimento da DA, três se destacam: o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (apoE), um dos principais fatores de risco para o aparecimento da DA e também um importante indicador do seu

desenvolvimento (POIRIER et al., 2014); o acúmulo de placas beta-amilóides ea neurodegeneração mediada por tau (SUN, JIN, LING, 2012; ALVES et al., 2012).

Em relação ao alelo  $\epsilon 4$  da apoE no corpo humano, esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2). As informações contidas neste gene são importantes para a formação da proteína apoE, uma vez que essa proteína é fundamental no mecanismo de redistribuição de triglicerídeos e colesterol nos diversos tecidos do organismo humano (POIRIER et al., 2014). Ocorre uma interação entre a beta-amilóide solúvel ( $A\beta$ ) e apoE, criando um complexo apoE- $A\beta$ . Posteriormente, é digerido enzimaticamente e dá origem a duas porções, uma é degradada e a outra promove o acúmulo de placas amilóides que serão excretadas no meio extracelular (PERL, 2010; HOLTZMAN; MORRIS e GOATE, 2011).

$A\beta$  é o principal constituinte das placas e é caracterizado como o principal agente da patologia da DA. A deposição dessas placas amilóides leva a uma grande diminuição dos neurônios no cérebro (PERL, 2010; REEDY, 2011). Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade do  $A\beta$  são complexos, mas acredita-se que envolvam a quebra da homeostase intracelular de cálcio e potássio, induzindo estresse oxidativo e ativando o processo de morte celular e neuroína-inflamação via caspases (REEDY, 2011; NELSON et al., 2011).

Os numerosos emaranhados neurofibrilares NFTs são compostos por proteínas tau associadas aos microtúbulos (NELSON et al., 2011). As proteínas tau fornecem estabilidade aos microtúbulos do citoesqueleto neural, e essa função é regulada por um processo de fosforilação e desfosforilação. Em neurônios que sofrem degeneração, as proteínas tau associadas aos microtúbulos tornam-se anormalmente hiperfosforadas e se acumulam na forma de filamentos emaranhados helicoidais emparelhados. Por sua vez, as placas senis consistem na deposição de fragmentos amilóides no parênquima cerebral (HOLTZMAN, MORRIS, GOATE, 2011; NELSON et al., 2011; ALVES et al., 2012).

Existem evidências que os radicais livres (RL) estão envolvidos na neurotoxicidade dos peptídeos  $A\beta$ . A exposição de células neuronais ao  $A\beta$ , eleva a produção de RL, ocasionando a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, assim como níveis de marcadores de estresse oxidativo (EO) foram relacionados ao peptídeo  $A\beta$  em animais com quadro similar a DA (BEHL, 1999; SMITH et al., 1998).

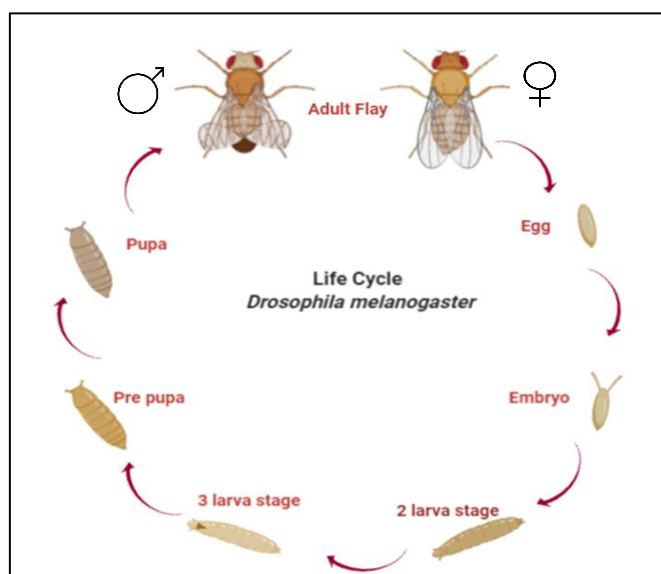
Um dos genes causadores dessa doença é conservado no modelo experimental *D. melanogaster*, que possui ortólogo semelhante à proteína precursora amilóide (dAPP) e componentes do complexo  $\gamma$ -secretase. Embora o local correspondente aos peptídeos de A $\beta$  careça de semelhanças significativas, é fato que não ocorre a produção endógena de A $\beta$  nas moscas.

Porém a supreexpressão da proteína semelhante a A $\beta$  gera a clivagem de dAPP, acarretando fragmentos correspondentes ao peptídeo A $\beta$  expressos em humanos. Quando ocorre essa clivagem, as moscas apresentam déficits de comportamentos, miméticos aos observados em doenças neurodegenerativas (PRUBING, VOIGT e SCHULZ, 2013).

### 4.3 MODELO EXPERIMENTAL *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é uma espécie de mosca, pertencente à família *Drosophilidae*. Essa mosca é conhecida popularmente como a mosca da fruta (BORROR e DELONG, 1988). Esse inseto foi utilizado pela primeira vez em 1900 por Charles W. Woodworth, para estudos genéticos. Também tem se destacado nos últimos anos na área da ciência por se tratar de um animal de baixo custo econômico, alta taxa de reprodução, fácil manuseio (tem em média de 3mm à 4mm) e ciclo de vida curto (durando cerca de 12 a 15 dias) (BORROR, 1969).

O ciclo de vida das moscas passa por sete fases: 1ª fase (eclosão do ovo), 2ª fase (primeira forma de larva), 3ª fase (segunda fase de larva), 4ª fase (terceira fase de larva, onde muda significativamente de tamanho), 5ª fase (estágio de pré-pupa), 6ª fase (estágio de pupa, onde ocorre a metamorfose) e 7ª fase (imago ou indivíduo adulto), como observado na Figura 1. Após eclosão, a mosca atingirá sua maturidade sexual após 12 horas e, em média, sobrevive em torno sessenta dias. Os sexos desses animais são identificáveis por meio de dimorfismo sexuais – no macho, os abdomens são listrados e na porção final dos mesmos existe uma pigmentação preta, enquanto que na fêmea o abdômen é claro (GOMES, 2001). O ciclo de vida desse animal nos permite obter uma grande quantidade de moscas dentro de um curto período de tempo. A mosca também é utilizada como opção para uso de animais de laboratório por seguir a “estratégia do 3Rs “*Replacement, Reduction e Refinement*” (DOKE e DHAWAL, 2015; COLPO et al., 2018).



**Figura1:** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Fonte: Autor

Esse inseto é considerado um modelo prático para avaliar os distúrbios do metabolismo, pois apresenta funções metabólicas semelhantes à dos mamíferos, incluindo a capacidade de manter a homeostase da glicose (COLPO et al., 2017).

Esse uso também ocorre porque as moscas apresentam vias metabólicas semelhantes aos encontrados em mamíferos. Na mosca estão presentes homólogos como, hormônios circulantes, enzimas chaves, vias de sinalização que equilibram a detecção e a utilização de carboidratos, proteínas e lipídeos. A exemplo disso, no pâncreas, as células  $\alpha$  e  $\beta$  controlam os níveis da glicose através da secreção de glucagon e insulina (COLPO, 2017).

O intestino das moscas também serve como local de absorção lipídica, no qual é metabolizado por meio de um homólogo de lipase gástrica de mamíferos, denominado Magro (COLPO, 2017). O Magro, por sua vez, absorve e converte os monoacilglicerídeos e ácidos graxos em diacilglicéridos que são transportados na hemolinfa como lipoproteínas (SIEBER e THUMMEL, 2009).

Além disso, esse modelo é usado com sucesso em pesquisas que envolvem alterações metabólicas desencadeadas por dietas, com elevadas concentrações de frutose (LUSHCHAK et al., 2011) e sacarose (MORRIS et al. 2012; ROVENKO et al., 2015). Também é um exemplo de estudo entre a área da nutrição e os mecanismos envolvendo doenças em humanos, por exemplo doenças metabólicas (ECKER, 2014).

A *D. melanogaster* também apresenta via de sinalização à insulina. As moscas possuem sete peptídeos análogos à insulina, conhecidos como *dilps*, sendo o *dilp2* o mais próximo à insulina em humanos (CASAS-TINTO et al., 2007). As células  $\alpha$  e  $\beta$  presentes nesse modelo assemelham-se às existentes no pâncreas de mamíferos (COLPO et al., 2017).

Ainda, esse modelo animal, tem contribuído com a investigação de pesquisas relacionadas a doenças humanas. Dentre essas, doenças neurodegenerativas como a DA e DP pois, compartilham de inúmeros genes responsáveis pela evolução destas desordens (SOARES et al., 2017). Parecido ao que ocorre em humanos, os neurônios dopaminérgicos presentes em cada hemisfério do cérebro da *D. melanogaster* ligam-se ao seu sistema de controle locomotor. As moscas também possuem carregadores de dopamina e vesículas de transporte do monoamina que são responsáveis pela homeostase da dopamina (De PAULA et al., 2016).

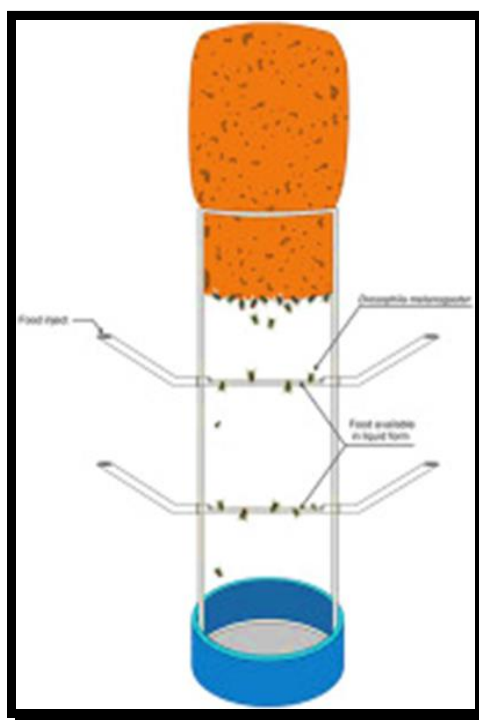
#### **4.3.1 Dieta líquida ofertada para *Drosophila melanogaster***

Já se sabe que a quantidade e a composição da dieta podem afetar a vida dos organismos. Assim como, uma alimentação equilibrada reduz os riscos de desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Nesta perceptiva, estudos vêm sendo realizados com o modelo experimental *D. melanogaster* para descrever as relações genéticas e alterações metabólicas, sendo essas desencadeadas por dietas (MORRIS et al., 2012).

Esse animal de experimentação apresenta funções regulatórias semelhantes aos mamíferos, incluindo a capacidade de manter a homeostase da glicose (COLPO et al., 2018). Além disso, também modula a ingestão de alimentos (TRINH e BOULIANE, 2013). A maneira como é ofertada uma dieta para esses animais pode se tornar um fator determinante no percentual de aproveitamento do alimento pela *D. melanogaster* (PORTELA et al., 2020).

Nesse viés Soares et al., (2017) desenvolveram um novo método para ofertar uma dieta às moscas com uma maior biodisponibilidade dos compostos de interesse chamado de Continuous Liquid Feeding (CLF). Esse método também reduz a manipulação das moscas durante o período de tratamento (SOARES et al., 2017).

A redução de manipulação dos animais também auxilia na redução de estresse das moscas, visto que esse fator pode influenciar nos resultados de pesquisa. O método consiste em um aparato feito com um tubo falcon de 50ml, com pequenos orifícios nas laterais. Nesses orifícios são colocados capilares de polipropileno com abertura central e a dieta é inserida nesses capilares, como mostra a Figura 2. Segundo Soares e colaboradores (2017), o método permite avaliar a quantidade de alimento consumido por dia.



**Figura 2:** Aparato do método CLF. Fonte: (SOARES et al., 2017)

#### 4.3.2 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO EM *Drosophila melanogaster*

Como citado anteriormente, a *D. melanogaster* tem sido utilizada em estudos envolvendo síndromes metabólicas e doenças neurodegenerativas (MACKAY e ANHOLT, 2006). As vantagens de se estudar essas patologias é que as moscas apresentam genes parecidos aos genes de humanos. Ainda, 75% dos genes que afetam as doenças humanas tem similaridade com os genes encontrados nas moscas. O cérebro desse modelo experimental apresenta neurônios que são responsáveis pela transmissão de informações através de impulsos elétricos e químicos, essa semelhança anatômica e molecular é similar com os humanos (PARRISH e COLLEGE, 2020).

As moscas também exibem atributos semelhantes aos mamíferos, como exemplo, ciclo circadiano, sono, locomoção e comportamento agressivo bem como, expõem comportamentos miméticos aos caracterizados das doenças neurológicas. Ainda, os cérebros das moscas compreendem moléculas parecidas com as dos humanos, a exemplo, as proteínas tóxicas que se acumulam no cérebro durante o processo de DNs (PANCHAL e TIWARI, 2017).

As DNs estão envolvidas com os distúrbios locomotores e conetivos em humanos, nesse viés, a *D. melanogaster* se demonstrou um modelo útil para estudar essas patologias (MADABATTULA et al., 2015). Dentre essas enfermidades citamos a DA e a DP. Na tabela 2 mostra a semelhança entre das características dessas doenças sob aspectos humanos e no modelo animal de *D. melanogaster*.

**Tabela 2:** Similaridade das características das doenças em humanos e moscas

<b>Doença</b>	<b>Aspecto Humano</b>	<b>Aspecto Mosca</b>
<b>Neurodegenerativa</b>		
<b>Doença de Alzheimer</b>	Caracterizada pela demência e está associada ao acúmulo neuronal de $\beta$ amilóide e proteínas tau.	Moscas geneticamente modificadas apresentam excesso da proteína $\beta$ amilóide e demonstram características como perda de memória.
<b>Doença de Parkinson</b>	Caracterizada pela perda progressiva de células que secretam o neurotransmissor dopamina, e está associada ao acúmulo de proteínas $\alpha$ -sinucleína.	Moscas geneticamente modificadas com $\alpha$ -sinucleína exibem a perda progressiva de neurônios e características como lentidão na locomoção.

**Fonte:** Autor. Baseado de (PARRISH e COLLEGE, 2020).

Uma maneira de se avaliar essas alterações de comportamento associados a DN é através de ensaios comportamentais. Entre esses, o teste de Geotaxia negativa, Open Field e Tolerância térmica. O ensaio de geotaxia negativa, também conhecido como teste de escalada analisa o desempenho no movimento de escalada e locomoção vertical das moscas (GANERZKY; FLANAGAN, 1978). E o teste de Open Field, também conhecido como teste de comportamento horizontal, avalia a capacidade de exploração da desses animais (HIRTH, 2010). Já o ensaio de tolerância térmica, avalia o comportamento aversivo da mosca quando entra em contato com altas temperaturas (NEELY et al. 2011).

Como citado anteriormente, o sistema dopaminérgico das moscas está interligado ao seu sistema locomotor e quando ocorrem danos nos neurônios dopaminérgicos das moscas será refletido no comportamento desses animais, assim como ocorre na DP (LIMA e MIESENBOCK, 2005). As moscas quando tem seus neurônios lesionados apresentam dificuldades de locomoção e voo (SOARES et al., 2017).

#### **4.4 AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUIMICOS**

##### **4.4.1 MARCADORES DE METABOLISMO**

Os carboidratos constituem uma valiosa fonte de energia ao nosso organismo. A homeostase da glicose visa manter uma concentração constante de glicose no sangue em uma faixa estreita de 3,9 a 5,6 mM (< 100 mg/dL). Isso se deve ao equilíbrio dinâmico entre a produção de glicose endógena e a utilização de glicose, que está associado a uma série de eventos metabólicos celulares (RODEN e BERNROIDER, 2003).

A insulina exerce um papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas. Imediatamente após refeição rica em carboidratos, a glicose absorvida para o sangue leva a rápida secreção de insulina, que por sua vez leva a rápida captação e armazenamento da glicose pelo fígado, sob a forma de glicogênio. Quando a quantidade de glicose que penetra nas células hepáticas é superior à que pode ser armazenada como glicogênio, a insulina promove a conversão de todo o excesso de glicose em ácidos graxos. Subsequentemente,

esses ácidos graxos são acondicionados sob a forma de triglicerídeos em lipoproteínas de muito baixa densidade e transportados pelo sangue para o tecido adiposo, onde são depositados como gordura (GUYTON e HALL, 2011).

Como o DM2 é caracterizado por um quadro de hiperglicemia causada pela resistência à insulina, utiliza-se a dosagem de glicose como biomarcador para o diagnóstico da mesma. Sendo considerados diabéticos pacientes que apresentam valores de 7 mM (> 126 mg/dL) (ADA, 2012). Visto que o excesso de glicose é acondicionado sob a forma de triglicerídeos, realizar a dosagem desse biomarcador também vem a ser uma ferramenta de auxílio no acompanhamento do quadro de pacientes diabéticos, sendo considerados normais valores inferiores a 150mg/dl e anormais valores acima (SCHIAVO, LUNARDELLI e OLIVEIRA, 2003).

#### 4.5 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo (EO) é um conjunto de condições fisiológicas que ocasionam a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) (MACHADO et al., 2009). O organismo apresenta um sistema de proteção antioxidante, no qual atua como mecanismo de defesa contra os radicais livres. Quando há um aumento de radicais livres ocorre o desequilíbrio redox e gera o EO (MACHADO et al., 2009).

Alteração no equilíbrio entre a formação e remoção de EROs tem papel fundamental na patologia de inúmeras doenças, a exemplo, o diabetes, desordens neurológicas e envelhecimento (PAWLAK et al., 1998). As EROs apresentam-se como radicais livres RL, e espécies não radicalares. O RL é considerado um átomo reativo, na qual possui em sua órbita um ou mais elétrons, por sua vez as espécies radicalares não apresentam elétrons em sua órbita (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Entretanto, os radicalares possuem um papel fundamental no dano oxidativo, devido a sua instabilidade. As principais espécies reativas, não radicais e radicais livres são mostradas na seguinte tabela:

**Tabela 3:** Mostra os principais radicais livres e radicalares

Radicais Livres	Radicalares
-----------------	-------------

Ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Peroxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Radicais hidroxil (OH <sup>•</sup> )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxil (RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	
Hidroperoxil (HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	

**Fonte:** Autor. Baseados em (HALLIWELL, 2000)

Os componentes celulares estão todos vulneráveis à ação de EROs. No entanto, a membrana é a mais atingida, devido a peroxidação lipídica, ocasionando alterações na estrutura e permeabilidade da membrana, além de causar prejuízos a enzimas e canais iônicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; FRANÇA, et al., 2013)

A lipoperoxidação lipídica, é uma cascata de reações decorrentes da ação dos RL sobre os lipídeos. Cabe aqui ressaltar que os danos gerados pela peroxidação lipídica são encontrados em altos níveis em humanos com grau de obesidade, dislipidemia e DM (FRANÇA et al., 2013). Ainda, o cérebro também se apresenta mais suscetível ao estresse oxidativo, isto porque o SNC tem elevado consumo de oxigênio em decorrência do gasto de ATP, gerando o aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (HALLIWELL, 2006).

Assim, evidencia-se que o EO esteja envolvido na patogênese das doenças neurodegenerativas, como a DA e DP, entre outras. Nas enfermidades humanas o organismo conta com a defesa do sistema antioxidante, que minimizam o feito do EO. Quando há o desequilíbrio dos antioxidantes ocorre o aumento do EO, ficando evidente que existe de fato a relação entre as EROs e as doenças humanas (HALLIWELL e GUTTERIGGE, 2000).

A maneira de avaliar o EO é feita através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), a sua quantificação é realizada pelo método denominado como TBARS (espécies reativas ao TBA) (OHKAWA ET AL., 1979). Esse método é usado para analisar a peroxidação lipídica de ácidos graxos. Nesse ensaio o MDA (malondialdeído), que é formado no decorrer da peroxidação, reage com o TBA gerando um composto colorido, no qual é detectado por espectrofotômetro (DUMONT et al. 1992).

#### 4.5.1 DOPAMINA

Os neurotransmissores são conhecidos como substâncias químicas que são produzidos pelos neurônios. Tem como função transmitir informações ao neurônio denominado pós-sináptico que por sua vez converte a mensagem em impulsos elétricos. Posteriormente os neurotransmissores são contidos em vesículas no terminal nervoso pré-sináptico. Nesse terminal, através de impulso nervoso, ocorre a liberação do neurotransmissor para a fenda sináptica (MENON, FREIRIAS e SANCHES, 1998). Ainda, quando se tem um menor aporte de neurotransmissores ou sensibilidades dos receptores, surgem os danos da transmissão neuronal (MENON, FREIRIAS e SANCHES, 1998).

Dentre a diversidade de substâncias que são capazes de propagar estímulo elétrico, as que correspondem o SNC são, serotonina, noradrenalina e dopamina (MENON, FREIRIAS e SANCHES, 1998). A dopamina é pertencente à família de catecolaminas, no qual consiste em um catecol ligado ao grupo por uma ponte de etil. A família das catecolaminas que estão presente no SNC modulam a função da neurotransmissão.

Os neurônios dopaminérgicos também estão ligados no controle das funções fisiológicas essenciais, das quais incluem o comportamento e cognição, motoras e neuroendócrinas (FIENBERG, 2018). Nos animais, a dopamina está relacionada ao sistema comportamental, interação social e ao sistema imunológico. A exemplo disso, quando ocorrem danos neuronais no SNC das moscas elas desenvolvem características semelhantes ao parkinsonismo (SOARES et al., 2017).

Como já citado anteriormente, as alterações dos neurônios dopaminérgicos estão envolvidas com as DN e acredita-se, com base na literatura, que esse fato pode estar associado à neurodegeneração neural da substância *nigra* do SNC, como observados na DP. Assim como, os déficits de movimentos surgem quando ocorre cerca de 40 a 60% da perda dos neurônios dopaminérgicos e da diminuição dos níveis dopamina (TORRÃO et al. 2012).

Aa DA, inclui a perda neuronal, mas também o acúmulo de emaranhados neurofibrilares (NTF), na qual corresponde aos depósitos aumentados da proteína tau e com isso o processamento anormal da  $\beta$ -amilóides. Em decorrência disso o grande acúmulo das placas amilóides, gera a diminuição dos neurônios no cérebro, ocasionando as características da DA (SUNG et al., 2014).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MANUSCRITO

**Revista a ser submetido:** Nutrition: The internacional Journal of Applied and Basic Nutritional Science: INSS 0899-9007 Quallis: A1

**Hyperglycidic diet causes behavioral damage associated with neurodegeneration in *Drosophila melanogaster***

Aline da Silva Goulart, Kellen Mariane Athaide Rocha, Márcio Tavares da Costa, Jefferson de Jesus Soares, Andréia Caroline Fernandes Salgueiro, Matheus Chimelo Bianchini, Mateus Cristofari Gayer, Robson Puntel, Elton Denardin, Ana Zilda Ceolin Colpo, Vanderlei Folmer

#### **Resumo**

O elevado consumo de dietas hiperglicídicas, tem sido associado ao desenvolvimento de sobrepeso e a obesidade, além disso, promove disfunções sistêmicas, como o *Diabetes mellitus* (DM). Muitos estudos têm mostrando os efeitos danosos dessa relação de consumo, no entanto ainda há necessidade de elucidação dos mecanismos envolvidos. Dessa forma, o presente estudo investigou os efeitos de uma dieta rica em sacarose sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em *Drosophila melanogaster*. Para isso, moscas adultas foram expostas à uma dieta hiperglicídica com diferentes concentrações de sacarose (5%, 10%, 20% e 40%). Ao final de cinco dias, as moscas foram crioplanadas, pesadas e preparadas para os ensaios bioquímicos e comportamentais. Os dados mostraram que a dieta hiperglicídica ocasionou redução na sobrevivência das moscas. Houve um aumento significativo nos níveis de glicose e triglicerídeos no corpo inteiro, carcaça e hemolinfa das moscas, nas concentrações de 20% e 40% sacarose, quando comparados ao controle (5%). A dieta rica em sacarose causou aumento de danos oxidativos e diminuição da resposta ao estresse térmico e afetou negativamente as atividades locomotora e exploratória das moscas. Ainda, a dieta hiperglicídica levou a uma depleção significativa nos níveis de dopamina.

Em conjunto, esses dados indicam uma relação entre dieta hiperglicídica, alterações bioquímicas, metabólicas e comportamentais em *D. melanogaster*. Esses achados abrem perspectivas para estudos na área de doenças neurodegenerativas, onde são observadas redução dos níveis de dopamina e da atividade locomotora, como, por exemplo, a doença de Parkinson.

### Highlights

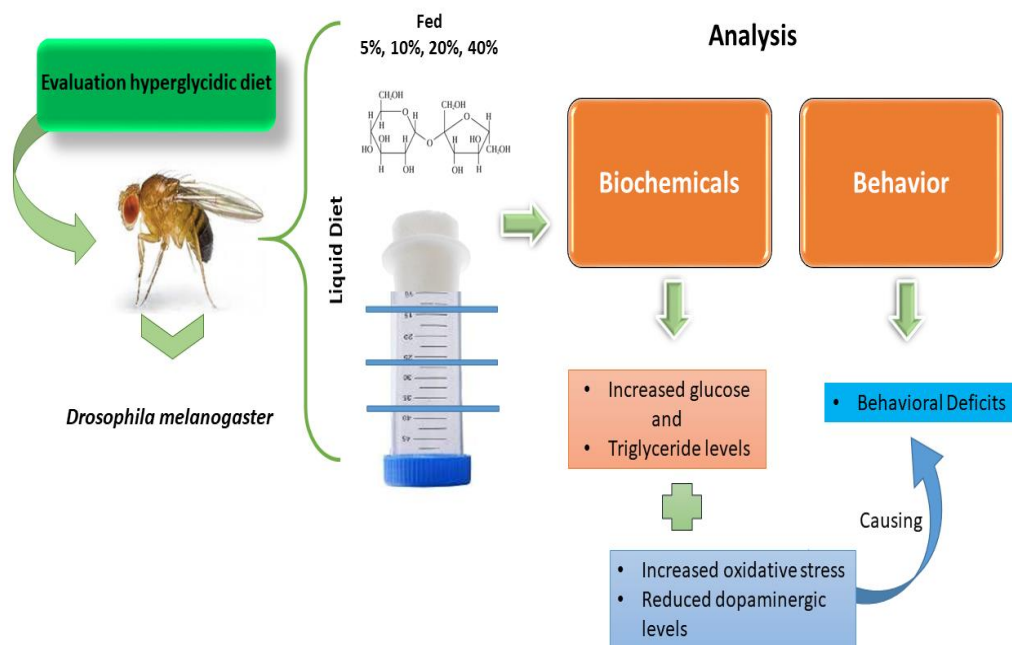
- We present the effects of a hyperglycemic diet on the biochemical and behavioral parameters in *Drosophila melanogaster*;
- Diet with high sucrose concentrations causes a decrease in life span and an increase in oxidative stress in *D. melanogaster*;
- Exposure to the diet causes both glucose and triglyceride levels to rise in flies;
- The hyperglycemic diet has a negative effect on the locomotor and exploratory behavior of *D. melanogaster*;
- *D. melanogaster* exposed to the hyperglycemic diet have decreased dopamine levels.

### Abstract

The high consumption of hyperglycemic diets has been associated with the development of overweight and obesity, in addition, it promotes systemic dysfunctions such as Diabetes mellitus (DM). Many studies have shown the harmful effects of this consumption relationship, however there is still a need to elucidate the mechanisms involved. So, this study investigated the effects of a diet rich in sucrose on biochemical and behavioral parameters in *Drosophila melanogaster*. For this, adult flies were exposed to a hyperglycemic diet with different concentrations of sucrose (5%, 10%, 20% and 40%). At the end of five days the flies were cryo-anesthetized, weighed and prepared for biochemical and behavioral tests. The data showed the hyperglycemic diet caused a reduction in the survival of the flies. There was a significant increase in the levels of both glucose and triglycerides in the entire body, carcass and hemolymph of the flies, in concentrations of 20% and 40% sucrose, when compared to the control (5%). The sucrose-rich diet caused an

increase in oxidative stress and decreased response to thermal stress and negatively affected both the locomotor and exploratory activities of the flies. Besides, the hyperglycemic diet led to significant depletion in dopamine levels. All together, these data indicate a relationship between hyperglycemic diet, biochemical, metabolic and behavioral changes in *D. melanogaster*. These findings open perspectives for studies in the area of neurodegenerative diseases, where reduced levels of dopamine and locomotor activity are observed, such as, for example, Parkinson's disease.

### Graphical abstract



**Keywords:** Metabolic disorder; High sugar diet; Neurodegenerative diseases; Fruit fly; Oxidative stress.

## 1 INTRODUCTION

The negative effects of high calorie diets, especially those associated with the consumption of foods with a high glycemic index, have been increasingly investigated in recent years (FOLMER *et al.*, 2002; MORRIS *et al.*, 2012; LUSHCHAK *et al.*, 2011; ROVENKO *et al.*, 2015). Energetically decompensated diets are related to the development of metabolic syndromes and *Diabetes mellitus* (DM). Indeed, the pathogenesis of DM involves a set of biochemical changes in the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids. These changes result in

hyperglycemia and are triggered especially by the absence of insulin production, or more commonly, resistance to the insulin produced (ADA, 2020).

Besides, studies demonstrate that there is an increase in the production of free radicals and consequent oxidative stress in hyperglycemia models *in vitro* and *in vivo* (FOLMER *et al.*, 2002; SALGUEIRO *et al.*, 2013; SALGUEIRO *et al.*, 2016). DM is also associated with the development of various dysfunctions in organs and systems (SALGUEIRO *et al.*, 2016). Among these dysfunctions there is the impairment of the central nervous system resulting in cognitive failures, one of the characteristics of neurodegenerative diseases (LOPES *et al.*, 2011). In this aspect, Gang *et al.* (2011) have shown a striking relationship between DM and Parkinson's disease. Biochemically, this relationship would occur especially due to complications induced by hyperglycemia in all organs, including the central nervous system (GANG *et al.* 2011).

Similar to what happens in humans, experimental models fed with hyperglycidic diets have presented DM-like pictures (FOLMER *et al.*, 2002). Most experimental tests are carried out on rodents (FOLMER, 2004). However, in the scientific world there is a trend that seeks to reduce the use of mammals in research, making alternative experimental models more targeted. Among these models we highlight *Drosophila melanogaster*, popularly known as fruit fly. The fruit fly is considered an experimental model of low economic cost, easy handling and high reproduction rate, in addition to having a short life cycle (DOKE & DHAWAL, 2015; COLPO *et al.*, 2018). This species has been widely used in research because it has genetic homology with mammals, in addition to similarities in biochemical and physiological routes (SCHAEFER & THOMPSON, 2015). These insects also have an endocrine system and organs with functions analogous to the energy metabolism of humans (LUSHCHAK *et al.*, 2011; MORRIS *et al.*, 2012; ROVENKO *et al.*, 2015).

Moreover, these flies have become excellent models for behavioral studies related to human diseases, for exhibiting similar neurological behavior (PANDEY & NICHOLS, 2011). As an example, the dopaminergic neurons existing in the brain of the flies are linked to their locomotor control system and, when injured, they cause the development of parkinsonian characteristics. For instance, in *D. melanogaster* they lead to difficulty in horizontal locomotion and flight (SOARES *et al.*, 2017). Given this context, our study aims to evaluate the effects of a diet rich in sucrose on the

biochemical and behavioral parameters associated with neurodegeneration in *D. melanogaster*.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Experimental Model and Diet

Harwich lineage *D. melanogaster* flies were maintained with controlled light/dark cycle and temperature. The Continuous Liquid Feeding method was used to offer the diet, as described by Soares *et al.* (2017). The diet consisted of powdered milk (1%), yeast *Saccharomyces cerevisiae* (1%), and commercial sucrose in the concentrations of 5% (control), 10%, 20% and 40%, diluted in 10ml mineral water. The nutritional information of the diet is shown in Table 1.

**Table 1** - Nutritional information of the diet (Nutritional information based on a portion of 300 µl/day)

NUTRITIONAL INFORMATION				
Hyperglycidic Diet (%)	5	10	20	40
Energetic value	8,12 Kcal	8,31 Kcal	8,7 Kcal	9,47 Kcal
Carbohydrates	1095 mg	1095 mg	1095 mg	1095 mg
Proteins	661 mg	661 mg	661 mg	661 mg
Total fat	314 mg			
Saturated fat	158 mg			
Trans fats	0			
Dietary fiber	0,2 g			
Calcium	8,6 mg	8,6 mg	8,6 mg	8,6 mg
Iron	0,001 mg	0,001 mg	0,001 mg	0,001 mg
Magnesium	0,005 mg	0,005 mg	0,005 mg	0,005 mg
Potassium	0,03 mg	0,03 mg	0,03 mg	0,03 mg
Sodium	4,84 - 5,14 mg			

Source: the authors, 2020

To offer the diet, adult male and female flies, three days old, were separated in 50mL plastic bottles, in the amount of thirty flies per bottle. The flies received the hyperglycidic or control diet for five days, in the amount of 300 µl/day, offered in three portions of 100 µl. At the end of five days the flies were removed from the flasks,

cryo-anesthetized, weighed and prepared for the experimental tests. Both biochemical and behavior tests were performed in quintuplicate.

## **2.2 Survival test**

Thirty male flies and thirty female flies with 3 days of life were kept on a 12-hour light/dark cycle at controlled temperature. The flies were fed for five days with 3 daily portions of 100 $\mu$ l of the diet in different concentrations (totalizing 300 $\mu$ l/day) and monitored once a day to monitor survival.

## **2.3 Weight Assessment**

The flies were weighed before and after 5 days of exposure to the diet. Thereunto, the flies were cryo-anesthetized and weighed in groups of 10 flies on a precision scale. The average individual weight was obtained by dividing the total weight by the number of weighted flies.

## **2.4 Biochemical Tests**

### **2.4.1 Dosage of Glucose and Triglyceride Levels**

Both glucose (GLI) and triglyceride (TG) levels were measured in two situations: i) in the whole body, except the head; and ii) hemolymph and carcass, except for the head. For the whole body dosage, twenty flies were cryo-anesthetized, weighed, washed, decapitated and homogenized in buffer TFK 0.05mM. The samples were centrifuged at 2,000 r.p.m. for 15 minutes, at 4°C, and the supernatant was used for the analyzes. For hemolymph and carcass dosing, thirty flies were cryo-anesthetized, weighed, washed and decapitated. The hemolymph was collected as described by Haselton and Fridell (2011), with modifications. In short, the body of the flies were placed inside a 500 $\mu$ L microtube with a filter at the base. The microtube was centrifuged at 10,000 r.p.m. for 10 min, at 4°C to obtain hemolymph. After that, the hemolymph was diluted in 80 $\mu$ L of 0.05mM TFK 1:10 (v/v). The body without hemolymph, now called carcass, was homogenized in 500 $\mu$ L TFK 0.05mM in a 1:10 (w/v) ratio, centrifuged at 10,000 r.p.m., at 4°C, for 10 minutes, and the supernatant used for the analyzes. Commercial glucose kits (Labtest/Brazil) were used to

measure glucose and triglycerides. The results were corrected by the standard calibration curves of the glucose and triglyceride kits.

#### **2.4.2 Levels of species reactive to thiobarbituric acid (TBA-RS)**

Lipid peroxidation was analyzed according to the method described by Ohkawa, Ohishi & Yagi (1979). For this, the flies were cryo-anesthetized, weighed, washed and homogenized in 0.05mM TFK buffer (1:20 w/v). In short, 100  $\mu$ L of the homogenate was mixed with 100  $\mu$ L of acetic acid and 100  $\mu$ L of 0.8% TBA. The mixture was incubated in a water bath for 120 minutes, at 95°C. Next, 8% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added. The mixture was then centrifuged at 10,000 r.p.m., for 10 min, at 18°C. The color obtained was measured on the spectrophotometer at 545 nm. The reading results were corrected using a standard malondialdehyde (MDA) curve and expressed in nmols of MDA per milligram of tissue.

#### **2.4.3 Analysis of Dopamine Levels through HPLC-DAD**

To assess dopamine levels, the flies were cryo-anesthetized and beheaded. Thirty heads were then homogenized in 0.9% NaCl (385  $\mu$ L) and 0.5 M HCl (15  $\mu$ L). Posteriorly, they were centrifuged at 3000 X g for 10 minutes, at 4°C. The supernatant was filtered through 0.22  $\mu$ m syringe filters and used in the analysis.

The HPLC system consists of a vacuum degasser and a quaternary pump connected to a phase column (synergi 4 $\mu$  Fusion-RP 80 at 250 at 4,60 mm; Phenomenex), coupled to a diode array detector. The volume of the injected sample was 20  $\mu$ L. The mobile phase was composed of methanol and water and the pH was adjusted to 3, with phosphoric acid. The flow rate was maintained at 0.8 ml per minute, with detection at 198nm. The results were expressed in % and corrected by the total protein, as described by Mello-Carpes *et al.* (2016).

### **2.5 Behavioral Tests**

#### **2.5.1 Negative geotaxis**

The vertical locomotion test is a behavioral test that evaluates the climbing movements of the *D. melanogaster*. To perform the test, ten male and ten female flies were placed separately inside a 15mL plastic tube, with a horizontal line marked at a distance of 6cm from the base. The flies were brought to the bottom of the flask from a light vertical tap. Then were observed for 6 seconds the number of flies that crossed the marked line (GANERZKY; FLANAGAN, 1978).

### **2.5.2 Open Field Test**

The horizontal locomotion test assesses the exploration capacity of *D. melanogaster*. For this test, three flies were used at a time. The flies were placed inside a Petri dish and left for 10 minutes for the setting to take place. Next, the dish containing the flies was placed on top of an “arena” marked with 1 cm squares. It was observed for 30 seconds the number of squares crossed. To facilitate interpretation, the test was filmed (HIRTH, 2010).

### **2.5.3 Heat Dodge Test**

This experiment evaluates the aversive behavior of flies to heat. For this test, ten flies were placed inside a Petri dish which was then sealed with masking tape. The flies were placed in the dark for ambiance for 10 minutes, and were subsequently exposed to heat. Exposure to heat occurred by placing the plate containing the flies on a metal grid, maintained at water level in a water bath, temperature controlled at 46°C for 4 minutes. During this period, it was observed how many flies climbed to the top of the Petri dish, as described by Neely *et al.* (2011), with modifications. The flies that showed the heat escape capacity preserved are the ones that at the end of the test were on top of the Petri dish. Flies unable to escape are at the bottom of the plate.

## **2.6 Statistical Analysis**

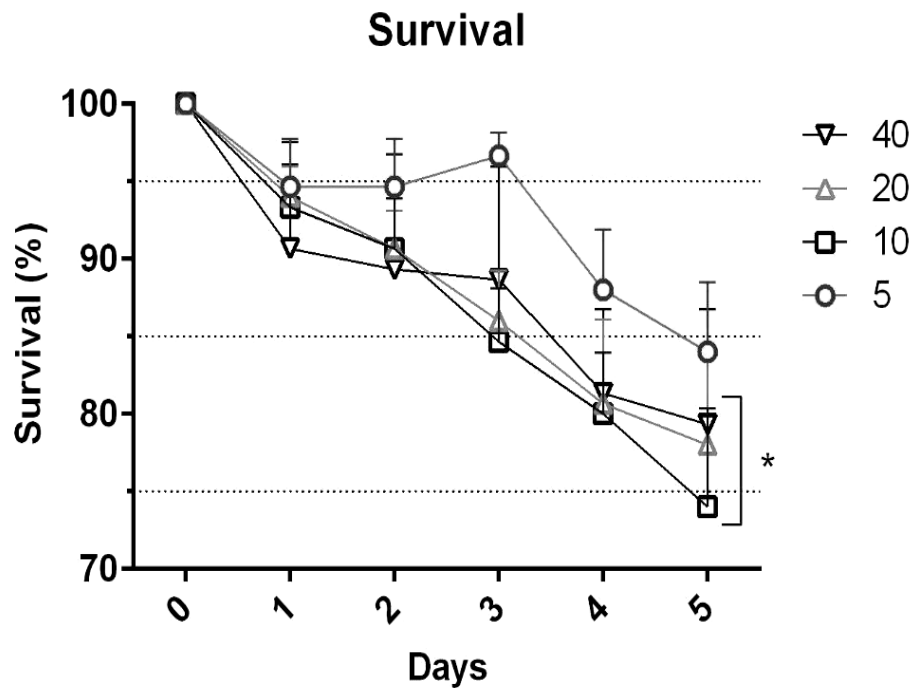
The collected data were expressed as mean  $\pm$  SD. And were evaluated by Analysis of Variance (ANOVA), with appropriate post-hoc when needed. HPLC data

were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Tukey test. All statistical analyzes used the software GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

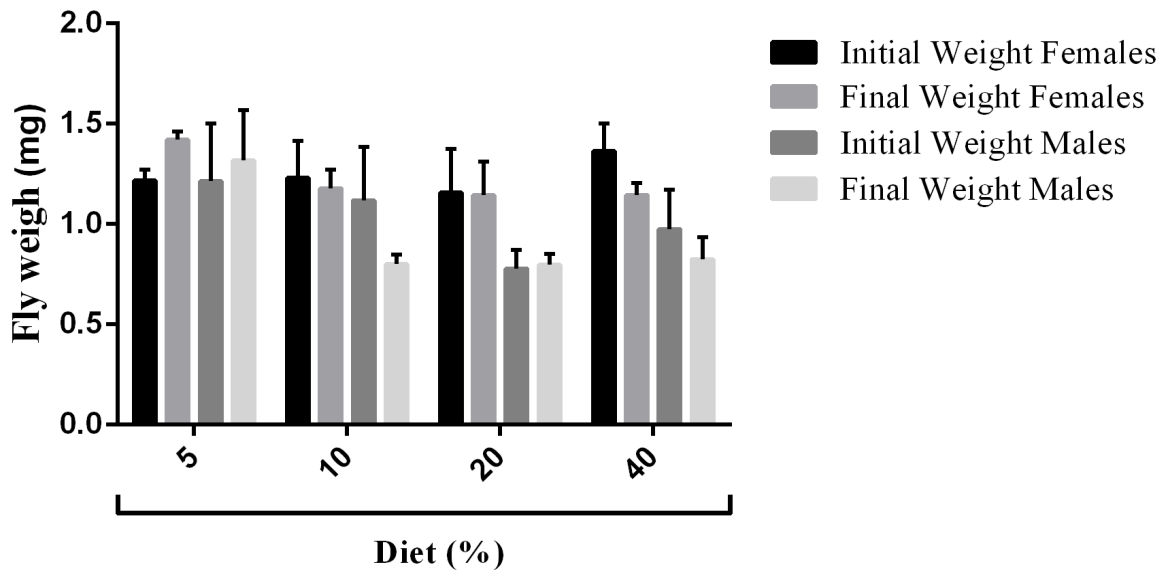
### 3 RESULTS

#### 3.1 Effect of Diet on Survival Parameters and Body Weight

Figure 1 shows the results of the survival curve of flies exposed to different concentrations of sucrose. We can see that the flies exposed to a 10%, 20% and 40% diet had a higher mortality rate, compared to the control group. This difference gradually increased with different concentrations. All groups had decreased survival compared to control during the five-day follow-up. The option of using flies with five days of treatment for the tests was in order to achieve a greater number of viable insects, since we had a decrease in the life span of these animals. Regarding the body weight of the flies, no difference was observed between the groups (Figure 2).



**Figure 1** - Evaluation of the hyperglycemic diet on the survival parameter of *D. melanogaster*. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5%,  $p < 0.05$ .

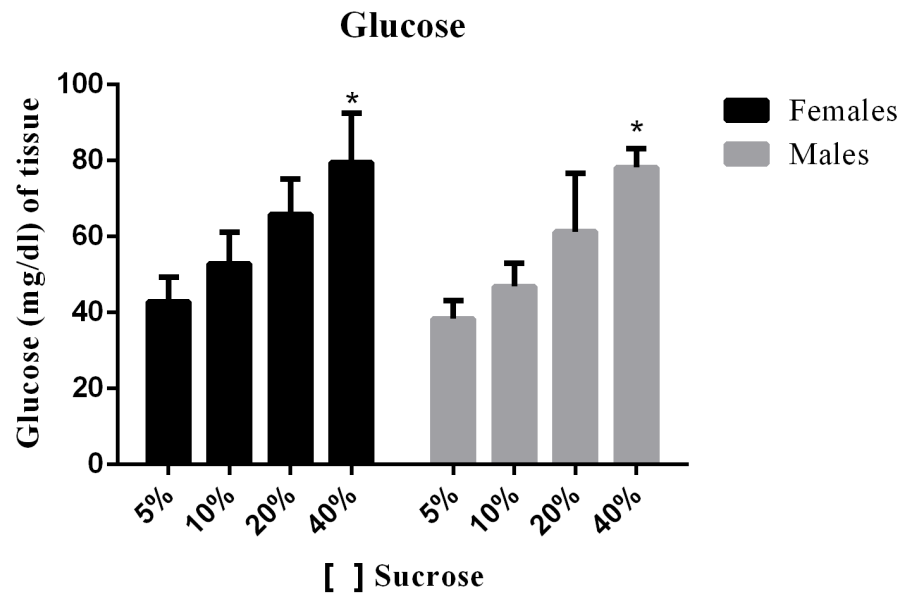


**Figure 2** - Weight assessment of *D. melanogaster* before and after exposure to the hyperglycidic diet.

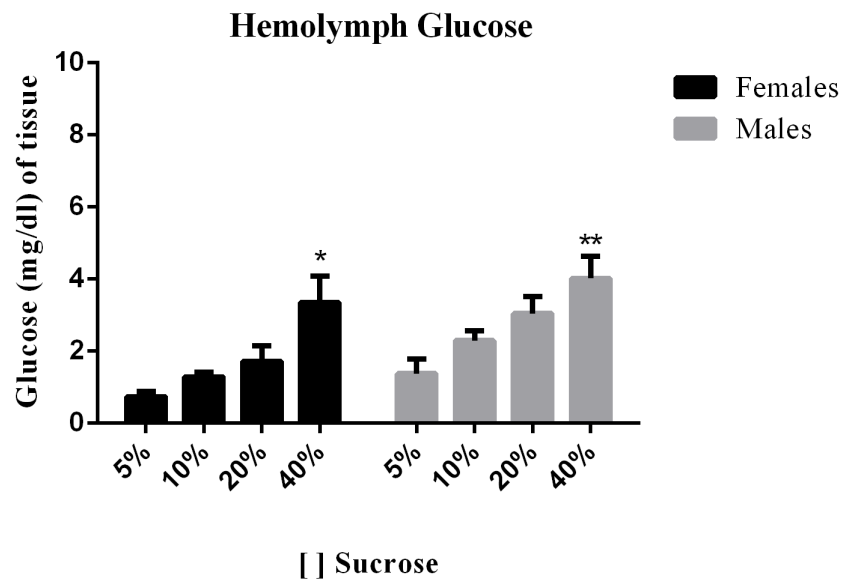
### 3.2 Metabolic parameters

#### • Glucose Levels

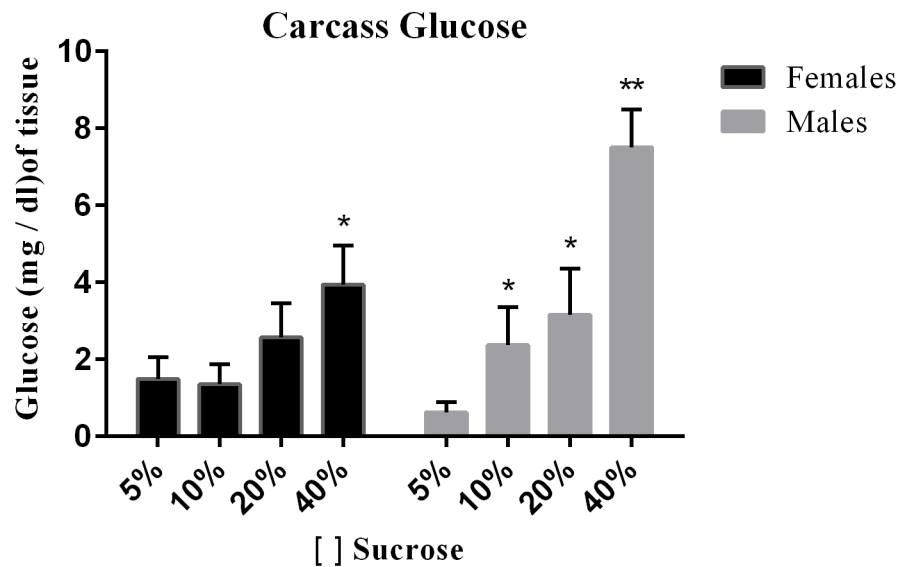
The hyperglycidic diet significantly increased glucose levels in the body of flies (Figure 3). This increase was found in the concentration of 40% in the groups of males and females, when compared to the control group (5%). This same trend was observed in the analysis of hemolymph (Figure 4), glucose levels were significantly increased in the 40% groups compared to the control both to male and female. In the carcass, the data show there was a significant difference in the concentration of 40% sucrose in the group of females when compared to the control group 5%. In the male group there was a significant increase in concentrations of 10%, 20% and 40% in relation to its control (Figure 5).



**Figure 3** - Effect of hyperglycemic diet on glucose levels in the body of *D. melanogaster* exposed to different concentrations of sucrose. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose, \*  $p < 0.05$



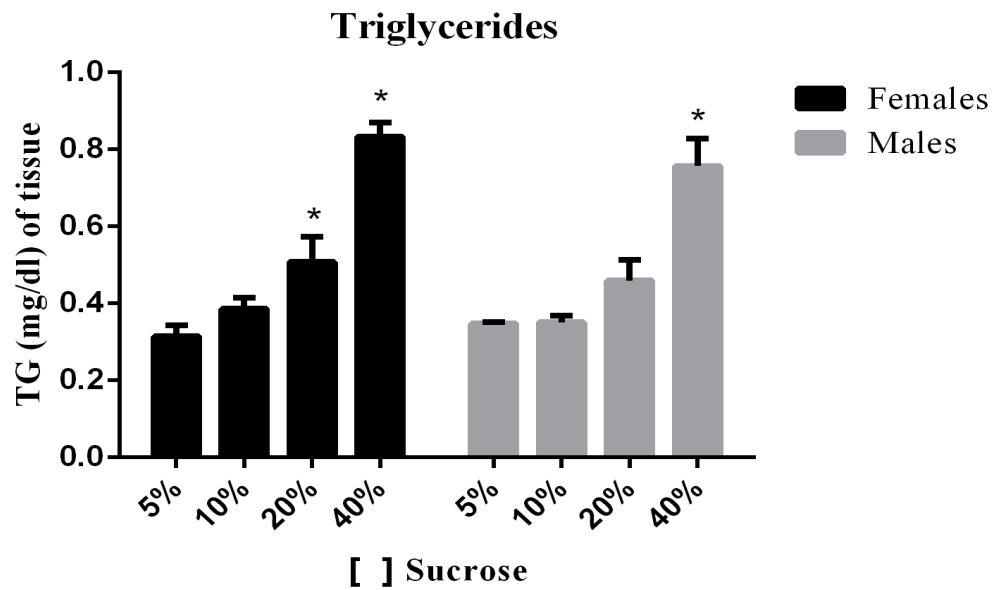
**Figure 4** - Effect of hyperglycemic diet on glucose levels in *D. melanogaster* hemolymph exposed to different sucrose concentrations. \* Indicates a significant difference in relation to the 5% control group, sucrose, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



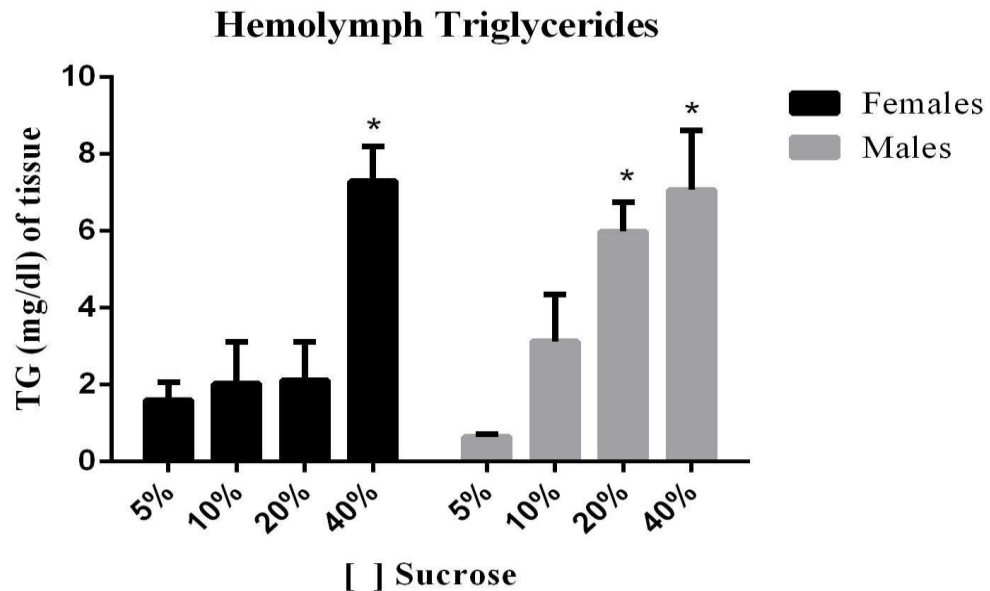
**Figure 5** - Effect of hyperglycemic diet on glucose levels in the carcass of *D. melanogaster* exposed to different concentrations of sucrose. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### • Triglyceride Levels

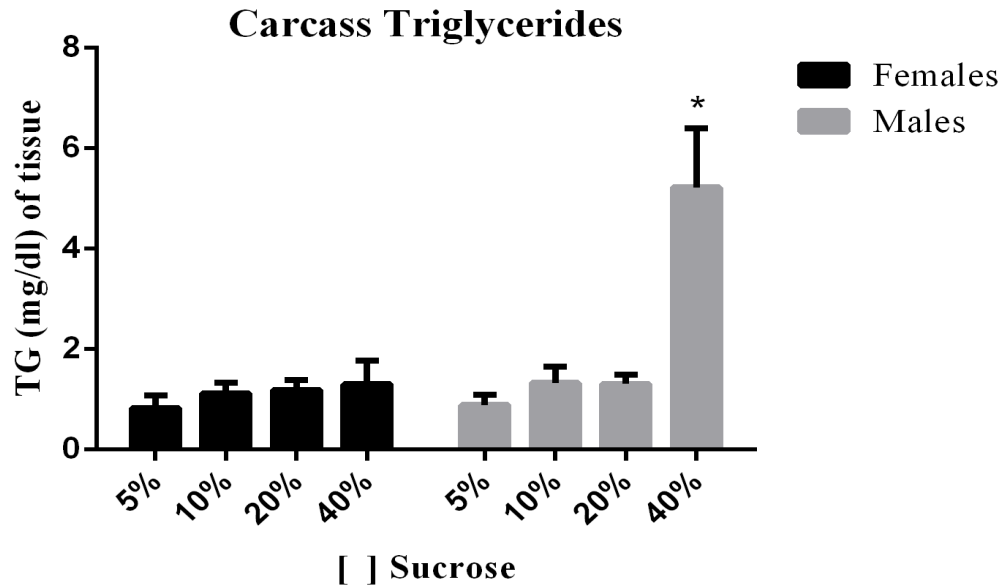
Flies treated with a sucrose-rich diet also had significantly elevated triglyceride levels compared to control groups. In the body of flies, TG levels increased in the group by 20% sucrose in females, and in the groups by 40% in both, males and females (Figure 6). In the hemolymph, the male group showed a significant increase in TG levels from the concentration of 20% sucrose. In females' hemolymph, levels increased only at a concentration of 40% sucrose compared to control (Figure 7). In the carcass it was observed that the TG had a significant increase only in the concentration of 40% sucrose in the group of males, when compared to the control group 5%. There were no significant differences among females (Figure 8).



**Figure 6** - Effect of hyperglycemic diet on TG levels in the body of *D. melanogaster* exposed to different concentrations of sucrose. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$ .



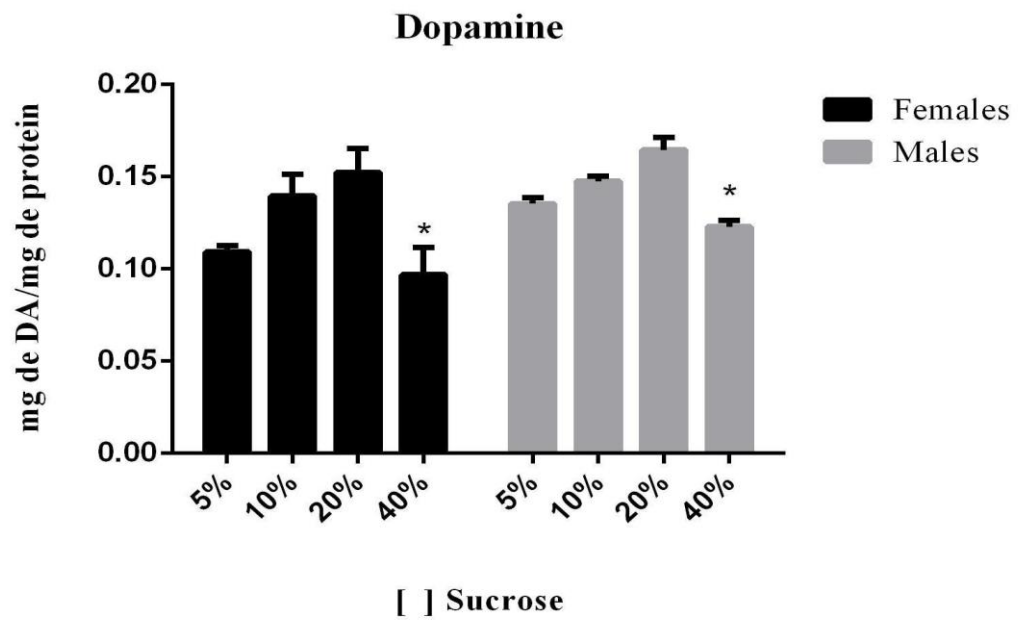
**Figure 7** - Effect of hyperglycemic diet on TG levels in *D. melanogaster* hemolymph exposed to different sucrose concentrations. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$ .



**Figure 8** - Effect of the hyperglycidic diet on TG levels in the carcass of *D. melanogaster* exposed to different concentrations of sucrose. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$ .

#### • Dopamine Levels

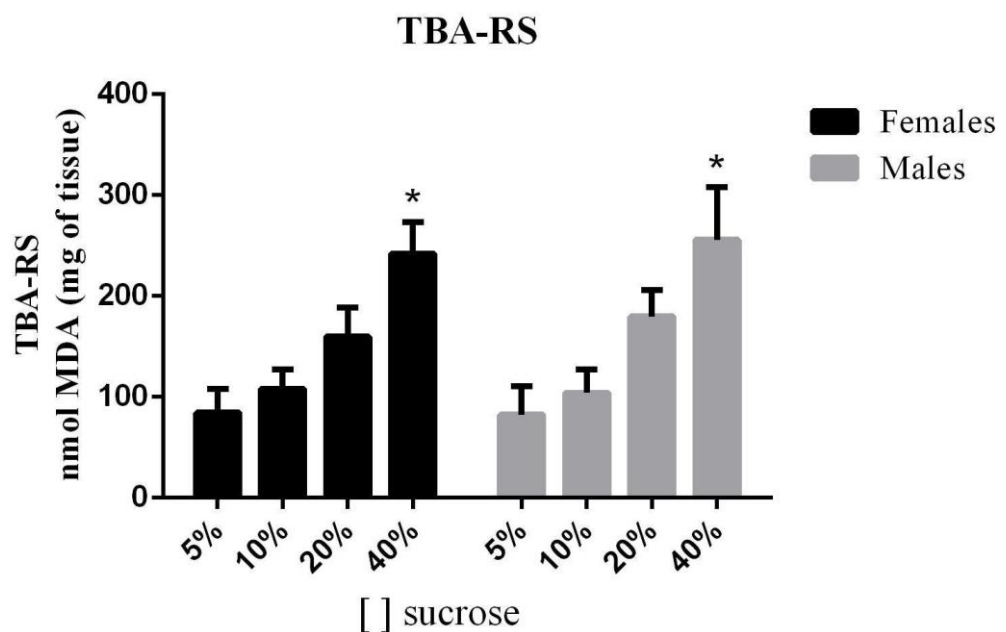
The data showed that the hyperglycidic diet is capable of leading to significant depletion in dopamine levels. This observation was verified in the concentration of 40% sucrose in both groups, males and females, when compared to the control group 5% sucrose (Figure 5).



**Figure 9** - Dopamine levels in *D. melanogaster* exposed to hyperglycemic diet. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$ .

- Levels of TBA-RS**

In our analysis of TBARS levels, it was possible to observe (Figure 10) that the 40% sucrose diet triggered a significant increase in lipoperoxidation in flies. This trend was observed both in the male and female group when compared to the control group.

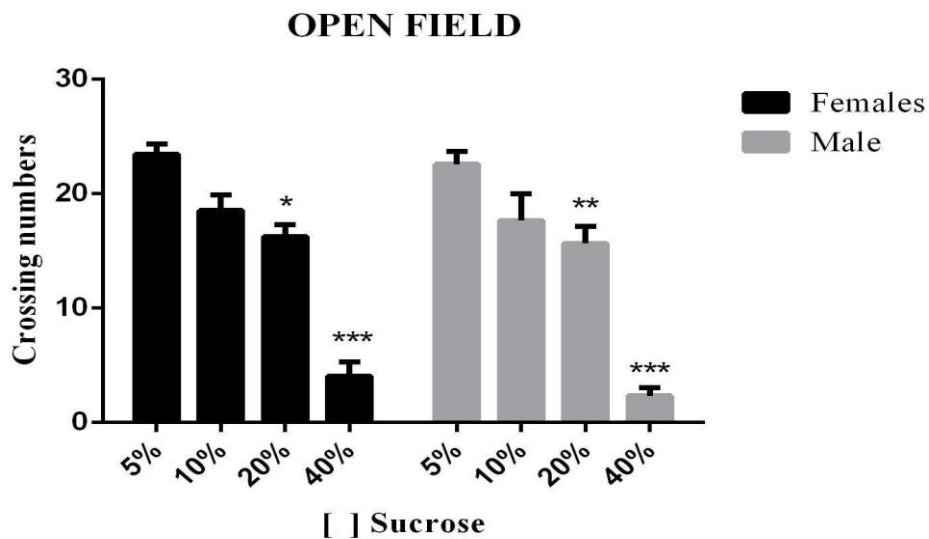


**Figure 10** - Analysis of TBA-RS levels in *D. melanogaster* exposed to hyperglycemic diet. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$

### 3.3 Behavioral Performance

#### • Open Field

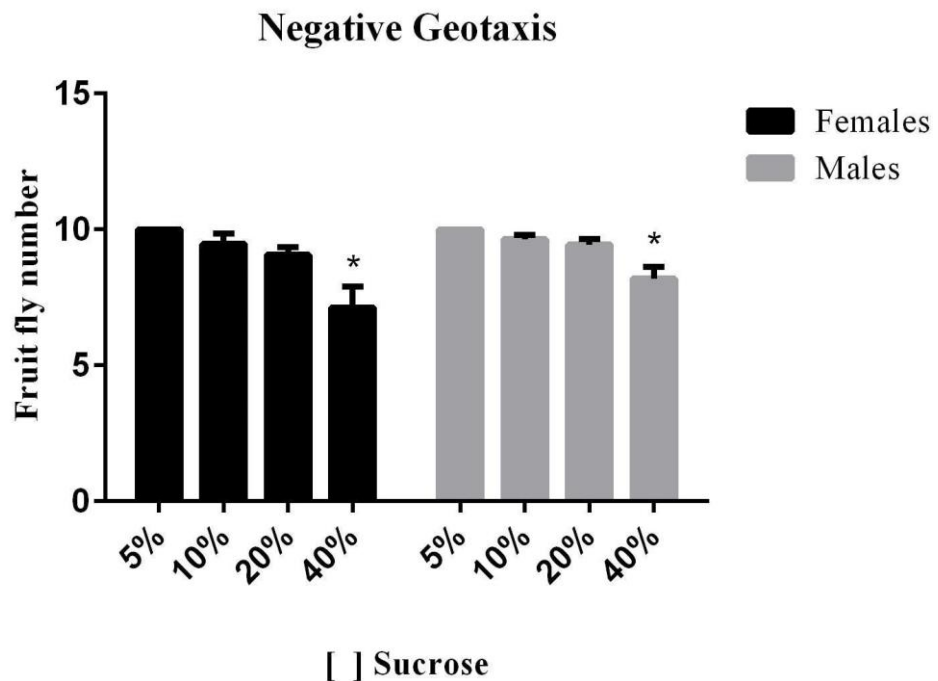
In the Open Field trial there was also a significant decrease in the exploratory behavior of animals in the groups of 20% and 40% sucrose, compared to the control group. These results were observed in the group of both females and males (Figure 11).



**Figure 11** - Effect of the hyperglycemic diet on the horizontal (exploratory) locomotor behavior of *D. melanogaster*. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### • Negative Geotaxis

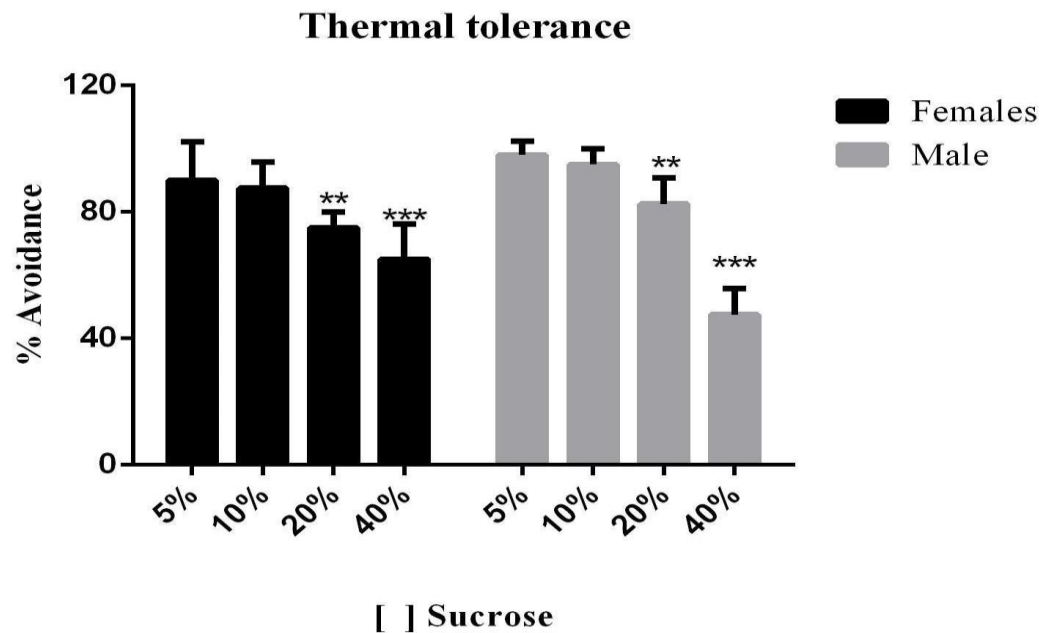
In the negative geotaxis test, it was observed that the diet promoted a negative damage in the vertical locomotor performance of the flies in the 40% sucrose concentration in both males and females (Figure 12). This negative damage is related to the low performance of the flies to climb.



**Figure 12** - Effect of the hyperglycemic diet on the climbing behavior of *D. melanogaster*. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose,  $p < 0.05$ .

- **Dodge heat**

In the heat avoidance test (thermal tolerance) a lower avoidance response was observed in increasing sucrose concentrations. As shown in Figure 13, exposure to the hyperglycemic diet significantly reduced the escape capacity of the flies in the 20% and 40% sucrose groups, compared to the control. Such results were observed both in males and females.



**Figure 13** - Effect of the hyperglycemic diet on the heat avoidance behavior of *D. melanogaster*. \* Indicates a significant difference in relation to the control group 5% sucrose, \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4 DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the effects of a diet rich in sucrose on biochemical and behavioral parameters in *D. melanogaster*. This experimental model has been widely used to study the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, as well as the effects of hypercaloric and hyperglycemic diets under physiological and pathophysiological aspects (PASCO & LEOPOLD, 2012; MORRIS, 2012).

Our results showed the hyperglycemic diet decreased the survival of the flies, which indicates ingestion of the diet with high concentrations of sucrose can cause a negative disturbance in the metabolism of the flies, causing changes in the health status of these animals. These factors may be related to the homeostasis imbalance of the flies, since the excess of sugar diets causes developmental disorder in *D. melanogaster* (ECKER *et al.*, 2013). Indeed, Lushchack *et al.* (2014) observed that consumption of sucrose decreases the life span of flies. Corroborating with our findings, the high sucrose intake causes glucose intolerance, consequently promoting toxicity negatively affecting metabolic regulation, decreasing the life span of these animals (ROVENKO *et al.*, 2015)

Regarding the weights of the flies, our results showed that there were no significant differences. These findings are in agreement with the study by Prado *et al.* (2020), which observed an increase in the weight of the female flies, however it was not significant. In another recent study, researchers analyzed that a diet with a high sucrose content in larval and adult flies was not able to increase weight. The authors pointed out that “insulin resistance in *Drosophila* is accompanied by a decrease in weight” (MUSSELMAN & BARANSKI, 2019). The fly insulin receptor (INR) pathway, in particular the CHICO protein (protein homologous to insulin receptor substrates in vertebrates) controls the cellular metabolism of flies. In adverse feeding conditions, the activity of the INR pathway is reduced, thus altering the metabolism, resulting in weight reduction (BÖHNI *et al.*, 1999).

We know that the consumption of high-carbohydrate and high-carbohydrate diets leads to the development of metabolic syndrome and the appearance of numerous diseases (ECKER *et al.*, 2017; DE PAULA *et al.*, 2018). Thereby, studies related to the effects of diets are gaining prominence. According to the literature, high levels of glucose and triglycerides lead to the development of changes in the metabolism of flies (COLPO, 2017). Insulin resistance is also accompanied by increased levels of glucose in the hemolymph (MUSSELMAN & BARANSKI, 2019).

In fact, our results showed that the diet with a high concentration of sucrose significantly increased the levels of carbohydrates and lipids in *D. melanogaster*. The addition of high concentrations (20% and 40%) of sucrose in the diet generated negative damages in the metabolism of these animals. Among these damages, we mention the negative effect generated in metabolic homeostasis, which can trigger continuous and uncontrolled inflammation, being the main damage factor of DM2. This inflammatory process resulting from hyperglycemia can cause harmful effects on adipokines, which interfere with all *D. melanogaster*, promoting an increase in triglyceride levels (ECKER *et al.*, 2017; DE AQUINO SILVA *et al.*, 2021).

As previously mentioned, our study showed the same trend, that the consumption of high concentrations of sucrose significantly increases the levels of lipids in flies. Our results corroborate with studies carried out by de Silva *et al.* (2021), that showed that the consumption of a high-carbohydrate diet causes negative effects on the metabolism of flies, these effects were caused by the increase in glucose and triglyceride levels (DE AQUINO SILVA *et al.*, 2021). As well

as Ecker and collaborators (2017) showed that a high calorie diet increased triglyceride levels in the hemolymph of the experimental model.

The action of insulin involves the uptake of glucose by the liver in mammals. In the case of *D. melanogaster* this process occurs in the fat body of the flies. The fat body is analogous to the human liver (DE AQUINO SILVA et al., 2021). In addition, the action of insulin is responsible for glycogen synthesis and decreased lipolysis. In a state of insulin resistance, peripheral tissues do not respond adequately to insulin, leading to increased glycemia, dysregulation of glycogen synthesis and also an increase in free fatty acids due to inadequate lipolysis (SAMUEL & SHULMAN, 2012). In this way, our data corroborate the idea that a diet rich in carbohydrates generates an increase in circulating glucose, providing an increase in free fatty acids due to inadequate lipolysis and insulin resistance.

In DM2 there is an imbalance in the redox state, due to a compromise of physiological antioxidant defenses. Hyperglycemia generates exacerbated NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) production, in addition to promoting the oxidation of low-density lipoproteins via an O<sub>2</sub>-dependent pathway, resulting in a cascade of free radical generation (GIACCO & BROWNLEE, 2010). To estimate the lipid damage of cells and tissues, the TBARS assay is used, and its increased levels are indirect evidence of high production of reactive oxygen species (ROS) (SALGUEIRO et al., 2016).

In this context, we observed that the diet with the highest concentration of sucrose (40%) triggered lipid peroxidation. In a variety of experimental models of hyperglycemia, high levels of circulating glucose have been found to produce permanent chemical changes in proteins and increase lipid peroxidation (FOLMER et al., 2003), as well as shown in our data. Increased levels of TBARS can be used as indirect evidence of high ROS production. In turn, the level of ROS produced by mitochondrial metabolism increases during excessive food intake and as a result of this fact increases the risk of diseases (COLPO et al., 2018).

The central nervous system (CNS) does not have a powerful antioxidant system. Furthermore, it has lipid components that can undergo lipid peroxidation and requires high oxygen consumption. All of these characteristics contribute to damage to the CNS occurring due to reactive species. Thus, DM2 exacerbates the effects of free radicals on the brain through hyperglycemia, which is one of the factors in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (SIMS-ROBINSON et al., 2011).

Mainly, the high production of reactive species impairs insulin signaling because it induces phosphorylation of IRS proteins (insulin receptor substrate), thus generating insulin resistance (GIACCO & BROWNLEE, 2010).

It is well established that insulin is a hormone that regulates glucose homeostasis throughout the body (MACIEJCZYK; ŻEBROWSKA; CHABOWSKI, 2019). In SNC insulin has well-characterized functions such as regulating apoptosis during neuronal development and increasing neuronal survival (FIORY *et al.*, 2019). In patients with DM2, there is a decrease in insulin signaling due to insulin resistance. This generates a reduction in glucose uptake in the substantia *nigra* and glucose metabolism, affecting the function of neurons. Besides, insulin transport to the CNS is suppressed by hyperglycemia.

In patients with Parkinson's disease (PD), changes in insulin signaling exacerbate clinical and pathological symptoms, increasing dopaminergic degeneration and worsening disease progression and, in parallel, motor and cognitive decline (FIORY *et al.*, 2019). Still, as described in the literature, metabolic changes compromise brain metabolism caused by insulin resistance (LIMA *et al.*, 2017), as well as affects the central nervous system, resulting in cognitive flaws (LOPES *et al.*, 2011).

Several studies on animal models have confirmed the occurrence of a harmful interference between insulin resistance and PD (CHOI *et al.*, 2005; MORRIS ET AL., 2010, 2011A, B). In this bias, we also assessed dopamine levels in the head of flies. In our analyzes it was possible to observe that the higher concentration of sucrose significantly reduced the levels of dopamine, which we infer to be determined by oxidative damage and to be in the precedence of behavioral changes.

Oxidative stress is the biological condition in which the formation of reactive species occurs to defend the body's repair, due to damage to biomolecules, such as lipids. When these damages are not repaired, they cause cell malfunction and even death due to apoptosis. Oxidative stress markers, such as the production of lipid peroxidation, are found in greater concentration in animal models of neurodegenerative diseases, such as PD (BARBOSA; MEDEIROS & AUGUSTO, 2006).

We believe that the imbalances caused by high glucose levels may be directly related to the development of oxidative stress, due to the glucose self-oxidation process. Our results showed that there was in fact an association between metabolic

changes and the generation of oxidative damage, from the increase in lipoperoxidation. Corroborating it, a study by Paula *et al.* (2016) showed that in the diet with the highest carbohydrate concentration, a higher oxidative stress was generated, which is caused by the metabolic imbalance.

In addition, in our study we noticed that the diet negatively affected the locomotor tests of the flies. These findings were accompanied by slowness in the vertical locomotor performance of the flies, as observed by changes in negative geotaxis. This behavioral assay is widely used to analyze neurolocomotor functions in flies (HOSAMANI & MURALIDHARA, 2009). The damage was also observed in the exploratory behavior of flies. Animals exposed to a diet with a high concentration of sucrose showed a deficit in exploratory behavior. In this sense, Paula *et al.* (2016) observed that the higher the concentration of a high-fat diet, the lower the mobility of *D. melanogaster*.

In all the behavioral tests carried out, they demonstrated that the groups of flies fed with high sucrose content had their performances reduced considerably. Based on these findings, we investigated the heat avoidance behavior of these insects. The heat tolerance test assesses the flies' ability to perceive, react, and escape the heat, since these animals tolerate a temperature of up to 40°C, when subjected to a higher temperature, these animals have escape behavior (NELLY, 2011).

In our findings, it was possible to notice that flies from groups with a higher concentration of sucrose did not show a heat escape response. So, we suppose that this inability to escape is directly related to deficits in locomotor and exploratory behavior, and in these tests the flies behaviors were drastically reduced.

Based on the above, we believe that metabolic changes led to the onset of oxidative stress, which was followed by a decrease in dopaminergic levels followed by changes in locomotor and exploratory behavior of insects, which we infer to be mimetic to those developed in PD. Indeed, oxidative stress can generate neurodegenerative diseases due to the neuronal propensity to oxidative damage (BARBOSA; MEDEIROS & AUGUSTO, 2006). Similar to what happens with humans, the dopaminergic system present in flies is also associated with locomotor control. This makes flies prone to the development of traits seen in neurodegenerative diseases (SOARES *et al.*, 2017).

## 5 FINAL CONSIDERATIONS

Summarizing, our results demonstrated that the ingestion of the hyperglycidic diet reduces the life span of the flies. The diet also resulted in increased levels of glucose and triglycerides in *Drosophila melanogaster*. Besides, the addition of sucrose in the diet caused a disorder in the metabolism of the fly, which we infer to be in the precedence of the aforementioned events.

Furthermore, diets rich in sucrose cause an increase in oxidative stress, as well as cause a decrease in the response to thermal stress, and cause deficits in the behavioral activities of flies. Together, these data indicate a relationship between hyperglycidic diet, metabolic disorders and behavioral changes.

Lastly, high glycidic diets cause a reduction in dopamine levels in the head of flies, which may be related to failures in their behavioral performances. We believe that the reduction in dopamine levels possibly precedes the locomotor and self-protection damage observed. It is worth mentioning that our research contributes to studies already published in order to understand the involvement of the metabolic syndrome and the emergence of neurological diseases. As well as our findings open perspectives for studies in the area of neurodegenerative diseases, where reduced levels of dopamine and locomotor activity are observed, such as, for example, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases.

## 6 REFERENCES

- AMERICAN Diabetes Association (ADA). **Standards of medical care in diabetes – 2020**. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc20-Sint>. Accessed in: 1 Nov 2020.
- BARBOSA, J.L.; MEDEIROS, H.G.; AUGUSTO, O. Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and knockout animals? **Química Nova**, v. 29, i. 6, p. 1352-1360, 2006.
- BÖHNI, R. et al. Controle autônomo do tamanho da célula e do órgão por CHICO, um homólogo de Drosophila do vertebrado IRS1-4. **Célula**, v. 97, i. 7, p. 865-875, Jun 1999.
- CHOI, J.Y. et al. Enhanced susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity in high-fat diet-induced obesity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, i. 6, p. 806-816, Mar 2005.
- COLPO, A.C. et al. Ilex paraguariensis extracts extend the lifespan of Drosophila melanogaster fed a high-fat diet. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, i. 2, p. 1–11, 2018.
- DE AQUINO-SILVA, D. et al. 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline co-treatment prevent oxidative stress in diabetic-like phenotype induced by hyperglycemic diet in Drosophila melanogaster. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 239, p. 108892, Jan 2021.
- DE PAULA, M. T. et al. Drosophila melanogaster: A model to study obesity effects on genes expression and developmental changes on descendants. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, i. 7, p. 5551-5562, Jul 2018.
- \_\_\_\_\_. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in Drosophila melanogaster. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, art. id. 4018157, Aug 2016.
- DOKE, S.K.; DHAWAL, S.C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, i. 3, p. 223-229, 2015.
- ECKER, A. et al. Syzygium cumini and Bauhinia forficata Attenuate High Sugar Diet-Induced Developmental Disorders in Drosophila melanogaster. **XLII Annual Meeting of SBBq**. Anais[...] Foz do Iguaçu: SBBq, 2013.
- \_\_\_\_\_. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in Drosophila melanogaster: Protective role of Syzygium cumini and Bauhinia forficata. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605-616, May 2017.
- FIORY, F. et al. The relevance of insulin action in the dopaminergic system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 868, 2019.

FOLMER, V. **Efeitos de dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas sobre a peroxidação lipídica e a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em camundongos.** 2004. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2004.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 10, i. 34, p. 1279-1285, Oct 2002.

FOLMER, V.; et al., A high fat diet inhibits delta-aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **The Journal of Nutrition Print**, v. 133, p. 2165-2170, 2003.

GANETZKY, B.; FLANAGAN, J.R. On The relations hip between senescence and age - related changes in two wild-type strains of drosophila melanogaster. **Experimental Gerontology**. v. 13, i. 3-4, p. 189–196, 1978.

GANG, H. et al. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v. 30, i. 4, p. 842-847, 2007.

GIACCO, F; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, n. 9, i. 107, p. 1058-1070, 2010.

GRAHAM, P.; PICK. L. Drosophila as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 121, p. 397-419, 2017.

HASELTON, A.T., FRIDELL, Y.W.C. Insulin Injection and Hemolymph Extraction to Measure Insulin Sensitivity in Adult Drosophila melanogaster. **Jove Journal: Biology**. v. 52, p. 2722, Jun 2011.

HIRTH, F. Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 9, i. 4, p. 504–523, Aug 2010.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Neuroprotective efficacy of Bacopa monnieri against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in Drosophila melanogaster. **NeuroToxicology**, v. 30, i. 6, p. 977-985, 2009.

LIMA, E.A., et al. Relação da doença de alzheimer, diabetes tipo três e infecções provenientes da cavidade oral. **16º SEMPESq, Ciencia e Tecnologia para um Brasil sem Fronteira.** Anais [...]. Aracaju: Universidade Tiradentes, Oct 2017.

LOPES, F.M.R.; et al., Cognição e Diabetes Mellitus tipo 2 em idosos. **Ciência e Cognição**, v. 16, i. 3, p. 095-108, Dez 2011.

LUSHCHAK, O.V. et al. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Drosophila melanogaster larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 160, i. 1, p. 27–34, 2011.

LUSHCHAK, O.V. et al., Os carboidratos específicos da dieta influenciam diferentemente a expectativa de vida e a fecundidade de *Drosophila melanogaster*. **The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, p 3-12, 2014.

MACIEJCZYK, M.; ŻEBROWSKA, E.; CHABOWSKI, A. Insulin resistance and oxidative stress in the brain: what's new? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, i. 4, p. 874, 2019.

MELLO-CARPES, P.B. et al. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. **Neurobiology of learning and memory**, v. 127, p. 84-92, Jan 2016.

MORRIS, J.K. et al. Effects of unilateral nigrostriatal dopamine depletion on peripheral glucose tolerance and insulin signaling in middle aged rats. **Neuroscience Letters**, p. 219–222, 2011.

MORRIS, J.K. Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated by a high-fat diet. **American Journal of PhysiologyRegulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, i. 4, p. R1082–R1090, Oct 2010.

MORRIS, S.N.S, et al. Development of diet-induced insuli resistance in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis**, v. 1822, i. 8, p. 1230-1237, Aug 2012.

MUSSELMAN, P.L.; THOMAS, J.; BARANSKI, J.T. Similar effects of high-fructose and high-glucose feeding in a *Drosophila* model of obesity and diabetes. **Plos One**, v. 14, i. 5, e0217096, May 2019.

NEELY, G.G. et al. TrpA1 Regulates Thermal Nociception in *Drosophila*. **Plos One**, v. 6, i. 8, e24343, Aug 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, i. 2, p. 351-358, 1979.

PANDEY. B.U.; NICHOLS D.C. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, i. 2, p 411-436, Jun 2011.

PASCO, M.Y.; LÉOPOLD, P. High Sugar-Induced Insulin Resistance in *Drosophila* Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo. **Plos One**, v. 7, i. 5, p. e36583, May 2012.

PRADO, I.O. et al. Metabolic effects of *Bauhinia forficata* leaves infusion in *Drosophila melanogaster* fed with high sucrose diet. **Research, Society and Development**, v. 9, p. e60932377, 2020.

ROVENKO B.M. et al. High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. **Comparative**

**Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 180, p. 75–85, 2015.

SALGUEIRO, A.C.F., et al. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 81-87, 2013.

\_\_\_\_\_. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, article id 8902954, Dec 2015.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Integrating mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Elsevier**, v. 148, p. 852-871, 2012.

SIMS-ROBINSON, C.; et al. How does diabetes accelerate alzheimer disease pathology? *Nature Reviews Neurology*, v. 6, i. 10, p. 551–559, Oct 2011.

SOARES, J. J. et al. Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Analytical Biochemistry**, v. 537, p. 60-62, 2017.

## 6 CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de uma dieta hiperglicídica sobre os comportamentos associados a neurodegeneração em *Drosophila melanogaster*. A partir de tudo que fora apresentado, e com intuito de responder a estas questões centrais, foram realizados testes bioquímicos e comportamentais. De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, concluímos:

- A dieta hiperglicídica reduziu o tempo de vida da *Drosophila melanogaster*;
- Altas concentrações de sacarose alteram o metabolismo das moscas, esses efeitos vieram acompanhado pelo alto níveis de glicose e triglicerídeo no corpo, hemolinfa e carcaça das moscas;
- Os mecanismos envolvendo o estresse oxidativo podem estar relacionados com a elevação da glicose e triglicerídeo no corpo das moscas, tendo em vista que a dieta alta concentração de sacarose causou um aumento da peroxidação lipídica;
- A dieta também causou a redução dos níveis de dopamina na cabeça das moscas;

➤ A redução dos níveis de dopamina foi acompanhada pelos déficits de comportamento da *D. melanogaster*.

Ainda, com base no exposto acima podemos concluir que dietas com alto teor hiperglicídico é capaz de ocasionar desequilíbrio no organismo metabólico dos seres vivos, ocasionando sérios danos à saúde. Assim como, nossos resultados mostram evidências que a síndrome metabólica está relacionada ao desenvolvimento doenças neurodegenerativas, uma vez que as moscas apresentaram características semelhantes ao DM tipo II e os déficits de comportamentos associados a Doença de Parkinson.

## 7 PERSPECTIVAS

Como esse estudo mostrou relação entre as síndromes metabólicas e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas; e com o intuito de compreender melhor os mecanismos envolvidos na alteração metabólica e o surgimento dos déficits de comportamento em moscas, temos como perspectivas:

- Investigar alguns genes que estejam envolvidos na sinalização da insulina, como os *dilps* (2, 3 e 5), *CHICO* e *Inr*;
- Averiguar a toxicidade da dieta hiperglicídica sobre marcadores inflamatórios em *Drosophila melanogaster*.

Ainda, com o objetivo de diminuir os efeitos causados pela síndrome metabólica, temos a intenção de avaliar o reposicionamento de fármacos no tratamento do DM tipo II. Dentre esses fármacos, a combinação da Metformina como hipoglicemiante oral e ácido acetilsalicílico (AAS), que atua na prevenção de eventos envolvendo a dislipidemia.

## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, L. et al. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. **Frontiers in neurology**, v. 3, p. 63, 2012.

AMERICAN Diabetes Association (ADA). **Standards of medical care in diabetes – 2020**. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc20-Sint>. Acesso em: 1 Nov. 2020.

\_\_\_\_\_. Diabetes Association (ADA) Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. v.47, p. 64-71, 2012.

APPOLINÁRIO, P.P. et al. Metabolism, oxidation and biological implications of docosahexaenoic acid in neurodegenerative diseases. **Química Nova**, vol.34 n.8, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000800021>. Acesso em: 30 de nov. 2020.

ATHAUDA, D; FOLTYNIE, T. Insulin resistance and Parkinson's disease: a new target for disease modification ?. **Progress in neurobiology**, v. 145, p. 98-120, 2016.

BALESTRINO, R; SCHAPIRA, A.H.V. Parkinson disease. **European journal of neurology**, v. 27, n. 1, p. 27-42, 2020.

BARBOSA, E.; SALLEM, F. Doença de Parkinson – Diagnóstico. **Rev Neurociências**, v. 13, n. 3, p. 158-165, 2005.

BEHL. C. Alzheimer's disease and antioxidant stress: implications for novel therapeutic approaches. **Prog. Neurobol.** V, 57, p 301-323, 1999.

BORROR, D.J.; Delong, M.D. **Introdução ao estudo dos insetos**. Edgard Bucher (1969).

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003.

CASAS-TINTO, S. et al. Characterization of the Drosophila insulin receptor promoter. **Biochimica e Biophysica Acta**, 2007.

CHOI, J K. et al. Histone acetylation: truth of consequences? This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting–Epigenetics and Chromatin Dynamics, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, n. 1, p.139-150, 2009.

COLPO, A.C. **Efeitos dos extratos de erva-mate sobre danos oxidativos e sua relação com anti e co-genotoxicidade**. 135 p. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguai, Uruguai, Uruguai.

2017. Disponível em: <http://dspace.unipampa.edu.br:8080/jspui/handle/riu/1924>. Acesso em 28 de nov. 2020.

COLPO, A.C. et al. Ilex paraguariensis extracts extend the lifespan of *Drosophila melanogaster* fed a high-fat diet. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, i. 2, p. 1–11, 2018.

COMPTA, Y. et al. The significance of  $\alpha$ -synuclein, amyloid- $\beta$  and tau pathologies in Parkinson's disease progression and related dementia. **Neurodegenerative Diseases**, v. 13, n. 2-3, p. 154-156, 2014.

DE MARIA, C.A.B. Insulina: aspectos históricos moleculares. In: De Maria C.A.B. Moreira, R.F.A., Marcilio, R. **Bioquímica do diabetes melito**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011.

DE PAULA, M. T. et al. *Drosophila melanogaster*: A model to study obesity effects on genes expression and developmental changes on descendants. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, v. 7, p. 5551-5562, Jul 2018.

DICKSON, D.W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 46, p. S30-S33, 2018.

DOKE, S.K.; DHAWAL, S.C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223-229, 2015.

DUGGER, B.N; DICKSON, D.W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **CSH Perspectives in Biology**. 2017. Disponível em: [10.1101/cshperspect.a028035](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035) . Acesso em 22 de nov. de 2020.

DUMONT, E. et al. Free radicals, lipids and protein degradation. **Free radical biology & medicine**, v, 13, p. 197-198, 1992.

ECKER, A. **Efeitos do consumo de sacarose sobre os parâmetros metabólicos, desenvolvimentais e antioxidantes em *Drosophila melanogaster*: papel das plantas *Syzygium cumini* e *Bauhinia forficata***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –BioquímicaToxicológica, 2014.

FEANY, M.B; BENDER, W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, p. 394-398, 2000.

FERREIRA, A.L.A, MATSUBARA, A.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.43 n.1 São Paulo, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>. Acesso em: 28 de nov. 2020.

FINBERG, J.P.M. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**,. Disponível em doi: 10.1007 / s00702-018-1952-7, Acesso de 26 nov. 2020.

FOLMER, V. **Efeitos de dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas sobre a peroxidação lipídica e a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em camundongos**. 2004. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2004.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 10, p. 1279-1285, Oct 2002.

FRANÇA, K.B. et al., Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v 20, p. 99-206, 2013. disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>. Acesso em: 26 de nov. 2020.

GANETZKY, B.; FLANAGAN, J.R. On The relations hip between senescence and age - related changes in two wild-type strains of drosophila melanogaster. **Experimental Gerontology**. v. 13, p, 189–196, 1978.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's Disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2011. disponível em: doi:10.1101/cshperspect.a008862. Acesso em: 28 de nov. 2020.

GOMES, R.A.P.L. Utilização de Drosophila em genética: 1º parte. Disponível em: Acesso em 31 mai: 2020, <http://ordembilogos.pt/Publicacoes/Biologias/>. 2001.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica** / John E. Hall. 12. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs Aging**. v, 18, p,685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., **Oxford University Press**: New York, 2000.

HIRTH, F. Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 9, i. 4, p. 504–523, Aug 2010.

HOFFMAN, E.L.; VONWALD, T.; HANSEN, K. The Metabolic Syndrome. **S D Med.; edição especial**, p. 24-28, 2015.

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J.C.; GOATE, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Science translational medicine**, v. 3, n. 77, p. 77sr1-77sr1, 2011

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em Dia Mundial do Alzheimer, dados ainda são subestimados, apesar de avanços no diagnóstico e tratamento da doença, 2019. Disponível em: <https://www.institutoalzheimerbrasil.org.br>. Acesso em 04 de dez. 2020.

IRWIN, D.; LEE, V.; TROJANOWSKI, J. Parkinson's disease dementia: convergence of  $\alpha$ -synuclein, tau and amyloid- $\beta$  pathologies. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 626-636, 2013.

LACERDA, D.S; BOCK, P.M; FUNCHAL, C. Excessive consumption of fat provokes systemic cellular damage in some metabolic and cardiovascular diseases. **Nutrire**, p. 200-213, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/2316-7874.41214>. Acesso em: 04 de dez. 2020.

LEMAN, R.D.C.. Carboidratos e doenças. **Publications International**, Ltd. 2006. Disponível em <http://saude.hsw.uol.com.br/comoescolhercarboidratos.html> Acesso em jun. de 2020.

LIGAARD, L.J; SANNES. J; PIHLSTROM, L. Deep brain stimulation and genetic variability in Parkinson's disease: a review of the literature. **NPJ Parkinson's Disease**, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41531-019-0091-7#Sec12>. Acesso em: 25 de nov. 2020.

LIMA, S. Q., MIESENBOCK, G. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. **Cell**, 2005.

LOPES, F.M.R.; et al., Cognição e Diabetes Mellitus tipo 2 em idosos. **Ciência e Cognição**, v. 16, p. 095-108, Dez. 2011.

LUSHCHAK, O.V. et al. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Drosophila melanogaster larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 160, p. 27–34, 2011.

MACHADO, L. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MACKAY, T.F.C; ANHOLT, R.R.H. Of flies and man: Drosophila as a model for human complex traits. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 7, p. 339-367, 2006.

MADABATTULA, S.T., et al. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a *Drosophila* Model of Neurodegenerative Disorders. **J. Vis. Exp.** Disponível em: doi:10.3791/52741 (2015). Acesso em: 25 de nov. 2020.

MENON, A.M., SANCHES, A.F.M. Tratamento da Depressão no Idoso. **Psychiatry online Brazil**.1998.

MOREIRA, R.F.A. Insulina: aspectos históricos e moleculares. In: De Maria C.A.B. Moreira, R.F.A., Marcilio, R. **Bioquímica do diabetes melito**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011.

MORRIS, S.N.S, et al. Development of diet-induced insuli resistance in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis**, v. 1822, p. 1230-1237, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**.6.ed. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, M.M; MESQUITA, M.M Incidence of metabolic syndrome in patients using the services of the clinical laboratory of PUC of Goiás state. **RBAC**. Disponível em: 10.21877/2448-3877.201800738. Acesso em: 02 de dez: 2020.  
of metabolic health. **Mol Metab.**, v. 2, p. 337-347, 2013.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues bythiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. p.351-358.

OLIVEIRA, V.P, et al. Reflexões sobre a relação entre resistência à insulina, diabetes mellitus e obesidade na adolescência à luz da literatura. Revista Eletrônica Acervo Saúde / **Electronic Journal Collection Health**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.25248/reas.e2105.2020>. Acesso em: 26 de nov. 2020.

OMS – organização mundial da saúde. Alimentação saudável. 2019. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5964:folh-a-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5964:folh-a-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839). Acesso em: 22 de nov. 2020.

PALAWLK, W.; et al. Effect of long term bed rest in mano n enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation eritrocytes 1998. In: SALVADOR, M., HENQUIQUES, J.A. P. **RADICAIS LIVRES E A RESPOSTA AO EXTRESSE OXIDATIVO**. ULBRA, Canoas, 2004.

PANCHAL, K., TIWARI, A. K. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plantderived components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v,89, p.1331–1345, 2017.

PARRICH, S; COLLEGE, Mc.D. Neurodegeneração: *Drosophila* como modelo para doenças humanas. Disponível em:

<http://modencode.sciencemag.org/drosophila/memory2/>. Acesso em 03 de dez. 2020.

PARRISH, S.; COLLEGE, MC.Daniel. Neurodegeneration: *Drosophila* as a Model for Human Disorders. **modENCODE**. 2020. Disponível em: <http://modencode.sciencemag.org/drosophila/memory2/>. Acesso em 30 de nov. 2020.

PERL, D.P. Neuropathology of Alzheimer's disease. **Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 77, n. 1, p. 32-42, 2010.

POIRIER, J. et al. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 2, p. 3-10, 2014.

POLACOW, V.O.; JUNIOR, A.H.L. Dietas Hiperglicídicas: Efeitos da Substituição Isoenergética de Gordura por Carboidratos Sobre o Metabolismo de Lipídios, Adiposidade Corporal e Sua Associação com Atividade Física e com o Risco de Doença Cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v51n3/a06v51n3.pdf> . Acesso em 22 de nov. 2020.

PORTELA, K. et al., Aumento da ingestão de açúcar afeta a capacidade da *Drosophila melanogaster* sobreviver em condições críticas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p.68875-68885, 2020.

PRADO, W.L. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

PRUBING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J.B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Mol Neurodegeneration**, v.8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35>. Acesso em: 04 de dez. 2020.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2005,. Disponível em doi: 10.1016 / j.parkreldis.2004.10.012. Acesso em: 26 de nov. 2020.

REDDY, P. H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. **Brain research**, v. 1415, p. 136-148, 2011.

RODEN, M; BERNROIDER, E. Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 365-383, 2003.

ROSINI, T.C; SILVA, A.S.R.; MORAES C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Rev Assoc Med Bras**. v. 58, p.383-387, 2012.

ROVENKO, B.M. et al. High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 180, p. 75–85, 2015.

SALGUEIRO, A.C.F., et al. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 81-87, 2013.

\_\_\_\_\_. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, article id 8902954, Dec 2015.

SALVADOR, M. e HENRIQUES J.A. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. ULBRA, Canoas, 2004.

SANTOS, C.R.B. et al. Dietary factors in preventing and treating comorbidities associated with the metabolic syndrome. **Rev. Nutr.** V,19 n,3, 2006.

SARTORELLI, D.S; CARDOSO, M.A. Association between dietary carbohydrates and type 2 diabetes mellitus: epidemiological evidences. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v,50 n, 3, 2006.

SCHIAVO, M; LUNARDELLI, A; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SCHUSTER, J; OLIVEIRA, de M.A; BOSCO, S.M. O papel da nutrição na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio grande do Sul**. n, 28, 2015.

SCHWENK, R. W.; VOGEL, H.; SCHURMANN, A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Mol Metab.**, v. 2, p. 337-347, 2013.

SERENIKI, A.; VITAL, M.A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr RS**, 2008.

SIEBER, M.H, THUMMEL, C.S. O receptor nuclear DHR96 controla a homeostase do triacilglicerol em *Drosophila*. **Cell Metab**, p. 481-490, 2009. Disponível em: doi: 10.1016 / j.cmet.2009.10.010. Acesso em 04 de dez. 2020.

SMITH, M.A et al. Amyloid- $\beta$  deposition in Alzheimer's transgenic mice is associated with oxidative stress. **J. neurochem**, v, 70, p 2212-2215, 1998.

SOARES, J. J. et al. Continuous liquid feeding new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Analytical Biochemistry**, v. 537, p. 60-62, 2017.

SOUZA, C.F.M.; et al. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. *Rev Neurocienc*, V, 4, p, 718-723, 2011.

SOUZA, M.F.C, ET AL., Parkinson's disease and the Process of Aging Motor: Literature Review. **Neurocienc**, v.1, p.718-723, 2011.

SUN, X; JIN, L; LING, P. Review of drugs for Alzheimer's disease. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 6, n. 6, p. 285-290, 2012.

TORRÃO, A. S. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. Official **Journal of the Brazilian Psychiatric Association**, V 34, 2012.

TRAN, J; ANASTACIO, H; BARDY, C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. **NPJ Parkinson's Disease**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41531-020-0110-8>. Acesso em: 30 de nov. 2020.

TRINH, I.; BOULIANNE, G. L. Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 28, n. 2, p. 117–124, mar. 2013.

WHITWORTH, A.J; WES, P.D; PALLANCK, L.J. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. **Drug Discov Today.**, v,11, p.119-126, 2006.