UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

O EFEITO DOS ÁCIDOS EICOSAPENTANÓICO (EPA) E
DOCOSAHEXANÓICO (DHA) EM MITOCÔNDRIAS SUBMETIDAS
AOS PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS

DOUTORANDO: ANDERSON DE OLIVEIRA SOUZA
ORIENTADORA: PROFa. Dra. LUCIANE CARLA ALBERICI

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

ANDERSON DE OLIVEIRA SOUZA

O EFEITO DOS ÁCIDOS EICOSAPENTANÓICO (EPA) E
DOCOSAHEXANÓICO (DHA) EM MITOCÔNDRIAS SUBMETIDAS
AOS PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências, ênfase em Bioquímica.
Orientadora: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Ribeirão Preto – SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Souza, Anderson de Oliveira

O efeito dos Ácidos Eicosapentanoico (EPA) e Docosahexanoico (DHA) em mitocôndrias submetidas aos processos neurodegenerativos. Ribeirão Preto, 2019. 139 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Carla Alberici, Luciane.

1. Ácidos Eicosapentanoico (EPA) e Docosahexanoico (DHA) . 2. Mitocôndria. 3. *Drosophila melanogaster*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Anderson de Oliveira Souza

Título: O efeito dos Ácidos Eicosapentanoico (EPA) e Docosahexanoico (DHA) em mitocôndrias submetidas aos processos neurodegenerativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, ênfase em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Carla Alberici

Aprovado em _____ de _____ de 20_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico essa tese a todos que acreditam na educação
como ferramenta de transformação de uma nação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela imensa paz transmitida nos momentos de angústia.

À minha esposa Camila pelo intenso suporte e amor durante esse período...é impressionante o quanto você vibrou comigo, a cada resultado de experimento, artigo aceito, a bolsa no exterior...muito obrigado meu amor, te amo muito!!!. Ao meu filho, meu pequeno menino, a grande realização de Deus em minha vida, Bruninho...o papai te ama muito, tenho por ti um amor incondicional, não consigo explicar, somente sentir!!!

Aos meus pais que abriram mão de bens materiais para oferecer o maior das riquezas, a educação...Aos meus irmãos, André e Adriano por todo suporte neste período. Agradeço às minhas cunhadas (meia irmãs) Gleiciane e Deisiane, bem como a minha sobrinha Vitória e sobrinhos Flavinho e Arthur por todo apoio...muito obrigado, amo vocês!!!

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela a liberação de minha funções para a realização de tal capacitação como docente e pesquisador, tenho certeza que tenho muito a oferecer à UFAM após o período de doutoramento.

Ao Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) pelo suporte durante o período de doutoramento e especial aos professores e grandes amigos que tenho no ISB, Adriano Pereira Guilherme, Deniz dos Santos Mota, Mayline Menezes da Mata, Verena Silva Lima, Irlei dos Santos, Regina Coeli da Silva Vieira, Natasha Verdasca Meliciano, Olavo Pinhatti Colatreli, Adriana Dantas Gonzaga de Freitas, Kemilla Sarmiento Rebelo, Cleber Araújo Gomes, Daiane Nascimento de Castro, Marinaldo Pacifico Cavalcanti Neto, Josemar Gurgel da Costa e Tânia Valeria de Oliveira Custodio, muito obrigado!!!.

Ao Alessandro dos Santos Pin, um colega de profissão que conheci no ISB e que hoje é um grande amigo, por quem tenho profunda admiração, muito obrigado!!!

À Profa Dra Luciane Carla Alberici, a qual chamo de mãe científica...muito obrigado pela grande mudança que proporcionou em minha

carreira, acredito que durante esse período de doutoramento, sua habilidade de pesquisadora ficou incorporado em minha maneira de ver um resultado. Muito obrigado!!!

Aos parceiros e colegas de Laboratório, Bruno Gonzaga Teodoro, Camila Pederiva Rossignoli, Carlos Roberto Porto Dechandt, Gustavo Ferrari, Jonathas Rodrigues, Igor Hayashibara Sampaio, Simone Takahasi e Anderson Vulczak aprendi com cada um de vocês, muito obrigado!!!. Aos colaboradores Carlos Henrique (Caique), Nilton, Mário, Douglas, Camila Brandão, Flávia, Niele, Jackeline, Carmen e Sônia...os quais tive a honra de conhecer e trabalhar...muito obrigado!!!

Aos técnicos de Laboratório da Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que sempre de forma prestativa me ajudaram no desenvolvimento desta tese. Agradeço à Cris, Ana, Luciana Ceribeli, Luciana Angulo, Alcides, Denise (secretaria do Departamento de Bioquímica - FCFRP) e especialmente à Dona Nadir...ainda sinto falta de seu café.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCFRP/USP, Profa Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, Profa Dra. Carolina Patrícia Aires, Prof Dr. Carlos Curti, Profa Dra. Yara Maria Lucisano Valim e Prof Dr. Sérgio Akira Uyemura, bem como a Profa Dra. Maria José Alves da Rocha (Faculdade de Odontologia – FORP/USP) que permitiram meu livre acesso aos laboratórios facilitando a obtenção de resultados.

Aos grandes responsáveis pelo meu atual conhecimento em *Drosophila melanogaster*, Carlos Antônio Couto-Lima, muito obrigado pela forte amizade que foi formada durante o período de doutoramento, te agradeço pelas orientações no cultivo e manejo das “mosquinhas”, muito obrigado!!!. Ao Dr. Maiaro Cabral Rosa Machado pela amizade e grande parceria na bancada, infelizmente foi por pouco tempo.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina pelo conhecimento transmitido nas aulas e em especial a Ivone pelo o suporte em diferentes aspectos acadêmicos, muito obrigado Ivone!!!

Ao Prof Dr Yaël Grosjean pela intensa orientação durante o período de estágio no Grupo Receptores Olfatórios na Universidade de Bourgogne. Ainda, agradeço aos demais pesquisadores, Martine Grosjean, Gerrard Manière, George Alves, Dehbai Abed-Vieillard pela calorosa recepção e pelas orientações em inglês/francês. Agradeço aos técnicos Serge Loquin e Charlene pelo grande suporte na cultura de *Drosophila melanogaster*, bem como nos experimentos...me sinto privilegiado em conhece-los.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa, bem como pelo processo 88881.189959/2018-01, o qual propiciou a incrível oportunidade de elaborar essenciais experimentos na Universidade de Bourgogne, na França.

ÍNDICE DE FÍGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática dos diferentes tipos celulares do Sistema Nervoso Central (SNC).....	21
Figura 2. Aspectos morfológicos e metabólicos das mitocôndrias.....	24
Figura 3. Geração de EROs nas mitocôndrias e sistema antioxidante mitocondrial.....	25
Figura 4. Dinâmica mitocondrial em neurônios.....	26
Figura 5. Estrutura de monômeros A β , fibrilas e oligômeros.....	29
Figura 6. Via proteolítica da APP em humanos na via não-amiloidogênica e na via amiloidogênica.....	32
Figura 7. Estrutura química do Paraquat.....	36
Figura 8. Ciclo redox do Paraquat (PQ).....	37
Figura 9. Estruturas químicas planares dos ácidos graxos poli-insaturados DHA e EPA.....	40
Figura 10. Ferramenta genética em <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Figura 11. Aspectos morfológicos de <i>Drosophila melanogaster</i>	43
Figura 12. Distribuição de neuroblastos no SNC de <i>D. melanogaster</i>	45
Figura 13. Sistema de contracorrente.....	46
Figura 14. Parâmetros respiratórios mitocondriais de tóraces de <i>D. melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	53
Figura 15. Parâmetros respiratórios mitocondriais de cabeças de <i>D. melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	54
Figura 16. Detecção de peróxido de hidrogênio com N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red).....	56
Figura 17. Sobrevivência e habilidade de escalada de <i>Drosophila melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	65
Figura 18. Parâmetros respiratórios mitocondriais de tóraces de <i>D. melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	67

Figura 19. Atividade de Citrato Sintase (CS) em <i>Drosophila melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	67
Figura 20. Parâmetros respiratórios mitocondriais de cabeças de <i>D. melanogaster</i> alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	69
Figura 21. Níveis de expressão de RNAm de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial, biogênese e metabolismo de Ca^{2+} em tóraces de <i>D. melanogaster</i>	70
Figura 22. Parâmetros de oxidação/redução nos tóraces e cabeças de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	71
Figura 23. Produção de H_2O_2 em cabeças de <i>D. melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	73
Figura 24. Concentração de lactato em cabeças de <i>D. melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	73
Figura 25. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) no tórax e cabeça de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	75
Figura 26. Cabeças de <i>D. melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	76
Figura 27. Análise da expressão da proteínas ELAV e α -spectrin por <i>Western Blotting</i>	78
Figura 28. Atividades de Monoamino oxidase (MAO) e Gama-secretase em cabeças de <i>D. melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	79
Figura 29. Concentração de fibrilas amilóides em cabeças de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	80
Figura S1. Distribuição de mitocôndrias e filamentos de actina/miosina em tóraces de <i>D. melanogaster</i> submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3.....	117
Figura S2. Reação catalítica da enzima citrato sintase (CS).....	118
Figura S3. <i>Western Blotting</i> – revelação das proteínas em Ponceau.....	119
Figura S4. <i>Western Blotting</i> – proteína elav.....	119

Figura S5. <i>Western Blotting</i> – proteína α -espectrina.....	120
Tabela 1. Desenho dos primers utilizados no estudo.....	63

RESUMO

SOUZA, AO. **O Efeito dos Ácidos Eicosapentanóico (EPA) e Docosahexanóico (DHA) em mitocôndrias submetidas aos processos neurodegenerativos.** 139f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O avanço na expectativa de vida da população elevou concomitantemente as manifestações de doenças neurodegenerativas, sendo Alzheimer a mais frequente. As condições clínicas mais importantes relacionadas aos pacientes acometidos por tal neurodegeneração, são as placas β -amilóides, os emaranhados neurofibrilares e a extensa perda neuronal, ocasionadas por fatores genéticos e/ou ambientais. A alimentação pode ser um fator desencadeador de demência, pois, a baixa ou longa exposição aos pesticidas incorporados aos alimentos promovem neurodegenerações em decorrência do estresse oxidativo gerado por tais produtos químicos, desenvolvidos para alterar o metabolismo em organismos não viáveis comercialmente na agricultura, denominados como pragas. Desta forma, um sistema de neuroproteção se faz necessário para minimizar e/ou reverter os danos desencadeados por agrotóxicos incorporados em alimentos rotineiramente consumidos.

Palavras-chave: Ácidos Eicosapentanóico (EPA) e Docosahexanóico (DHA); Mitocôndria; *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

SOUZA, AO. **The effect of Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexanoic (DHA) Acids on mitochondria submitted to neurodegenerative processes.** 139f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The advancement in the life expectancy of the population concomitantly increased the manifestations of neurodegenerative diseases, with Alzheimer being the most frequent. The most important clinical conditions related to the patients affected by such neurodegeneration are β -amyloid plaques, neurofibrillary tangles and extensive neuronal loss, caused by genetic and / or environmental factors. Feeding can be a trigger for dementia since the low or long exposure to pesticides incorporated into foods promote neurodegenerations due to the oxidative stress generated by such chemicals, designed to alter the metabolism in non-commercially viable organisms in agriculture, known as pests. In this way, a neuroprotection system is necessary to minimize and / or reverse the damage caused by pesticides incorporated into routinely consumed foods.

Key Words: Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexanoic (DHA) Acids; Mitochondria; *Drosophila melanogaster*.

SUMÁRIO

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA.....	16
2. INTRODUÇÃO.....	20
2.1 – PRINCÍPIOS DO METABOLISMO NEURONAL.....	20
2.2 – ALZHEIMER.....	28
2.2.1 – MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	30
2.3 – AGRICULTURA.....	34
2.4 – NEUROPROTEÇÃO.....	38
2.5 – <i>Drosophila melanogaster</i>	41
3. OBJETIVOS.....	48
4. METODOLOGIA.....	49
4.1 – CULTIVO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	49
4.2 – TESTE DE SOBREVIVÊNCIA E ESCALADA.....	51
4.3 – AVALIAÇÃO NOS NÍVEIS DA RESPIRAÇÃO CELULAR.....	51
4.4 – ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE.....	54
4.5 – AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	55
4.5.1 – PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂).....	55
4.5.2 – PRODUÇÃO DE GLUTATIONA NO ESTADO REDUZIDO (GSH) E OXIDADO (GSSG).....	56
4.5.3 – PROTEÍNA CARBONILADA.....	57
4.6 – PRODUÇÃO DE LACTATO.....	58
4.7 – ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	58
4.8 – ATIVIDADE DA MONOAMINO OXIDASE (MAO).....	59
4.9 – ATIVIDADE DA GAMA-SECRETASE.....	60
4.10 – CONCENTRAÇÃO DE FIBRILAS AMILÓIDES.....	60
4.11 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR <i>Western Blotting</i>	61
4.12 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	62
4.12.1 – IMUNOHISTOQUÍMICA.....	62
4.12.2 – MICROSCOPIA CONFOCAL.....	62
4.13 – ASPECTOS MOLECULARES.....	63

4.13.1 – REAL TIME PCR.....	63
4.14 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	64
4.15 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5. RESULTADOS.....	65
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÃO.....	90
8. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	91
9. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....	115
10. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	117
11. RELATÓRIO DE ATIVIDADES – BOLSA CAPES (PDSE).....	121

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

Nos tempos primórdios do planeta Terra, a vida surgiu e dependeu exclusivamente na garantia de ingestão de energia suficiente para permitir o crescimento, movimento e reprodução (LIEBERMAN et al., 2009). Ao longo da evolução, diferentes formas de vida têm se esforçado para consumir energia e oxigênio de forma adequada e esta continua a ser um grande desafio para muitas espécies (KREBS, 2009; BRAAKMAN; SMITH, 2013). Os humanos modernos são particularmente bem adaptados para armazenar energia excedente proveniente de alimentos, sendo o único animal com habilidade para cultivar, cozinhar e fabricar seu alimento (KREBS, 2009; ROBBINS; SAVAGE, 2015; MASLIN et al., 2015).

O avanço de técnicas e uso de substâncias que defendam a agricultura contra pragas iniciaram na Segunda Guerra Mundial e trouxeram mudanças no modo de trabalho no campo, posteriormente refletiram na saúde da população, pois os pesticidas foram desenvolvidos para impactar o metabolismo de organismos comercialmente não viáveis, porém a preservação de tais moléculas nos alimentos impactou igualmente diversas condições fisiológicas humanas (STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005; MIRANDA et al., 2007).

A exposição aos pesticidas é considerada como um dos fatores de risco ambientais na etiologia das doenças neurodegenerativas (revisado por JETT, 2011), particularmente a doença de Alzheimer, DA (YAN et al., 2016). Registrando aproximadamente 80% dos casos de demência, a DA é a doença neurodegenerativa mais comum (REITZ; MAYEUX, 2014), a qual é caracterizada pela deterioração da função cognitiva e comprometimento na memória devido ao

acúmulo extracelular de placas β -amilóides, formação de amaranhados intraneuronais de proteínas tau hiperfosforiladas, bem como no elevado estresse oxidativo neuronal, resultando em uma deficiência na transmissão colinérgica (PARIHAR; BREWER, 2007; CHAKRABORTY et al., 2011; ENGEL, 2014; VENIGALLA et al., 2015; REGLODI et al., 2015).

Atualmente estima-se em 44 milhões de pessoas no mundo possua algum tipo de neurodegeneração e este número pode dobrar no prazo de 20 anos (MONTOLIU-GAYA; VILLEGAS, 2015). No Brasil, o último levantamento realizado demonstrou que as taxas de incidência de doenças neurodegenerativas na população com mais de 65 anos foram de 7,1%, sendo a doença de Alzheimer responsável por 55% dos casos registrados, já em São Paulo estima-se 7,7 por 1000 pessoas com o diagnóstico para Alzheimer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Embora os dados epidemiológicos tenham apontado para o herbicida Paraquat (PQ) como fator de risco para DA (BALDI et al., 2013; HAYDEN et al., 2010), experimentos científicos demonstraram que a exposição ao PQ aumenta os níveis de placas β -amilóides, induz disfunção mitocondrial e dano oxidativo especificamente nas mitocôndrias, sendo tais eventos diretamente correlacionados com o aprendizado e memória (CHEN et al., 2012). O comprometimento da síntese de ATP mitocondrial é uma condição típica no envelhecimento, bem como de processos neurodegenerativos (JOHRI; BEAL, 2012).

Alguns nutrientes nos alimentos podem proteger as mitocôndrias dos danos oxidativos, melhorando o metabolismo aeróbico ou limitando a produção de

espécies reativas de oxigênio (EROs) (SULIMAN; PIANTADOSI, 2016). Entre estes, os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 destacam-se por ser facilmente incorporados nas células, bem como por contribuir para a alteração na composição dos fosfolipídeos nas membranas, promovendo efeitos associados à insaturação da cadeia acíclica, com consequente alteração da fluidez das membranas mitocondriais e vazamento de prótons (GOGUS; SMITH, 2010) importante evento na formação do gradiente de prótons no espaço intermembranar da mitocôndria para a síntese de ATP. O Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e Docosahexanóico (DHA) são ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa responsáveis por promover vários benefícios nas funções cerebrais, como a redução na fração de colesterol nas membranas neuronais, facilitando assim, a liberação de neurotransmissores (ZHANG et al., 2011), atuar como um fator neurotrófico (ZHANG et al., 2016) e são considerados uma estratégia preventiva para doenças neurodegenerativas (INNIS, 2008) como depressão (DEACON et al., 2017; McNAMARA, 2016), esquizofrenia (PAWELCZYK et al., 2016) e desordens psiquiátricas associadas com inflamação (MATSUOKA et al., 2016).

Nesse sentido, avaliamos o efeito protetor de EPA e DHA em mitocôndrias frente a intoxicação ao PQ, herbicida comercialmente utilizados nas culturas vegetais. Para tanto, utilizamos técnicas de respiração tecidual, enzimologia, biologia molecular e comportamental, os quais proporcionaram importantes informações a respeito dos efeitos de DHA e EPA nas mitocôndrias musculares e

cerebrais em *Drosophila melanogaster*, prevenindo e/ou minimizando doenças neurodegenerativas em modelos animais, como a DA.

2. INTRODUÇÃO

2.1 – PRINCÍPIOS DO METABOLISMO NEURONAL

Durante a transição evolutiva dos animais ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) para endotérmicos (aves e mamíferos), houve um aumento no consumo de alimento e de oxigênio, com isso, maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BARJA et al., 2004; BAKKEBO et al., 2015; MASLIN et al., 2015), essencial condição para a diferenciação celular, favorecendo assim, a composição de organismos dinâmicos com tecidos especializados, como o sistema nervoso (MARTIN, 1983; LAKE, 2015).

O cérebro é um tecido formado por uma complexa rede de células nervosas (neurônios), as quais são altamente diferenciadas e possuem três distintos domínios funcionais; corpo celular (contendo um núcleo, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, mitocôndrias e lisossomos); um longo axônio (mielinizado ou não-mielinizado) e numerosas regiões sinápticas denominadas como dendritos (SAXTON; HOLLENBECK, 2012; WU et al., 2013). Sabe-se que os neurônios estão associados com as células da glia (*cola* do Grego), sendo tais incapazes de gerar potencial de ação, mas podem responder as diferentes atividades nervosas (TREVISIOL; NAVE, 2015). Em vertebrados, as células da glia são classificadas mediante a morfologia e critérios moleculares, no sistema nervoso periférico (SNP) são denominadas células de Schwann, por outro lado, no sistema nervoso central (SNC) geralmente se dividem em três outras categorias: oligodendrócitos, as quais mielinizam os neurônios; astrócitos, que se estendem em processos envolvendo vasos sanguíneos e neurônios; e micróglias,

células destinadas com o funcionamento da capacidade imune no SNC (**Figura 1**) (SHAHAM, 2005).

Figura 1: Representação esquemática dos diferentes tipos celulares do Sistema Nervoso Central (SNC). Astrócitos e oligodendrócitos são células gliais do SNC. Astrócitos são células estreladas com numerosos acessos de comunicação com outros tipos celulares como os neurônios, realizando essa interação pelo corpo celular, dendritos e axônios ou com oligodendrócitos pelo corpo celular. Oligodendrócitos são células mielinizantes, ou seja, responsáveis pela formação de mielina ao redor dos axônios. Os neurônios recebem sinais através de seus dendritos e enviam informações nervosas “sinais” para outros neurônios ou fibras musculares inervadas através de seus axônios e sinapses (seta). Microglia são pequenas células intersticiais não neuronais de várias formas que são migratórias e agem como fagócitos para remover produtos residuais do tecido nervoso, ainda, estão envolvidas na formação da barreira hematoencefálica (Retirado e modificado a partir de ECHTEN-DECKERT; HERGET, 2006).

O aprendizado e formação da memória são fundamentais processos biológicos desempenhados pelo cérebro, os quais contribuem para a sobrevivência da espécie sob mudanças ambientais (SCHOENEMANN, 2006). O cérebro é crucial na realização desta função, pois mediante os processos de informação através do visual, audição, olfato, paladar e outros sistemas sensoriais o aprendizado e memória serão formados no SNC (ZHANG et al., 2015).

O SNC é um tecido com elevada taxa metabólica, comparado aos outros órgãos do corpo, considerando que este utiliza aproximadamente 20% do oxigênio total consumido (JAIN et al., 2010) para a síntese de adenosina trifosfato (ATP) requerida pelo SNC para manter o gradiente iônico da membrana celular, promover a neurogênese, diferenciação celular, formação de dendritos e axônios, bem como a exocitose de neurotransmissores nas extremidades dos neurônios (BOLISSETTY; JAIMES, 2013; GEHRKE et al., 2015; RAJASEKARAN et al., 2015; XAVIER et al., 2015).

O ATP é gerado principalmente pelo metabolismo oxidativo da glicose, porém quando silenciadas algumas enzimas da glicólise (aldolase e piruvato quinase) em células gliais, a dependência energética por glicose é inesperadamente dispensável nos neurônios (PEI et al., 2015; TREVISIOL; NAVE, 2015; XAVIER et al., 2015). Os neurônios podem usar substratos alternativos além da glicose, tais como lactato, piruvato e corpos cetônicos, particularmente em condições de aumento na demanda energética e limitada disponibilidade de glicose, como durante um exercício físico, jejum, hipoglicemia ou hipóxia/isquemia (STOCCHETTI et al., 2015).

A geração de ATP destinado aos diferentes mecanismos celulares acontece nas mitocôndrias, que são organelas semiautônomas, estruturalmente formada por quatro compartimentos: a membrana externa, espaço intermembranar, membrana interna e matriz mitocondrial (**Figura 2A**). Nesta última estão os ribossomos e DNA (DNAm_t), os quais estão envolvidos na síntese de algumas proteínas específicas para a formação dos complexos da cadeia respiratória (ou cadeia transportadora de elétrons, CTE), componente da membrana interna. Os referidos complexos proteicos (I-IV) juntamente com o Ciclo de Krebs (na matriz) são essenciais para a geração de um gradiente eletroquímico de prótons (H^+) através da membrana interna: a transferência de elétrons pela cadeia respiratória até o oxigênio molecular é acoplada ao transporte de H^+ da matriz para o espaço intermembranar (revisado por FRIEDMAN; NUNNARI, 2014). Uma vez formado, o gradiente eletroquímico de H^+ aciona o complexo V (ATP sintase), a qual catalisa a síntese de ATP, um processo denominado fosforilação oxidativa (**Figura 2B**).

Figura 2: Aspectos morfológicos e metabólicos das mitocôndrias. (A) Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. A membrana externa tem poros que a tornam permeável a moléculas pequenas e íons, mas não a proteínas. As convoluções (cristas) da membrana interna fornecem uma grande superfície. A membrana interna de uma única mitocôndria hepática pode ter mais de 10 mil conjuntos de sistemas de transferência de elétrons (cadeias respiratórias) e de moléculas de ATP-sintase distribuídos na superfície da membrana. **(B) O mecanismo eletroquímico para a síntese de ATP na mitocôndria.** Os elétrons movem-se por uma cadeia de transportadoras ligados a membranas espontaneamente, governados pelo alto potencial de redução do oxigênio e tratos reduzidos (combustível) que sofrem oxidação na mitocôndria. O fluxo de elétrons cria um potencial eletroquímico pelo movimento transmembrana de prótons e carga positiva. Esse potencial eletroquímico fornece energia para a síntese de ATP que ocorre por meio de uma enzima de membrana, a ATP-sintase (Retirado e modificado a partir de NELSON; COX, 2016).

Durante o transporte, os elétrons podem escapar da cadeia transportadora de elétrons e induzir a formação de ânion superóxido por meio da redução monoelétrica do oxigênio, ou seja, sob certas condições, as mitocôndrias podem contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) celular. Para evitar a produção de EROs excessiva e a consequente indução do

estresse oxidativo, as mitocôndrias possuem poderosos sistemas antioxidantes, enzimático e não enzimático, os quais preservam a homeostase redox celular (**Figura 3**) (revisado por LIEMBURG-APERS et al., 2015).

Figura 3: Geração de EROs nas mitocôndrias e sistema antioxidante mitocondrial. Em situações que o fluxo de elétrons não está em harmonia com a cadeia respiratória, o vazamento de elétrons é acentuado, com isso, a produção do radical superóxido (O₂^{•-}) aumenta nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona (Q) parcialmente reduzido doa um elétron para o oxigênio (O₂). Ainda, a enzima aconitase leva a formação do do radical hidroxil ([•]OH), fortemente reativo. O sistema antioxidante também atuante pela glutathione reduzida (GSH) doa elétrons para a redução de H₂O₂ e dos resíduos oxidados de cisteína de enzimas e outras proteínas. O GSH é regenerado a partir da forma oxidada (GSSG) por redução utilizando NADPH (Retirado e modificado a partir de NELSON; COX, 2016).

No ambiente celular, as mitocôndrias diferenciam-se das demais estruturas subcelulares por possuir potencial de membrana, mecanismos de fissão e fusão, transportar biomoléculas, bem como desencadear a biogênese e mitofagia (**Figura 4**) (BUNKAR et al., 2016). Tais dinâmicas são cruciais na distribuição, regulação e bioenergética mitocondrial, pois tais condições quando não reguladas podem desencadear disfunções mitocondriais, comprometendo a saúde celular (STEKETEE et al., 2012; SZCZEPANOWSKA; TRIFUNOVIC, 2015), incluindo doenças neurodegenerativas (TANNER et al., 2011; XAVIER et al., 2015; ZHANG et al., 2015^a; BUNKAR et al., 2016).

Figura 4: Dinâmica mitocondrial em neurônios. A dinâmica mitocondrial em neurônios é finamente regulada pela razão entre fusão, fissão, transporte mitocondrial e mitofagia. Mitocôndrias danificadas (em vermelho) podem ser restauradas pela fusão (1) com mitocôndrias saudáveis (em verde), um processo que ocorre principalmente no corpo celular dos neurônios e são direcionados pela mitofusina (Mfn) e *Optical atrophy 1* (OPA1). Mitocôndrias saudáveis são

transportadas nos axônios do corpo celular para as sinapses pelo sistema de transporte axonal anterógrado (2), sendo auxiliada principalmente pela proteína motora kinesina. Mitocôndrias envelhecidas ou danificadas podem sofrer fissão (3) direcionadas pela *Dynamin-related protein 1* (DRP1) e *Fission 1 homologue protein* (Fis1) e tais organelas são trazidas de volta ao corpo celular neuronal pelo sistema de transporte axonal retrógrado (4), sendo auxiliada principalmente pela proteína motora dineína. Em condições de danos irreversíveis no DNA mitocondrial, a referida organela é destinada ao autofagossomo (5) (Retirado e modificado a partir de DEVOTO; FALZONE, 2017).

Alterações no metabolismo neuronal, especialmente na dinâmica mitocondrial (CHAN et al., 2015; CHINNERY, 2015), fosforilação oxidativa e estresse oxidativo são associados com o envelhecimento e diversas doenças neurológicas humanas (BARBOSA et al., 2010; PEI et al., 2015; RAJASEKARAN et al., 2015). Outro importante fator para o desenvolvimento de neurodegenerações está relacionada a baixa ou longa exposição aos pesticidas (BALTAZAR et al., 2014), produtos químicos elaborados para a geração de estresse oxidativo em organismos não viáveis comercialmente na agricultura, também denominadas como pragas (SKRZYPCZAK et al., 2011).

O papel da exposição aos pesticidas na gênese das doenças neurodegenerativas têm sido examinados para Parkinson (TANNER et al., 2011; BALTAZAR et al., 2014) e Alzheimer (CHAN et al., 2015^a). Em decorrência de tal exposição, os neurônios são submetidos a momentos energéticos desfavoráveis com substratos insuficientes, com isso, eventos como aumento no estresse oxidativo (BENANI et al., 2009), redução da sinapse neuronal, hiperfosforilação da proteína tau (PARIHAR; BREWER, 2007), alterações na transmissão específica de neurotransmissores como os colinérgicos, noradrenérgicos e somatostatinérgicos (McKHANN et al., 1984), bem como a elevação nas

concentrações de placas β -amilóides características marcantes da doença de Alzheimer (STROOPER; ANNAERT, 2000; CHAKRABORTY et al., 2011; ENGEL, 2014).

2.2 – ALZHEIMER

Nas últimas décadas, a expectativa de vida aumentou em decorrência das melhorias na alimentação e medicina. Porém, tais benefícios favoreceram um crescente número de pessoas com doenças neurodegenerativas, como Parkinson e a doença de Alzheimer (DA) (CHAN et al., 2015). A primeira descrição feita por Alois Alzheimer em 1906, tratava-se de uma paciente de 50 anos de idade, a qual apresentava uma sintomatologia paranóica associada com distúrbios do sono, comprometimento cognitivo relacionados com a memória e esporádicas manifestações de intensa agressividade (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003).

Atualmente, a DA representa a mais prevalente disfunção neurológica em pacientes com idade avançada, sendo caracterizada pela presença de demência progressiva incluindo episódios de danos na memória e o envolvimento de outras habilidades e domínios cognitivos, comprometimento na transmissão colinérgica com a redução nos níveis de acetilcolina, bem como a formação de estruturas neurofibrilares e placas senis associadas com perda de aspectos sinápticos, sugerindo que esses efeitos estejam relacionados com o enovelamento incorreto da proteína β -amilóide ($A\beta$) extracelular e consequente depósito em fibrilas de amilóides (**Figura 5**) em regiões susceptíveis do cérebro, tais como hipocampo, amígdala e prosencéfalo basal (revisado por ZARROUK et al., 2017; revisado por APETZ et al., 2014; revisado por CHEN et al., 2017).

Figura 5: Estrutura de monômeros A β , fibrilas e oligômeros. (A) A sequência primária de aminoácidos da isoforma A β 42 de 42 aminoácidos, A β engloba um grupo de peptídeos que variam em tamanho de 37 a 49 resíduos. (B) A estrutura do peptídeo A β (1-28) forma uma estrutura predominantemente alfa-helicoidal que pode ser convertida em uma estrutura de folha beta, sendo esta estrutura o principal componente proteico de depósitos de amilóide na DA. (C e D) Estruturas de peptídeos A β (1-40) e (10-35), nas quais as forças van der Waals e eletrostáticas mantêm sua estabilização conformacional. (E) Proposta de via responsável pela conversão de monômeros A β em oligômeros, protofibrilas e fibrilas (Retirado e modificado a partir de CHEN et al., 2017).

Existem duas formas reconhecidas de DA, a primeira denominada familiar ou de início precoce, na qual inicia-se em pacientes com menos de 65 anos sendo caracterizada por mutações nos genes da proteína precursora de amilóide (APP) e presenilina (PSEN), sendo ambas responsáveis pela síntese dos peptídeos β -amilóides (STROOPER; ANNAERT, 2000; CHAN et al., 2015). Por outro lado, a segunda e mais comum forma DA não é causada por mutações pontuais, mas possa estar relacionada com a redução do estrogênio na menopausa (PAGANINI-

HILL; HENDERSON, 1994; MERLO et al., 2017), estilo de vida (ARAB; SABBAGH, 2010; revisado por FLICKER, 2010) e alguns fatores de risco genéticos, os quais têm sido descritos como polimorfismos em ApoE (responsável por codificar Apolipoproteína E), SORL1 (codifica o receptor neuronal para ApoE), GSK3 (gene codificador da glicogênio sintase quinase 3, enzima responsável por fosforilar a proteína tau) (PARIHAR; BREWER, 2007; CHAKRABORTY et al., 2011; CHAN et al., 2015), bem como a redução da função colinérgica (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).

2.2.1 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

As proteínas precursoras de amilóides (APP) são conhecidas como um dos principais fatores no desenvolvimento da DA em decorrência da neurotoxicidade geradas pelo o acúmulo de peptídeos beta amilóides (A β) (revisado por O'BRIEN; WONG, 2011). Três tipos de RNAm para a expressão de APP tem sido encontrado no cérebro humano e através de *splicing* alternativo no gene APP três isoformas contendo 695, 751 e 770 aminoácidos são produzidos, sendo a isoforma APP₆₉₅ encontrada em maior proporção no sistema nervoso (TANAKA et al., 1989). As proteínas APP são mais abundantes no cérebro, principalmente em neurônios e consistem de um domínio na membrana plasmática, sendo um dos três membros de genes mais expressos em humanos, os outros dois compõem proteínas relacionadas com APP (APLPs) APLP1 e APLP2, implicadas como reguladores da formação e reparo sináptico e transporte neuronal anterógrado (revisado por CHEN et al., 2017; revisado por O'BRIEN; WONG, 2011).

A clivagem de APP pode ocorrer por duas vias metabólicas alternativas – via não-amiloidogênica e via amiloidogênica – sendo mediada pelo menos por três enzimas proteolíticas: α , β e γ -secretases. Na via não-amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre sob ação da enzima α -secretase na superfície celular, na qual uma porção N-terminal grande e solúvel (sAPP α) é liberada, aumentando a resposta da atividade elétrica e a ativação de receptores muscarínicos para acetilcolina, posteriormente a sAPP α é clivada pela γ -secretase (revisado por O'BRIEN; WONG, 2011) liberando um pequeno peptídeo (P3) correspondendo aos resíduos A β 17-40 e A β 14-42 aminoácidos, os quais apresentam baixa propensão para se agruparem em oligômeros estáveis, evoluindo então diretamente para agregados fibrilares (DULIN et al., 2008). Na via amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre sob ação da enzima β -secretase na porção aminoterminal onde um fragmento sAPP β é liberado, a porção C-terminal é clivado pela γ -secretase, originando o peptídeo A β (**Figura 6**) de 37 a 49 aminoácidos (revisado por CHEN et al., 2017). A produção exagerada de peptídeos A β e sua posterior agregação nos neurônios, favorecem a formação das placas amilóides e consequente atrofia cerebral (particularmente no hipocampo e nos lobos temporais e parietais) encontradas em análises *postmortem* em cérebros de pacientes com DA (SATO; MORISHITA, 2015; revisado por CHEN et al., 2017).

Figura 6: Via proteolítica da APP em humanos na via não-amiloidogênica e na via amiloidogênica. A via não-amiloidogênica de APP refere-se ao processamento sequencial de APP por α -secretases ligadas à membrana, que clivam dentro do domínio A β para gerar o fragmento terminal CTF α (C83) ligado à membrana e o fragmento N-terminal sAPP α . O CTF α é então clivado pelas γ -secretases para gerar o peptídeo P3 extracelular e o domínio intracelular da APP (AICD). Por outro lado, a via amiloidogênica da APP é realizada pela ação sequencial das β - e γ -secretases ligadas à membrana. A β -secretase cliva a APP nos fragmentos C-terminais ligados à membrana (CTF β ou C99) e no terminal N sAPP β . A CTF β é subsequentemente clivada pelas γ -secretases no domínio intracelular extracelular A β e APP (AICD) (Retirado e modificado a partir de CHEN et al., 2017).

Aproximadamente 1/3 dos pacientes diagnosticados com DA apresentam um padrão de herança monogênica autossômica dominante, geralmente são acometimentos precocemente e com probabilidade hereditária de 50%, ou seja, a chance de ter filhos igualmente afetados pela doença (SERENIKI; VITAL, 2008). Além das condições fisiopatológicas conhecidas, sintomas neuropsiquiátricos são reconhecidos como fundamentais para o diagnóstico de pacientes com Alzheimer, sendo identificadas como quatro diferentes sub-síndromes: hiperatividade (agressão, irritabilidade e euforia), psicose (alucinações e comprometimento no

sono), afetiva (depressão e ansiedade) e apatia (apatia e desordens no apetite) (ZHAO et al., 2016).

A disponibilidade de terapias farmacológicas, denominadas como drogas antidemência, para processos neurodegenerativos são somente sintomáticas, ou seja, os benefícios clínicos são temporários sob os aspectos cognitivos, funcionais, comportamentais e manifestação da doença (APRAHAMIAN et al., 2013). Por outro lado, recentes estudos se concentram em abordagens nutricionais para beneficiar pacientes com DA, muitos dos trabalhos relacionam as deficiências de nutrientes dietéticos específicos, como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados (DHA e EPA) associadas à perda de memória e outras deficiências cognitivas em idosos, e acredita-se que agravam processos patológicos no cérebro com DA (revisado por APETZ et al., 2014).

Mediante tais aspectos, um número crescente de suplementos alimentares e medicamentos alopáticos à base de ervas vem sendo comercializados como possíveis tratamentos para retardar ou prevenir a DA, bem como outras condições relacionadas à memória, sendo que a maioria desses produtos são constituídos de alto teor vitamínico ou contêm ingredientes naturais, os quais tornam-se uma ótima opção para o consumidor regular que busca melhorar e/ou promover a manutenção da capacidade cerebral (BOTCHWAY et al., 2018).

2.3 – AGRICULTURA

Os animais precisam de contínua e adequada fonte de nutrição, as quais são essenciais para a manutenção de processos fisiológicos, como a neurogênese, mecanismo responsável pela plasticidade neuronal no hipocampo, uma região do cérebro destinada às funções cognitivas e permanentemente alterada em sua estrutura em decorrência da alimentação. Proteínas, carboidratos e lipídeos são os principais nutrientes que o organismo precisa para sobreviver, sendo estes obtidos de uma saudável e balanceada alimentação, rica principalmente em legumes e verduras importantes fontes de vitaminas e minerais (revisado por BOTCHWAY et al., 2018; SPENCER et al., 2017).

Desde o início da produção de alimentos de fonte vegetal, o maior problema enfrentado pelos produtores está relacionado com a fertilidade do solo cultivado, o qual diminui com o tempo (DESPOMMIER, 2009), sendo necessária a restauração dessas perdas por meio de fertilizantes, com isso, a implementação de tais suplementos químicos foram responsáveis por aumentos substanciais nos rendimentos (revisado por GEISSELER; SCOW, 2014), mas o uso de pesticidas sintéticos contribuiu para a segurança da produtividade no campo (CARVALHO, 2006).

Os pesticidas são agroquímicos usados intencionalmente em terras agrícolas no controle de plantas indesejáveis (ervas daninhas) e de organismos nocivos (pragas), mas muitos desses compostos podem causar efeitos colaterais em espécies não-alvo (NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016). Ainda, os

pesticidas são utilizados em programas de saúde pública para proteger seres humanos de várias doenças, como a dengue (DHRA et al., 2017).

O marketing desenvolvido nos efeitos dos pesticidas ampliou a utilização destes produtos, porém foi minimizado pela resistência dos insetos a estes compostos, bem como o acúmulo no meio ambiente e ação carcinogênica nos animais que consumiram alimentos cultivados em solos expostos aos pesticidas (STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005; MIRANDA et al., 2007).

Desde 2008, o mercado brasileiro de agrotóxicos apresenta uma rápida expansão, com aumento aproximado de 190% superando o mercado global que atingiu 93%, com isso, o Brasil destaca-se no ranking mundial como o maior consumidor de agrotóxicos (RIGOTTO et al., 2014). Dentre os pesticidas usados no Brasil, destacaremos o Paraquat (NEVES et al., 2010).

Paraquat (PQ, 1,1'-dimethyl-4-4'-bipyridinium dichloride) pertence a uma classe química das bipyridinas, um amônio quartenário caracterizado por duas ligações covalentes entre anéis de metilpiridina (**Figura 7**), sendo usado na agricultura pelo seu conhecido poder herbicida não seletivo e sua ação relacionada a capacidade de captar elétrons em reações de oxido-redução (BALTAZAR et al, 2014), como a oxidação de NADPH para NADP^+ durante a fotossíntese, com isso, o radical monocatión do PQ é formado ($\text{PQ}^{\bullet+}$), sendo rapidamente reoxidado e na presença de O_2 , origina ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o qual pode reagir com o óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$) formando peroxinitrito (ONOO^-) ou ser dismutado pela superóxido dismutase (SOD) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**Figura 8**). Na presença de metais, H_2O_2 é reduzido a radical hidroxil ($^{\bullet}\text{OH}$), um

dos EROs mais prejudiciais, pois, favorece a rápida oxidação do DNA, proteínas e lipídeos, consequentemente a morte celular (BLANCO-AYALA et al., 2014; BALTAZAR et al., 2014).

Figura 7: Estrutura química do Paraquat. (PQ, 1,1'-dimethyl-4-4'-bipyridinium dichloride) (Retirado e modificado a partir de BLANCO-AYALA et al., 2014).

Figura 8: Ciclo redox do Paraquat (PQ). Na fração citossólica, a toxicidade do PQ é mediada por sua redução pela ação do citocromo P450 redutase. O PQ interfere no fotosistema de transferência de elétrons intracelular através da inibição da redução do $NADP^+$ para NADPH, com isso, PQ^{2+} é reduzido para $PQ^{\bullet+}$, o qual reage espontaneamente com o oxigênio favorecendo a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Outras EROs como o peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\bullet OH$) são gerados durante a redução do PQ. EROs pode reagir com a membrana celular, causando peroxidação lipídica, contribuindo para o estresse oxidativo e redução nos níveis de GSH e NADPH (Retirado e modificado a partir de BLANCO-AYALA et al., 2014).

O mecanismo neurotóxico induzido pelo PQ não está claro, mas algumas vias são sugeridas, como a indução do estresse oxidativo (BLANCO-AYALA et al., 2014); disfunção mitocondrial (TANNER et al., 2011); apoptose e autofagia; inibição do sistema de ubiquitinação no proteossoma e indução da sinucleinopatia e tauopatia (BALTAZAR et al., 2014). Ainda, a toxicidade inerente ao PQ possa

estar relacionada ao fato desta molécula se inserir em diferentes regiões cerebrais (BLANCO-AYALA et al., 2014; CHAN et al., 2015^a).

2.4 – NEUROPROTEÇÃO

Atualmente, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que a ação neuroprotetora possa estar relacionada com a restauração do potencial de membrana mitocondrial, redução da secreção de peptídeos β -amilóides e/ou minimizar os efeitos do estresse oxidativo (CHAN et al., 2006; PARIHAR; BREWER, 2007; CASTRO et al., 2014; REGLODI et al., 2015).

Dentre os diferentes compostos usados na DA, tais como as vitaminas C (BAGI et al., 2003), B₁₂ (NADEAU; ROBERGE, 1988; IKEDA et al., 1992), E e selênio (KRYSCIO et al., 2013), *Ginkgo biloba* (ANDRIEU et al., 2008; VELLAS et al., 2012; SNITZ et al., 2009) e cafeína (PRASANTHI et al., 2010), uma ação neuroprotetora interessante pode ser obtida nos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), os quais são importantes para determinar a fluidez de membranas biológicas, aspecto crítico na modulação e processamento de APP (AFSHORDEL et al., 2015; DAVIS et al., 2015). Ainda, PUFAs podem ativar proteína quinase C (PKC), fosfolipase C (PLC) e Proteínas G (CHYB et al., 1999) mecanismos essenciais para promover a homeostase celular.

Estudos *in vivo*, indicam que o ω -3 provenientes de plantas e/ou organismos marinhos como peixes, mexilhões, ostras, camarões, mas principalmente de peixes de águas frias (WU; BECHTEL, 2008; GOGUS; SMITH, 2010), promovem uma extensa variedade de benefícios para a saúde humana,

principalmente voltadas para o aspecto antioxidante, proliferação neuronal durante o desenvolvimento fetal e neuroplasticidade em adultos (SCHOENEMANN, 2006; ECKERT et al., 2010; HASADSRI et al., 2013; PIERMARTIRI et al., 2015) bem como, favorecendo uma ativação no sistema PI 3-quinase/Akt (DYALL, 2015) . Por outro lado, em ratos idosos, a ingestão de ω -3 tem sido associada como um fator protetor frente a redução cognitiva do cérebro, bem como aos processos neurodegenerativos (WU et al., 2015).

Organismos como *Drosophila melanogaster* e mamíferos possuem a habilidade de sintetizar ácidos graxos monoinsaturados, mas não são capazes de sintetizar o ômega-3 devido à ausência da enzima n-3-desaturase, com isso, as PUFA's ômega-3 (ω -3) podem ser obtidas através de alimentos enriquecidos com tais biomoléculas (SHEN et al., 2010; HASADSRI et al., 2013; JANSSEN; KILIAAN, 2014).

Os ω -3 são incorporados por praticamente todas as células e podem contribuir para a alteração na composição da membrana plasmática, permitindo uma maior fluidez, permeabilidade, fusão, biossíntese de eicosanóides e sinalização celular promovendo a expressão gênica (ECKERT et al., 2010; GOGUS; SMITH, 2010; DYALL, 2015). As longas cadeias dos ω -3 são geralmente compostas por aproximadamente 20 carbonos e 6 duplas ligações e dentre os diferentes representantes desta classe, o ácido docosahexanóico (DHA) e ácido eicosapentanóico (EPA) destacam-se por apresentarem importantes funções metabólicas, principalmente no cérebro, como na redução da fração de colesterol na membrana dos neurônios, promovendo assim, uma melhor liberação de neurotransmissores (ZHANG et al., 2011) (**Figura 9**). Ainda, o DHA é o mais

abundante ω -3 nos tecidos nervosos de mamíferos durante o desenvolvimento e sua redução tem sido associada com o envelhecimento e doenças neurodegenerativas (INNIS, 2008; ECHEVERRÍA et al., 2017). Estruturalmente diferenciam-se pelo o número e posição das insaturações nas cadeias carbônicas, sendo tal condição determinante nas propriedades físicas e químicas das PUFA's (NELSON; COX, 2016).

Figura 9: Estruturas químicas planares dos ácidos graxos poli-insaturados DHA e EPA. (A) Ácido docosahexanóico (DHA, C22:6 ω -3) e (B) Ácido eicosapentanóico (EPA, C20:5 ω -3) (Retirado e modificado a partir de CALDER; YAQOUB, 2009).

Estudos de longa duração em humanos são complexos e poucos descritos na literatura, por isso, a incorporação de animais modelos para processos neurodegenerativos propiciam excelentes oportunidades para testar as mais diferentes intervenções farmacológicas, nutricionais e/ou fisiológicas, sendo que muitos estudos utilizando suplementação de ω -3 em animais modelos para DA apresentaram resultados positivos (revisado por DEVASSY et al., 2016).

2.5 – *Drosophila melanogaster*

As *Drosophilas melanogaster* são insetos holometabólicos com mais de cem anos de história em pesquisas genéticas, sendo usado como importante modelo em estudos experimentais de organismos multicelulares eucariontes, ainda, teve o genoma completamente sequenciado anteriormente ao genoma humano (revisado por JENNINGS, 2011; revisado por LIMMER et al., 2014). A facilidade no cultivo, baixo custo de manutenção, a incorporação do sistema de expressão UAS/GAL4 (**Figura 10**), bem como o alto grau de conservação evolutiva e nível relativamente baixo de redundância genética no genoma de tais insetos (RIETER et al., 2001; CHIEN et al., 2002; BRAND; PERRIMON, 1993; MENDONÇA et al., 2011), fazem da *D. melanogaster* um importante modelo com aplicabilidade em diferentes áreas.

Figura 10: Ferramenta genética em *Drosophila melanogaster*. Em *D. melanogaster* o sistema de expressão UAS/GAL4 tem sido usado extensivamente para expressar endógenas e exógenas sequências em tecidos de interesse, sendo que isso é possível por duas diferentes linhas. A linha direcionadora é chamada de sequência codificante GAL4 inserida após a região promotora de um gene endógeno de *Drosophila melanogaster*. GAL4 é um fator de transcrição originalmente encontrado em *Saccharomyces cerevisiae*, ligando-se especificamente em regiões promotoras *Upstream Activating Sequence* (UAS), favorecendo assim a expressão de um determinada sequência alvo (Retirado e modificado a partir de PRÜßING et al., 2013; BRAND; PERRIMON, 1993).

No aspecto morfológico, as *D. melanogaster* possuem claro dimorfismo sexual e basicamente são compostas por cabeça (olhos, antenas, probóscide e sistema nervoso central, SNC), tórax (pernas e asas) e abdômen (**Figura 11**) (CHYB; GOMPEL, 2013; PRÜßING et al., 2013). Durante o desenvolvimento, as fêmeas são 30% maiores que os machos e 12% maior ao final do desenvolvimento pupal (TESTA et al., 2013), chegando na fase adulta pesando $1,56 \pm 0,009$ mg e $0,99 \pm 0,004$ mg para as fêmeas e machos (KATZ; YOUNG, 1975), respectivamente, mas tais condições podem variar em função da idade, condições de cultura, constituição genética (CHYB; GOMPEL, 2013;

EGENRIETHER et al., 2015) e alimentação (TATUM, 1939). O consumo diário de alimento de uma única *D. melanogaster* é de aproximadamente 1,5 μ L o que representa 1,7 vezes a sua massa corpórea (JA et al., 2007), porém fêmeas em processo de maturação dos ovos fecundados consomem mais alimentos sólidos do que fêmeas virgens (DESHPANDE et al., 2014).

Figura 11: Aspectos morfológicos de *Drosophila melanogaster*. Na morfologia externa, a fêmea apresenta uma terminação pontiaguda no final do abdômen, por outro lado, no macho é arredondado e com maior pigmentação (Retirado e modificado a partir de CHYB; GOMPEL, 2013). A barra de escala corresponde a 1 mm.

O cérebro de *Drosophila* apresenta diferente estruturação em decorrência da fase de desenvolvimento, sendo moldado durante três fases, a fase embrionária, larval e pupal. Ainda, pode ser dividido em lóbulos ópticos (OL), cérebro central (CB) e cordão nervoso ventral (VNC). O CB contém os centros olfativos de aprendizagem e memória conhecidos como *mushroom bodies* (MB) e o VNC é subdividido em 3 neurômeros torácicos (Th) e 9 abdominais (Ab) (**Figura 12**). As células que geram os neurônios e células gliais em todas as regiões do cérebro de *D. melanogaster* são progenitores do tipo células-tronco neurais chamados neuroblastos, uma linhagem celular embrionária (revisado por LIMMER et al., 2014; revisado por SOUSA-NUNES et al., 2010).

As células gliais tem sido relacionada a manutenção homeostática iônica e fornecimento de neurotransmissores aos neurônios bem como atuando como células imunológicas no SNC, bem como formando epitélios na barreira hematoencefálica em *Drosophila* (KREMER et al., 2017).

A musculatura do tórax é responsável pela a dinâmica de vôo, a qual requer uma das maiores atividades metabólicas na natureza (HORST, 2003), consequentemente elevados níveis de EROs, por isso são os melhores modelos animais para o estudo do envelhecimento, tempo de vida e mudanças neuronais e sensoriais em função da idade, aspectos que são semelhantes à senescência em humanos (HADDADI et al., 2014; EGENRIETHER et al., 2015; FORIEL et al., 2015; FREEMAN; DAHANUKAR, 2015; HATZIHIRSTIDIS et al., 2015; OWALD et al., 2015).

Figura 12: Distribuição de neuroblastos no SNC de *D. melanogaster*. Representação esquemática do SNC embrionário, larva e em adulto, destacando neuroblastos (NBs, círculos). O lobo óptico (OL, verde) é subdividido em células gliais precursoras (GPC) e centro proliferativo externo (OPC), os quais geram neuroblastos OPC. O cérebro central (CB) contém numerosos neuroblastos tipo-ID, quatro neuroblastos *mushroom body* (MB) e oito neuroblastos tipo-II. O cordão nervoso ventral (VNC) é subdividido em neuromeros torácicos (Th) e abdominais (Ab) contendo neuroblastos tipo-ID e tipo-IA, respectivamente (Retirado e modificado a partir de SOUSA-NUNES et al., 2010).

O envelhecimento está intimamente associada com deficiências funcionais em diferentes animais (BOYD et al., 2005), dentre tantas complicações, a senescência na atividade motora é melhor representada pela redução na velocidade no caminhar. Em tais condições, a *D. melanogaster* tem sido usado como importante modelo para a compreensão da locomoção, orientação visual, comportamento (BENZER, 1967) e dano neuromuscular (SHALTIEL-KARYO et al., 2012; MADABATTULA et al., 2015) durante a senescência, o geotropismo negativo é uma resposta de fuga inata provocada ao direcionar a *D. melanogaster* para o fundo de um recipiente em um sistema de contracorrente (**Figura 13**), nesta condição, os animais respondem ao mecanismo de estímulo subindo pela

parede do sistema, tal condição experimental gera um índice frequentemente usado no comportamento locomotor de insetos (revisado por GROTEWIEL et al., 2005).

Figura 13: Sistema de contracorrente. O sistema de contracorrente avalia a habilidade locomotora de *Drosophila melanogaster* submetida a qualquer experimento que possa influenciar neurônios motores (INAGAKI et al, 2010), para tanto, os animais foram anestesiados em CO₂ e transferidos para o tubo 1, (a) após um período de espera até a total recuperação da anestesia; (b) o sistema foi batido contra uma placa de borracha cinco vezes, tal condição faz com que as *D. melanogaster* sejam agitadas sendo capaz de induzir forte comportamento de geotropismo negativo; (c) após a agitação, o aparato foi deslocado rapidamente em direção ao tubo 1 para permitir que os insetos subam do tubo inferior (1) para o tubo superior (1'), o tempo de 30 segundos foi iniciado para permitir que os animais optassem por subir ou ficar na parte inferior do aparato; (d) o aparato foi deslocado rapidamente em direção ao tubo 2, novamente o sistema foi batido contra uma placa de borracha cinco vezes. Os insetos que subiram até 1' foram transferidos para o fundo do segundo tubo inferior e com as batidas, os animais são agitados novamente, induzindo geotropismo negativo; (e) Esse processo foi repetido mais quatro vezes (Retirado e modificado a partir de INAGAKI et al., 2010).

No decorrer da vida, muitas espécies de animais, incluindo nematóides (revisado por CHEN et al., 2013), insetos (MARGOTTA et al., 2013), peixes (GILBERT et al., 2014), roedores (MOBLEY et al., 2017; HAMEZAH et al., 2017) e primatas (revisado por KOHAMA et al., 2012; SANTIAGO II et al., 2015), apresentam perda progressiva da massa muscular esquelética, força e habilidade cognitiva com a idade. Existem muitos modelos disponíveis para estudar o envelhecimento muscular esquelético, bem como processos neurodegenerativos, dentre tantos modelos, *D. melanogaster* tornou-se extremamente útil para examinar os processos celulares responsáveis por decréscimos funcionais do músculo esquelético e cérebro durante o envelhecimento (revisado por HE; JASPER, 2014). Mediante tais aspectos, alimentos funcionais com propriedades antioxidantes possivelmente apresentem um potencial mitocondrial terapêutico, frente as injúrias induzidas pelo PQ em *Drosophila melanogaster*.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o efeito protetor da suplementação com os ácidos eicosapentanóico (EPA) e docosahexanóico (DHA) em mitocôndrias nas musculaturas torácicas e terminações nervosas de *Drosophila melanogaster* frente as neuromusculares disfunções ocasionadas pela exposição ao PQ.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Induzir importantes danos com a exposição ao PQ em *D. melanogaster* com concomitante avaliação protetora de EPA/DHA;
2. Verificar a taxa de sobrevivência e habilidade locomotora de *D. melanogaster* submetidas as diferentes suplementações alimentares contendo PQ e/ou EPA/DHA;
3. Avaliar os níveis respiratórios e parâmetros de estresse oxidativo em *D. melanogaster* frente as diferentes condições alimentares;
4. Correlacionar a atividade de importantes enzimas, como citrato sintase, acetilcolinesterase, monoaminoxidase e gama-secretase com a exposição ao PQ e/ou EPA/DHA;
5. Analisar aspectos morfológicos, bem como a biogênese e dinâmica mitocondrial de *D. melanogaster* frente as condições experimentais através de técnicas de microscopia e biologia molecular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE *Drosophila melanogaster* – Todos os estoques utilizados neste trabalho (Mef2-GAL4>UAS-MitoGFP/CyO e *Canton Special*) foram mantidos em vials e/ou garrafas plásticas lacradas com algodão e gaze (material que permite aeração) em ambiente climatizado a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ com 70-80% de umidade relativa e fotoperíodo (claro/escuro) de 12/12hs. A alimentação padrão para *D. melanogaster* foi composta de meio enriquecido farinha de milho (8%), extrato de levedura (1,5%), sacarose (2,5%), glicose (5%), ágar (0,5%), metil-p-hidroxibenzoato (0,5%) e mistura ácida composta por ácido propiônico (8,2%) e ácido fosfórico (45,85%) (CHAKRABORTY et al., 2011; EGENRIETHER et al., 2015).

Para os experimentos que serão descritos, os animais foram separados em 4 grupos: (1) Grupo Controle, contendo a alimentação padrão para *D. melanogaster*; (2) Alimentação padrão suplementada com 1 mg/mL de ω -3 (Ácido eicosapentanoico, EPA e Ácido docosahexanoico, DHA), 39 e 24%, respectivamente de cada isômero; (3) Alimentação padrão com 200 $\mu\text{g/mL}$ de PQ; e (4) Alimentação padrão contendo 1 mg/mL de EPA/DHA e 200 $\mu\text{g/mL}$ de PQ. O consumo diário de PQ foi de aproximadamente 0,3 ng por dia e EPA/DHA 0,585/0,36 μg por dia, respectivamente. As fêmeas de *D. melanogaster* foram sincronizadas (1 dia após a eclosão) e destinadas as diferentes condições alimentares por 3 dias. A cada 2 dias, os animais foram transferidos para vials contendo comida fresca para a manutenção das melhores condições fisiológicas e evitar a morte de *D. melanogaster* devido a outras causas, como a aderência em

alimentos úmidos, mofo ou desenvolvimento de bactérias (BOSCO et al., 2015). Após 3 dias submetidos a diferentes condições alimentares, os insetos foram anestesiados em CO₂ e os tóraxes e cabeças foram removidos com o auxílio de pinças e tesoura (SANTALLA et al., 2014). Para a realização dos experimentos descritos, utilizamos somente as fêmeas de *D. melanogaster* por consumir uma maior quantidade de alimento em decorrência da elevada demanda energética destinada ao desenvolvimento do embrião após a fecundação e sua deposição no substrato, bem como por apresentarem diferenças entre as dietas (**Figura S1**).

Os animais adultos foram coletados dos referidos estoques enriquecidos e divididos pelo tempo de vida, com isso, insetos com até 5 dias de vida foram agrupados como jovens adultos, com 6 até 25 dias adultos de meia idade e de 50 dias como animais velhos (HADDADI et al., 2014).

Para viabilizar a expressão de certas proteínas em *D. melanogaster*, como proteína GFP ancorada na membrana mitocondrial (MitoGFP), utilizamos o sistema UAS/GAL4, no qual os animais foram construídos como descrito por Brand & Perrimon (1993). Para a expressão de transgenes UAS, as regiões promotoras Mef2-GAL4 foram usados como drive de expressão gênica em células musculares. Os animais *Canton Special* e os transgênicos Mef2-GAL4;UAS-MitoGFP/CyO foram construídos e gentilmente doados pelo Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento do Prof. Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina (FMRP-USP).

4.2 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA E ESCALADA – Para o teste de sobrevivência, cada tubo contendo as quatro diferentes condições de alimentação, juntamente com 30 animais foram monitorados por 5 dias, realizando a contagem dos animais vivos e mortos neste período. Por outro lado, a atividade de escalada foi mensurada como descrita por Benzer (1967), usando o aparato de contracorrente (**Figura 13**) (INAGAKI et al., 2010), posteriormente conduzido por 5 dias. Os resultados foram obtidos mediante o índice de fototaxia, a qual é calculada pela equação:

$$\Sigma (i \cdot N_i) / N$$

N representa o número total de *D. melanogaster* utilizadas no ensaio; i está relacionado com o número do tubo (1-5) e N_i indica o número de insetos no tubo ao término do experimento (ZIEGLER et al., 2015).

4.3 AVALIAÇÃO NOS NÍVEIS DA RESPIRAÇÃO CELULAR – A formação de ATP via respiração celular está diretamente relacionada com a atividade metabólica desempenhada pela mitocôndria (CHISTIAKOV et al., 2014). Desta forma, avaliamos os níveis da respiração tecidual (cabeça e tórax) frente ao PQ, ω -3, bem como a combinação de PQ e ω -3. Para tanto, as respectivas respirações foram realizadas em 2,1 mL de tampão de respiração MiR05 (20 mM HEPES, 60 mM K-lactobionato, 0,5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$ e 1 g/L de BSA livre de ácidos graxos, pH 7,1) a 25°C utilizando um respirômetro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph) e o software DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Austria) para a aquisição de dados (2 segundos de intervalo) e análises. As taxas de respiração para os tóraces (Mef2-Gal4;UAS-MitoGFP/CyO) foram determinadas

na ausência (*Estado R*) e na presença (*Estado netR*) de substratos exógenos (1,5 mM piruvato, 0,28 mM malato e 1,3 mM glutamato). As respirações de fosforilação (*Estado P*) e não-fosforilação (ou *leak*) (*Estado L*) foram obtidos após as adições de 240 μ M de ADP e 0,5 μ g/mL de oligomicina, respectivamente. Posteriormente, a respiração foi desacoplada (*Estado E*) pela adição de 0,25 μ M à 0,75 μ M (titulação) de carbonil cianede 3-clorofenilhidrazona (CCCP). Finalmente, para inibição da respiração mitocondrial e avaliação do fluxo de oxigênio devido às reações oxidativas não-mitocondriais (*Estado Rox*), as quais ocorrem continuamente 0,625 μ g/mL de antimicina A foram adicionados (BAGGIO et al., 2014; COSTA et al., 2013). Para testar as condições de permeabilidade da membrana celular e consequente mensuração da taxa respiratória (pmol / segundos / unidades) de toraces isoladas de *D. melanogaster* foram mantidas em 0,025 mg/mL de saponina por 5 minutos (**Figura 14**). Em organismos complexos, a membrana celular não é permeável para substratos mitocondriais, bem como para adenilatos. Porém, observamos que a respiração foi estimulada após adição de um mix de substratos, contendo piruvato, malato e glutamato e ADP em toraces sem saponina, indicando que a membrana celular está permeável, provavelmente devido ao pequeno volume do tecido. Mesmo assim, utilizamos um agente permeabilizante, a saponina, e um menor estímulo da respiração foi evidenciado, comparando à ausência de saponina, indicando danos à respiração. Então, subsequentes experimentos foram conduzidos sem qualquer agente químico permeabilizante.

Figura 14. Parâmetros respiratórios mitocondriais de tóraces de *D. melanogaster* alimentados com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Tóraces de *D. melanogaster* foram lavadas em tampão BIOPS com ou sem 0,025 mg/mL de saponina por 5 minutos, posteriormente, submetemos as amostras na câmara do Oxígrafo contendo tampão MiR05 como descrito anteriormente. As setas indicam adição de substratos (piruvato 1,5 mM, glutamato 1,3 mM e malato 0,28 mM), 240 μ M ADP, 0,5 μ g/mL oligomicina, 0,25 μ M (cada adição) de CCCP e 0,625 μ g/mL de Antimicina A (AA) para determinar os Estados de ROUTINE (R), netROUTINE (netR), OXPHOS (P), LEAK (L), ETS (E) e RESIDUAL (Rox).

Para as cabeças de *D. melanogaster* (Canton Special), as taxas de respiração foram determinadas na presença de substratos ligados à formação de NADH (1,5 mM piruvato, 0,28 mM malato e 1,3 mM glutamato) e 240 μ M ADP (P1, fosforilação sustentada pela atividade do complex I), na sequência 10 mM succinato e 0,5 μ M rotenona (P2, fosforilação sustentada por succinato). Sequencialmente, o estado não-fosforilativo (L) e Estado Rox, foram determinados após adição de 0,5 μ g/mL oligomicina e 0,6 μ g/mL Antimicina A, respectivamente (Figura 15).

Figura 15: Parâmetros respiratórios mitocondriais de cabeças de *D. melanogaster* alimentados com dieta suplementada com PQ e/ou ω-3. Traçado representativo no Oxígrafo de cabeças de *D. melanogaster* (20 unidades por câmara) indicando que foi adicionado substrato ligado com a formação de NADH (mix), ADP, succinato, rotenona, oligomicina e antimicina A (Ant. A), para determinar os Estados de fosforilação OXPHOS (P1) e OXPHOS (P2), LEAK (L), e RESIDUAL (Rox).

4.4 CITRATO SINTASE – A enzima citrato sintase (CS, EC 4.1.3.7) está localizada na matriz mitocondrial e catalisa a condensação da acetil coenzima A (acetil-CoA) e oxaloacetato em citrato e coenzima A com grupo tiol (CoA-SH), sendo essa reação a primeira etapa do Ciclo de Krebs (SHEPHERD; GARLAND, 1969).

Experimentalmente, a atividade da CS foi mensurada após a avaliação do consumo de oxigênio das amostras (tóraces e cabeças). Para tal análise as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e homogeneizado duas vezes em tampão Trietanolamina-HCl 0,1 M, pH 8 para promover a ruptura das membranas mitocondriais e favorecer a

liberação de seu conteúdo. O homogenato foi centrifugado a 12000xg durante 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado (PELEG et al., 2016). A concentração proteica foi determinada pelo ensaio de Bradford em um volume final de 200 µL em temperatura ambiente. A reação (10 minutos) foi iniciada pela adição de 10 µg de proteína para ~170 µL de tampão Trietanolamina-HCl contendo 0,1 mM Acetil-CoA, 0,1 mM Ácido 5',5'-Dithiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), 0,2 mM de Oxaloacetato, 0,10 % Triton X-100. A redução de CoA (CoA-SH) formada durante a transformação de DTNB em Ácido 2-nitro-5-benzóico (TNB) absorve especificamente em 412 nm (**Figura S2**). As atividades de CS foram mensuradas pela oxidação de DTNB formando TNB, com isso, os ensaios foram mensurados espectrofotometricamente como proposto por Srere (1969).

A atividade da CS foi calculada com o auxílio da equação: Unidades ($\mu\text{mol/mL/min}$) = $((\Delta A_{412}) / \text{min} \times V \text{ (mL)} / \epsilon^{\text{mM}} \times L \text{ (cm)})$, onde A_{412} corresponde a absorbância do TNB em 412 nm, $V \text{ (mL)}$ é o volume da reação (mL), ϵ^{mM} trata-se do coeficiente equimolar do TNB, o qual é $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $L \text{ (cm)}$ distância para mensuração da absorbância. Cada amostra foi analisada em quintuplicada e os valores de absorbância foram expressos pela quantidade total de proteína na amostra.

4.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) – Para mensurar a produção de H_2O_2 , utilizamos quinze tórces de *D. melanogaster*, incubadas em 2,1 mL de tampão MiR05 contendo substratos (1,5 mM piruvato, 0,28 mM malato e 1,3 mM glutamato) à 25°C durante 10 minutos.

Figura 16: Detecção de peróxido de hidrogênio com N-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina (Amplex Red). O composto não fluorescente Amplex Red é oxidado pela peroxidase (HRP) e H_2O_2 formando a resorufina, uma molécula altamente fluorescente (Retirado e modificado a partir de DIKALOV et al., 2007).

Para o perfil cerebral, quinze cabeças foram incubadas em 2,1 mL de tampão respiratório MiR05 contendo 2 μM de Amplex Red e 1 U/mL de HRP (RHEE et al., 2010) na presença de substratos ligados a NAD^+ (1,5 mM piruvato, 0,28 mM malato, 1,3 mM glutamato) ou 10,5 mM de succinato, à temperatura ambiente durante 10 min. A taxa de produção de H_2O_2 foi monitorada pela oxidação do Amplex Red em Resorufina na presença de peroxidase (HRP) (**Figura 16**), determinada fluorometricamente (a 563/587 nm excitação/emissão) em um fluorímetro (F-4500 Hitachi Ltd., Tóquio, Japão) com agitação contínua. Após o término da sessão de ensaio, o meio contendo o tecido foi coletado para determinar a proteína e a atividade de citrato sintase (CS), valores usados para calcular as taxas de produção de H_2O_2 .

4.5.2 PRODUÇÃO DE GLUTATIONA NO ESTADO REDUZIDO (GSH) E OXIDADO (GSSG) – A produção de GSH e GSSG foi mensurada utilizando quinze tóraxes ou cabeças de *D. melanogaster*, sendo o tecido homogeneizado

em 150 μ L de tampão Tris-HCl gelado 0,1 M, pH 7,4 e centrifugado em 1500xg durante 10 minutos à 4°C (REBRIN et al., 2004). Após a quantificação proteica (método de Bradford), os sobrenadantes foram adicionados em 30% de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados em 2000xg por 10 minutos à 4°C. Para GSSG, metade dos sobrenadantes foram incubados em tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 6 mM de EGTA e N-etil-maleimide, pH 7,4 por 30 minutos. A mistura foi incubada (na ausência de luz) com 1 M de NaOH, 1 mg/mL de orto-ftaldeído (OPT) durante 15 minutos. Para GSH, metade dos sobrenadantes foram incubados (na ausência de luz) somente com tampão fosfato de sódio contendo EGTA e OPT por 15 minutos (HISSIN; HILF, 1976). O conteúdo de GSH e GSSG foram avaliados fluoremetricamente (350/420 nm excitação/emissão) em um Fluorímetro (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA).

4.5.3 PROTEÍNA CARBONILADA - A quantificação da proteína foi determinada com a utilização de quinze tóraces ou cabeças de *D. melanogaster*, sendo homogeneizado em 100 μ L de tampão Tris-HCl gelado 0,1 M, pH 7,4 e centrifugado em 1500xg durante 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram separados em duas frações, incubadas em 10% de TCA e centrifugadas a 5000xg durante 10 minutos à 4°C. Com os dois tubos previamente identificados, no primeiro tubo, o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em HCl 2,5 M, enquanto que o outro foi ressuspensionado somente em 1 mL de HCl 2,5 M (REZNICK & PACKER, 1994). Após a incubação (1 hora, 37°C na ausência de luz), as amostras foram transferidas para um banho de gelo durante 10 minutos e 10% de TCA foram

adicionados, homogeneizados e centrifugados a 5000xg durante 5 minutos à 4°C. Os *pellets* foram lavados três vezes com 1 mL de solução contendo etanol / acetato de etila (1:1) e centrifugados a 5000xg por 5 minutos à 4°C. Finalmente, os *pellets* foram dissolvidos em guanidina 6 M e mantida em moderada agitação durante 40 minutos. O conteúdo de proteína carbonilada foi analisado espectrofotometricamente a 340 nm (Cary 50MPR, Varian Ltd., Melbourne, Australia).

4.6 PRODUÇÃO DE LACTATO – Para mensurar a concentração de lactato em amostras de *D. melanogaster*, utilizamos quinze cabeças, as quais foram maceradas e homogeneizadas três vezes em 0,02 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 10000xg por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado. A reação (5 minutos) foi iniciada pela adição de 10 µL da amostra para 1 mL do tampão de ensaio, mediante as instruções do fabricante (Labtest, Brazil, catálogo número #138-1/50). A absorbância foi monitorada espectrofotometricamente em 550 nm usando um espectrofotômetro modelo Cary 50MPR Varian (Varian Ltd., Melbourne, Austrália). Cada amostra foi avaliada em quintuplicata e os valores de absorbância foram expressos pela a quantidade total de proteína na amostra.

4.7 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) – Para a realização de tal experimento, utilizamos quinze tóraces ou cabeças de *D. melanogaster*, os quais foram homogeneizados duas vezes em 0,1 M tampão fosfato de sódio, pH 7,4 para promover o rompimento celular. Os homogenatos foram centrifugados a

9000xg durante 30 minutos à 4°C e o sobrenadante (fração citossólica) coletada. O *pellet* foi homogeneizado em 0,1 M tampão fosfato de sódio, pH 7,4 gelado contendo 0,5% Triton X-100 e centrifugado (9000xg; 30 minutos; 4°C) e o sobrenadante (fração contendo membranas) coletado (AGUIAR et al., 2016). Após a quantificação das proteínas (método de Bradford), a reação (10 minutos) foi iniciada pela adição de 0,01 mg de proteína para 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7,4 contendo 150 mM de acetilcolina e 10 mM de DTNB. A atividade de AChE foi determinada espectrofotometricamente, baseado na metodologia de Ellman e colaboradores (1961), utilizamos um espectrofotômetro (Cary 50MPR, Varian Ltd., Melbourne, Australia) para expressar o resultado em η mol de conjugado formado/minuto/mg proteína. Cada amostra foi analisada em triplicata.

4.8 ATIVIDADE DA MONOAMINO OXIDASE (MAO) – A mensuração da atividade catalítica da MAO foi realizada com a homogeneização de quinze cabeças por duas vezes em 0,02 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 0,1% de Triton X-100 para promover a ruptura das células e reduzir interferentes nos homogenatos. Os homogenatos foram centrifugados a 16000xg por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado. A reação enzimática (10 minutos) foi iniciada com a adição de 0,2 mg de proteína para aproximadamente 150 μ L de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, 2 U/mL HRP, 2,5 μ mol/L de Amplex Red e 20 μ mol/L de serotonina (GUANG; DU, 2006). A atividade de MAO foi mensurada através do monitoramento na formação de H_2O_2 pela oxidação do Amplex Red em Resorufina na presença de HRP (563/587 η m excitação/emissão) em um fluorímetro (Synergy

2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Cada amostra foi analisada em quintuplicatas e os valores de fluorescência foram expressos pela quantidade total de proteína na amostra.

4.9 ATIVIDADE DA GAMA-SECRETASE – A atividade catalítica da gama-secretase foi obtida utilizando quinze cabeças lisadas em 0,02 mL em tampão hipotônico (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; e 1 mM EGTA) contendo 0,2% CHAPS suplementado com cocktail com inibidor de protease (P1860 – Sigma Aldrich). A reação (12 horas) foi iniciada pela adição de 0,01 mg de proteína para tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, contendo 10 µM de substrato referente ao peptídeo conjugado fluorescente [NMA-GGVVIATVK(DNP)-DRDRDR-NH₂] (AminoTech Research and Development Ltda, Brasil), uma sequência de APP para clivagem da gama-secretase (HAYASHI et al., 2012). O ritmo da clivagem do substrato foi determinado fluorometricamente (em 355/440 nm excitação/emissão) em um espectrofotômetro fluorescente (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Cada amostra foi analisada em quintuplicata e os valores de fluorescência (U.F) foram expressos pela quantidade total de proteína da amostra.

4.10 CONCENTRAÇÃO DE FIBRILAS AMILÓIDES – A concentração de fibrilas amilóides foram obtidas utilizando quinze cabeças de *D. melanogaster* (*Canton Special*), as quais foram submetidas a 2 ciclos de homogenização e centrifugação em 0,02 mL de tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) contendo cocktail com inibidores de

proteases. As amostras foram centrifugadas a 2000xg durante 2 minutos à 4°C. O sobrenadante (5 µL) foi incubado por 5 minutos em 195 µL de PBS contendo 200 µM tioflavina T (ThT). Uma curva padrão de β 42 foi feita (0-11 µM) e incubada em PBS com ThT durante 24 horas para a formação das fibrilas amilóides (XUE et al., 2017). As ligações das fibrilas amilóides e ThT foram determinadas fluorometricamente (a 450/482 nm excitação/emissão) (NAIKI et al, 1989) em um espectrofotômetro de fluorescência (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Cada amostra foi analisada em triplicata e os valores de fluorescência foram expressos pela quantidade total de proteína da amostra.

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR *Western Blotting*

– Alíquotas proteicas (30 µg) provenientes de vinte cabeças de *D. melanogaster* (*Canton Special*) foram obtidas mediante 2 ciclos de homogenização e centrifugação em 0,02 mL tampão PBS contendo cocktail de inibidores de proteases. Proteínas solúveis foram homogenizados em tampão (40 mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.05% Triton X-100) e separados em 10% de gel SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocellulose (**Figura S3**). Após o bloqueio com 10% de leite desnatado, a membrana foi incubada *overnight* à 4°C com diluições apropriadas dos anticorpos primários α -spectrina (1:3000, Developmental Studies Hybridoma Bank - DSHB, University of Iowa, Iowa), ELAV (1:2000, cat. no. 7E8A10, DSHB) e β -Actin (1:1000, cat. no. C4: sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário diluído 1:10000 (cat. no. 12-348, EMD Millipore), (cat. no. 14-16-12, KLP SeraCare) ou (cat. no. 12-349, EMD Millipore) conjugado com HRP durante 120

minutos à temperatura ambiente sob leve agitação. A ligação do anticorpo foi detectada pelo aumento do produto quimioluminescente (Millipore, #WBKLS0050, Merck Millipore, USA), como descrito pelo fabricante. As imagens foram obtidas utilizando sistema digital XRS+ (BioRad system based on CCD high-resolution) (Figura S4 e S5).

4.12 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

4.12.1 IMUNOHISTOQUÍMICA – As cabeças de *D. melanogaster* foram isoladas por dissecação em tampão PBS com 0,2% (v/v) de Triton X-100 (PBS-T 0,2%) e fixadas em 4% (v/v) de paraformaldeído (PFA) por 30 minutos em temperatura ambiente com leve agitação para otimização do efeito fixador do PFA. Os tecidos foram lavados por três vezes em PBS-T 0,2% (COSTA et al., 2011) e incubados *overnight* à 8°C com anticorpo primário produzido em coelho anti-NeuN diluído 1:1000 (cat. no. ABN78, EMD Millipore), posteriormente lavados em PBS-T 0,2% e incubado por 3 horas com anticorpo secundário conjugado para Fluoróforo Alexa (2 mg/mL) Alexa 594 (1:1000), lavados por três vezes em PBS-T 0,2% e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente com DAPI (1:400) e Tioflavina T (1:1). As lâminas foram preparadas em meio de montagem, Fluoromount (cat. no. F4680, Sigma-Aldrich), o qual preserva tecidos corados com moléculas fluorescentes sem interferir na emissão de fluorescência.

4.12.2 MICROSCOPIA CONFOCAL – As imagens foram obtidas em um microscópio confocal invertido (Leica TCS SP5) com software LasAF, usando APO 40x/1,30 óleo, tendo o auxílio de um laser de argônio 25 mW usado como fonte

para excitação, posteriormente emissão em 405 nm (DAPI), 488 nm (Tioflavina) e 594 nm (NeuN). Quando apropriado, ajustes e zoom digital foram aplicados. As vinte e cinco imagens foram sobrepostas e utilizadas para um total de 50 µm de espessura.

4.13 ASPECTOS MOLECULARES

4.13.1 Real Time PCR – Para quantificar os experimentos de reação em cadeia de polimerase em real-time (RT-qPCR), seguimos as etapas como descrito por Machado e colaboradores (2011). As sequências de primers utilizados constam na **Tabela 1**.

GENE	PRIMER FORWARD (5'- 3')	PRIMER REVERSE (5'- 3')
DRP1	TCCATCCAATTGCCCCAAAT	GACGGGTCACAATACCAGTT
dPGC-1	TTACGTACGAAAGAGCGCAG	CCAGCATTATCCAAGTCAGC
MARF	GGCGAGGCGTATCTTATGAC	TTGTGCCAGGAGAAGCT
OPA1	GGCTACTATGCCGTCGTTAC	CCCCTCGACGATGGAAAAGC
CaMKII	CCTGTACGCGTTTTTCGGAC	CCTCCTGTATACTGTCATGT

Tabela 1 – Desenho dos primers utilizados no estudo.

RpL32 e tubulina foram utilizados como genes de referência amplificados com sequências de primers obtidos de Ponton e colaboradores (2011). O método $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado para comparar os níveis de expressão (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para plotar os gráficos, utilizamos a tubulina como gene

de referência, o qual apresenta resultados idênticos ao RpL32 (dados não apresentados).

4.14 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (BioRad Cat#500-0006), utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão (0,05 – 0,5 mg/mL) (BRADFORD, 1976).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA – Os dados apresentados são médias $\pm$ S.E.M. N médias no número de *Drosophila melanogaster* por grupo usado em cada experimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA para múltiplas comparações, tendo como suporte o software GraphPad ©Prism 6 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$ (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$) e ns for $P > 0,05$.

5 RESULTADOS

Longevidade e atividade de escalada – A adição de PQ na comida semissólida exerceu uma significativa influência no tempo de vida após 48 horas de alimentação (**Figura 17A**), como aproximadamente somente 40% de sobrevivência em comparação aos 82% nos controles após 120 horas. A administração de ω -3 em combinação com PQ foi capaz de prevenir a redução na longevidade em aproximadamente 20% após 120 horas, um efeito similar foi também notado nos animais que consumiram somente ω -3. Neste tempo, a exposição ao PQ marcadamente diminuiu a habilidade de escalada de maneira dependente do tempo (**Figura 17B**), a qual foi protegida pelo ω -3 em combinação com PQ após 72 horas de alimentação.

Figura 17: Sobrevivência e habilidade de escalada de *Drosophila melanogaster* alimentadas com uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. (A) Sobrevivência e (B) Habilidade de escalada foram monitoradas em *D. melanogaster* (n = 30) como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Parâmetros mitocondriais do tórax – Em tóraces de *D. melanogaster* a suplementação com PQ promoveu uma redução das taxas respiratórias nos Estados de netRoutine (*netR*, na presença de substratos exógenos) (**Figura 18A**), OXPHOS (*P*, fosforilação oxidativa) (**Figura 18B**) e ETS (*E*, desacoplado) (**Figura 18D**), sem qualquer mudança marcante no Estado de LEAK (*L*, não-fosforilativo) (**Figura 18C**) e *Rox* (consumo de oxigênio não relacionado com a atividade da cadeia respiratória) (**Figura 18E**). Em concordância esses toraces também apresentaram uma menor atividade de citrato sintase (CS), uma enzima do ciclo de Krebs, a qual é fortemente correlacionada com o conteúdo mitocondrial celular (**Figura 19A**). O consumo de ω -3 em combinação com PQ bloquearam a redução nos Estados de respiração *P* e *E*, bem como a atividade de CS. As taxas de controle de fluxo L / P (vazamento como uma fração da fosforilação) e L / E (vazamento como uma fração da ETS) não foram significativamente alteradas pela suplementação (**Figura 18F e 18G**), sugerindo uma proporcional atividade respiratória não relacionada à síntese de ATP.

Figura 18: Parâmetros respiratórios mitocondriais de tórax de *D. melanogaster* alimentadas com uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. (A) Taxas respiratórias no Estado de netROUTINE (*netR*), (B) OXPHOS ou acoplado (*P*), (C) LEAK (*L*), (D) ETS ou desacoplado (*E*), e (E) RESIDUAL (*Rox*). (F) Razões de controle de fluxo *L/P* (fosforilação acoplada) e (G) *L/E* (vazamento de H⁺) (n = 75 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Figura 19: Atividade de Citrato Sintase (CS) em *Drosophila melanogaster* alimentadas com uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. (A) tórax (B) cabeça. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Parâmetros mitocondriais da cabeça – A suplementação com PQ na alimentação de *D. melanogaster* induziu uma redução na atividade de CS (**Figura 19B**). Ainda, PQ reduziu as taxas de respiração nos Estados de OXPHOS suportada por substratos vinculados ao NAD^+ (Estado *P1*) (**Figura 20A**), mas não na fosforilação oxidativa suportada pelo succinato na presença de rotenona (Estado *P2*) (**Figura 20B**), indicando dano no Complexo I mitocondrial. A análise da razão *P2/P1* reforça esse resultado, demonstrando elevada atividade do Complexo II em comparação ao Complexo I na cabeça de *D. melanogaster* expostas ao PQ (**Figura 20E**). Nenhuma alteração marcante foi observada nos Estados LEAK (**Figura 20C**) e Rox (**Figura 20D**), ou na razão *L/P* (**Figura 20F**). A administração de ω -3 em combinação com PQ aumentou o estado de Rox, como encontrado na consumo somente com ω -3. Em particular, ω -3 sozinho diminuiu a razão *L/P*, um indicativo de elevado grau de acoplamento mitocondrial.

Figura 20: Parâmetros respiratórios mitocondriais de cabeças de *D. melanogaster* alimentadas com dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Taxas respiratórias por unidades de citrato sintase (CS) no (A) Estado P1, (B) P2, (C) L e (D) Rox. Relações de controle de fluxo dos Estados (E) P2/P1 e (F) L/P (n = 60 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Níveis de expressão de RNAm – A ingestão de PQ não alterou significativamente o relativo nível de expressão de RNAm de genes envolvidos na dinâmica ou na biogênese mitocondrial nos toraces de *D. melanogaster*: *Dynamin-related protein* (DRP1, **Figura 21A**), Fator regulador do conjunto mitocondrial (MARF, **Figura 21B**), *Mitochondrial Dynamin like GTPase* (OPA1, **Figura 21C**) e *Peroxisome Proliferator-activated receptor-gama coactivator 1-alpha* (PGC1 α , **Figura 21D**). Entretanto, PQ induziu um significativo aumento na expressão de RNAm de *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII, **Figura 21E**), um indicativo de alto influxo de Ca^{2+} do citosol para a matriz mitocondrial. O aumento na expressão do RNAm de CaMKII, induzida pelo PQ foi inibida pela administração de ω -3. Finalmente, ω -3 administrado sozinho foi capaz de elevar a expressão de

todos os genes envolvidos na dinâmica e biogênese mitocondrial, um efeito similar foi encontrado com ω -3 em combinação com PQ, exceto para a expressão de RNAm para MARF.

Figura 21: Níveis de expressão de RNAm de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial, biogênese e metabolismo de Ca^{2+} em tóraxes de *D. melanogaster*. Análises dos níveis de RNAm para (A) DRP1, (B) MARF, (C) OPA1, (D) PGC1 α e (E) CaMKII em tóraxes de *D. melanogaster*. O gene da tubulina foi usada para normalização e níveis de expressão são expressos como valores relativos para controles pareados (linhas tracejadas). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Parâmetros redox no tórax e cabeça – as taxas de produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram significativamente elevados nos tóraxes de *D. melanogaster* expostas ao PQ (Figura 18A) acompanhado pelos baixos níveis de glutathiona na forma reduzida (baixa GSH/GSSG, Figura 18B), e similares níveis de marcadores oxidativos (proteína carbonilada, Figura 18C) indicando o

consumo do sistema antioxidante para neutralizar as espécies oxidantes. ω -3 em combinação com o PQ bloqueou essas variações no sistema oxidante e antioxidante e, em adição, reduziu o estado oxidativo do tecido, um efeito também mediado pelo ω -3 na ausência de PQ.

Na cabeça, a suplementação com PQ aumentou a produção de H_2O_2 (Figura 22D) mas surpreendentemente também elevou a razão GSH/GSSG (Figura 22E), sem qualquer alteração aparente nos níveis de proteínas oxidadas (Figura 22F). ω -3 em combinação com PQ diminui significativamente a geração de H_2O_2 para níveis menores em comparação ao controle, um efeito também encontrado com a ingestão somente de ω -3.

Figura 22: Parâmetros de oxidação/redução nos tóraxes e cabeças de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Produção de H_2O_2 (A e D), GSH/GSSG (B e E) e conteúdo de proteína carbonilada (C e F) em tóraxes (A, B e C) e cabeças (D, E e F) de *Drosophila melanogaster* (n = 45 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Modulação da cadeia respiratória e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cabeças – Após 3 dias de exposição ao PQ, cabeças de *D. melanogaster* apresentaram taxas semelhantes na produção de H_2O_2 por mg de proteína tecidual quando energizados com substratos ligados ao NAD^+ (entrada de elétrons pelo complexo I, **Figura 25A**). Entretanto, quando essas taxas foram normalizadas por unidades de citrato sintase (CS), uma elevada produção de H_2O_2 por mitocôndria é observado nessas cabeças (**Figura 25B**). Tal condição não foi observada quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato (a entrada de elétrons pelo complexo II), indicando que nas cabeças de animais suplementadas com PQ, a geração de H_2O_2 está relacionada à disfunção do complexo I. As cabeças de *D. melanogaster* controle apresentaram incrementos na geração de H_2O_2 como resultado do fluxo reverso de elétrons do complexo II para o complexo I (SCIALÒ et al., 2017). A exposição somente a ω -3 ou em combinação com PQ reduziu fortemente a produção de H_2O_2 por tecido ou por mitocôndria energizada com qualquer um dos substratos.

Figura 25 – Produção de H_2O_2 em cabeças de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. (A) Taxas de produção de H_2O_2 por mg de proteína tecidual na presença de substratos ligados ao NAD^+ (piruvato, malato e glutamato) e (B) Taxas de produção de H_2O_2 por unidades de citrato sintase (CS) na presença de (I) NAD^+ substratos e (II) succinate, como descrito em Materiais e Métodos (n = 45 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01; * P <0,001; **** P <0,0001: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.**

Concentração de lactato – A ingestão de PQ por *D. melanogaster* aumentou de forma significativa a concentração de lactato em cabeças, um efeito prevenido pela ingestão combinada de EPA/DHA (Figura 26).

Figura 26 – Concentração de lactato em cabeças de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01; * P <0,001; **** P <0,0001: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.**

Atividade de Acetilcolinesterase (AChE) no tórax e cabeça – embora a exposição ao PQ não tenha afetado a atividade da AChE na forma solúvel (**Figura 23A**), o herbicida diminuiu a atividade de AChE ancorada na membrana de células torácicas (**Figura 23B**). ω -3 em combinação com PQ foi efetivo na prevenção da queda de atividade de AChE na forma insolúvel (ou ancorado em membranas) mas também aumentou as atividades de ambas as frações enzimáticas acima dos níveis encontrados no controle.

Na cabeça, a suplementação com PQ reduziu significativamente as atividades de AChE solúvel (**Figura 23C**) e fração de membrana (**Figura 23D**). ω -3 em combinação com PQ restaurou de forma significativa ambas as atividades de AChE, alcançando níveis superiores em relação ao controle, um efeito similar para a ingestão somente de ω -3.

Figura 23: Atividade de Acetilcolinesterase (AChE) no tórax e cabeça de *Drosophila melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Atividade da AChE na fração citossólica (A e C) e fração proteica ancorada em membranas (B e D) em tóraxes (A e B) e cabeças (C e D) de *D. melanogaster* (n = 45 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

A **Figura 24** ilustra uma imagem de microscopia confocal em cabeças de *D. melanogaster*, mostrando que o tratamento com PQ promove reduções na fluorescência com DAPI (núcleo celular) e NeuN (neurônios), indicando redução no conteúdo de células neuronais, e aumenta a fluorescência de tioflavina, a qual indica a formação de fibrilas de amilóides. ω -3 em combinação com PQ recuperou a fluorescência do NeuN e reduziu a de fibrilas de amilóides, uma estrutura intimamente envolvida em processos neurodegenerativos.

Figura 24: Cabeças de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. Imunohistoquímica para diferentes análises: integridade dos núcleos (DAPI); evidência de proteína amilóide (Tioflavina) e viabilidade neuronal (NeuN) para **(a)** CTR, **(b)** PQ, **(c)** ω -3, e **(d)** PQ+ ω -3. A barra de escala corresponde a 50 μ m. Os valores de intensidade de fluorescência **(E, F e G)** representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Viabilidade neuronal e estabilidade sináptica - A exposição ao PQ afetou marcadamente o conteúdo de ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) (**Figura 27A**), uma proteína localizada no núcleo de neurônios em *Drosophila* expressa em todos os estágios do desenvolvimento neural e envolvida na manutenção do sistema nervoso em adultos (COLOMBRITA et al, 2013) e também afeta negativamente o conteúdo de α -espectrina (**Figura 27B**), uma proteína envolvida na estabilidade e estrutura da membrana celular, controlando a forma da célula (revisado por ZHANG et al, 2013). Em neurônios, α -espectrina atua estabilizando as sinapses, axônios e a formação de axônios em segmentos iniciais e nos nodos de Ranvier (BENNETT; BAINES, 2001; BAINES, 2010; RASBAND, 2010) (**Figura 27B**). A exposição a EPA/DHA aumentou os níveis de ELAV e α -espectrina e quando em combinação com PQ foi eficaz na prevenção na queda nos conteúdos de ELAV e α -espectrina, sugerindo que estes ω -3 protegem a cabeça contra a perda de neurônios e/ou redução na diferenciação neuronal, e disfunção sináptica promovida pela intoxicação ao PQ.

Figura 27 – Análise da expressão da proteínas ELAV e α-spectrin por Western Blotting. (A) ELAV e (B) α-spectrin foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos (n = 5 por grupo). As expressões de ELAV e α-spectrin foram normalizadas pelo total de expressão da proteína β-actina. Os valores representam a média ± S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω-3.

Atividades da Monoamino oxidase (MAO) e Gama-secretase – A suplementação com PQ aumentou significativamente as atividades de MAO e gama-secretase nas cabeças de *D. melanogaster* (**Figura 28A e 28B**), sugerindo aumento na clivagem de serotonina e liberação de APP (uma molécula precursora da formação do peptídeo beta amiloide peptide 42 (A β 42)), respectivamente. Por outro lado, ω -3 em combinação com PQ reduziu significativamente essas atividades, retornando aos níveis do controle.

Figura 28 – Atividades de Monoamino oxidase (MAO) e Gama-secretase em cabeças de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. (A) MAO e (B) Gama-secretase atividades foram realizadas como descritos em Materiais e Métodos (n = 75 por grupo). A atividade de Gama-secretase foi expressa como unidades arbitrárias de fluorescência (A.U.F.) do substrato clivado por 12hs por mg de proteína. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de cinco experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

Produção de fibrilas amilóides – O conteúdo de fibrilas amilóides foi significativamente aumentado em cabeças dos insetos expostos ao PQ e prevenidos pela exposição ao ω -3 em combinação (**Figura 29**), sugerindo um efeito neuroprotetor desses ácidos graxos poli-insaturados contra a intoxicação por PQ.

Figura 29 – Concentração de fibrilas amilóides em cabeças de *Drosophila melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω -3. A concentração de fibrilas amilóides foram realizadas como descritos em Materiais e Métodos (n = 75 por grupo). Os valores representam a média $\pm$ S.E.M provenientes de três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$: ^a vs CTR, ^b vs PQ e ^c vs ω -3.

6. DISCUSSÃO

O Paraquat (PQ) apresenta uma forte interação com as mitocôndrias e seu acúmulo é dependente do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (COCHEMÉ; MURPHY 2008; MEDINA-LEENDERTZ et al., 2014). Com isso, o PQ pode interagir com complexos de cadeia de transporte de elétrons (ETC), especialmente os complexos I e III promovendo um ciclo redox: o cátion PQ divalente (PQ^{2+}) é reduzido ao radical monocatiônico altamente reativo (PQ^+), que por sua vez reage com o oxigênio molecular para gerar radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e subsequentemente outras espécies reativas de oxigênio (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013; BLANCO-AYALA et al., 2014; MEDINA-LEENDERTZ et al., 2014). Similarmente, nos tóraxes de *D. melanogaster*, verificou-se que após o consumo de PQ, tal composto promoveu um comprometimento no equilíbrio redox intracelular desencadeando um *status* oxidante intracelular, conforme evidenciado pelos elevados níveis de H_2O_2 , bem como a diminuição na razão GSH/GSSG. O PQ também reduziu conteúdo mitocondrial levando a redução no consumo celular de oxigênio, como ilustrado nos Estados *netR*, *P*, e *E*, cujas taxas respiratórias refletem a demanda intracelular de ATP, fosforilação oxidativa e máxima capacidade respiratória, respectivamente. A diminuição na fosforilação oxidativa leva a baixa produção de ATP, que altera a contração muscular e contribui a redução progressiva na capacidade de escalada destes insetos. Esta diminuição da atividade muscular promovida pelo o PQ também foi associado a valores

mitocondriais com elevado influxo de cálcio induzido pela despolarização da membrana, como mostrado nas arteríolas aferentes de ratos (VOGEL et al., 2015).

O baixo conteúdo mitocondrial no tórax não foi associada à biogênese prejudicada, pois o mRNA nível de expressão de PGC1 α , um regulador mestre de biogênese mitocondrial (WU et al., 1999), não foi marcadamente afetado pelo tratamento com PQ. No entanto, a perda de mitocôndrias danificadas pode estar ocorrendo, como previamente relatado, induzido por PQ em adultos de *D. melanogaster* (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013) e em ratos (MURAKAMI et al., 2006). Além disso, elevados níveis de RNAm de CaMKII sugerem perturbação na homeostasia de cálcio em tórax de insetos expostos ao PQ, como observado na insuficiência cardíaca em camundongos (ZHANG et al., 2003). CaMKII existe nas mitocôndrias e no citosol. A ativação da CaMKII nas mitocôndrias, a qual pode ser promovida por estresse oxidativo, é responsável pela captação excessiva de Ca²⁺ do citosol pela mitocôndria através do transportador de cálcio mitocondrial uniporte (MCU) sob condições patológicas, que em última instância leva a uma redução na viabilidade celular (MEI-LING; KOVAL, 2014). Em mitocôndrias carregadas com Ca²⁺, as espécies reativas de oxigênio (EROs) promovem uma desestabilização das proteínas de membrana, favorecendo a formação de poro de transição de permeabilidade (mPTP) mitocondrial. Este processo resulta em inchaço da organela e comprometimento das funções mitocondriais com conseqüente ruptura das membranas e liberação de componentes, incluindo moléculas sinalizadoras apoptogênicas (KOWALTOWSKI et al., 2001). Porém o uso de inibidores de CaMKII favorecem a redução de mPTP e morte (YUN et al., 2013). Assim, em

nosso modelo de intoxicação por PQ pode estar ocorrendo um aumento na frequência de morte celular, a qual leva à disfunção do tórax.

A redução na atividade de escalada pela ingestão de PQ também pode estar associado à diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no tórax e cabeça de *D. melanogaster*. AChE está presente no citosol, bem como incorporado às membranas biológicas e desempenha importante função na junção neuromuscular (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). A atividade da AChE ocorre predominantemente na fenda sináptica, porém nos vasos sanguíneos, AChE favorece uma maior captação de cálcio para a contração muscular, enquanto que no sistema nervosa central, mantém um equilíbrio entre neurotransmissores e acetilcolina (ALDUNATE et al., 2004). Na cabeça de *D. melanogaster*, o efeito tóxico do PQ foi mais efetivo em ambas as frações (citossólica e ancorada na membrana plasmática) pela diminuição da atividade da AChE, sendo que esta condição pode ser explicada por interações com os receptores colinérgicos e o herbicida PQ no cérebro (ALCARO et al., 2007), desencadeando uma desestabilização dos fosfolipídios da membrana (por EROs) ou alterações na expressão de AChE por estresse químico (KIM et al., 2014) e consequente degradação dos receptores colinérgicos que reduzem a atividade da AChE.

Mais importante, experimentos *in vivo* demonstraram que o ômega-3 diminui efetivamente os efeitos adversos do PQ em *D. melanogaster* como evidenciado pelo aumento no tempo de vida e capacidade de escalada, que são medidas úteis de envelhecimento individual (LE BOURG et al., 1993). Nossos resultados atribuem tais efeitos as melhorias nas funções mitocondriais e estado

redox promovido por ômega-3. Ômega-3 inibiu uma intensa produção de H_2O_2 e aumentou GSH/GSSG, um efeito que pode ser atribuído à modulação na expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase (SILVA et al., 2016), com uma conseqüente prevenção de dano oxidativo. Ômega-3 também bloqueou a perda do conteúdo mitocondrial no tórax, mantendo assim, as funções respiratórias celulares, conforme demonstrado pela melhora nos parâmetros de biogênese e dinâmica mitocondrial.

No fígado de ratos, descobriu-se que o DHA desencadeia fusão mitocondrial através de fatores de transcrição modificados incluindo o fator nuclear κB (NF- κB) e peroxissoma receptor ativado por proliferador α e γ (PPAR α e γ) (CALDER; YAQOOB, 2009), regulando diretamente a transcrição gênica de mitofusina-2 e PGC1 α (BUSQUETS-CORTÉS et al., 2016). O DHA altera as propriedades físicas das membranas, que subsequentemente influenciam a atividade das proteínas de membrana incluindo receptores, transportadores, canais iônicos e enzimas de sinalização (CALDER; YAQOOB, 2009). Portanto, ômega-3 restaura os níveis de RNAm de CaMKII e impediram a redução da atividade mitocondrial, já que esses ácidos graxos poliinsaturados podem regular o movimento de Ca^{2+} intracelular (GOGUS; SMITH, 2010), bem como normalizar e/ou retardar a abertura de mPTP induzido por Ca^{2+} em hamsters cardiomiopáticos (GALVÃO et al., 2013). De acordo com nosso estudo, a suplementação de ômega-3 sugere uma proteção em neurônios colinérgicos contra a toxicidade induzida pela citotoxicidade de glutamato em ratos (HÖGYES

et al., 2003). Estes efeitos podem estar relacionados aos efeitos preventivos da ingestão de EPA / DHA na redução da atividade de AChE promovida por PQ.

Além de preservar funções neuronais, ômega-3 serviu como um agente neuroprotetor e modulador da patologia amilóide induzida por PQ, um efeito relacionado à diminuição da produção de amilóide e agregação atribuída às propriedades do DHA (ARSENAULT et al., 2011; CALON et al., 2004; GREEN et al., 2007; GRIMM et al., 2011; LIM et al., 2005; ZARROUK et al., 2015). Enquanto mecanismos de produção e/ou liberação de amilóide permanecem obscuros, múltiplos mecanismos são propostos para a neuroproteção promovida pelo ômega-3, incluindo a normalização de neurotransmissores, prostaglandinas e moléculas pró-inflamatórias e respostas inflamatórias mediadas por microglias (ZHANG et al., 2015; WANI et al., 2015). Em modelos experimentais da doença de Alzheimer, bem como em várias doenças neurológicas em ratos (BUSQUETS-CORTÉS et al., 2016; COLE et al., 2010), os benefícios da EPA e suplementação de DHA foram correlacionados com proteção contra o estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (DENNY JOSEPH; MURALIDHARA, 2013).

No aspecto cerebral, o acúmulo de PQ implica em dano neuronal mediado pelo o estresse oxidativo (BALTAZAR et al., 2014). Quando o PQ foi incorporado ao pulmão de ratos, a formação de $O_2^{\cdot -}$ induzida por PQ e a peroxidação lipídica promoveram a inibição na atividade do complexo I (FUKUSHIMA et al., 1994). Além disso, outros complexos da CTE (I, II e III), bem como atividade de CS, foram encontrados menos ativos após exposição aguda (24 horas) a altas concentrações de PQ (10 - 40 mM) em *D. melanogaster* (HOSAMANI;

MURALIDHARA, 2013). Aqui, mostramos cuidadosamente que em baixa concentração (0,77 mM por 72 horas), a exposição PQ não apenas diminuiu a atividade de CS, evidenciando baixo conteúdo mitocondrial, como também prejudicou especificamente a atividade do complexo I, reduzindo a capacidade respiratória / fosforiladora mitocondrial. Como os neurônios são os principais consumidores de O₂ para a fosforilação oxidativa, esses resultados sugerem uma menor disponibilidade de ATP nos neurônios, o que é essencial para a atividade e viabilidade dessas células (revisado por BÉLANGER et al., 2011). Consistente com nossos resultados, a disfunção mitocondrial induzida por PQ em baixas doses (0,1 mM) também foi demonstrada em embriões de *Danio rerio* (vertebrados), nos quais a respiração máxima foi reduzida em 70% (WANG et al., 2018).

Como um ciclo vicioso, a inibição do complexo I mitocondrial pode, por sua vez, estimular um contínuo vazamento de elétrons, intensificando a formação de EROs (TAKESHIGE; MINAKAMI, 1979; TURRENS; BOVIERS, 1980; TURRENS et al., 1982). Elevada geração de superóxido mitocondrial e biomarcadores de estresse oxidativo foram evidenciados em *D. melanogaster* após exposição aguda a altas concentrações de PQ (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013). Nossos resultados, demonstram que *D. melanogaster* expostas a baixas concentrações de PQ demonstram com precisão que o complexo I mitocondrial é o principal local de formação de EROs, o que pode estar associado à atividade prejudicada desse complexo. No entanto, as taxas totais na produção de H₂O₂ nas cabeças de *D. melanogaster* expostas ao PQ não foram alteradas, provavelmente como consequência da redução do conteúdo mitocondrial.

A diminuição do conteúdo mitocondrial e do metabolismo em cabeças de *D. melanogaster* suplementadas com PQ aqui observadas também possam estar associadas com a elevação na concentração de lactato encontrada. Como produto final da glicólise, o lactato é produzido principalmente por astrócitos e também por neurônios com alta demanda energética (revisado por BÉLANGER et al., 2011). O lactato de astrócitos é transportado para os neurônios através de transportadores de monocarboxilato ligados a prótons (MCTs) sendo convertidos em piruvato para entrar na mitocôndria (PROIA et al., 2016) seguindo o metabolismo oxidativo. No entanto, os níveis elevados de lactato são importantes biomarcadores de degeneração neuronal relacionada à disfunção mitocondrial detectada no líquido cefalorraquidiano (ALBANESE et al., 2016) e soro (AMORINI et al., 2014) de humanos com esclerose múltipla e cérebros de mamíferos em envelhecimento (ROSS et al., 2010), com doenças de Parkinson (BOWEN et al., 1995) ou Alzheimer (HARRIS et al., 2016).

Aqui demonstramos pela primeira vez que a intoxicação por PQ diminui o conteúdo de α -espectrina, uma proteína que estabiliza os axônios e sinapses, e desempenha um papel importante nas funções sinápticas, incluindo fixação de vesículas pré-sinápticas e agregação de receptores pós-sinápticos (PIELAGE et al., 2006; FEATHERSTONE et al., 2001). A deleção de α -espectrina em *D. melanogaster* prejudica os neurotransmissores e perturba a localização subcelular de várias proteínas sinápticas (FEATHERSTONE et al., 2001). De fato, juntamente com demais estudos, demonstramos disfunções nas transmissões sinápticas colinérgicas (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2017), dopaminérgicas (CASSAR et al.,

2015) e glutamatérgicas (BALTAZAR et al., 2014) em *D. melanogaster* induzidas por PQ.

Abordando os aspectos da DA, a ingestão de PQ induziu a formação anormal de fibrilas amilóides em cabeças de *D. melanogaster*, o que pode desencadear a cascata patológica da DA (CHEN et al., 2012). A formação de fibrilas amilóides inicia-se com o acúmulo de oligómeros A β 42, um produto de clivagem proteolítica da APP no domínio transmembranar pela PS1, o componente catalítico do complexo γ -secretase (HAASS; SELKOE 1993; DE STROOPER, 2003), que também foi encontrado ativo após a exposição PQ. O PQ também reduziu o conteúdo de ELAV, uma proteína de ligação ao RNA neuronal que trabalha na regulação pós-transcricional e está envolvida na manutenção do sistema nervoso adulto (ROBINOW; WHITE, 1991; OGAWA et al., 2018). No cérebro de mamíferos, o recrutamento e ativação da proteína ELAV α -dependente de proteína quinase C (PKC) tem um papel positivo nos mecanismos de diferenciação, regeneração e aprendizagem (PASCALE et al., 2005), e seu desarranjo pode contribuir para a fisiopatologia da DA (TALMAN et al., 2016).

Como descrito na musculatura de *D. melanogaster* (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2017), a ingestão dietética de EPA e DHA também protegeu as cabeças de *D. melanogaster* contra a perda de conteúdo mitocondrial e capacidade respiratória, bem como contra as modulações em α -espectrina, ELAV, MAO, γ -secretase e A β 42 induzida por PQ. Além disso, ω -3 impediu o aumento dos níveis de lactato, sugerindo que a ação neuroprotetora ω -3 no cérebro realmente envolve a mitocôndria. Esses efeitos benéficos de ω -3 nas mitocôndrias têm sido

relacionados ao controle do estresse oxidativo e da permeabilidade da membrana mitocondrial (KUMAR et al., 2014; ZHANG et al., 2016). Relacionado a proteínas neuronais, estudos prévios mostraram que a perda / deficiência tecidual de ω -3 está associada à elevada degradação de espectrina após lesão cerebral traumática (DESAI et al., 2014) e diminuição nos níveis de serotonina, bem como elevada atividade de MAO no cérebro de ratos irradiados com raios gama (SAADA et al., 2014), enquanto níveis mais baixos de A β e placas amilóides foram encontrados no cérebro de camundongo transgênico expressando a forma mutante de APP humana alimentada com uma dieta pobre em gordura mas enriquecida em DHA (AMTUL et al., 2011). Até onde sabemos, somos os primeiros a mostrar que a suplementação de ω -3 eleva o conteúdo de ELAV no cérebro.

Finalmente, ω -3 aumentou o fluxo de O₂ para reações de consumo de oxigênio não mitocondrial na cabeça, sugerindo a oxidação estimulada por EPA e DHA. Esta reação pode ser catalisada pela ciclooxigenase (COX), lipoxigenase e citocromo P450 para a síntese de mediadores derivados de lipídeos chamados oxilipinas (MOSBLECH et al., 2009; MARTÍNEZ; CAMPOS-GÓMEZ, 2016). As oxilipinas derivadas de DHA e EPA podem reduzir a neuroinflamação, um importante aspecto envolvendo o avanço da DA, com isso, prevenindo o declínio cognitivo (revisado por DEVASSY et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que a ingestão de PQ por *D. melanogaster* resultou em extensa disfunção neuromuscular, incluindo processos amiloidogênicos e neurodegenerativos no cérebro, conteúdo mitocondrial alterado, produção de EROs no tórax e taxa acelerada de envelhecimento. A ingestão concomitante de EPA/DHA protegeu os insetos durante a intoxicação induzida por PQ, preservando as funções neuromusculares, melhorando a biogênese e a dinâmica mitocondrial no tórax, bem como, bloqueando a deposição de amilóide no cérebro.

No aspecto neuronal, a ingestão de PQ resultou em importantes alterações frequentemente encontradas em processos neurodegenerativos, incluindo as disfunções mitocondriais e acúmulo de lactato, os quais afetaram negativamente as principais proteínas relacionadas com a organização e estabilidade das sinapses, eventos característicos da doença de Alzheimer. A ingestão concomitante de EPA e DHA propiciou uma proteção para *D. melanogaster* frente as alterações neuronais induzidas por PQ, reforçando assim seu papel protetor contra doenças neurodegenerativas.

8. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABLAT, A.; MOHAMAD, J.; AWANG, K.; SHILPI, J. A.; ARYA, A. Evaluation of antidiabetic and antioxidant properties of Brucea javanica Seed. **The Scientific World Journal** p.1-8, 2014.

AFSHORDEL, S.; HAGL, S.; WERNER, D.; RÖHNER, N.; KÖGEL, D.; BAZAN, N. G.; ECKERT, G. P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging. Impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 92: 23-31, 2015.

AGUIAR, L. M.; FIGUEIRA, F. H.; GOTTSCHALK, M. S.; ROSA, C. E. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defenceresponses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comp. Biochem. Physiol. Part. C**, 185-186: 94-101, 2016.

APETZ, N.; MUNCH, G.; GOVINDARAGHAVAN, S.; GYENGESI, E. Natural compounds and plant extracts as therapeutics against chronic inflammation in Alzheimer's disease – a translational perspective. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 13 (7): 1175-1191, 2014.

APRAHAMIAN, I.; STELLA, F.; FORLENZA, O. V. New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope? **Indian Journal of Medical Research**, 138: 449-460, 2013.

ANDRIEU, S.; OUSSET, P. J.; COLEY, N.; OUZID, M.; MATHIEX-FORTUNET, H.; VELLAS, B. GuidAge study: a 5-year double-blind, randomized trial of EGb761 for the prevention of Alzheimer's disease in elderly subjects with memory complaints rationale, design and baseline data. **Curr Alzheimer Res**, 5: 406-415, 2008.

ARAB, L.; SABBAGH, M. N. Are certain life style habits associated with lower Alzheimer disease risk?. **Journal of Alzheimer's Disease**, 20 (3): 785-794, 2010.

BADMUS, J. A.; ODUNOLA, O. A.; YEKEEN, T. A.; GBADEGESIN, A. M.; FATOKI, J. O.; GODO, M. O.; OYEBANJO, K. S.; HISS, D. C. Evaluation of

antioxidant, antimutagenic, and lipid peroxidation inhibitory activities of selected fractions of *Holarrhena floribunda* (G. Don) leaves. **Acta Biochimica Polonica**, 60 (3): 435-442, 2013.

BAGGIO, F.; BRATIC, A.; MOURIER, A.; KAUPPILA, T. E. S.; TAIN, L. S.; KUKAT, C.; HABERMANN, B.; PARTRIDGE, L.; LARSSON, N. G. *Drosophila melanogaster* LRPPRC2 is involved in coordination of mitochondrial translation. **Nucleic Acids Res**, 42: 13920-13938, 2014.

BAGI, Z.; CSEKO, C.; TOTH, E.; KOLLER, A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 285: 2277–2283, 2003

BAINES, A. J. The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: Adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. **Protoplasma**, 244 (1-4): 99-131, 2010.

BAKKEBO, M. K.; MOUILLET-RICHARD, S.; ESPENES, A.; GOLDMANN, W.; TATZELT, J.; TRANULIS, M. A. The cellular prion protein: A play in immunological quiescence. **Frontiers in Immunology**, 6 (450): 1-12, 2015.

BALTAZAR, M. T.; OLIVEIRA, R. J. D.; BASTOS, M. L.; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, 230: 85-103, 2014.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23 (4): 629-643, 2010.

BARJA, G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: A mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?. **Biological Reviews**, 79: 235-251, 2004.

BENANI, A.; BARQUISSAU, V.; CARNEIRO, L.; SALIN, B.; COLOMBANI, A. L.; LELOUP, C.; CASTEILLA, L.; RIGOLET, M.; PÉNICAUD, L. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. **Journal of Neuroscience Methods**, 178: 301-307, 2009.

BENNETT, V.; BAINES, A. J. Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. **Physiological Reviews**, 81 (3): 1353-1392, 2001.

BENZER, S. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 58: 1112-1119, 1967.

BHARADWAJ, M. S.; TYRRELL, D. J.; LENG, I.; DEMONS, J. L.; LYLES, M. F.; CARR, J. J.; NICKLAS, B. J.; MOLINA, A. J. A. Relationships between mitochondrial content and bioenergetics with obesity, body composition and fat distribution in healthy older adults. **BMC Obesity**, 2 (40): 01-11, 2015.

BLANCO-AYALA, T.; ROMERO, A. C. A.; CHAVERRI, J. P. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radical Research**, 48 (6): 623-640, 2014.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygens species. Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, 14: 6306-6344, 2013.

BOSCO, G.; CLAMER, M.; MESSULAM, E.; DARE, C.; YANG, Z.; ZORDAN, M.; REGGIANI, C.; HU, Q.; MEGIGHIAN, A. Effects of oxygen concentration and pressure on *Drosophila melanogaster*: oxidative stress, mitochondrial activity, and survivorship. **Arch Insect Biochem Physiol**, 88: 222-234, 2015.

BOTCHWAY, B. O. A.; MOORE, M. K.; AKINLEYE, F. O.; IYER, I. C.; FANG, M. Nutrition: Review on the possible treatment for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 61: 867-883, 2018.

BOYD, C. M.; XUE, Q. L.; SIMPSON, C. F.; GURALNIK, J. M.; FRIED, L. P. Frailty, hospitalization, and progression of disability in a cohort of disabled older women. **Am J Med**, 118 (11): 1225-1231, 2005.

BRAAKMAN, R.; SMITH, E. The compositional and evolutionary logic of metabolism. **Physical Biology**, 10: 1-62, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 7 (72): 248-254, 1976.

BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, 118: 401-415, 1993.

BUNKAR, N.; BHARGAVA, A.; KHARE, N. K.; MISHRA, P. K. Mitochondrial anomalies: driver to age associated degenerative human ailments. **Frontiers in Bioscience**, 21: 769-793, 2016.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgraduate Medicine**, 121 (6): 148-157, 2009.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, 9 (7-8): 685-692, 2006.

CASSAR, M.; KRETZSCHMAR, D. Analysis of amyloid precursor protein function in *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 9: 61, 2016.

CASTRO, J. S.; GAMEIRO, M.; ARAÚJO, C.; PINTO, A.; TELES, T. P. Magnesium sulfate for fetal neuroprotection, a review. **Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**, 8 (4): 391-397, 2014.

CHAKRABORTY, R.; VEPURI, V.; MHATRE, S. D.; PADDOCK, B. E.; MILLER, S.; MICHELSON, S. J.; DELVADIA, R.; DESAI, A.; VINOKUR, M.; MELICHAREK, D. J.; UTREJA, S.; KHANDELWAL, P.; ANSALONI, S.; GOLDSTEIN, L. E.; MOIR, R. D.; LEE, J. C.; TABB, L. P.; SAUNDERS, A. J.; MAREND, D. R. Characterization

of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects. **PLOS ONE**, 6(6): 1-13, 2011.

CHAN, D. C. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. **Cell**, 125: 1241-1252, 2006.

CHAN, F.; LAX, N. Z.; DAVIES, C. H.; TURNBULL, D. M.; CUNNINGHAM, M. O. Neuronal oscillations: A physiological correlate for targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease?. **Neuropharmacology**, 102: 48-58, 2015.

CHAN, M. C.; YEPES, J. N.; VEGA, B. Q. Environmental pollutants risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 9 (124): 1-22, 2015^a.

CHEN, G. F.; XU, T. H.; YAN, Y.; ZHOU, Y. R.; JIANG, Y.; MELCHER, K.; XU, H. E. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, 38: 1205-1235, 2017.

CHEN, C. H.; CHEN, Y. C.; JIANG, H. C.; CHEN, C. K.; PAN, C. L. Neuronal aging: learning from *C. elegans*. **Journal of Molecular Signaling**, 8: 14, 2013.

CHIEN, S.; REITER, L. T.; BIER, E.; GRIBSKOV, M. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. **Nucleic Acids Research**, 30 (1): 149-151, 2002.

CHINNERY, P. F. Mitochondrial disease in adults: What's old and what's new? **EMBO Molecular Medicine**, 7: 1503-1512, 2015.

CHISTIAKOV, D. A.; SOBENIN, I. A.; REVIN, V. V.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSEV, Y. V. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. **BioMed Research International**, 2014: 238463, 2014.

CHYB, S.; RAGHU, P.; HARDIE, R. C. Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. **Nature**, 397: 255-259, 1999.

CHYB, S.; GOMPEL, N. **Atlas of Drosophila Morphology – Wild-type and classical mutants**. Academic Press, 224p., 2013.

COLOMBRITA, C.; SILANI, V.; RATTI, A. ELAV proteins along evolution: Back to the nucleus?. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 56: 447-455, 2013.

COSTA, A. C.; LOH, S.; MARTINS, M. *Drosophila* Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. **Cell Death Dis.** 4: 1-10, 2013.

COSTA, R.; SPERETTA, E; CROWTHER, D. C.; CARDOSO, I. Testing the therapeutic potential of doxycycline in a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer Disease. **J. Biol. Chem**, 286: 41647-41655, 2011.

DAVIS, C.; BRYAN, J.; HODGSON, J.; MURPHY, K. Definition of the Mediterranean Diet: A Literature Review. **Nutrients**, 7: 9139-9153, 2015.

DENNY JOSEPH, K. M.; M. MURALIDHARA. Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 40: 83-92, 2013.

DESHPANDE, S. A.; CARVALHO, G. B.; AMADOR, A.; PHILLIPS, A. M.; HOXHA, S.; LIZOTTE, K. J.; JA, W. W. Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. **Nature Methods**, 11: 535-540, 2014.

DESPOMMIER, D. The rise of vertical farms. **Sci. Am.**, 301: 60-67, 2009.

DEVASSY, J. G.; LENG, S.; GABBS, M.; MONIRUJJAMAN, M.; AUKEMA, H. M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and oxylipins in neuroinflammation and management of Alzheimer disease. **Advances in Nutrition**, 7: 905-916, 2016.

DEVOTO, V. M. P.; FALZONE, T. L. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein?. **Disease Models & Mechanisms**, 10: 1075-1087, 2017.

DHRA, G.; NUSRAT; BHANDARI, P.; KUMAR, J.; PATANJALI, P. K. Advanced pesticide formulations for dengue preventions. **Journal of Fever**, 1 (2): 1007, 2017.

DIKALOV, S.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension**, 49: 717-727, 2007.

DULIN, F.; LÉVEILLÉ, F.; ORTEGA, J. B.; MORNON, J. P.; BUISSON, A.; CALLEBAUT, I.; COLLOC'H, N. p3 peptide, a truncated form of A β devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. **FEBS Letters**, 582 (13): 1865-1870, 2008.

DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 7: 1-15, 2015.

ECHEVERRÍA, F.; VALENZUELA, R.; HERNANDEZ-RODAS, M. C.; VALENZUELA, A. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 124: 1-10, 2017.

ECHTEN-DECKERT, G. V.; HERGET, T. Sphingolipid metabolism in neural cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, 1758 (12): 1978-1994, 2006.

ECKERT, G. P.; FRANKE, C.; NÖLDNER, M.; RAU, O.; WURGLICS, M.; ZSILAVECZ, M. S.; MÜLLER, W. E. Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. **Pharmacological Research**, 61: 234-241, 2010.

EGENRIETHER, S. M.; CHOW, E. S.; KRAUTH, N.; GIEBULTOWICZ, J. M. Accelerated food source location in aging *Drosophila*. **Aging Cell**, 14: 916-918, 2015.

EIGENTLER, A.; DRAXL, A.; WIETHÜCHTER, A.; KUZNETSOV, A. V.; LASSING, B.; GNAIGER, E. Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. **Mitochondrial Physiology Network**, 17.04 (03): 1-11, 2015.

EGGER, B.; GIESEN, L. V.; MORARU, M.; SPRECHER, S. G. In vitro imaging of primary neural cell culture from *Drosophila*. **Nature Protocols**, 8 (5): 958-965, 2013.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JR, V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol**, 7: 88-95, 1961.

ENGEL, P. A. Does metabolic failure at the synapse cause Alzheimer's disease?. **Medical Hypotheses**, 83: 802-808, 2014.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, 18: 872-879, 2002.

FERREIRA-VIEIRA, T. H.; GUIMARAES, I. M.; SILVA, F. R.; RIBEIRO, F. M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic system. **Current Neuropharmacology**, 14: 101-115, 2016.

FISHER, J. A.; GINIGER, E.; MANIATIS, T.; PTASHNE, M. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. **Nature**, 332 (6167): 853-856, 1988.

FLICKER, L. Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 20 (3): 803-811, 2010.

FORIEL, S.; WILLEMS, P.; SMEITINK, J.; SCHENCK, A.; BEYRATH, J. Mitochondrial diseases. *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate potential therapeutics. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 63: 60-65, 2015.

FREEMAN, E. G.; DAHANUKAR, A. Molecular neurobiology of *Drosophila* taste. **Current Opinion in Neurobiology**, 34: 140-148, 2015.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S. P.; NETO, E. D.; OJOPI, E. P. B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 31 (1): 19-25, 2004.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, 505: 335-343, 2014.

GEHRKE, S.; WU, Z.; KLINKENBERG, M.; SUN, Y.; AUBURGER, G.; GUO, S.; LU, B. PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondrial outer membrane. **Cell Metabolism**, 21: 95-108, 2015.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, 75: 54-63, 2014.

GIBELLINI, L.; BIANCHINI, E.; BIASI, S. D.; NASI, M.; COSSARIZZA, A.; PINTI, M. Natural compounds modulating mitochondrial functions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p1-13, 2015.

GILBERT, M. J. H.; ZERULLA, T. C.; TIERNEY, K. B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: Physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**, 50: 106-113, 2014.

GOGUS, U.; SMITH, C. n-3 omega fatty acids. A review of current knowledge. **International Journal of Food Science & Technology**, 45: 417-436, 2010.

GRIMM, M. O. W.; METT, J.; STAHLMANN, C. P.; GRÖSGEN, S.; HAUPENTHAL, V. J.; BLÜMEL, T.; HUNDSDÖRFER, B.; ZIMMER, V. C.; MYLONAS, N. T.; TANILA, H.; MÜLLER, U.; GRIMM, H. S.; HARTMANN, T. APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. **Front Aging Neurosci**, 7: 77, 2015.

GROTEWIEL, M. S.; MARTIN, I.; BHANDARI, P.; COOK-WIENS, E. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. **Ageing Research Reviews**, 4: 372-397, 2005.

GUANG, H.; DU, G. High-throughput screening for monoamine oxidase-A and monoamine oxidase-B inhibitors using one-step fluorescence assay. **Acta Pharmacologica Sinica**, 27 (6): 760-766, 2006.

GUS, I. Perfis de saúde – Brasil, 2006 – modificações e suas causas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 88(4): 88-91, 2007.

HADDADI, M.; JAHROMI, S. R.; SAGAR, B. K. C.; PATIL, R. K.; SHIVANANDAPPA, T.; RAMESH, S. R. Brain aging, memory impairment and oxidative stress: A study in *Drosophila melanogaster*. **Behavioural Brain Research**, 259: 60-69, 2014.

HAMEZAH, H. S.; DURANI, L. W.; IBRAHIM, N. F.; YANAGISAWA, D.; KATO, T.; SHIINO, A.; TANAKA, S.; DAMANHURI, H. A.; NGAH, W. Z. W.; TOOYAMA, I. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. **Exp Gerontol**, 99: 69-79, 2017.

HE, Y.; JASPER, H. Studying aging in *Drosophila*. **Methods**, 68 (1): 129-133, 2014.

HASADSRI, L.; WANG, B. H.; LEE, J. V.; ERDMAN, J. W.; LIANO, D. A.; BARBEY, A. K.; WSZALEK, T.; SHARROCK, M. F.; WANG, H. Omega-3 fatty acids as a putative treatment for traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, 30: 897-906, 2013.

HATZIHRISTIDIS, T.; DESAI, N.; HUTCHINS, A. P.; MENG, T. C.; TREMBLAY, M. L.; SAAVEDRA, D. M. A *Drosophila*-centric view of protein tyrosine phosphatases. **FEBS Letters**, 589: 951-966, 2015.

HAYASHI, H.; NAKAGAMI, H.; TAKEICHI, M.; SHIMAMURA, M.; KOIBUCHI, N.; OIKI, E.; SATO, N.; KORIYAMA, H.; MORI, M.; ARAUJO, R. G.; MAEDA, A.; MORISHITA, R.; TAMAI, K.; KANEDA, Y. HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. **The FASEB Journal**, 26: 2306-2317, 2012.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, 5(1): 101-108, 2003.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem**, 74: 214-226, 1976.

HORST, D. J. V. Insect adipokinetic hormones: Release and integration of flight energy metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 136: 217-226, 2003.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 83 (1): 25-40, 2013.

IKEDA, T.; YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, K. Treatment of Alzheimer type dementia with intravenous methylcobalamin. **Clin Ther**, 14: 426–437, 1992.

INAGAKI, H. K.; KAMIKOUCHI, A.; ITO, K. Methods for quantifying simple gravity sensing in *Drosophila melanogaster*. **Nature Protocols**, 5 (1): 20-25, 2010.

INNIS, S. M. Dietary omega-3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, 1237: 35-43. 2008.

JA, W. W.; CARVALHO, G. B.; MAK, E. M.; ROSA, N. N. D. L.; FANG, A. Y.; LIONG, J. C.; BRUMMEL, T.; BENZER, S. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. **PNAS**, 104 (20): 8253-8256, 2007.

JANSSEN, C. I. F.; KILIAAN, A. J. Long-chain polyunsaturated fatty acids LCPUFA from genesis to senescence. The influence of LCPUFA on neural development, aging and neurodegeneration. **Progress in Lipid Research**, 53: 1-17, 2014.

JAIN, V.; LANGHAM, M. C.; WEHRLI, F. W. MRI estimation of global brain oxygen consumption rate. **J Cereb Blood Flow Metab**, 30 (9): 1598-1607, 2010.

JENNEKENS, F. G. I. A short history of the notion of neurodegenerative disease. **Journal of the History of the Neuroscience**, 23: 85-94, 2014.

JENNINGS, B. H. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. **MaterialsToday**, 14 (5): 190-195, 2011.

JETT, D. A. Neurotoxic pesticides and neurologic effects. **Neurologic Clinics**, 29 (3): 667-677, 2011.

KATZ, A. J.; YOUNG, S. S. Y. Selection for high adult body weight in *Drosophila* populations with different structures. **Genetics**, 81: 163-175, 1975.

KOHAMA, S. G.; ROSENE, D. L.; SHERMAN, L. S. Age-related changes in human and non-human primate white matter: from myelination disturbances to cognitive decline. **Age**, 34 (5): 1093-1110, 2012.

KIL, H. N.; EOM, S. Y.; PARK, J. D.; KAWAMOTO, T.; KIM, Y. D.; KIM, H. A rapid method for estimating the levels of urinary thiobarbituric acid reactive substances for environmental epidemiologic survey. **Toxicological Research**, 30 (1): 07-11, 2014.

KREBS, J. R. The gourmet ape: evolution and human food preferences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 90: 707-711, 2009.

KREMER, M. C.; JUNG, C.; BATELLI, S.; RUBIN, G. M.; GAUL, U. The glia of the adult *Drosophila* nervous system. **Glia**, 65 (4): 606-638, 2017.

KRUCEK, T.; KORANDOVÁ, M.; SERY, M.; FRYDRYCHOVÁ, R. C. Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 88 (4): 235-248, 2015.

KRYSCIO, R. J.; ABNER, E.; SCHMITT, F. A.; GOODMAN, P. J.; MENDIONDO, M.; CABAN-HOLT, A.; DENNIS, B. C.; MATHEWS, M.; KLEIN, E. A.; CROWLEY, J. J. A randomized controlled Alzheimer's disease prevention trial's evolution into an exposure trial: the PREADViSE trial. **J Nutr Health Aging** 17: 72–75, 2013.

LAKE, J. A. Eukaryotic origins. **Philosophical Transactions Royal Society B**, 370: 1-5, 2015.

LIEBERMAN, D. E.; BRAMBLE, D. M.; RAICHLEN, D. A.; SHEA, J. J. Brains, Brawn, and the evolution of human endurance running capabilities. **The first humans: Origin and early evolution of the genus Homo, vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology**, p.77-92, 2009.

LIEMBURG-APERS, D. C.; WILLEMS, P. H. G. M.; KOOPMAN, W. J. H.; GREFFE, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. **Archives of Toxicology**, 89 (8): 1209-1228, 2015.

LIMMER, S.; WEILER, A.; VOLKENHOFF, A.; BABATZ, F.; KLÄMBT, C. The *Drosophila* blood-brain barrier: development and function of a glial endothelium. **Frontiers in Neuroscience**, 8: Article 365, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Meth. Meth**, 25: 402-408, 2001.

MACHADO, M. C. R.; SILVA, S. O.; COSTA, M. S. A.; RAMOS, R. G. P. Transcriptional activity influences kirre mRNA concentration in the *Drosophila* pupal retina during the final steps of ommatidial patterning. **PLOS ONE**, 6 (8): 1-12, 2011.

MADABATTULA, S. T.; STRAUTMAN, J. C.; BYSICE, A. M.; O'SULLIVAN, J. A.; ANDROSCHUK, A.; ROSENFELT, C.; DOUCET, K.; ROULEAU, G.; BOLDUC, F. Quantitative analysis of climbing defects in a *Drosophila* model of neurodegenerative disorders. **Journal of Visualized Experiments**, (100): 52741, 2015.

MALLAJOSYULA, J. K.; KAUR, D.; CHINTA, S. J.; RAJAGOPALAN, S.; RANE, A.; NICHOLLS, D. G.; DI MONTE, D. A.; MACARTHUR, H.; ANDERSEN, J. K. MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. **PLoS One**, 3 (2): e1618, 2008.

MARGOTTA, J. W.; MANCINELLI, G. E.; BENITO, A. A.; AMMONS, A.; ROBERTS, S. P.; ELEKONICH, M. M. Effects of light on gene expression and aging in the honey bee brain and flight muscle. **Insects**, 4 (1): 9-30, 2013.

MARGNI, M.; ROSSIER, D.; CRETTEZ, P.; JOLLIET, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 93: 379-392, 2002.

MARTIN, R. D. Human brain evolution in an ecological context. **American Museum of Natural History, New York/USA**, p72, 1983.

MASLIN, M. A.; SHULTZ, S.; TRAUTH, M. A synthesis of the theories and concepts of early human evolution. **Philosophical Transactions B**, 370: 1-12, 2015.

McKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STADLAN, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, 34: 939-944, 1984.

MEDINA-LEENDERTZ, S.; PAZ, M.; MORA, M.; BONILLA, E.; BRAVO, Y.; ARCAYA, J. L.; TERÁN, R.; VILLALOBOS, V. Longterm melatonin administration alleviates paraquat mediated oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Invest. Clin**, 55: 352-364, 2014.

MENDONÇA, A. G.; ALVES, R. J.; PEREIRA-LEAL, J. B. Loss of genetic redundancy in reductive genome evolution. **PLoS Computational Biology**, 7 (2): e1001082, 2011.

MERLO, S.; SPAMPINATO, S. F.; SORTINO, M. A. Estrogen and Alzheimer's disease: Still an attractive topic despite disappointment from early clinical results. **European Journal of Pharmacology**, 817: 51-58, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença de Alzheimer. **Portaria SAS/MS nº 1.298**, 2013.

MIRANDA, A. C.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12 (1): 7-14, 2007.

MOBLEY, C. B.; MUMFORD, P. W.; KEPHART, W. C.; HAUN, C. T.; HOLLAND, A. M.; BECK, D. T.; MARTIN, J. S.; YOUNG, K. C.; ANDERSON, R. G.; PATEL, R. K.; LANGSTON, G. L.; LOWERY, R. P.; WILSON, J. M.; ROBERTS, M. D. Aging

in rats differentially affects markers of transcriptional and translational capacity in soleus and plantaris muscle. **Frontiers in Physiology**, 8: 518, 2017.

MONTOLIU-GAYA, L.; VILLEGAS, S. Protein structures in Alzheimer's disease: The basis of rationale therapeutic design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 588: 1-14, 2015.

MORARU, M. M.; EGGER, B.; BAO, D. B.; SPRECHER, S. G. Analysis of cell identify, morphology, apoptosis and mitotic activity in a primary neural culture system in Drosophila. **Neural Development**, 7: 14, 2012.

MULLAN. M.; CRAWFORD, F.; AXELMAN, K.; HOULDEN, H.; LILIUS, L.; WINBLAD, B.; LANNFELT, L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. **Nature Genetics**, 1 (5): 345-347, 1992.

NAIKI, H.; HIGUCHI, K.; HOSOKAWA, M.; TAKEDA, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, Thioflavine T. **Analytical Biochemistry**, 177: 244-249, 1989.

NADEAU, A.; ROBERGE, A. G. Effects of vitamin B12 supplementation on choline acetyltransferase activity in cat brain. **Int J Vitam Nutr Res** 58:402–406, 1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 6^a. ed. Porto Alegre. Editora Artmed. 1336p, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 7^a.ed. Porto Alegre. Editora Artmed. 1278p, 2019.

NEVES, F. F.; SOUSA, R. B.; PAZIN-FILHO, A.; CUPO, P.; JÚNIOR, J. E.; NOGUEIRA-BARBOSA, M. H. Severe paraquat poisoning: clinical and radiological findings in a survivor. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, 36 (4): 513-516, 2010.

NICHOLS, C. D.; BECNEL, J.; PANDEY, U. B. Methods to assay Drosophila behavior. **J Vis Exp**, 61: 3795, 2012.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; MAIPAS, S.; KOTAMPASI, C.; STAMATIS, P.; HENS, L. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. **Front Public Health**, 4: 148, 2016.

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annu Rev Neurosci**, 34: 185-204, 2011.

OWALD, D.; LIN, S.; WADDELL, S. Light, heat, action: Neural control of fruit fly behavior. **Philosophical Transactions Royal Society B**, 370: 1-13, 2015.

PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, V. W. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. **American Journal of Epidemiology**, 140 (3): 256-261, 1994.

PARIHAR, M. S.; BREWER, G. J. Mitochondrial failure in Alzheimer disease. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, 292 (1): 08-23, 2007.

PRASANTHI, J. R. P.; DASARI, B.; MARWARHA, G.; LARSON, T.; CHEN, X.; GEIGER, J. D.; CHRIBI, O. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. **Free Radic Biol Med** 49: 1212-1220, 2010.

PEI, L.; MU, Y.; LEBLANC, M.; ALAYNICK, W.; BARISH, G. D.; PANKRATZ, M.; TSENG, T. W.; KAUFMAN, S.; LIDDLE, C.; YU, R. T.; DOWNES, M.; PFAFF, S. L.; AUWERX, J.; GAGE, F. H.; EVANS, R. M. Dependence of hippocampal function on ERR γ -Regulated mitochondrial 106ebster106sm. **Cell Metabolism**, 21: 628-636, 2015.

PELEG, S.; FELLER, C.; FORNE, I.; SCHILLER, E.; SÉVIN, D. C.; SCHAUER, T.; REGNARD, C.; STRAUB, T.; PRESTEL, M.; KLIMA, C.; NOGUEIRA, M. S.; BECKER, L.; KLOPSTOCK, T.; SAUER, U.; BECKER, P. B.; IMHOF, A.; LADURNER, A. G. Life span extension by targeting a link between metabolism and histone acetylation in *Drosophila*. **EMBO Rep**, 17: 455-469, 2016.

PIERMARTIRI, T.; PAN, H.; FIGUEIREDO, T. H.; MARINI, A. N. Linoleic Acid, A nutraceutical with pleiotropic properties that targets endogenous neuroprotective

pathways to protect against organophosphate nerve agente-induced neuropathology. **Molecules**, 20: 20355-20380, 2015.

PONTON, F.; CHAPUIS, M. P.; PERNICE, M.; SWORD, G. A.; SIMPSON, S. J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. **J. Insect Physiol**, 57: 840-850, 2011.

PRÜßING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, 8: 35, 2013.

RAJASEKARAN, A.; VENKATASUBRAMANIAN, G.; BERK, M.; DEBNATH, M. Mitochondrial dysfunction in Schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 48: 10-21, 2015.

RASBAND, M. N. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. **Nature Reviews Neuroscience**, 11 (8): 552-562, 2010.

REBRIN, I.; BAYNE, A. C. V.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C.; SOHAL, R. S. Free aminothiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J**, 382: 131-136, 2004.

REGLODI, D.; RENAUD, J.; TAMAS, A.; TIZABI, Y.; SOCÍAS, B.; DEL-BEL, E.; RAISMAN-VOZARI, R. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. **Progress in Neurobiology**, in press, 2015.

REITER, L. T.; POTOCKI, L.; CHIEN, S.; GRIBSKOV, M.; BIER, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, 11 (6): 1114-125, 2001.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Meth. Enzymol**, 233: 357-363, 1994.

RHEE, S. G.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; KANG, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. **Mol. Cells**, 29: 539-549, 2010.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, 30 (7): 1-3, 2014.

ROBBINS, A. L.; SAVAGE, D. B. The genetics of lipid storage and human lipodystrophies. **Trends in Molecular Medicine**, 21 (7): 433-438, 2015.

SANTALLA, M.; VALVERDE, C. A.; HARNICHAR, E.; LACUNZA, E.; FUENTE, A. J.; MATTIAZZI, A.; FERRERO, P. Aging and CaMKII alter intracellular Ca^{2+} transient and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, 9 (7): 1-10, 2014.

SANTAGO II, A. C.; PLATE, J. F.; SHIVELY, C. A.; REGISTER, T. C.; SMITH, T. L.; SAUL, K. R. Age-related structural changes in upper extremity muscle tissue in a nonhuman primate model. **J Shoulder Elbow Surg**, 24: 1660-1668, 2015.

SARANTSEVA, S.; TIMOSHENKO, S.; BOLSHAKOVA, O.; KARASEVA, E.; RODIN, D.; SCHWARZMAN, A. L.; VITEK, M. P. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, 4 (12): e8191, 2009.

SATO, N.; MORISHITA, R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of β -amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 7 (199): 1-9, 2015.

SAXTON, W. M.; HOLLENBECK, P. J. The axonal transport of mitochondria. **J Cell Sci**, 125: 2095-2104, 2012.

SEO, E.; LEE, E. K.; LEE, C. S.; CHUN, K. H.; LEE, M. Y.; JUN, H. S. Psoralea corylifolia L. Seed extract ameliorates streptozotocin-induced diabetes in mice by inhibition of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p1-9, 2014.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. Alzheimer's disease: Pathophysiological and pharmacological features. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, 30 (1 Supl): 1-17, 2008.

SCHEDIN-WEISS, S.; INOUE, M.; HROMADKOVA, L.; TERANISHI, Y.; YAMAMOTO, N. G.; WIEHAGER, B.; BOGDANOVIC, N.; WINBLAD, B.; SANDEBRING-MATTON, A.; FRYKMAN, S.; TJERNBERG, L. O. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels. **Alzheimers' Research and Therapy**, 9 (57): 1-19, 2017.

SCHOENEMANN, P. T. Evolution of the size and functional areas of the human brain. **Annual Review of Anthropology**, 35: 379-406, 2006.

SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. **Frontiers in Physiology**, 8: 428, 2017.

SHAHAM, S. Glial-neuron interactions in nervous system function and development. **Current Topics in Development Biology**, 69: 39-66, 2005.

SHALTIEL-KARYO, R.; DAVIDI, D.; MENUCHIN, Y.; FRENKEL-PINTEL, M.; MARCUS-KALISH, M.; RINGO, J.; GAZIT, E.; SEGAL, D. A novel, sensitive assay for behavioral defects in Parkinson's disease model *Drosophila*. **Parkinson's Disease**, Article ID 697564, 1-6 p., 2012.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. **Biochem J.**, 114 (3): 597-610, 1969.

SHEN, L. R.; LAI, C. Q.; FENG, X.; PARNELL, L. D.; WAN, J. B.; WANG, J. D.; LI, D.; ORDOVAS, J. M.; KANG, J. X. *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. **Journal of Lipid Research**, 51: 2985-2992, 2010.

SINGH, M. K.; YADAV, S. S.; YADAV, R. S.; SINGH, U. S.; SHUKLA, Y.; PANT, K. K.; KHATTRI, S. Efficacy of crude extract of *Embica officinalis* (amla) in arsenic-induced oxidative damage and apoptosis in splenocytes of mice. **Toxicology Internacional**, 21 (1): 08-17, 2014.

SIU, P. M.; DONLEY, D. A.; BRYNER, R. W.; ALWAYS, S. E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, 94: 555-560, 2003.

SKRZYPCZAK, L. K.; CYRANKA, M.; SKRZYPCZAK, M.; KRUSZEWSKI, M. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure – state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, 18 (2): 294-303, 2011.

SNITZ, B. E.; O'MEARA, E. S.; CARLSON, M. C.; ARNOLD, A. M.; IVES, D. G.; RAPP, S. R.; SAXTON, J.; LOPEZ, O. L.; DUNN, L. O.; SINK, K. M.; DEKOSKY, S. T. Ginkgo biloba for preventing cognitive decline in older adults: a randomized trial. **JAMA** 302: 2663-2670, 2009.

SOUSA-NUNES, R.; CHENG, L. Y.; GOULD, A. P. Regulating neural proliferation in the *Drosophila* CNS. **Current Opinion in Neurobiology**, 20: 50-57, 2010.

SPENCER, S. J.; KOROSI, A.; LAYÉ, S.; SHUKITT-HALE, B.; BARRIENTOS, R. M. Food for thought: How nutrition impacts cognition and emotion. **Science of Food**, 1: 7, 2017.

SRERE, P. A. Citrate synthase. **Method Enzymol**, 13: 3-11, 1969.

STEKETEE, M. B.; MOYSIDIS, S. N.; WEINSTEIN, J. E.; KREYMERMAN, A.; SILVA, J. P.; IQBAL, S.; GOLDBERG, J. L. Mitochondrial dynamics regulate growth cone motility, guidance, and neurite growth rate in perinatal retinal ganglion cells in vitro. **Retinal Cell Biology**, 53 (11): 7402-7411, 2012.

STOCCHETTI, N.; TACCONE, F. S.; CITERIO, G.; PEPE, P. E.; ROUX, P. D. L.; ODDO, M.; POLDERMAN, K. H.; STEVENS, R. D.; BARSAN, W.; MAAS, A. I.; MEYFROIDT, G.; BELL, M. J.; SILBERGLEIT, R.; VESPA, P. M.; FADEN, A. I.; HELBOK, R.; TISHERMAN, S.; ZANIER, E. R.; VALENZUELA, T.; WENDON, J.; MENON, D. K.; VICENT, J. L. Neuroprotection in acute brain injury: na up-to-date review. **Critical Care**, 19 (186): 1-11, 2015.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 10: 91-100, 2005.

STROOPER, B. D.; ANNAERT, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. **Journal of Cell Science**, 113: 1857-1870, 2000.

SZCZEPANOWSKA, K.; TRIFUNOVIC, A. Different faces of mitochondrial DNA mutators. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1847 (11): 1362-1372, 2015.

TANAKA, S.; SHIOJIRI, S.; TAKAHASHI, Y.; KITAGUCHI, N.; ITO, H.; KAMEYAMA, M.; KIMURA, J.; NAKAMURA, S.; UEDA, K. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: Enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 165: 1406-1414, 1989.

TANNER, C. M.; KAMEL, F.; ROSS, G. W.; HOPPIN, J. A.; GOLDMAN, S. M.; KORELL, M.; MARRAS, C.; BHUDHIKANOK, G. S.; KASTEN, M.; CHADE, A. R.; COMYMS, K.; RICHARDS, M. B.; MENG, C.; PRIESTLEY, B.; FERNANDEZ, H. H.; CAMBI, F.; UMBACH, D. M.; BLAIR, A.; SANDLER, D. P.; LANGSTON, W. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives**, 119 (6): 866-872, 2011.

TATUM, E. L. Nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. **PNAS**, 25 (9): 490-497, 1939.

TESTA, N. D.; GHOSH, S. M.; SHINGLETON, A. W. Sex-specific weight loss mediates sexual size dimorphism in *Drosophila melanogaster*. **PLOSone**, 8 (3): e58936, 2013.

TRAVERN, A.; JELICIC, B.; SOPTA, M. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. **EMBO Rep**, 7 (5): 496-499, 2006.

TREVISIOL, A.; NAVE, K. A. Brain Energy Metabolism: Conserved functions of glycolytic glial cells. **Cell Metabolism**, 22: 361-362, 2015.

UPADHYAY, R.; CHAURASIA, J. K.; TIWARI, K. N.; SINGH, K. Antioxidant property of aerial parts and root of *Phyllanthus fraternus* 112ebster, an important medicinal plant. **The Scientific World Journal**, p1-7, 2014.

VELLAS, B.; COLEY, N.; OUSSET, P. J.; BERRUT, G.; DARTIGUES, J. F.; DUBOIS, B.; GRANDJEAN, H.; PASQUIER, F.; PIETTE, F.; ROBERT, P.; TOUCHON, J.; GARNIER, P.; MATHIEX-FORTUNET, H.; ANDRIEU, S. Long-term use of standardized Ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer' disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. **Lancet Neurol**, 11: 851-859, 2012.

VENIGALLA, M.; GYENGESI, E.; MÜNCH, G. Curcumin and Apigenin – novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, 10 (8): 1181-1185, 2015.

WU, M.; KALYANASUNDARAM, A.; ZHU, J. Structural and biomechanical basis of mitochondrial movement in eukaryotic cells. **International Journal of Nanomedicine**, 8: 4033-4042, 2013.

WU, S.; DING, Y.; WU, F.; LI, R.; HOU, J.; MAO, P. Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 48: 1-9, 2015.

WU, T. H.; BECHTEL, P. J. Salmon by-product storage and oil extraction. **Food Chemistry**, 11: 868-871, 2008.

XAVIER, J. M.; RODRIGUES, C. M. P.; SOLÁ, S. Mitochondria: Major regulators of neural development. **The Neuroscientist**, p1-13, 2015.

XUE, C.; LIN, T. Y.; CHANG, D.; GUO, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. **R. Soc. Open Sci**, 4: 160696, 2017.

YAN, D.; ZHANG, Y.; LIU, L.; YAN, H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, 6: 32222, 2016.

ZARROUK, A.; DEBBABI, M.; BEZINE, M.; KARYM, E. M.; BADREDDINE, A.; ROUAUD, O.; MOREAU, T.; CHERKAoui-MALKI, M.; AYEB, M. E.; NASSER, B.; HAMMAMI, M.; LIZARD, G. Lipid biomarkers in Alzheimer disease. **Current Alzheimer Research**, 14: 1-10, 2017.

ZHAO, Q. F.; TAN, L.; WANG, H. F.; JIANG, T.; TAN, M. S.; TAN, L.; XU, W.; LI, J. Q.; WANG, J.; LAI, T. J.; YU, J. T. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and Meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, 15 (190): 264-271, 2016.

ZHANG, H.; DAVIES, K. J. A.; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology & Medicine**, 88: 314-336, 2015^a.

ZHANG, R.; ZHANG, C. Y.; ZHAO, Q.; LI, D. H. Spectrin: Structure, function and disease. **Sci China Life Sci**, 56 (12): 1076-1085, 2013.

ZHANG, Y.; LIU, G.; YAN, J.; ZHANG, Y.; LI, B.; CAI, D. Metabolic learning and memory formation by the brain influence systemic metabolic homeostasis. **Nature Communications**, 6: 1-13, 2015.

ZHANG, W.; LI, P.; HU, X.; ZHANG, F.; CHEN, J.; GAO, Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: Metabolism and Neuroprotection. **Frontiers in Bioscience**, 16: 2653-2670, 2011.

ZIEGLER, A. B.; MÉNAGÉ, C.; GRÉGOIRE, S.; GARCIA, T.; FERVEUR, J. F.; BRETILLON, L.; GROSJEAN, Y. Lack of dietary polyunsaturated fatty acids causes synapse dysfunction in the *Drosophila* visual system. **PLoS One**, 10:1-15, 2015.

ZIEGLER, A. B.; AUGUSTIN, H.; CLARK, N. L.; BERTHELOT-GROSJEAN, M.; SIMONNET, M. M.; STEINERT, J. R.; GEILLON, F.; MANIÈRE, G.; FEATHERSTONE, D. E.; GROSJEAN, Y. The amino acid transporter Jhl-21 coevolves with glutamate receptors, impacts NMJ physiology, and influences locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, 6: 19692, 2016.

ZOLALI, E.; HAMISHEHKAR, H.; MALEKI-DIZAJI, N.; ZOLBANIN, N. M.; GHAVIMI, H.; KOUHSOLTANI, M.; ASGHARIAN, P. Selenium effect on oxidative stress factors in septic rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 4(3): 289-293, 2014.

9. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

- ARTIGO

- Vulczak, A.; **Souza, A. O.**; Ferrari, G. D.; Pereira-da-Silva, G.; Alberici, L. C. Moderate exercise modulated tumor metabolism and reduced tumorigenesis in triple negative breast cancer. (2019) MANUSCRITO EM SUBMISSÃO
- Santos, D. E.; **Souza, A. O.**, Tibério, G. J. ; Alberici, L. C.; Hartfelder, K. Differential balance of ROS production, cellular redox state and antioxidant system gene expression in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development (2019) MANUSCRITO EM SUBMISSÃO
- Brandão, C. F. C.; Carvalho, F. G.; **Souza, A. O.**; Miranda, G. B.; Junqueira-Franco, M. V. M.; Couto-Lima, C. A.; Fett, C. A.; Papoti, M.; Freitas, E. C.; Alberici, L. C.; Marchini, J. S. Physical training increase mitochondrial respiration from subcutaneous white adipose tissue obese women. (2019) MANUSCRITO EM SUBMISSÃO
- **De Oliveira Souza, A.**; Couto-Lima C. A.; Catalão, C. H. R.; Santos-Júnior, N. N.; Rocha, M. J. A.; Alberici, L. C. Neuroprotective action of Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexaenoic (DHA) acids on Paraquat intoxication in *Drosophila melanogaster*. (2018) DOI: 10.1016/j.neuro.2018.11.013.
- Santos-Junior, N.; Catalão, C. H. R.; **Souza, A. O.**; Mota, C.; Alberici, L. C.; Branco, L. G.; Rocha, M. J. Sepsis induces sustained inflammation and acetylcholinesterase activity impairment in the hypothalamus. (2018) DOI: 10.1016/j.jneuroim.2018.08.013.
- Rossignoli, C. P.; Dechandt, C. R. P.; **Souza, A. O.**; Sampaio, I. H.; Vicentini, T. M.; Teodoro, B. G.; Neto, M. P. C.; Ferrari, G. D.; Couto-Lima, C. A.; Alberici, L. C. Effect of intermittent dietary supplementation with conjugated linoleic acid and fish oil (EPA/DHA) on body metabolism and mitochondrial energetics in mice (2018) DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.001
- Cervoni, M. S.; Cardoso-Júnior, C. A. M.; Craveiro, G.; **Souza, A. O.**; Alberici, L. C.; Hartfelder, K. Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene

expression are associated with age-related division of labor in honey bee, *Apis mellifera* L., workers. (2017) DOI: 10.1242/jeb.161844

- **De Oliveira Souza, A.**; Couto-Lima, C. A.; Machado, M. C. R.; Espreafico, E. M.; Ramos, R. G. P.; Alberici, L. C. Protective action of ômega-3 on paraquat intoxication in *Drosophila melanogaster*. (2017) DOI: 10.1080/1587394.2017.1357345
- Catalão, C. H. R.; Santos-Júnior, N. N.; Da Costa, L. H. A.; **Souza, A. O.**; Alberici, L. C.; Rocha, M. J. A. Brain oxidative stress during experimental sepsis is attenuated by Simvastatin administration. (2016) DOI: 10.1007/s12035-016-0218-3
- Teodoro, B. G.; Sampaio, I. H.; Bomfim, L. H. M.; Queiroz, A. L.; Silveira, L. R.; **Souza, A. O.**; Fernandes, A. M. A. P.; Ederlin, M. N.; Huang, T. Y.; Zheng, D.; Neuffer, P. D.; Cortright, R. N.; Alberici, L. C. Long-chain acyl-CoA synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human. (2016) DOI: 10.1113/JP272962

- ARTIGO DE CONFERÊNCIA

- Guimarães, M. P.; **Souza, A. O.**; Maciel, J. G.; Pupim, M. P.; Monteverde, N. L. S.; Nogueira-Barbosa, M.; Alberici, L. C.; Santana, R. C.; Navarro, A. M. Functionality and density mitochondrial of subcutaneous adipose tissue in men with HIV-associated lipodystrophy syndrome. (2018) DOI: 10.1016/j.clnu.2018.06.1926
- Costa, L. H. A.; Catalão, C. H. R.; Santos-Júnior, N. N.; **Souza, A. O.**; Alberici, L. C.; Rocha, M. J. A. Simvastatin effects in the brain oxidative stress during experimental sepsis. (2016) DOI: 10.1186/s13054-016-1518-8

- CAPÍTULO DE LIVRO

- Appolinário, P. P.; **Souza, A. O.** Bioquímica dos nutrientes e o exercício. Editora: Martinari. (2015) ISBN: 9788581160597

10. MATERIAL SUPLEMENTAR

Efeito da suplementação de PQ e omega-3 na dieta de Drosophila melanogaster –
Os tóraxes foram fixados como descritos em Materiais e Métodos no item 4.12.1. Porém, a incubação em PBS-T 0,2% com faloidina ocorreu em 30 minutos. As amostras foram excitadas em 488 (verde) e 680 (vermelho) nm.

Figura S1: Distribuição de mitocôndrias e filamentos de actina/miosina em tóraxes de *D. melanogaster* submetidas a uma dieta suplementada com PQ e/ou ω-3. Imagens de microscopia confocal da musculatura torácica de *D. melanogaster*, demonstrando as proteínas GFP (verde) ancoradas nas membranas mitocondriais e filamentos de actina/miosina (vermelho) marcadas com faloidina.

Linearidade Citrato Sintase

Figura S2: Reação catalítica da enzima Citrato Sintase (CS). Plot realizado como proposto por Michaelis-Menten para a enzima CS com acetil-CoA e oxaloacetato variando nas concentrações como substrato. **(A)** Concentração de acetil-CoA utilizada foi de 0,01 – 0,1 mM e para **(B)** oxaloacetato variamos de 0,05 – 0,2 mM. Todos os experimentos foram realizados como descritos em Materiais e Métodos no item 4.4.

Western Blotting

Figura S3: Western Blotting. A solução Ponceau foi usada para a detecção de proteínas como (A) elav e (B) α-spectrin em membranas de nitrocelulose.

Figura S4: Western Blotting. Detecção da proteína elav em membranas de nitrocelulose. Todos os experimentos foram realizados como descrito em Materiais e Métodos no item 4.11.

Figura S5: Western Blotting. Detecção da proteína α -spectrina em membranas de nitrocelulose. Todos os experimentos foram realizados como descrito em Materiais e Métodos no item 4.11.

11. RELATÓRIO DE ATIVIDADES – BOLSA CAPES (PDSE)

University of Burgundy
Center for Taste and Feeding Behaviour

**The influence of Eicosapentaenoic (EPA) and
Docohexaenoic (DHA) acids on olfactory neuron
signaling in neurodegenerative processes**

PhD student: MSc. **Anderson de Oliveira Souza**

PhD advisor (in Brazil): Dra. Luciane Carla Alberici

PhD advisor (in France): Dr. Yaël Grosjean

Dijon
2018

This report refers to the internship period provided by process 88881.189959/2018-01 of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministry of Education – Brazil.

1. INTRODUCTION

The recent increase in the occurrence of neurodegenerative disorders, responsible for 4% of all deaths in the world, may be related to biotechnological advances in agriculture and medicine, and to a significant increase in human longevity seen in the last century (Gus, 2007; Pearce and Kroomhout, 2014). Of the tissues that can contribute to longevity, the brain stands out for regulating the functioning of important organs and although it represents only 2% of body weight, this tissue is responsible for consuming 20% of all the oxygen consumed by the organism.

The nervous system allows individuals to interact with their environment. A part of its function is dedicated to identify sensory cues such as volatile chemicals. The olfactory neurons (OSNs) stand out because they are the first step in communicating the information initiated by the odorant to higher brain centers. These centers code and decode the sensory input triggered by OSN to store it as a memory and to lead to emotions (Boyce; Shone, 2006). In mammals, emotional processes are mediated by the amygdala. When it becomes active, its anatomical connections with the cortex and/or with the hippocampus can facilitate the processing of any given stimulus, such as odors. In this way, OSNs favor an intimate integration of the odoriferous information in the central nervous system. OSN also initiate a memory for odorants that present emotional content. This process will be proportional to the intensity of the signal captured by OSNs (Anderson et al., 2007; Pergher et al., 2006; Krusemark et al., 2013).

The neurons promote an important equilibrium between stimulation/inhibition of different physiological processes by the neurotransmitters, but in the metabolic aspect are unable to store glucose and are totally dependent on aerobic metabolism, which oxidizes carbon derived from the diet to generate ATP, an essential condition to favor the release of neurotransmitters in the synaptic cleft (Ankarcrona et al., 2010; Demetrius et al., 2015; Magistretti and Allaman, 2015). Most of the energy produced in the brain is consumed by synaptic transmission, so the neurons are strongly impacted by any alteration in the mitochondrial activity (Llorente-Folch et al., 2015). Changes in mitochondrial metabolism especially in dynamics (Chan et al., 2015; Chinnery, 2015), oxidative phosphorylation and oxidative stress, are associated with aging and various human neurological diseases (Pei et al., 2015; Rajasekaran et al., 2015). Disorders associated with mitochondrial dysfunction are progressive and expressed belatedly in life, as in Parkinson and Alzheimer patients (Bunkar et al., 2016; Simoncini et al., 2015), suggesting that for a period, mitochondria are able to cope with important physiological changes (Baker et al., 2011).

Some food nutrients may also protect mitochondria from oxidative damage by improving aerobic metabolism or by limiting mitochondrial reactive oxygen species (Suliman; Piantadosi, 2016). Among these, eicosapentaenoic acid (20: 5 ω -3, EPA) and docosahexaenoic acid (22: 6 ω -3, DHA) are long chain polyunsaturated fatty acids obtained in the feed, in which they promote several benefits for the functioning of mitochondria (Swanson et al., 2012). EPA and DHA also reduce the fraction of cholesterol in the neuronal membrane, facilitating the

release of neurotransmitters (Zhang et al., 2011), acting as neurotrophic factors (Zhang et al., 2015). EPA and DHA are considered as possible strategic preventive nutrients to protect against neurodegenerative diseases (Innis, 2008), depression (Deacon et al., 2017; McNamara, 2016), schizophrenia (Pawelczyk et al., 2016) and psychiatric disorders associated with inflammation (Matsuoka et al., 2016).

Different animal models are used to understand peculiar aspects of neurodegenerative diseases in humans, such as rats (Benedikz et al., 2009), mice (Janus; Welzl, 2010), rabbits (Deci et al., 2012), fishes (Xi et al., 2011) and nematodes (Link, 2006). However, *Drosophila melanogaster* has been intensively studied for more than a hundred years (Alaraby et al., 2016) and is a very valuable genetic model to understand diseases. This small insect has important similarities to humans, as adult tissues are not regenerated in *D. melanogaster*. If the wing is removed, the organism will remain without such a structure (Jennings, 2011). In nerve tissue, *D. melanogaster* and humans present important similarities such as in synaptic formation, neuronal communication and mechanism of cell death. Some ortholog neurobiological mechanisms exist in regard to sensory perception, neuromuscular integration, neural circuitry and learning and memory formation (Chakraborty et al., 2011; Chambers et al., 2015; Hirth, 2010; Nall; Sehgal, 2014; Prübing et al., 2013; Ziegler et al., 2015).

In the present study, we intend to test the influence of some omega-3 fatty acids on *D. melanogaster* expressing the amyloid precursor protein (APP)₆₉₅ gene, the most expressed isoform of APP in the human brain with Alzheimer's disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Culture of *Drosophila melanogaster* – The flies (w^1118 ; $P\{w^{+mC}=UAS-APP_{695}-Swedish-N-myc\}TS23$ from Bloomington *Drosophila* Stock Center – BDSC, still the stocks w^{1118} and $w^{+};elav-Gal4/TM6b$ used as drivers and internal controls) were maintained under traditional growing conditions ($25\pm1^{\circ}C$, 12:12 hours light/dark) and separated into two groups: 1) on standard food containing cornmeal (6.5% m/v), agar (1% m/v), Tegosept (Apex) antifungic (3% v/v), and yeast (6.5% m/v) (control) (Depetris-Chauvin et al., 2017); 2) on food supplemented with 1 mg/mL of omega-3 (EPA/DHA) (De Oliveira Souza et al., 2017). Female and male of *D. melanogaster* (up to 6 hours after pupal eclosion) were separated and submitted to different dietary conditions for 10 days. After 2 days, the insects (male and female) were transferred on vials containing identical fresh food conditions to avoid death due to contaminated food with fungi and/or bacteria (Bosco et al., 2015; Oka et al., 2015).

2.2 Development of *D. melanogaster* – A solution for oviposition was prepared containing 15% agar, 3% sucrose and 3% antifungal solution. After solidification of the solution in a Petri dish, yeast commercial was mixed with distilled water and placed gently in the center of the dish, odor from this mixture stimulates a better egg deposition. Approximately 50 flies (males and females) were kept for 24 hours under controlled conditions ($25\pm1^{\circ}C$, 12:12 hours light/dark). After this period, fifty eggs were collected and transferred to tubes containing the experimental conditions mentioned in item 2.1.

2.3 Lifespan and Climbing assay – For the survival test, each tube containing the different feeding conditions, animals from the oviposition experiment (described in item 2.2) were monitored for 30 days, counting the live and dead animals in this period. On the other hand, climbing activity was measured as described by Benzer (1967), using the countercurrent apparatus, later conducted for 30 days. The results were obtained by means of the phototaxis index, which is calculated by the equation:

$$\sum (i \cdot N_i) / N$$

N represents the total number of flies assayed; i the tube number (0-5) and N_i the number of flies in the i^{th} tube at the end of the experiment (Ziegler et al., 2015).

2.4 Citrate synthase (CS) activity – Fifteen heads were homogenized with tungsten beads in 0.05 mL triethanolamine-HCl buffer (0.1 M) pH 8, to disrupt mitochondrial membranes. Then, the homogenates were centrifuged at 12000xg for 10 min at 4°C, the supernatant collected (Peleg et al, 2016) and protein concentration determined. The reaction (10 minutes) was started by adding 10 µg protein to ~170 µL triethanolamine-HCl buffer containing 0.1 mM Acetyl-CoA, 0.1 mM 5',5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.2 mM oxaloacetate and 0.1 % Triton X-100. The reduced CoA (CoA-SH) formed by CS activity converts the DTNB into 2-nitro-5-benzoic acid (TNB). CS activities were evaluated by the rate of TNB formation, measured spectrophotometrically at 412 nm according to Sere

(1969) using a Model Spectrophotometer (Perkin Elmer, Model Envision 2104). The CS activity was calculated by the following equation: Units ($\mu\text{mol/mL/min}$) = $((\Delta A_{412}) / \text{min} \times V \text{ (mL)} / \epsilon^{\text{mM}} \times L \text{ (cm)})$, where A_{412} is the absorbance of TNB in 412 nm, $V \text{ (mL)}$ is the reaction volume (mL), ϵ^{mM} is the extinction coefficient of TNB which is $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and, $L \text{ (cm)}$ pathlength for absorbance measurement. Each sample was run in quintuplicate and the absorbance values were expressed per total amount of protein in the sample.

2.5 Acetylcholinesterase (AChE) activity – Fifteen heads of *D. melanogaster* were homogenized with tungsten beads in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 to promote the cellular disruption. The homogenates were centrifuged at 9000xg for 30 minutes at 4°C and the supernatant collected (Aguilar et al., 2016). After protein quantification (Lowry method), the reaction (10 minutes) was initiated by the addition of 10 μg protein to 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 150 mM acetylcholine and 10 mM DTNB. AChE activity was determined spectrophotometrically, based on the methodology of Ellman et al. (1961) using a Model Spectrophotometer (Perkin Elmer, Model Envision 2104) to express the result in ηmol of formed/minute/mg protein. Each sample was analyzed in triplicate.

2.6 qRT-PCR – For qRT-PCR, fifteen heads were lysed with TRIzol (Invitrogen) with tungsten beads and the RNA was extracted and treated with RNase free DNase to eliminate genomic DNA. The purification occurred by means of chloroform, isopropanol and ethanol 75% and total RNA (2 μg) was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). A standard protocol

was used for real-time PCR (Applied Biosystems, Roche) (Manière et al., 2016). cDNA was analyzed by the construction of specific primers (Supplementary informations) for mitochondrial biogenesis (Spagel/dPGC-1), retrograde axonal transport (Dynein, Dnah3), anterograde axonal transport (Kynasin, Khc), neuronal function/viability (Talin-rhea) and constitutive RP49 genes and amplified by TaqPolimerase with fluorophore (EvaGreen - BioRad).

2.7 Fluorescence quantification – Flies heads were isolated in PBS with 0.3% (v/v) Triton X-100 (PBS-T 0.3%) and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 40 minutes with shaking (~70 rpm). Tissues were washed twice in PBS-T 0.3% for 30 minutes with shaking. The brains dissections were in PBS and incubated in 200 μ M Thioflavin T solution in room temperature (in absence of light) for 10 minutes with shaking. Tissue were washed three times with PBT-T and Vectashield used to mount on slides for microscopy.

2.8 Fluorescence microscopy – The images were performed in a Zeiss microscope using LSM 510 laser (Zeiss) with emission in 488 nm for Thioflavin T.

2.9 Protein assay – The protein concentration was determined by Lowry assay using ovoalbumin (0.2 – 1.2 mg/mL) as the standard.

2.10 Statistical analyses – The data are presented as mean $\pm$ S.E.M. N means the number of flies per group used in each experiment. Statistical analysis was performed using a paired Student *t* test for two-mean comparison and two-way

ANOVA for multiple comparisons using the GraphPad ©Prism 6 software (San Diego, CA, USA). Results were considered significant when $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$) and ns for $P > 0.05$.

3. RESULTS

The influence of EPA/DHA on pupariation rate in Drosophila melanogaster phenotypes – The addition of EPA/DHA in semisolid food did not have a significant influence on pupariation rate in phenotypes after 5 days of feeding (**Figure 1**).

Figure 1: Pupariation rate of *D. melanogaster* phenotypes fed on diet supplemented with/without EPA/DHA. The Pupariation rate were monitored in *D. melanogaster* phenotypes (n = 250) as described in item 2.2. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of five experiments. Two-way ANOVA, interaction ($F_{(2,24)} = 0.9632$, $p = 0.3959$). The results were considered statistically significant when $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. ^a vs elav-Gal4/UAS-APP standard diet, ^b vs elav-Gal4/+ standard diet, ^c vs UAS-APP/+ standard diet and ^d vs elav-Gal4/UAS-APP supplemented EPA/DHA.

Longevity and climbing activity – The consumption of EPA/DHA for two days does not show any effects on the longevity and climbing activity in the phenotypes. Only from 10 days, *D. melanogaster* phenotype expressing APP₆₉₅ showed a significant reduction in survival rate (**Figure 2A**) and climbing ability (**Figure 2B**), which were inhibited by EPA/DHA consumption.

Figure 2: Lifespan and climbing activity of *Drosophila melanogaster* fed a diet supplemented with/without EPA/DHA. (A) Lifespan and (B) Climbing activity were monitored in *D. melanogaster* as described in item 2.3. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of five experiments. Two-way ANOVA, interaction: (A) 2 days ($F_{(2,24)} = \text{ns}$, $p = \text{ns}$), 10 days ($F_{(2,24)} = 5.008$, $p = 0.0152$) and 15 days ($F_{(2,24)} = 8.045$, $p = 0.0021$). (B) 2 days ($F_{(2,24)} = 0.08933$, $p = 0.9148$), 10 days ($F_{(2,24)} = 5.378$, $p = 0.0118$) and 15 days ($F_{(2,24)} = 12.02$, $p = 0.0002$). The results were

considered statistically significant when $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$. ^a vs elav-Gal4/UAS-APP standard diet, ^b vs elav-Gal4/+ standard diet, ^c vs UAS-APP/+ standard diet and ^d vs elav-Gal4/UAS-APP supplemented EPA/DHA.

Production of amyloid fibrils – The administration of EPA/DHA was able to prevent the significant increase in the production of amyloid fibrils in *D. melanogaster* by 20%, 15% and 26% after 10 (**Figure 3D**), 15 (**Figure 3E**) and 30 days (**Figure 3F**), respectively.

Figure 3: Amyloid fibrils detection in heads of *D. melanogaster* fed on a diet with/without EPA/DHA. The amyloid fibrils detection were performed as described in item 2.7 and 2.8 in different stages of development **(A)** larvae and adults after **(B)** 2 days, **(C)** 5 days, **(D)** 10 days, **(E)** 15 days and **(F)** 30 days eclosion. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of five experiments. The results were considered statistically significant when $*P<0.05$.

Citrate synthase activity – Flies transgenic expressing APP₆₉₅ showed increase of amyloid fibrils (**Figure 3**) and decrease of CS activity (**Figure 4**) a extensive evidence for altered oxidative metabolism in Alzheimer's brain tissue (Moreira et al., 2010), but after supplementation of EPA/DHA was able to induced a increase of citrate synthase activity, an enzyme of Krebs Cycle which can be an indicative of mitochondrial content (**Figure 4**).

Figure 4: Citrate synthase (CS) activity in heads of *D. melanogaster* after 10 days on a diet supplemented with/without EPA/DHA. The CS activity were performed as described in item 2.4. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of three experiments. Two-way ANOVA, interaction ($F_{(2,12)} = 4.237$, $p = 0.0405$). The results were considered statistically significant when $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. ^a vs elav-Gal4/UAS-APP standard diet, ^b vs elav-Gal4/+ standard diet, ^c vs UAS-APP/+ standard diet, ^d vs elav-Gal4/UAS-APP supplemented EPA/DHA and ^e vs elav-Gal4/+ supplemented EPA/DHA.

Acetylcholinesterase (AChE) activity – The AChE activity is lower in most regions of Alzheimer brains, but it is increased within and around amyloid fibrils (Carvajal and Inestrosa, 2011). Although EPA/DHA supplementation was not altered AChE activity in the most phenotypes studied, it was sufficient to reduced the AChE activity in 22% of transgenic flies expressing APP₆₉₅ (**Figure 5**).

Figure 5. Acetylcholinesterase (AChE) activity of *D. melanogaster* submitted to a diet supplemented with/without EPA/DHA. The AChE activity were performed as described in item 2.5. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of three experiments. Two-way ANOVA, interaction ($F_{(2,12)} = 6.495$, $p = 0.0123$). The results were considered statistically significant when $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. ^a vs elav-Gal4/UAS-APP standard diet, ^b vs elav-Gal4/+ standard diet and ^c vs UAS-APP/+ standard diet.

Neuronal mRNA expression levels – High levels of intracellular APP were associated with decreased ATP synthesis, loss of the mitochondrial membrane potential, therefore, dysfunctional mitochondria (Lin and Beal, 2006), aspects evidenced in the reduction of spargel mRNA levels (**Figure 6A**). However, the molecular functionality of talin (**Figure 6B**) and kinesin (Khc) (**Figure 6C**) was not altered by the expression of APP₆₉₅. Finally, EPA/DHA administration was able to elevate mRNA expression of spargel, an important gene related to mitochondrial biogenesis.

Figure 6. The mRNA expression levels of protein involved in mitochondrial biogenesis, neuronal integrity and axonal transport in heads of *D. melanogaster*. Analysis of the mRNA levels of (A) Spargel, (B) Talin and (C) Khc. RP49 gene was used for normalization. The mRNA expression were performed as described in item 2.6. The values represent the mean $\pm$ S.E.M of six experiments. Two-way ANOVA, interactions: (A) ($F_{(2,30)} = 12.47$, $p = 0.0001$), (B) ($F_{(2,30)} = 0.1750$, $p = 0.8403$) and (C) ($F_{(2,30)} = 0.2772$, $p = 0.7598$). The results were considered statistically significant when $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. ^a vs elav-Gal4/UAS-APP standard diet, ^b vs elav-Gal4/+ standard diet, ^c vs UAS-APP/+ standard diet and ^d vs elav-Gal4/UAS-APP supplemented EPA/DHA.

4. DISCUSSION

Here, we demonstrate that the expression of the human amyloid precursor protein (APP) gene, specifically the APP₆₉₅ isoform in *Drosophila melanogaster* showed important neurodegenerative aspects from the tenth day after eclosion, during development, it was possible to verify an accumulation of amyloid fibrils and as a consequence the pupariation rate was only approximately 20%. The survival rate shows a significant reduction in adults with 10 days and this effect was followed up to 30 days after eclosion (data not shown), yet data on climbing ability indicate a possible reduction in locomotor capacity in the presence of APP as demonstrated by Liu et al., (2018).

The consumption of EPA/DHA in *D. melanogaster* influenced the lower deposition of amyloid fibrils by reducing gamma-secretase activity (De Oliveira Souza et al., 2019), but did not affect the low pupariation rate, however, avoided the decline in survival rate and climbing ability in flies expressing APP₆₉₅, suggesting that in the initial stages the expression of APP may be compromising the expression of important genes related to neuromuscular maturation, a possible condition lethal (Dawkins, 2014).

Reduced climbing activity may also be associated with increased AChE activity in head of flies expressing APP₆₉₅. AChE plays a vital neuronal and muscle function and catalysis favors a great uptake of calcium for muscle contraction while in the central nervous system maintains a balance between neurotransmitters and acetylcholine (Ferreira-Vieira et al., 2016; Aldunate et al., 2004). The toxic effect of APP was more pronounced as evidenced by increased AChE activity. This condition

may be explained by AChE promotes amyloid fibrils formation, in fact, AChE forms macromolecular complexes with the growing amyloid fibrils, and its incorporated into senile-like plaque in vitro, similar condition as the filaments found in the brains of AD patients (Morgan et al., 2004) and in the cortical extracts of APP₆₉₅ mice (Fodero et al., 2002).

The intake of EPA/DHA was able to reduce the AChE activity and the beneficial effects of omega-3 on neuronal functions have traditionally been assumed to be mediated via fatty acid enrichment of neuronal membranes and alterations in membrane biophysical properties (Willis et al., 2009). This effect might be of therapeutic interest in the treatment of Alzheimer disease as demonstrated with IDN5706, a hyperforin derivative that has potential preventive effects on the development of DA (Carvajal and Inestrosa, 2011).

A higher degree of amyloid fibrils deposition accumulates exclusively in the protein import channels of mitochondria of human AD brains (Anandatheerthavarada et al., 2003), reduced levels of brain ATP and elevated lactate concentration in *D. melanogaster* after exposure to herbicide (De Oliveira Souza et al., 2019) suggested a metabolic shift occurring a neurotransmitter release impairment. These effects are associated with reduced citrate synthase activity and spargel mRNA levels in flies transgenic expressing APP₆₉₅, also the genes associated with neuronal viability (talin) and axonal transport (kinesin) were not affected by the presence of APP₆₉₅. However, the high mitochondrial content in the head was associated with biogenesis because the mRNA level of spargel expression, a master regulator of mitochondrial biogenesis, was markedly affected by EPA/DHA treatment, suggesting an important neuroprotective effect.

5. CONCLUSION

The intake of EPA/DHA protected flies that expressed the APP₆₉₅ isoform, preserving neuromuscular functions, improving biogenesis and mitochondrial content, as well as delaying the deposition of amyloid fibrils in the brain. Thus, the consumption of EPA/DHA provided a protection for *D. melanogaster* against the neuronal changes induced by the APP₆₉₅ isoform, still reinforcing its protective role in neurodegenerative diseases.