

DIETA RICA EM AÇÚCAR ALTERA NÍVEIS METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS, VIABILIZANDO O ESTUDO DE DIABETES EM MOSCAS DA FRUTA *DROSOPHILA MELANOGASTER*¹

Daiane de Aquino Silva², Luana Garcia³, Jassana Moreira Floriano⁴

¹ Pesquisa desenvolvida pelo Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa/ UNIPAMPA

² Nutricionista, Mestra em Bioquímica

³ Nutricionista

⁴ Nutricionista, Mestra em Ciências Farmacêuticas

Introdução: Entre as doenças não transmissíveis de maior prevalência nas últimas décadas, destaca-se o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2).

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi viabilizar o modelo de estudo de DM2 em moscas da fruta.

Metodologia: Para as dietas hiperglicídica foi adicionado sacarose nas concentrações de 10, 30 e 40 %. Foi avaliado a mortalidade, peso corporal e ao final dos 10 dias a atividade locomotora. Após o período do experimento as moscas foram crioanestesiadas, eutanasiadas e homogeneizadas para realização das análises bioquímicas.

Resultados: Nossos resultados demonstram que a ingestão da dieta hiperglicídica culmina em aumento de peso, e dos níveis de glicose e triglicerídeos em *Drosophila melanogaster*, nas concentrações de 30% e 40% de sacarose. A Dieta hiperglicídica teve um impacto negativo no comportamento locomotor das mesmas.

Conclusão: Este trabalho evidencia a viabilidade do modelo de estudo de diabetes mellitus tipo 2 em moscas da fruta.

INTRODUÇÃO

As doenças não transmissíveis são a principal causa de mortalidade, tendo sido responsáveis, em 2012, por 38 (68%) dos 56 milhões de mortes em todo o mundo. Mais de 40% dessas mortes (16 milhões) foram prematuras (isto é, antes dos 70 anos de idade), (OMS, 2021). Entre essas doenças destaca-se o diabetes mellitus (DM) que é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. Dentre os tipos de DM, o mais comum é o tipo II, que ocorre em cerca de 90% dos casos e é ocasionado por uma interação de fatores genéticos, como a herdabilidade e fatores ambientais, tais como sedentarismo, envelhecimento e dietas ricas em açúcares e gorduras

(SBD, 2021). Os efeitos relacionados a essa doença incluem danos a longo prazo, disfunção e falência de vários tecidos e órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ROVENKO *et al.*, 2015).

Nesse cenário, e diante da alta incidência dessa condição metabólica do DM 2 no Brasil, bem como dos agravos e índices significativos de morbimortalidade que a doença acarreta à população atingida, reforça-se a necessidade de melhor compreender os mecanismos e fatores que se relacionam diretamente com o seu aparecimento, suas possíveis complicações e seu controle. Logo, são relevantes os acréscimos de conhecimento acerca das estratégias de enfrentamento de tal distúrbio.

Nesse contexto o interesse pelo uso de modelos experimentais alternativos em pesquisas vem crescendo a cada ano. Entre esses modelos destaca-se, a *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), que tem se mostrado uma alternativa promissora como modelo experimental para o estudo de doenças crônicas, considerando que várias alterações metabólicas relacionadas com a obesidade em seres humanos podem ser observados na *Drosophila melanogaster*, devido á semelhanças existentes entre várias vias de sinalização pertencente aos mamíferos (DE PAULA *et al.*, 2016) . Com base no exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas por uma dieta hiperglicídica, afim de verificar a viabilidade de um modelo de estudo experimental tipo diabetes em *Drosophila melanogaster*.

MÉTODOS

As *Drosophila melanogaster* tipo selvagem (estirpe Harwich) foram obtidas a partir da Espécie Nacional da Center, Bowling Green, Ohio, USA. Foram utilizadas moscas adultas fêmeas, com até 3 dias de idade, mantidas em temperatura controlada de 25° a 30°, com 50% de umidade em ciclos claro e escuro por 12 horas.

Divididas em quatro grupos de 50 moscas cada: (1) dieta padrão, (2) dieta hiperglicídica 10%, (3) dieta hiperglicídica 30%, (4) dieta hiperglicídica 40%. Para a dieta padrão foi utilizada uma mistura padronizada de farinha de milho, fermento biológico fresco, leite em pó, gérmen de trigo, sal, açúcar e antifúngico, nas concentrações descritas de acordo com a **Tabela 1**.

Tabela 1 Composição da dieta padrão

Ingrediente	%
-------------	---

Farinha de milho M	34,02%
Farinha de milho G	42,53%
Gérmen de trigo	8,54%
Açúcar	7,23%
Leite	7,23%
Sal	0,42%
Fermento em pó	0,042%
Total	100%

Para as dietas hiperglicídicas foi adicionado sacarose nas concentrações de 10, 30 e 40 %. As moscas foram expostas as respectivas dietas durante 10 dias.

A taxa de mortalidade foi avaliada por contagem diária do número de moscas vivendo até ao final do período experimental, cerca de 150 moscas por grupo foram incluídos nos dados de mortalidade e o número total de moscas representa a soma das três repetições (50 moscas / cada repetição do tratamento).

Para a avaliação do ganho de peso, mediu-se o peso corporal no início e no fim do experimento. A variação de peso corporal foi determinada comparando o peso das moscas nas diferentes concentrações de sacarose com o grupo controle.

Ao final dos 10 dias foram avaliadas a atividade locomotora utilizando o teste de geotaxia negativa, de acordo com COULOM & BIRMAN (2004) onde o desempenho das moscas alimentadas com dieta padrão e dieta hiperglicídica foi investigado. No teste dez moscas alimentadas com dieta padrão e dieta hiperglicídica foram imobilizadas sob anestesia leve com gelo e colocadas separadamente em um recipiente vertical (15 cm de largura e 1,5 cm de diâmetro). Depois de 30 minutos de recuperação da anestesia, as moscas foram depositadas na parte inferior do recipiente e o tempo que ela levou para alcançar a altura de 8 cm foi cronometrado. Os testes foram repetidos cinco vezes para cada mosca em intervalos de um minuto. Os resultados são apresentados na média de tempo de cinco avaliações independentes.

Para avaliação da capacidade exploratória foi realizado o teste de campo aberto, onde 5 moscas foram usadas em cada grupo e estas foram mantidas em uma placa de petri coberta, dividida em quadrados de 1 centímetro. A trajetória resultante foi registrada por cronômetro digital durante um minuto (60 segundos), de acordo com o número de quadrados explorados por cada mosca analisada. O número total de moscas (50), representa a soma das repetições independentes. Metodologia conforme descrito por (HIRTH, 2010).

Após o período do experimento as moscas foram crioanestesiadas, eutanasiadas e homogeneizadas para realização das análises de glicose e triglicerídeos, avaliados através de Kits comerciais (LABTEST – MG / Brasil). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism, utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls com valor de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A dieta hiperglicídica causou aumento significativo das taxas de mortalidade e aumento do peso corporal quando comparadas ao grupo controle. Na figura 1A o índice de mortalidade do grupo controle foi em média 23,3% enquanto nas dietas hiperglicídicas esses índices se elevam para 41,27%, 37,27% e 44,18 % respectivamente. Na figura 1B podemos observar o aumento de peso corporal das moscas expostas as dietas padrão e hiperglicídicas nos 10 dias de experimento, onde o grupo com dieta 10% de sacarose aumentou de peso apenas 5% em relação ao grupo controle, porém os grupos com dietas 30% e 40% de sacarose diferem significativamente do grupo controle com aumento de peso corporal 176,62% e 162% respectivamente.

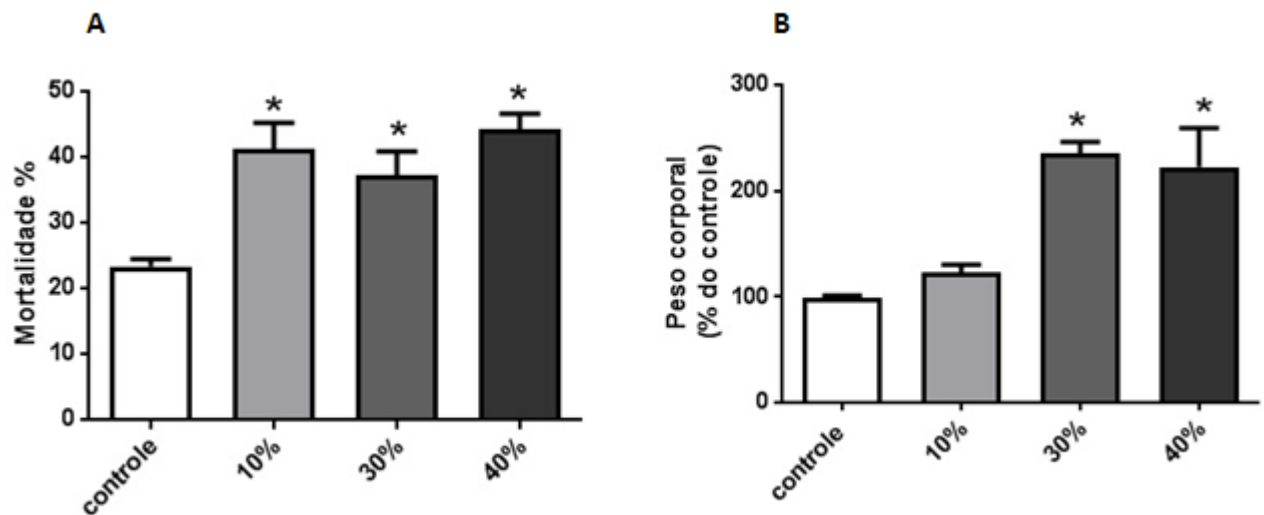


Fig. 1. Efeito da dieta padrão e dieta hiperglicídica (com adição de sacarose 10, 30 e 40 %) no metabolismo de *Drosophila melanogaster*. Figura 1 A, índice de mortalidade. Figura 1 B, ganho de peso corporal em relação ao grupo controle. Os valores são média $\pm$ desvio padrão (n = 50 moscas por experimento, quatro experimentos independentes foram realizados). * Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Conforme podemos observar na Figura 2 a exposição das moscas a uma dieta hiperglicídica teve um impacto negativo no comportamento locomotor das mesmas. No teste de campo aberto (Figura 2 A) houve redução da mobilidade das moscas tratadas com a dieta hiperglicídica quando comparadas à dieta padrão. As moscas alimentadas com dieta hiperglicídica 10%, 30% e 40% tiveram mobilidade de 2 a 4 vezes menor que as moscas alimentadas com dieta padrão. No teste de geotaxia negativa, (Figura 2 B), as moscas expostas a dieta hiperglicídica tiveram um aumento do tempo de escalada e também uma redução do estímulo ao vôo, todos os grupos experimentais (10%, 30% e 40%) diferiram estatisticamente do grupo controle (dieta padrão), sendo que no grupo com 40% de sacarose houve um aumento no tempo de escalada 7 vezes maior quando comparado com o grupo controle.

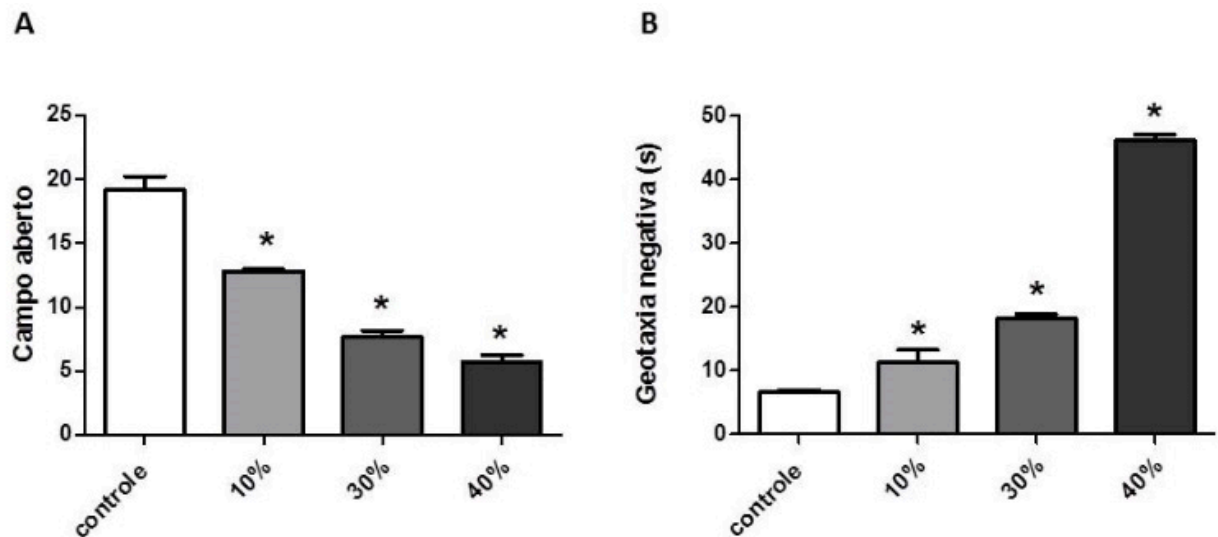


Fig. 2. Efeito da dieta padrão e dieta hiperglicídica (com adição de sacarose 10, 30 e 40 %) no comportamento de *Drosophila melanogaster* (Figura 2 A) no teste de campo aberto e (Figura 2 B) na geotaxia negativa. * Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Nossos resultados demonstram que a ingestão das dietas hiperglicídicas culmina em aumento dos níveis de glicose e aumento dos níveis de triglicerídeos em *Drosophila melanogaster* (Figuras 3 A e 3 B). Na análise de glicose quando comparado com o grupo controle (dieta padrão) o grupo com 10% de sacarose, não diferiu significativamente, aumentando somente 3,25% os níveis, entretanto os grupos 30% e 40% aumentaram 60,42% e 57,74% os níveis de glicose em relação ao grupo controle. Na análise de triglicerídeos o grupo com dieta 10% de sacarose também não diferiu significativamente do grupo com dieta padrão, porém aumentou os níveis em 9,14%, os grupos experimentais 30% e 40% de sacarose obtiveram um aumento nos níveis de triglicerídeos de 53,65% e 33,84% respectivamente.

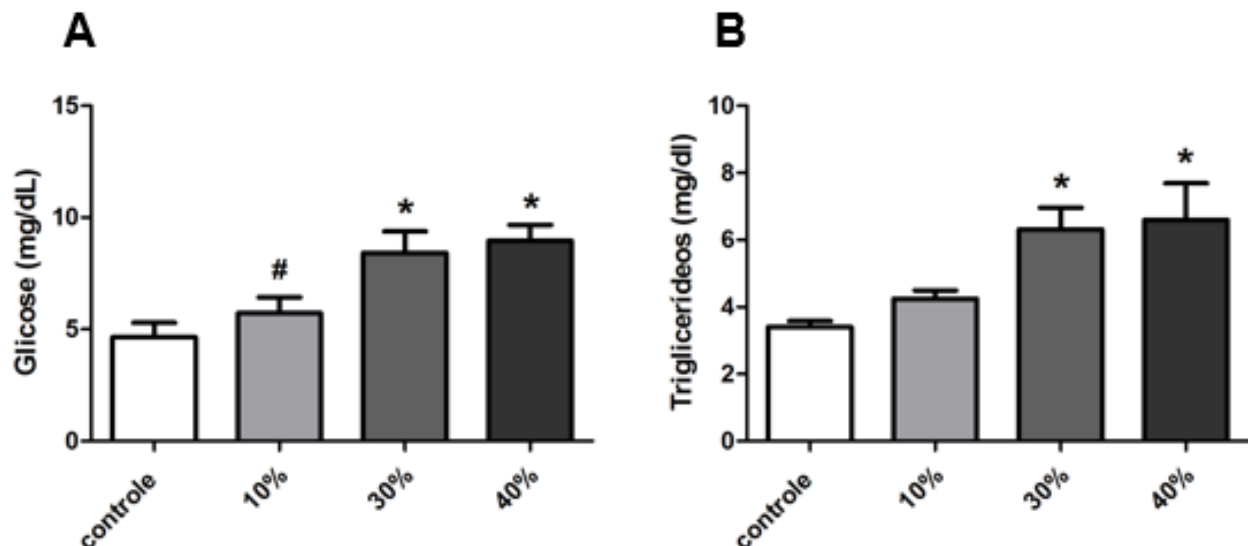


Fig. 3. Efeito da dieta padrão e dieta hiperglicídica (com adição de sacarose 10, 30 e 40 %) no metabolismo de *Drosophila melanogaster*. Figura 3 A, níveis de glicose. Figura 3 B, níveis de triglicerídeos. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, # Diferença do 30 e 40% em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo indicam que a ingestão das dietas hiperglicídicas contendo sacarose causaram alterações no metabolismo de *Drosophila melanogaster*. A sacarose nas maiores concentrações (30% e 40%), causou aumento da mortalidade, aumento de peso corporal, redução do desempenho locomotor e elevação dos níveis de glicose e triglicerídeos.

Em nosso estudo observamos que nas maiores concentrações de sacarose (30% e 40%) ocorreu os maiores níveis de glicose corporal, o nível glicêmico foi mais intenso nas moscas que foram alimentados com dieta hiperglicídica 40%, o que sugere um alcance da glicemia semelhante ao que é observado em moscas resistentes à insulina.

O aumento do nível glicêmico em dietas hiperglicídica já foi descrito anteriormente na literatura e o resultado está de acordo com ROVENKO *et al.*, (2015), que relata em seu estudo que dietas hiperglicídicas desequilibram a homeostase metabólica em *Drosophila melanogaster*, além de promoverem fenótipos de obesidade e resistência à insulina. Além disso, uma das complicações metabólicas graves de diabetes é cetoacidose, o que pode resultar em níveis de glicose circulante excepcionalmente elevados (HEIER *et al.*, 2021).

A maior parte das enzimas metabólicas em mamíferos são conservadas em *Drosophila*. Por exemplo, os genes que regulam a absorção de lipídios, transporte, armazenamento e mobilização são todos bem conservados. DE PAULA *et al.*, (2016) relata que dietas hiperlipídicas resultam em redução do desempenho locomotor, aumento da mortalidade e aumento do peso corporal em *Drosophilas*, sendo que a obesidade é uma das principais causas dessas alterações, estando diretamente ligada a redução do tempo de vida das moscas, pois os danos oxidativos podem favorecer processos de danos celulares e processos inflamatórios. A obesidade causada pelo acúmulo de lipídios no tecido adiposo, é responsável por desencadear o estresse celular, um processo de Inflamação crônica caracterizada por produção anormal das citocinas pelo tecido adiposo. Nesse contexto, o aumento de massa corporal das moscas foi resultante, provavelmente, do desenvolvimento da adiposidade, corroborando com o quadro de obesidade, o que está em conformidade com ROVENKO *et al.*, (2015), que relata em seu estudo um aumento de tecido adiposo em moscas expostas a dietas com altas quantidades de sacarose.

Para determinar se a dieta hiperglicídica aumentou o armazenamento de gordura em *Drosophilas*, mediu-se os triglicérides (TAG), a principal forma de gordura armazenada, em moscas e larvas. Houve um aumento significativo na porcentagem de gordura corporal, em comparação com as moscas alimentadas com dieta padrão. O aumento do TAG foi semelhante ao descrito HEIER *et al* (2021) que relata um acúmulo de triglicerídeos em moscas alimentadas com dieta hiperglicídica quando comparadas aos grupos alimentados com as dietas padrão.

Um importante resultado observado em nosso estudo e não relatado por outros autores é que dietas hiperglicídicas, mesmo na menor concentração (10%), levou a alterações comportamentais relacionadas a locomoção, evidenciando que o presente estudo fornece a primeira evidência de que o desenvolvimento da fadiga neuromuscular relacionada ao estresse metabólico é acelerado em *Drosophilas melanogaster* com fenótipos de obesidade e DM2.

CONCLUSÃO

Este trabalho evidencia que a dieta hiperglicídica em *Drosophila melanogaster* causou alterações comportamentais relacionadas a locomoção assim como o aumento nos níveis de glicose e triglicerídeos, sendo assim um bom modelo para o estudo de alterações metabólicas do DM2.

REFERÊNCIAS

COULOM AND S. BIRMAN, "Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*," The Journal of Neuroscience, vol. 24, no. 48, pp. 10993–10998,

2004.

DE PAULA. T. M; SILVA, M. R.; ARAUJO, S; BORTOLOTTTO, C V.; MEICHTRY, B.L; ZEMOLIN, A. P. P; PRIGOL, M. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

HEIER, C., KLISHCH, S., STILBYTSKA, O., SEMAIUK, U., & LUSHCHAK, O. The *Drosophila* model to interrogate triacylglycerol biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 158924. 2021.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 504–523, 2010.

ROVENKO.B.M; PERKHULYN.N.V; GOSPODARYOV.D; SANZ.A; LUSHCHAK.O. High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 180 75–85, 2015.

SBD (Sociedade Brasileira de Diabetes) Disponível em <<http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/diabetes/tipos-de-diabetes>> Acesso em 25 de Março de 2021.

The World Oral Health Report 2021. Diretriz: Ingestão de açúcares por adultos e crianças. Genebra, Organização Mundial da Saúde, Disponível em (<http://www.who.int/oral-health/media/en/orh-report03-en.pdf>, consultado em 24 de fevereiro de 2021).