

Aumento da ingestão de açúcar afeta a capacidade da *Drosophila melanogaster* sobreviver em condições críticas**Increased sugar intake affects the *Drosophila melanogaster* ability to survive in critical conditions**

DOI:10.34117/bjdv6n9-363

Recebimento dos originais:08/08/2020

Aceitação para publicação:16/09/2020

Kally Portela

Aluna de Iniciação Científica, bolsista CNPq, acadêmica do Curso de Fisioterapia
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: kallyportela98@hotmail.com

Esthéfani Lettnin

Aluna de Iniciação Científica, bolsista FAPERGS, acadêmica do Curso de Fisioterapia
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: esthefanilettin@gmail.com

Ana Carolina Zago

Mestre em Saúde e Comportamento pela Universidade Católica de Pelotas
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha(URCAMP)
E-mail: anaczago@urcamp.edu.br

Graciela Maldaner

Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: gracielamaldaner@urcamp.edu.br

Rafael Reis

Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicado à Saúde pela Universidade Luterana do Brasil
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: rafaelreis@urcamp.edu.br

Vera Maria de Souza Bortolini

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: verabortolini@urcamp.edu.br

Ana Zilda Ceolin Colpo

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Pampa
Instituição: Centro Universitário da Região da Campanha (URCAMP)
Endereço: Av. Tupy Silveira, 2099 / CEP 96400-110
E-mail: anacolpo@urcamp.edu.br

RESUMO

Atualmente são crescentes as publicações apontando a composição da dieta como um fator que pode afetar o tempo de vida e o envelhecimento dos seres vivos, no entanto ainda não são claras as relações entre proporções adequadas de macronutrientes na dieta. O objetivo principal desse estudo foi validar em nosso laboratório o método *Continuous Liquid Feeding* (CLF) para alimentação de *Drosophila melanogaster* e verificar como diferentes concentrações de macronutrientes afetam o tempo de vida do inseto. Desenvolvemos os aparatos para CLF, aplicamos dietas com diferentes concentrações de carboidrato: proteína e avaliamos seus efeitos na longevidade e resistência ao frio e fome. Tomados em conjunto nossos dados sugerem que interações metabólicas associadas ao aumento no consumo de açúcar por *Drosophila melanogaster* afetam sua capacidade de sobreviver em condições críticas.

Palavras-chave: carboidrato, longevidade, *Continuous Liquid Feeding*

ABSTRACT

Currently, there are a growing number of publications pointing out the composition of the diet as a factor that can affect the lifetime and aging of living beings, however, the adequate relationships proportions of macronutrients in the diet are not clear yet. The main objective of this study was to validate in our laboratory the Continuous Liquid Feeding (CLF) method for feeding *Drosophila melanogaster* and to verify how different macronutrient concentrations affect the insects lifetime. We developed the devices for CLF, applied diets with different carbohydrate concentrations: protein and evaluated their effects on longevity and resistance to cold and starvation. Taken together, our data suggest that metabolic interactions associated to the increased sugar consumption by *Drosophila melanogaster* affect their ability to survive in critical conditions.

Keywords: carbohydrate, longevity, *Continuous Liquid Feeding*

1 INTRODUÇÃO

Estudos sugerem que a ingestão total de energia e a composição da dieta afetam a vida útil e o envelhecimento de organismos vivos. Regimes alimentares que favorecem a redução da ingestão de calorias retardam o envelhecimento e as doenças associadas à idade em vários modelos de envelhecimento (INGRAM et al., 2006; PENG et al., 2012; SANTOS et al., 2016).

O cuidado com alimentação intui tanto a promoção quanto a prevenção, fatores que concernem à saúde coletiva. No entanto, as recomendações alimentares para manter a saúde humana se concentraram seletivamente na redução de gorduras nutritivas, especificamente dos triglicerídeos saturados contidos nela, desde os anos 1970 (RAVICHANDRAN, GERALD e RISTOW, 2017;

PANDOLFI; MOREIRA; TEIXEIRA, 2020). No entanto, um número crescente de estudos prospectivos em grandes *Coortes* de seres humanos nas últimas duas décadas questionou repetidamente essa prática, mas permaneceu amplamente despercebido no público em geral e também em parte da comunidade científica (RAVICHANDRAN, GERALD e RISTOW, 2017). O estudo PURE, uma *Coorte* composta por 135.000 indivíduos recrutados de 18 países com diferentes níveis de desenvolvimento, conduzido por Dehghan et al. (2017), mostrou que a ingestão de carboidratos foi associada a aumento da mortalidade total.

A dieta com baixo conteúdo de carboidratos, e maior quantidade de proteínas e gordura, por outro lado, pode ser uma estratégia para contrapor os efeitos danosos de uma dieta com predomínio desse tipo de substrato energético, isto porque ela confere inversão da rota metabólica a partir da glicose para a geração e metabolismo de corpos cetônicos. Esta dieta melhora o status redox mitocondrial, estimula a biogênese mitocondrial, promove a diminuição da produção de EROs, aumenta a capacidade antioxidante, além de prevenir mutações no DNA mitocondrial e morte celular (WALDBAUM e PATEL, 2010; BOUGH et al. 2006; KELLY, UNWIN e FINUCANE, 2020).

Bioensaios com diferentes objetivos destacam o uso da *Drosophila melanogaster* como um bom modelo para descrever relações metabólicas e genéticas. As moscas de frutas têm funções regulatórias similares aos mamíferos, incluindo a capacidade de manter a homeostase da glicose, armazenar e mobilizar energia e modular a ingestão de alimentos (TRINH e BOULIANNE, 2013). A forma que a dieta é ofertada é um fator que pode influenciar o percentual de aproveitamento do alimento pela mosca, nesse contexto Soares et al. (2017), desenvolveram uma dieta líquida para *Drosophila melanogaster* e esta demonstrou proporcionar maior biodisponibilidade de compostos em teste. Desta forma, o objetivo principal desse estudo foi validar em nosso laboratório o método *Continuos Liquid Feeding* (CLF) para alimentação de *Drosophila melanogaster* e verificar como diferentes concentrações macronutrientes afetam o tempo de vida do inseto.

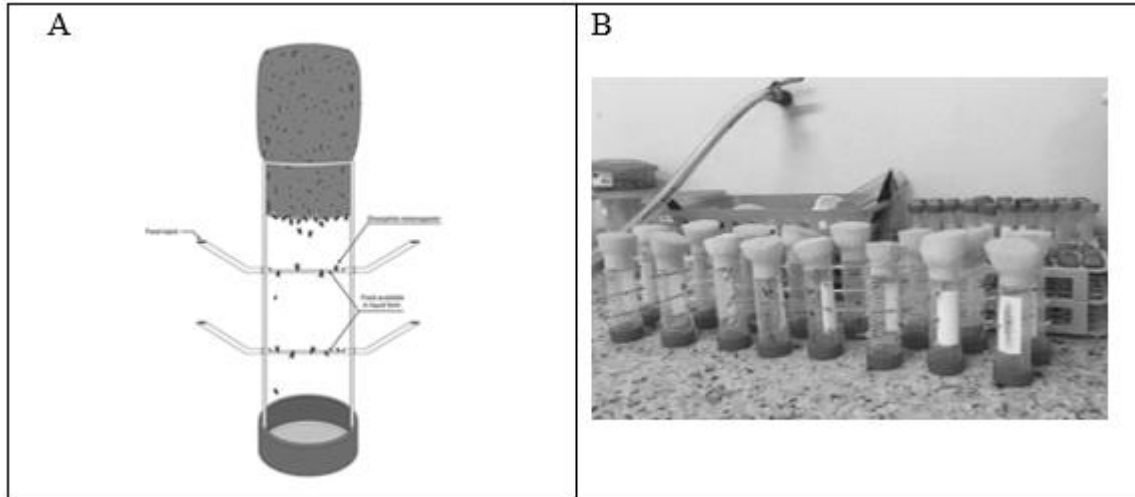
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 APARATO PARA OFERTA DA DIETA LÍQUIDA CONTÍNUA *CONTINUOS LIQUID FEEDING* (CLF)

A dieta líquida foi desenvolvida em aparatos apresentados na Figura 1. Foram utilizados tubos cônicos (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA) de 15 ml, nestes com um objeto metálico aquecido foram feitas aberturas e ali introduzidos bastonetes com pequenos orifícios (para disponibilizar o alimento aos insetos). Após separação do número de moscas indicado para cada

tratamento, os insetos foram adicionadas ao tubo e diariamente introduzidos 100 ml de dieta nas extremidades do dispositivo.

Figura 1- Aparatos utilizados para tratamento dos insetos com dieta líquida contínua *Continuos Liquid Feeding* (CLF).



A imagem 1A mostra o modelo sugerido por Soares et al. (2017) e a 1B o aparato desenvolvido no laboratório para este estudo.

2.2 PROCRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DO ESTOQUE

Drosophila melanogaster, da linhagem Harwich foram cultivadas no Laboratório da Universidade da Região da Campanha (URCAMP), onde foram mantidos em meios a base de farinha de milho, ágar, levedura e água, em temperatura controlada de 25°C, com ciclo de 12 horas claro/ escuro (BAHADORANI et al., 2008).

2.3 DIETA LÍQUIDA *CONTINUOS LIQUID FEEDING* (CLF)

Para oferta da dieta utilizou-se o método de alimentação CLF, descrito por Soares et al. (2017). As moscas foram alimentadas com uma das duas dietas durante o período do protocolo experimental:

Dieta líquida padrão (DP)- dieta contendo carboidrato e proteína, nas quantidades de 5 g de sacarose e 10.5 g de levedura.

Dieta líquida experimental (DE)- dieta contendo carboidrato e proteína, nas quantidades de 2.58 g de sacarose e 12.92 g de levedura.

Essas proporções de macronutrientes foram alcançados variando o teor de levedura homogeneizada com sacarose, que foram dissolvidos em água destilada. Os dois tipos de dieta continham 0,1% de metilparabeno e 0,1% de solução ácida (ácido fosfórico: ácido propiônico 1:10),

para prevenir o crescimento microbiano (WINWOOD-SMITH, FRANKLIN E WHITE, 2017). O volume final foi ajustado para 38.75 ml.

2.4 LONGEVIDADE

Para avaliar os efeitos das diferentes dietas sobre o tempo de vida das moscas usamos o protocolo que foi descrito anteriormente por Peng et al. (2009) com pequenas modificações propostas por Colpo et al. (2018). Cada grupo de 20 moscas machos, de 2 a 3 dias, nascidas na dieta sólida para manutenção de estoque, foram expostas a DP e DE, sendo as moscas mortas contadas a cada 2-3 dias. Os experimentos foram feitos em triplicata.

2.5 TESTES DE RESISTÊNCIA A ESTRESSE INDUZIDO POR FOME

20 moscas macho, de 2 a 3 dias, nascidas na dieta sólida para manutenção do estoque) foram expostas aos diferentes tipos de dieta por 10 dias e após submetidas ao protocolo de resistência a fome. No dia 10, cada grupo de moscas foi colocado em um frasco de plástico (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA) sem alimentos. Um pequeno círculo papel de filtro foi colocado no fundo do frasco com 75 mL de água para evitar a desidratação, a água foi reabastecida a cada 16 horas ou conforme necessário. A sobrevivência foi registrada a cada 4-8 h em cada frasco (HEINRICHSEN e HADDAD, 2012).

2.6 TESTE DE RESISTÊNCIA AO FRIO

Um banho de -5°C foi feito usando água, gelo e sal. No dia 10 cada grupo de 20 moscas foi colocado em frascos de plástico vazios e no banho. Elas permaneceram por 2 h, neste banho, enquanto a temperatura foi regularmente verificada de 15 em 15 minutos. No final do período de 2 horas, os frascos foram removidos do banho e as moscas transferidas para tubos tipo *falcons* com comida regular e deixadas para se recuperar à temperatura ambiente. Após 24 h, a sobrevivência foi registrada como o número de moscas que recuperaram a consciência (HEINRICHSEN e HADDAD, 2012).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como médias \pm DP. Para longevidade e sobrevivência, realizamos uma curva dose-resposta e usando regressão não linear seguido pelo teste *Shapiro-Wilk*. Diferenças entre os grupos foram considerados significativos se $p \leq 0.05$. Para análises e confecção dos gráficos utilizou-se o programa estatístico *Graphpad Prism demo*®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

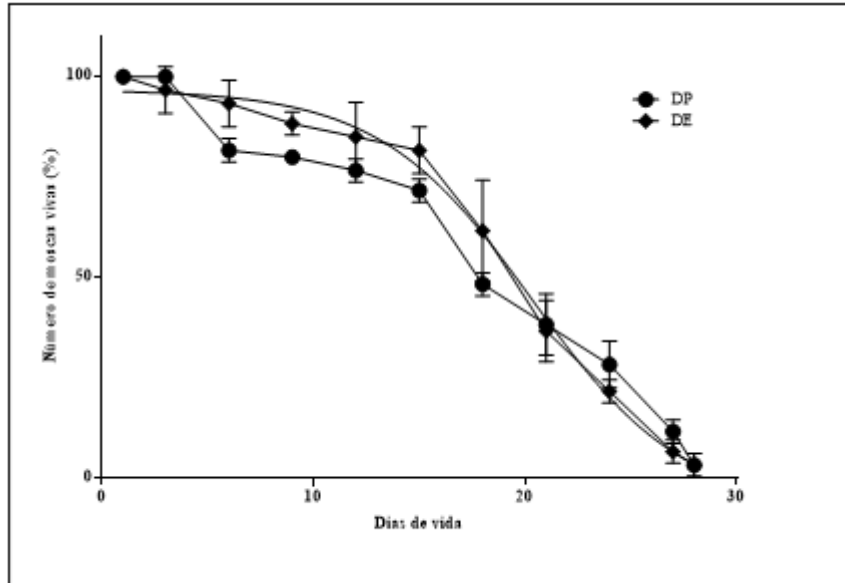
Este estudo descreve uma investigação sobre a influência da concentração de macronutrientes na longevidade e resistência a estresse induzido em *D. melanogaster*. Além disso, adaptamos a metodologia para oferecimento da dieta líquida para os insetos, o que favorece a biodisponibilidade de compostos alvo, promove a aplicação do princípio 3R's (Reduzir, Reutilizar e Reciclar) e requer pouca manipulação dos insetos em tratamento (SOARES et al., 2018).

Anteriormente, relatamos os efeitos de compostos bioativos de plantas em relação a proteção contra o estresse oxidativo, aumento do tempo de vida e modificação de parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético em *D. melanogaster*. Entre os compostos testados estão o extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (COLPO et al., 2018) e farinha de couve manteiga (*Brassicaoleracea L. var.acephala*) (COLPO et al., 2019). No trabalho atual, nossa hipótese é que a composição da dieta, em função dos elementos químicos presentes na sua constituição e das rotas metabólicas utilizadas na produção de energia, pode conferir aumento ou redução da capacidade do inseto resistir a estresse induzido.

Ao utilizarmos a CLF observamos que o tempo de vida das moscas expostas a esta dieta foi reduzido, quando comparado a moscas alimentadas com dieta sólida convencional. Em média o tempo de vida dos insetos alimentados em CLF foi de 28 dias, enquanto que na dieta sólida (aplicada em estudos prévios do nosso grupo) foi de 40 dias. Nossa suposição inicial, para o menor tempo de vida observado seria associado a restrição energética, que afetaria a vida do inseto. No entanto, não é um dado conclusivo, uma vez que Soares et al. (2017) quantificam o teor de alimento necessária para o período de 72 horas e também observaram que moscas alimentadas com CLF comiam de 2 a 4 vezes mais que moscas alimentadas no meio sólido.

Em relação a longevidade ao comparar-se os grupos de DP e DE observou-se que moscas alimentadas com a dieta experimental, ou seja com reduzida concentração de carboidrato começaram a morrer mais tardiamente que as moscas em DP, no entanto o tempo total de vida não foi significativamente diferente entre os dois grupos de tratamento. A Figura 2 apresenta estes resultados.

Figura 2- Curva de sobrevivência das moscas expostas a dieta padrão (DP) e dieta experimental (DE).



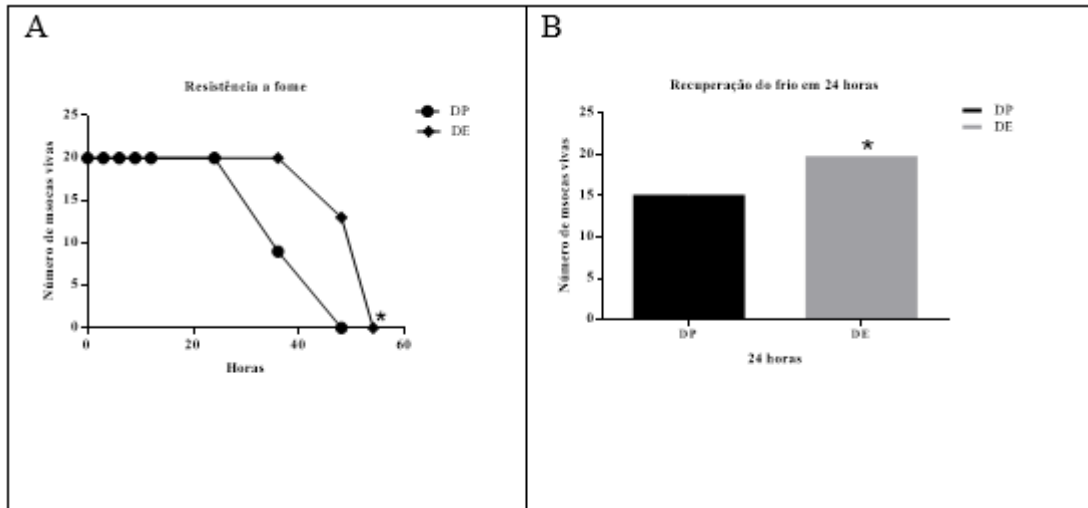
Os dados foram expressos como tempo máximo de vida da última mosca. O teste de *Shapiro Wilk* mostrou que não houveram diferenças estatisticamente significantes quando comparados os dois grupos. O DP refere-se aos experimentos em triplicata.

De acordo com Burger et al. (2007) a restrição energética, experimentada em dietas com menores taxas de carboidrato, pode aumentar a vida útil, mas também afetar a fecundidade e trazer prejuízos em fases tardias da vida. Um estudo conduzido por Lushchak et al. (2014) demonstrou que a sacarose, pode encurtar a expectativa de vida de *Drosophila* e diminuir a capacidade de postura de ovos em dietas com teor de proteína muito baixo, destacando também os carboidratos na modulação da taxa de ingestão de alimentos. No nosso estudo apenas moscas macho foram usadas porque há menor ação hormonal e também porque elimina-se a condição de postura de ovos como agente influenciador dos resultados.

Quando avaliamos a capacidade das moscas, alimentadas com as diferentes dietas, resistirem a condições de estresse induzido (frio e fome) observamos que essas condições foram significativamente afetadas pela concentração dos substratos da dieta. As moscas que tinham maior concentração de sacarose na dieta resistiram menos (tempo em horas), nas duas formas de exposição, esses resultados podem ser observados nas Figuras 3A e 3B.

No experimento onde as moscas permaneceram em inanição até sua morte, o tempo de vida máximo na DP foi de 48 horas e na DE 54 horas. Em relação a capacidade de recuperação após exposição ao frio extremo observou-se que todas as moscas alimentadas com concentrações maiores de proteína se recuperaram em 24 horas, ao passo que nas moscas da DP apenas 75% se recuperaram.

Figura 3- Sobrevivência de moscas expostas a fome (A) e ao frio (B).



Moscas que passaram 10 dias sendo alimentadas com as dietas padrão (DP) e experimental (DE) foram testadas em sua capacidade de suportar inanição e frio extremo. Os dados são expressos como média das triplicatas e foram submetidos ao teste de *Shapiro-Wilk*. * $p \leq 0.05$.

O consumo de uma dieta rica em açúcar diminui as diferenças metabólicas e comportamentais entre os estados jejum e alimentado, e remodela a forma como os nutrientes são utilizados na alimentação (WILINSKI et al. 2019). Além disso, o excesso de açúcar na dieta inibe o fator de transcrição dFOXO (DOBSON et al., 2016), que controla o envelhecimento em *Drosophila melanogaster* (HWANGBO et al., 2004) e é crucial para regular alterações transcricionais desenvolvidas no tempo de vida da mosca. Neste contexto, a capacidade de resistir a fome em *Drosophila melanogaster* está diretamente relacionada a regulação homeostática. Slade e Staveley (2016) salientam a presença de mecanismos neuroendócrinos que ativam um sistema de recompensa pós-alimentação e que pequenos ajustes, nesse sistema, podem afetar as reservas de energia e sobrevivência em momentos de adversidade de nutrientes.

Dietas com teor elevado de carboidratos afetam também a capacidade do inseto suportar temperaturas extremamente baixas, o que foi observado no nosso estudo. Isto pode ser explicado pelo fato de que altas doses de açúcar criam um desequilíbrio metabólico e afetam negativamente a tolerância ao frio. Colinet et al. (2013) aumentaram gradualmente a concentração de quatro açúcares diferentes (sacarose, frutose, glicose e trealose) em dietas e testaram a tolerância basal ao frio, eles observaram que altas doses de açúcar induzem a alteração metabólica de todo o sistema associada ao desequilíbrio do metabolismo de carboidratos, atraso no desenvolvimento e redução da massa magra. Carnosina e taurina, por sua vez, aumentaram a tolerância ao frio ao diminuir a propensão de proteínas se agregarem em baixas temperaturas (HUANG et al., 2008). Esses dados dão bons

indicativos dos processos subjacentes envolvidos nos processos metabólicos em teste, mas temos convicção da necessidade de aprofundamento desses resultados.

4 CONCLUSÃO

Uma vez que as adaptações metabólicas são importantes para a sobrevivência, é fundamental melhorar nossa compreensão de como macronutrientes afetam a sobrevivência e a plasticidade fisiológica. Tomados em conjunto nossos dados nos dão indicativos de que interações metabólicas associadas ao aumento no consumo de açúcar por *Drosophila melanogaster* afetam a capacidade de sobreviver em condições críticas, mas os mecanismos associados a esse desfecho ainda precisam ser elucidados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte da URCAMP, como instituição sede para o desenvolvimento do estudo, ao CNPQ e a FAPERGS pelo provimento de bolsas de Iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- BAHADORANI, S. et al. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 63, n. 1, p. 35–42, jan. 2008.
- BOUGH, K. J. et al. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Annals of Neurology*, v. 60, n. 2, p. 223–235, ago. 2006.
- BURGER, J. M. S. et al. The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell*, v. 6, n. 1, p. 63–71, fev. 2007.
- COLINET, H. et al. Dietary sugars affect cold tolerance of *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics*, v. 9, n. 3, p. 608–622, jun. 2013.
- COLPO, A. C. et al. Ilex paraguariensis extracts extend the lifespan of *Drosophila melanogaster* fed a high-fat diet. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, n. 2, p. e6784, 2018.
- COLPO, A. Z. C. et al. Atividade antioxidante da farinha de couve manteiga e seu efeito nos parâmetros bioquímicos em *Drosophila Melanogaster*. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, n. 4, p. 2796–2801, 2019.
- DEGHAN, M. et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*, v. 390, n. 10107, p. 2050–2062, nov. 2017.
- DOBSON, A. J. et al. Nutritional Programming of Lifespan by FOXO Inhibition on Sugar-Rich Diets. *Cell Reports*, v. 18, n. 2, p. 299–306, jan. 2017.
- HEINRICHSEN, E. T.; HADDAD, G. G. Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. *PLOS ONE*, v. 7, n. 8, p. e42587, ago. 2012.
- HUANG, J.-S. et al. Effect of taurine on advanced glycation end products-induced hypertrophy in renal tubular epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 233, n. 2, p. 220–226, dez. 2008.
- HWANGBO, D. S. et al. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, v. 429, n. 6991, p. 562–566, jun. 2004.
- INGRAM, D. K. et al. The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. *Biogerontology*, v. 7, n. 3, p. 143–148, jun. 2006.
- KELLY, T.; UNWIN, D.; FINUCANE, F. Low-Carbohydrate Diets in the Management of Obesity and Type 2 Diabetes: A Review from Clinicians Using the Approach in Practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 7, p. 2557, abr. 2020.
- LUSHCHAK, O. V. et al. Specific dietary carbohydrates differentially influence the life span and fecundity of *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 69, n. 1, p. 3–12, jan. 2014.

- PANDOLFI, I. A.; MOREIRA, L. Q.; TEIXEIRA, E. M. B. Segurança alimentar e serviços de alimentação-revisão de literatura. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, p. 42237–42246, 2020.
- PENG, C. et al. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies. *Experimental Gerontology*, v. 44, n. 12, p. 773–783, dez. 2009.
- PENG, C. et al. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, v. 47, n. 2, p. 170–178, fev. 2012.
- RAVICHANDRAN, M.; GRANDL, G.; RISTOW, M. Dietary Carbohydrates Impair Healthspan and Promote Mortality. *Cell Metabolism*, v. 26, n. 4, p. 585–587, out. 2017.
- SANTOS, J. et al. Dietary Restriction and Nutrient Balance in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 4010357, 2016.
- SLADE, J. D.; STAVELEY, B. E. Enhanced survival of *Drosophila Akt1* hypomorphs during amino-acid starvation requires *foxo*. *Genome*, v. 59, n. 2, p. 87–93, fev. 2016.
- SOARES, D. C. S. et al. Treatment with pentylentetrazole (PTZ) and 4-aminopyridine (4-AP) differently affects survival, locomotor activity, and biochemical markers in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 442, n. 1–2, p. 129–142, maio 2018.
- SOARES, J. J. et al. Continuous liquid feeding: New method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Analytical Biochemistry*, v. 537, p. 60–62, nov. 2017.
- SOUZA, G. S. DE et al. Controlled traffic and soil physical quality of an Oxisol under sugarcane cultivation. *Scientia Agricola*, v. 72, n. 3, p. 270–277, jun. 2015.
- TRINH, I.; BOULIANNE, G. L. Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology (Bethesda, Md.)*, v. 28, n. 2, p. 117–124, mar. 2013.
- WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial Oxidative Stress In Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy research*, v. 88, n. 1, p. 23–45, jan. 2010.
- WILINSKI, D. et al. Rapid metabolic shifts occur during the transition between hunger and satiety in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 4052, set. 2019.