

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
NUTRIÇÃO

LARISSA LONDERO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA CREATINA SOBRE ALTERAÇÕES
NA MEMÓRIA DE *Drosophila melanogaster* EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA**

Itaqui
2021

LARISSA LONDERO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA CREATINA SOBRE ALTERAÇÕES
NA MEMÓRIA DE *Drosophila melanogaster* EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à banca examinadora da
Universidade Federal do Pampa para
obtenção do grau de bacharel em Nutrição.
Orientadora: Prof. Dra. Marina Prigol.
Coorientadora: Luana Barreto Meichtry.

**Itaqui
2021**

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

L323i Lontero, Larissa

Investigação do efeito protetor da creatina sobre
alterações na memória de *Drosophila melanogaster* expostas a
uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada / Larissa
Lontero.

31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, NUTRIÇÃO, 2021.

"Orientação: Marina Prigol".

1. Creatina. 2. Gordura vegetal hidrogenada. 3. Memória. I.
Título.

LARISSA LONDERO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA CREATINA SOBRE ALTERAÇÕES
NA MEMÓRIA DE *Drosophila melanogaster* EXPOSTAS A UMA DIETA RICA EM
GORDURA VEGETAL HIDROGENADA**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à banca examinadora da
Universidade Federal do Pampa para
obtenção do grau de bacharel em Nutrição.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 30 de Abril de 2021

Banca examinadora:

Prof. Dra. Marina Prigol

Orientadora

UNIPAMPA

Prof. Dra. Silvana Peterini Boeira

UNIPAMPA

Luana Barreto Meichtry

Coorientadora

UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e aos meus pais, Aparecida e Gladimir Londero, pelo amor e confiança depositados em mim durante toda a minha trajetória acadêmica. Por sempre acreditarem no meu potencial e pela oportunidade a mim oferecida da realização de um sonho através de mais um curso de graduação.

Aos meus irmãos Letícia e Roner Londero, pelo apoio durante todos esses anos. Meu muito obrigada também a todos os meus amigos, os quais perto ou longe, estiveram sempre comigo.

Agradeço também aos professores que tive na Universidade Federal do Pampa. Em especial, agradeço a minha orientadora, professora Marina Prigol, por todo o exemplo profissional passado durante a graduação, por ter aberto as portas do laboratório para que eu pudesse executar minha pesquisa e também por ter aceitado me orientar. Aos professores Silvana Peterini, Joice Trindade, Leandro Cattelan e Marina Santos que, de uma forma ou de outra, me inspiraram e contribuíram para moldar este trabalho e a minha formação acadêmica de maneira geral.

À todos os meus colegas de laboratório, em especial, Luana Barreto Meichtry e Guilherme Silva da Silva, obrigada pela ajuda, paciência e parceria incansável.

À todos os colegas da turma de Nutrição, os quais levarei para sempre dentro do coração.

“Paciência é o intervalo entre a semente e a flor”.

Ana Jácomo

RESUMO

O elevado consumo de produtos alimentícios ultraprocessados está associado ao aumento do consumo de ácidos graxos *trans*. O tipo de gordura ingerida através da alimentação pode influenciar no desempenho cerebral, visto que a membrana que envolve as células neuronais e acelera a condução dos impulsos nervosos, é rica em colesterol e fosfolípidos. Logo, os ácidos graxos *trans* advindos da dieta podem ser incorporados à essa estrutura e promover alterações, afetando a capacidade de aprendizado e memória. A creatina é um composto nitrogenado produzido pelo organismo e também obtido através da alimentação e/ou suplementação. Este composto funciona como uma reserva de energia para o cérebro, já que a enzima creatina quinase, responsável por catalisar a conversão da creatina em fosfocreatina e difosfato de adenosina, está presente em várias áreas desse tecido e, portanto, atua reduzindo a fadiga mental podendo melhorar o desempenho de aprendizagem e de memória. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito protetor da creatina sobre alterações na memória de *Drosophila melanogaster* expostas a uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada. As moscas *Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich), 1-3 dias de idade foram divididas em quatro grupos contendo cerca de 50 moscas cada: (1) Dieta regular, (2) Creatina 10 mM, (3) Gordura vegetal hidrogenada 10%, (4) Gordura vegetal hidrogenada 10% + Creatina 10 mM. Tanto a creatina quanto a gordura foram incorporadas à dieta dos animais. A exposição aos tratamentos teve duração de 7 dias e após esse período, foi realizado o teste comportamental de campo aberto, com o objetivo de avaliar a atividade locomotora das moscas; análise da mortalidade; peso corporal; consumo alimentar; e o teste de supressão fototóxica aversiva, com o intuito de avaliar o aprendizado e memória de curto prazo dos animais. De acordo com os resultados, foi possível observar que não houve diferença significativa em relação ao teste de campo aberto entre todos os grupos analisados. Mesmo resultado foi observado na análise do peso corporal e do consumo alimentar. Em relação à análise da mortalidade, observou-se que a dieta rica em gordura vegetal hidrogenada aumentou a mortalidade das moscas e a creatina não apresentou efeito protetor. Em relação ao teste de supressão fototóxica aversiva, foi possível observar que as moscas expostas a uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada apresentaram menor percentual de aprovação para aprendizado e memória. O tratamento com creatina mostrou-se eficaz na prevenção dos danos cognitivos apresentados, sugerindo seu envolvimento em processos de sinapses e na homeostase energética cerebral, além de sua atuação na regulação da velocidade dos potenciais de ação e na comunicação intracelular utilizada para processos de aprendizagem e memória. Conclui-se que a creatina é capaz de proteger contra danos no aprendizado e

memória causados por uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada em *Drosophila melanogaster*, contudo, ainda são necessários mais estudos para elucidar os principais mecanismos de ação envolvidos.

Palavras-chave: Creatina. Gordura vegetal hidrogenada. Memória.

ABSTRACT

The high consumption of ultra-processed food products is associated with an increase in the consumption of trans fatty acids. The type of fat ingested through food can influence brain performance, as the membrane that surrounds neuronal cells and accelerates the conduction of nerve impulses is rich in cholesterol and phospholipids. Therefore, trans fatty acids from the diet can be incorporated into this structure and promote changes, affecting learning and memory ability. Creatine is a nitrogenous compound produced by the body and also gained by food and/or supplementation. The compound acts as an energy reserve for the brain, as the enzyme creatine kinase, responsible for catalyzing the conversion of creatine to phosphocreatine and adenosine diphosphate, is present in several areas of this tissue and, therefore, acts on the reduction of mental fatigue to improve learning and memory performance. Thus, this study aimed to investigate the protective effect of creatine on changes in the memory of *Drosophila melanogaster* exposed to a diet rich in hydrogenated vegetable fat. *Drosophila melanogaster* flies (Harwich strain), 1-3 days old were divided into four groups containing about 50 flies each: (1) Regular diet, (2) 10 mM Creatine, (3) 10% Hydrogenated vegetable fat, (4) 10% Hydrogenated vegetable fat + 10 mM Creatine. Both creatine and fat were incorporated into the animals' diet. Exposure to the requirements lasts 7 days and after that period, an open field behavioral test was carried out, with the objective of evaluating the locomotor activity of the flies; mortality analysis; body weight; food consumption; and the aversive phototoxic suppression test, in order to assess the animal's learning and short-term memory. Based on the results, it was possible to observe that there was no significant difference in the open field test between all imposed groups. The same result was observed on the analysis of body weight and food consumption. Regarding the mortality analysis, it was observed that the diet rich in hydrogenated vegetable fat increased the mortality of flies and creatine did not have a protective effect. Regarding the aversive phototoxic suppression test, it was possible to observe that the flies exposed to a diet rich in hydrogenated vegetable fat had a lower percentage of approval for learning and memory. Treatment with creatine proved to be effective in preventing cognitive damage, suggesting its involvement in synapsis processes and cerebral energy homeostasis, in addition to its role in regulating the speed of action potentials and in intracellular communication using for learning and memory processes. It was concluded that creatine is able to protect against damage in learning and memory caused by a diet rich in hydrogenated vegetable fat in *Drosophila melanogaster*, however, further studies are still needed to elucidate the main action mechanisms involved.

Keywords: Creatine. Hydrogenated vegetable fat. Memory.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Ácido graxo

AGE – Ácido graxo essencial

AGT – Ácido graxo *trans*

ATP – Adenosina trifosfato

Cr – Creatina

CK – Creatina quinase

CP – Creatina fosfato

DR – Dieta regular

DRG – Dieta rica em gordura

GVH – Gordura vegetal hidrogenada

MCP – Memória de curto prazo

MLP – Memória de longo prazo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Gordura vegetal hidrogenada	11
2.2 Creatina	12
2.3 Memória	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Materiais químicos e meio de cultura	15
3.2 Protocolo experimental	15
3.2.1 Esquema de tratamento	15
3.3 Protocolo de tratamento	16
3.3.1 Análises <i>in vivo</i>	16
3.4 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Efeito da dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e da co-exposição à creatina sobre a taxa de mortalidade de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
4.2 Teste de campo aberto	19
4.3 Efeito da dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e da co-exposição à creatina sobre o consumo alimentar e o peso corporal de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
4.4 Teste de supressão fototóxica aversiva	20
5 DISCUSSÃO	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O crescente consumo de alimentos ultraprocessados e a conseqüente redução do consumo de alimentos *in natura* reflete a presença de grandes quantidades de açúcar, sódio e principalmente de gordura na alimentação da população. O consumo de uma dieta rica em gordura (DRG) e açúcar aumenta o risco de desenvolvimento de várias doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (ABESO, 2016). Além disso, com o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, observa-se também a grande presença de ácidos graxos do tipo *trans* (AGT) na alimentação, visto que são utilizados pela indústria alimentícia com o intuito de aumentar a estabilidade e validade dos produtos comercializados (PASE et al., 2017).

A ingestão de gorduras através da alimentação está relacionada com o desenvolvimento e desempenho cerebral, visto que a membrana que envolve as células neuronais e acelera a condução dos impulsos nervosos, é rica em colesterol e fosfolípidos e, dessa forma, a qualidade da dieta tem influência no tipo de gordura que irá compor essa estrutura (SHEPPARD; CHEATHAM, 2013). Dessa maneira, mudanças advindas da dieta que levam à substituição do consumo de ácidos graxos ômega-3 por ácidos graxos ômega-6 refletem na composição dos fosfolípidos da membrana, podendo levar à perda de memória e dificuldades na aprendizagem (JUMP, 2002).

Além disso, ácidos graxos poli-insaturados, quando incorporados à membrana neuronal, além de afetar sua fluidez e permeabilidade, também têm influência na atividade de neurotransmissores como a dopamina (JUMP, 2002; WAINWRIGHT, 2002) e de enzimas presentes na mesma (TEIXEIRA et al., 2013). Assim, os AGT podem ser incorporados a essa estrutura e promover alterações afetando a capacidade de aprendizado e memória, além de aumentar o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CORDNER; TAMASHIRO, 2015; PASE et al., 2017).

Diante dessas alterações, há uma grande busca por alternativas que visem reduzir os impactos provocados pelo alto consumo de gordura *trans* na dieta e, dessa forma, uma substância que vem demonstrando vários benefícios à saúde, principalmente na homeostasia cerebral é a creatina (Cr) (BEAL, 2011). A Cr pode ser obtida a partir de duas fontes: síntese pelo organismo a partir de três aminoácidos (arginina, glicina e metionina) em reações que ocorrem no fígado, pâncreas e rins; ou através do consumo de alimentos de origem animal, principalmente de carnes (REDONDO et al., 1996). Cerca de 95 % da Cr presente no corpo

humano é encontrada nas células do tecido muscular esquelético e o restante está distribuído em outros órgãos como o cérebro (KREIDER et al., 2017).

A Cr pode atenuar a formação de espécies reativas de oxigênio (SESTILI et al., 2011) e seus efeitos antioxidantes já demonstraram ter eficácia terapêutica em doenças neurodegenerativas (BEAL, 2011). Por facilitar a homeostase de ATP no cérebro durante períodos de necessidade de renovação rápida de energia, também é capaz de atuar na melhora de parâmetros cognitivos como, por exemplo, em situações de privação de sono, hipóxia e atividades cognitivas mais complexas (RAE; BRÖER, 2015; ROSCHEL, 2021).

Diante disso, é de grande relevância a busca por modelos alternativos e eficazes que possibilitem a compreensão de desordens cognitivas e que permitam discutir a fisiologia humana. Dessa forma, um modelo alternativo que vem se destacando quanto à compreensão de doenças humanas é o modelo de *Drosophila melanogaster*, já que supera outros modelos animais de mamíferos como camundongos e ratos em relação aos custos de manutenção, alta taxa de proliferação e rápido ciclo de vida. Este modelo possui cerca de 75% de similaridade de seus genes com humanos, conservando vias metabólicas importantes, além de conservação a nível comportamental e de seus mecanismos moleculares (PANDEY; NICHOLS, 2011). Além disso, em comparação aos mamíferos, a *Drosophila* compartilha anatomia de órgãos envolvidos no metabolismo lipídico, onde os lipídios são armazenados e acumulados no corpo gordo da mosca, tendo essa similaridade aos adipócitos encontrados em humanos (KÜHNLEIN, 2011; LIU; HUANG, 2013).

Também é possível uma compreensão acerca da neurociência através da *Drosophila*, sendo possível estudar os mecanismos sobre o comportamento, uma vez que seu cérebro utiliza neurotransmissores, canais e módulos semelhantes como aqueles encontrados no cérebro de mamíferos (KAZAMA, 2015). Além de já existirem trabalhos mostrando que as moscas são capazes de formar uma espécie de memória de trabalho e tomada de decisões simples, tornando possível a compreensão de mecanismos comportamentais (KAZAMA, 2015).

No entanto, tendo em vista que desordens relacionadas à memória podem ser avaliadas nesse modelo animal, que o consumo inadequado de gordura está relacionado a tais desordens e, ainda, considerando os benefícios da Cr, há uma deficiência de estudos que relacionem tais parâmetros concomitantemente nesse modelo. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo investigar o possível papel protetor da Cr sobre alterações na capacidade de aprendizagem e de memória de *Drosophila melanogaster* expostas a uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada (GVH).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gordura vegetal hidrogenada

A GVH é obtida de forma artificial pela indústria de alimentos a partir da hidrogenação de óleos vegetais, a fim de formar uma gordura de consistência mais firme à temperatura ambiente. Esse tipo de gordura é muito utilizado em produtos alimentícios como biscoitos, sorvetes, bolos, etc., pois tem a capacidade de aumentar o tempo de prateleira, além de oferecer melhor palatabilidade (REMIG, 2010).

Esse processo de hidrogenação dos óleos é responsável pela geração de AGT, os quais são definidos como isômeros geométricos de ácidos graxos (AG) mono e poli-insaturados, com pelo menos uma ligação dupla na configuração *trans* (SEMMA, 2002). Os AGT são encontrados naturalmente em alimentos de origem animal, porém seu consumo tornou-se exacerbado devido às mudanças no padrão alimentar que levaram à redução do consumo de alimentos *in natura* e o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados (REMIG, 2010).

Tanto em estudos com seres humanos quanto com animais, fica claro que os AGT advindos da dieta são digeridos, absorvidos e incorporados em triglicerídeos séricos, ésteres de colesterol, fosfolídeos, lipoproteínas e tecido adiposo ou plaquetas, da mesma forma que os seus isômeros *cis* naturais (BOUE et al., 2000). Do ponto de vista nutricional, o consumo elevado de AGT representa uma perda de ingestão de ácidos graxos essenciais (AGE), o que pode ter um impacto negativo na saúde humana, estando associado, por exemplo, ao aumento do risco de doença cardiovascular (REMING et al., 2010).

Além disso, os AGE são convertidos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como ácido docosahexaenóico (DHA), eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (AA), que são responsáveis por integrar e estruturar as membranas neuronais. Deficiências nesses AGE têm sido associadas à disfunções cognitivas e comportamentais (WAINWRIGHT, 2002; YEHUDA et al., 2005), além de modificações na permeabilidade celular e a fluidez da membrana sináptica (JUMP, 2002).

Dietas com elevado teor de AGT, ao estarem relacionadas com alterações na estrutura da membrana celular, também podem levar a mudanças na liberação de neurotransmissores responsáveis pelo humor, como o neurotransmissor serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT) (ZEMDEGS et al., 2016). Isso está associado com o possível desenvolvimento de ansiedade, depressão, anedonia e desordens comportamentais (DUTHEIL et al., 2016; KRISHNA et al., 2015; EDWARDS et al., 2006). Esse padrão dietético também pode alterar a atividade da

enzima Na^+/K^+ -ATPase na membrana neuronal, a qual é responsável por mediar os processos de aprendizado e de memória (TEIXEIRA et al., 2011; SCURI et al., 2007; ZHAN et al., 2004).

2.2 Creatina

Ácido α -metil-guanidino acético ou Creatina (da palavra grega *kreas*, que significa carne) é um composto nitrogenado solúvel em água, comumente utilizado por atletas ou praticantes de exercício físico como um suplemento alimentar ergogênico (PASCHOAL; NAVES, 2014), sendo capaz de constituir uma reserva de energia e promover rápida regeneração de adenosina trifosfato (ATP) na célula muscular, principalmente em exercícios de alta intensidade e curta duração (PERALTA; AMANCIO, 2002).

A Cr pode ser encontrada em alimentos de origem animal e também pode ser sintetizada de forma endógena, ou seja, a partir do próprio organismo. Sua síntese inicia com a enzima L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT), que catalisa a reação de transaminação entre a arginina e a glicina, formando guanidinoacetato e ornitina. Após, a enzima N-guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) transfere um grupo metil da S-adenosil metionina para o guanidinoacetato, formando a Cr (KREIDER et al., 2017).

Seu transporte para as células é realizado através do transportador específico dependente de canais de íons sódio e cloreto *solute carrier class 6, member 8* (SLC6A8), também conhecido como CreaT (KREIDER et al., 2017). Cerca de 2/3 da Cr no organismo são transformados em creatina fosfato (CP) pelas isoformas da enzima creatina quinase (CK). Cr e CP podem sofrer reação não enzimática de desidratação e ciclização, formando creatinina que é um metabólito excretado através dos rins em forma de urina (KREIDER et al., 2017).

No cérebro, sua importância dá-se devido à presença da enzima CK em várias áreas do tecido (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). Além disso, como o cérebro demanda muita energia, a Cr em níveis baixos pode levar a disfunções mitocondriais e outras consequências graves, além do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BOLAÑOS et al., 2009; MARTIN, 2012).

Pacientes com deficiência congênita de GAMT possuem uma redução anormal da síntese de Cr e apresentam atrasos no desenvolvimento, dificuldades no controle do tônus muscular e da postura, além de convulsões (BALESTRINO, 2018). Síndromes de deficiência de Cr cerebral levam a transtornos mentais e de desenvolvimento, podendo ser tratadas e revertidas através da suplementação com esse composto aminoácido (SALOMONS et al., 2003; STÖCKLER; HANEFELD; FRAHM, 1996). Além disso, seus benefícios também estão

associados a melhoras em lesão cerebral traumática leve (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019).

2.3 Memória

A definição de memória pode ser descrita como a capacidade de adquirir, armazenar e lembrar de informações ao longo da vida. Os diferentes tipos de memória adquiridos podem ser classificadas de acordo com sua função (de trabalho ou memória propriamente dita); conteúdo (explícita ou implícita); e tempo de duração (remota, curta ou longa duração) (LIMA, 2021). A força do traço mnemônico é um dos principais fatores que irá determinar a duração de uma memória (KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013).

A memória de curto prazo (MCP) não causa alterações permanentes no tecido cerebral, pois não requer expressão gênica ou síntese proteica (LEE; EVERITT; THOMAS, 2004). Ela é responsável por manter a nova informação aprendida disponível no período de 1 a 6 horas, enquanto a memória de longo prazo (MLP) está sendo formada (MCGAUGH, 2000). A MLP por sua vez, demora mais tempo para ser armazenada, pois sua formação depende da síntese de novas proteínas. Ela é capaz de promover modificações em sinapses cerebrais e pode ter duração de dias ou meses (VARGAS et al., 2017). Já a memória remota corresponde a uma MLP que permaneceu por anos (IZQUIERDO, 2018).

A formação da memória pode ser influenciada pelos diferentes tipos de ácidos graxos (AG) consumidos através da dieta, os quais podem ser incorporados às membranas neuronais, modificando sua fluidez e influenciando na conformação e função de proteínas que ali se encontram. Uma dessas proteínas é a Na^+/K^+ -ATPase, responsável pela geração de energia e manutenção do potencial de membrana, possuindo um papel importante em processos de aprendizado e consolidação de memória (TEIXEIRA et al., 2011).

Teixeira et al. (2011), observaram que o consumo de uma dieta rica em GVH foi suficientemente forte para modificar parâmetros de ansiedade, aquisição de memória e a atividade da Na^+/K^+ -ATPase no tecido cerebral de ratos. Rivera et al. (2019) concluíram que um modelo de obesidade induzido por uma DRG em *Drosophila* levou ao desenvolvimento de vários fenótipos previamente associados à doenças neurodegenerativas e declínio neural em roedores, como o déficit de memória. Já em recente estudo de Cordner et al. (2019), foi sugerido que a exposição materna à uma DRG em ratos pode alterar a expressão hipocampal de genes que estão envolvidos no metabolismo e cognição, predispondo a prole à danos cognitivos na idade adulta.

Estudos com a suplementação de creatina sugerem que esse composto pode elevar o conteúdo de CP no cérebro de 5 a 15%, aumentando, assim, a bioenergética cerebral. Sua utilização pode atenuar a fadiga mental, melhorar a cognição, função executiva e memória (KREIDER; STOUT, 2021). Também foi observado que, em roedores, a Cr parece afetar os receptores GABA_A via antagonismo competitivo ao mesmo tempo que estimula a transmissão glutamatérgica via receptores NMDA no hipocampo, o que estaria relacionado à melhora na memória espacial (MARQUES; WYSE, 2019).

De acordo com Marques e Wyse (2019), a Cr pode atuar como um modulador de sinapses, o que ajudaria a prevenir o comprometimento da memória no teste de reconhecimento de objetos realizado em ratos. Conforme Watanabe, Kato e Kato (2002), a suplementação de Cr aumentou a utilização de oxigênio no cérebro e reduziu da fadiga mental em participantes do estudo que realizaram cálculos matemáticos repetitivos. Em recente estudo de Van Cutsem et al. (2020), foi relatado que a suplementação de Cr antes de realizar uma partida de futebol, além de melhorar a resistência muscular, aumentou o desempenho cognitivo dos participantes.

Os mecanismos moleculares subjacentes ao aprendizado e à memória são conservados em muitas espécies. Em *Drosophila*, é possível realizar treinos para memorizar odores e padrões visuais por meio da aprendizagem clássica ou operante (KAHSAI; ZARS, 2011). Os primeiros estudos envolvendo memória nesse organismo foram conduzidos principalmente através do ensaio de condicionamento olfativo clássico, o qual utiliza punição aversiva por choque elétrico e que mais tarde, passou a receber variações como a substituição do choque por uma recompensa gustativa para o animal, como a sacarose (DAVIS, 2005).

No entanto, outros métodos para medir formas de aprendizagem e memória em *Drosophila* surgiram ao longo do tempo. Entre eles, destacam-se: o teste de supressão fototóxica aversiva (ALLY et al., 2011), o qual foi utilizado no presente estudo, e o ensaio de condicionamento de coorte (KOEMANS et al., 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais químicos e meio de cultura

A gordura hidrogenada utilizada para o tratamento foi a produzida pela COAMO Agroindustrial Cooperativa. A Cr monoidratada foi adquirida pela SUPLEY Laboratório de Alimentos e Suplementos Nutricionais Ltda. (Matão – SP). O corante azul FD & C Blue Dye nº 1 foi adquirido da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram provenientes da grade analítica do Campus UNIPAMPA.

Drosophila melanogaster (linhagem Harwich) foram mantidas em incubadora BOD, ciclo claro/escuro 12 horas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 60% de umidade) alimentadas em meio padrão do laboratório composto por farinha de milho (76,59%), açúcar (7,23%), gérmen de trigo (8,51%), sal (0,43%), leite em pó (7,23%), ágar (5%) e nipagin (antifúngico).

3.2 Protocolo experimental

3.2.1 Esquema de tratamento

As moscas (1-3 dias de vida) foram divididas em 4 grupos contendo cerca de 50 moscas de ambos os sexos cada: (1) Dieta Regular (DR), composto pela dieta padrão do laboratório; (2) Cr, onde a concentração de Cr 10 mM foi adicionada a DR; (3) GVH, onde 10% de GVH, rica em AGT, foi adicionada a DR; e (4) GVH+Cr. A concentração de Cr escolhida foi baseada em estudos anteriores realizados com *Drosophila melanogaster* (HOSAMANI; RAMESH; MURALIDHARA, 2010; DEHNOW; KRISHNA, 2019). As moscas foram expostas ao seu devido tratamento durante um período de 7 dias. A composição das dietas está de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de macronutrientes da dieta regular (DR) e da dieta rica em gordura *trans* (GVH).

	DR	GVH
Total (kcal/g)	3,67	4,16
Carboidratos (%)	79,44	63,81
Fibras (%)	6,44	6,44
Proteínas (%)	11,4	9,21
Gorduras totais (%)	9,1	26,97
<i>C10:0</i>	0,12	0,16

<i>C12:0</i>	0,18	0,22
<i>C14:0</i>	0,63	0,63
<i>C16:0</i>	2,70	5,65
<i>C16:1n7</i>	0,09	0,09
<i>C17:0</i>	0,04	0,06
<i>C17:1n5</i>	0,00	0,00
<i>C18:0</i>	0,81	3,66
<i>C18:1n9t</i>	0,16	2,81
<i>C18:1n9c</i>	2,05	9,69
<i>C18:1n7</i>	0,08	0,71
<i>C18:2n6t</i>	0,00	0,19
<i>C18:2n6c</i>	2,09	2,98
<i>C18:3n3</i>	0,15	0,15
<i>C20:1n9</i>	0,02	0,02
<i>C20:3n6</i>	0,00	0,00
<i>C20:4n6</i>	0,00	0,00

Fonte: adaptado de Meichtry et al. (2020).

3.3 Protocolo de tratamento

3.3.1 Análises *in vivo*

3.3.1.1 Mortalidade

A mortalidade das moscas foi monitorada diariamente, sendo contabilizado o número de moscas mortas a cada 24 horas até o final do período experimental, que teve duração de 7 dias. Os animais foram transferidos para alimentos frescos a cada 2 dias e, após o final do tratamento, as moscas foram contabilizadas e o resultado foi expresso como o percentual de mortalidade das moscas em relação ao número total. Foram utilizadas ao total 550 moscas por grupo experimental, distribuídas em 11 experimentos independentes.

3.3.1.2 Peso corporal

O peso corporal foi analisado no início e fim do tratamento, a diferença entre os pesos foi calculada e analisada. Foram utilizadas ao total 200 moscas por grupo experimental, distribuídas em 4 experimentos independentes.

3.3.1.3 Consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado através da ingestão da dieta tingida com corante azul, de acordo com Sun et al. (2013), com adaptações de Meichtry et al. (2020). Cerca de 5 moscas por grupo foram colocadas em suas respectivas dietas de tratamento contendo 0,5% de corante azul (FD & C Blue Dye nº 1). As moscas foram alimentadas por 30 minutos e depois foram anestesiadas e decapitadas. Os corpos foram homogeneizados em 200 µL de água destilada, e após, foi realizada centrifugação a 12.370 rpm por 2 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida a 625 nm usando espectrofotômetro. Foram utilizadas ao total 25 moscas por grupo experimental, distribuídas em 5 experimentos independentes.

3.3.1.4 Teste de campo aberto

O teste comportamental de campo aberto teve como objetivo avaliar a atividade locomotora das moscas e foi realizado de acordo com Hirth (2010) com algumas modificações. Cada mosca foi posicionada em uma placa de Petri de 9 centímetros de diâmetro dividida em quadrados (1cm x 1cm) e coberta com outra placa. O percurso dos animais foi observado e a distância percorrida durante o tempo de 60 segundos calculada através da contagem do número de quadrados que cada um ultrapassou. Foram utilizadas ao total 20 moscas por grupo experimental, distribuídas em 4 experimentos independentes.

3.3.1.5 Teste de supressão fototóxica aversiva

O teste de supressão fototóxica aversiva teve como objetivo avaliar o aprendizado e a MCP das moscas e foi realizado conforme descrito por Ali et al. (2011). Após 7 dias de exposição ao tratamento, as moscas de cada grupo experimental foram colocadas individualmente em um aparato com tubos vazios, sendo um lado escuro e outro com acesso à luz, para avaliação da fototaxia. Os animais foram considerados fototóxicos quando, em um intervalo de dez segundos, fossem capazes de caminhar do lado escuro em direção à luz. Uma vez consideradas positivas para a fototaxia, 15 moscas por grupo experimental individualmente foram treinadas para evitar o lado do aparato iluminado, sendo colocado um tubo com papel toalha embebido com quinina 0,1% dissolvida em água destilada. O treinamento das moscas para evitar o lado iluminado contendo quinina foi realizado 9 vezes, com duração de 1 minuto por vez, para cada mosca individualmente. Após isso, o tubo contendo quinina foi substituído por um tubo vazio e o aprendizado da mosca foi testado 5 vezes, por 10 segundos cada. Os animais foram então colocados de volta em seus respectivos meios experimentais por 6 horas

e, após esse período, tiveram a MCP testada no aparato da mesma forma que foi feito o teste de aprendizado.

3.4 Análise estatística

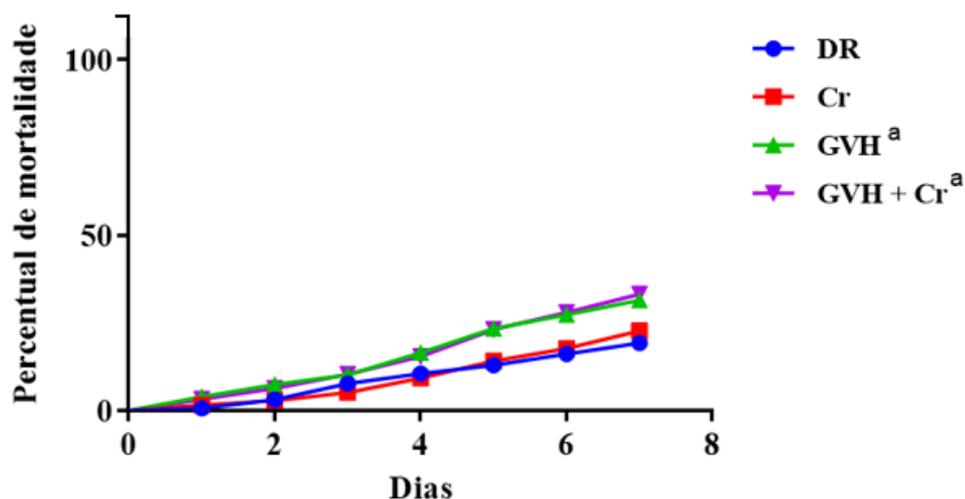
O percentual de mortalidade foi determinado pelo teste de log-rank Mantel-Cox. Para as demais análises estatísticas, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para os dados com distribuição normal, realizou-se o teste ANOVA de uma via, seguido do pelo post-hoc de Tukey. Já para os dados com distribuição anormal, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn. Os dados foram representados pela média \pm o erro padrão da média. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e da co-exposição à creatina sobre a taxa de mortalidade de *Drosophila melanogaster*

De acordo com a Figura 1, é possível observar um aumento nas taxas de mortalidade do grupo GVH (31,5%) em comparação ao grupo DR (19,3%), resultado que também foi observado no grupo GVH + Cr (33,3%). A taxa apresentada pelo grupo Cr (22,8%) manteve-se perto do índice do grupo DR. A Cr não mostrou capacidade de prevenção à mortalidade nesse modelo de dieta rica em GVH em moscas ($p < 0,05$).

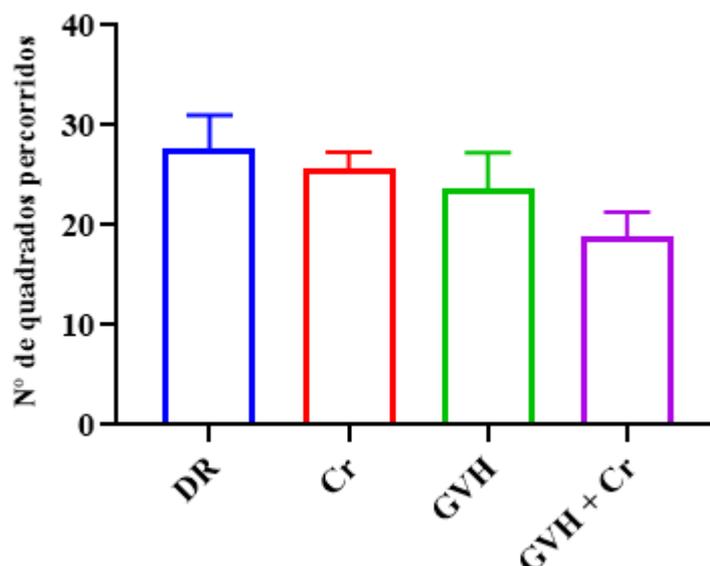
Figura 1 – Percentual de mortalidade de moscas expostas à uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e co-expostas à creatina. A medida do tempo de vida foi determinada pela comparação das curvas de sobrevivência através do teste de long-rank Mantel-Cox. (a) indica diferença significativa em relação ao grupo DR.



4.2 Teste de campo aberto

No teste comportamental de campo aberto, observa-se que não houve diferença significativa no número de quadrados percorridos entre todos os grupos analisados (One-way ANOVA $F(3, 12) = 1,766$; $p = 0,2071$; Fig. 2).

Figura 2 - Desempenho locomotor no teste comportamental de campo aberto de moscas expostas a uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e co-expostas a creatina. Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média.



4.3 Efeito da dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e da co-exposição à creatina sobre o consumo alimentar e o peso corporal de *Drosophila melanogaster*

Não houve diferença significativa na ingestão de alimentos entre as moscas de todos os grupos (One-way ANOVA, $F(3, 16) = 11,82$; $p = 0,9481$; Tabela 2). Da mesma forma, não houve diferença significativa no peso corporal dos animais (Kruskal-Wallis, $p = 0,8672$; Tabela 2).

Tabela 2 – Consumo alimentar e peso corporal das moscas *Drosophila melanogaster* expostas a uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e co-expostas a creatina. Os valores são expressos por porcentagem do grupo DR \pm o erro padrão das médias.

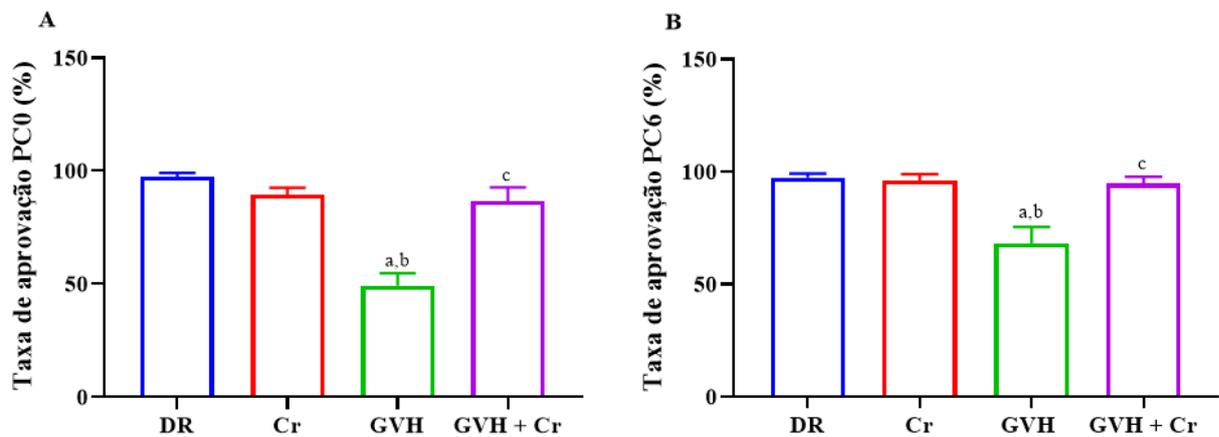
	Consumo alimentar	Peso corporal
DR	100,00 \pm 12,10	0,02 \pm 0,002
GVH	106,80 \pm 15,88	0,02 \pm 0,004
Cr	108,40 \pm 9,24	0,01 \pm 0,005
GVH + Cr	100,80 \pm 11,05	0,01 \pm 0,004

4.4 Teste de supressão fototáxica aversiva

As Figuras 4A e 4B apresentam as taxas de aprovação após o teste de aprendizado e após o teste de memória de curto prazo de *Drosophila melanogaster*, respectivamente. Foi possível observar que as moscas expostas a dieta rica em GVH apresentaram menor percentual de aprovação nos dois momentos do teste (49,3% e 68,0%, respectivamente) (Kruskal-Wallis,

$p < 0,0001$; Figura 4A; $p < 0,0005$; Figura 4B). Já a co-exposição à Cr mostrou-se eficaz tanto na taxa de aprovação do aprendizado (86,7%), quanto na prevenção da perda de memória das moscas (94,7%) ($p < 0,0004$; Figura 4A; $p < 0,0028$; Figura 4B). A exposição isolada à Cr apresentou taxa de aprovação do aprendizado de 89,3% e da memória de 96,0%.

Figura 4 – Teste de supressão fototóxica aversiva de moscas expostas à uma dieta rica em gordura vegetal hidrogenada e co-expostas à creatina. (A) Taxa de aprovação após o condicionamento (PC0). (B) Taxa de aprovação 6 horas após o condicionamento (PC6). Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média. (a) indica diferença significativa do grupo DR, (b) diferença entre Cr e (c) diferença entre GVH ($p < 0,05$).



5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível papel protetor da Cr sobre alterações na aprendizagem e memória de *Drosophila Melanogaster* expostas a uma dieta rica em GVH. Os resultados obtidos demonstraram que a Cr foi capaz de atuar na melhora de alterações cognitivas causadas nesse modelo.

O consumo elevado de AGT está associado à consequências negativas à saúde e à redução da expectativa de vida, devido ao risco aumentado de desenvolvimento de doença coronariana, prejuízos ao neurodesenvolvimento e ao crescimento fetal e infantil e aumento do estresse oxidativo (SEMMA, 2002; DHIBI et al., 2011; MONGUCHI, 2017). Nesse sentido, foi possível observar um aumento nas taxas de mortalidade do grupo GVH em comparação ao grupo DR. Resultado semelhante foi encontrado em estudo de Meichtry et al. (2020), no qual a adição de diferentes concentrações de AGT na dieta de *Drosophila* também refletiu em maiores percentuais de mortalidade. O mesmo já havia sido observado por Heinrichsen e Haddad (2012) em estudo que demonstrou efeitos prejudiciais de uma DRG na expectativa de vida e na tolerância ao estresse em *Drosophila*.

A Cr, além de funcionar como uma reserva de energia para as células, vem sendo estudada como um composto neuroprotetor, devido a sua ação antioxidante (AVGERINOS et al., 2018). No entanto, o presente estudo demonstrou que a Cr não foi capaz de prevenir a mortalidade nesse modelo de dieta rica em GVH em moscas. Esse fato pode ter ocorrido devido à uma maior incorporação de isômeros *trans* na estrutura cerebral dos animais, já que a composição das dietas apresentou deficiência de AGE como o ácido α -linolênico ou ômega 3, fundamental para o bom funcionamento do cérebro (LABOUSSE et al., 2013).

Ao avaliar a atividade locomotora dos animais, através do teste de campo aberto, não foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos analisados. Esse resultado demonstra que não houve nenhum declínio locomotor nas moscas, o que é considerado positivo pois, dessa forma, o teste realizado para avaliar o aprendizado e memória passa a ser considerado válido, visto que não houve interferências nos resultados que pudessem estar relacionadas à possíveis danos locomotores. Meichtry et al. (2020) já havia constatado que a incorporação de diferentes concentrações de AGT na dieta de *Drosophila* não alterou o desempenho locomotor dos animais.

Em relação à Cr, o resultado do presente estudo vai de encontro com estudo de Kim et al. (2020) o qual, ao investigar o efeito desse composto nitrogenado no tratamento do comportamento tipo depressivo em *Drosophila* e em camundongos, constatou que não houve

diferença significativa em relação à atividade locomotora dos roedores, através dos dados obtidos pelo teste de campo aberto. Da mesma forma, Allahyar, Akbar e Iqbal (2017), observaram que a suplementação de 1% e 3% de Cr na dieta não afetaram o comportamento exploratório e locomotor de camundongos albinos fêmeas.

A Cr é uma substância osmoticamente ativa e é captada pelas células através de um transportador dependente de sódio. Dessa maneira, sua utilização de forma aguda pode estar associada ao aumento do peso corporal devido à retenção de água intracelular (ANTONIO et al., 2021). No entanto, na análise do peso corporal realizada nas moscas, não foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos experimentais. Isso demonstra que o peso corporal dos animais não influenciou no desempenho dos demais testes, descartando também uma possível associação da ingestão de gordura com a inflamação causada por sobrepeso ou obesidade (BOURASSA; DAVID; 2017).

A análise do consumo alimentar dos animais demonstrou que não houve diferenças significativas entre todos os grupos em relação à quantidade de alimento ingerida durante o experimento. Esse resultado indica que as moscas não apresentaram menor ou maior preferência por nenhuma das dietas experimentais e, portanto, não houve interferência nos resultados dos demais testes.

Em relação ao aprendizado e memória das moscas, observou-se que os animais do grupo GVH apresentaram menores percentuais de aprovação nos dois momentos do teste, quando comparados ao grupo DR. De acordo com Cordner et al. (2015), o excesso de AG na dieta pode aumentar a carga de estresse oxidativo e a inflamação, afetando negativamente a cognição.

Em estudo de Rivera et al. (2019), no qual a DRG consistia na adição de 20% de óleo de coco, rico em gordura saturada, à DR, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação do aprendizado, mas um declínio na taxa de aprovação das moscas pertencentes ao grupo DRG na avaliação da MCP. Embora o presente estudo tenha utilizado uma concentração de gordura menor, observa-se que o perfil de ácidos graxos é diferente, o que sugere que uma dieta rica em AGT, por conter maior teor de gordura artificial, pode causar maiores danos em parâmetros cognitivos. Além disso, após 6 horas de condicionamento, as moscas pertencentes ao grupo GVH apresentaram uma tendência à recuperação do dano cognitivo, possivelmente ocasionado pelo período no qual aguardaram a próxima etapa do teste em uma DR.

O ensaio de supressão fototóxica aversiva é considerado um teste comportamental robusto para avaliar alterações na capacidade de aprendizagem e memória decorrentes de manipulação genética ou ambiental em *Drosophila* (ALI et al., 2011). Apesar do fato de que o

presente estudo utilize a metodologia de Ali et al. (2011), a qual afirma que após 6 horas, a memória ainda seja considerada de curto prazo, de acordo com recente trabalho de Zhao et al. (2019), a MLP dependente de contexto em *Drosophila* poderia ser formada sem a necessidade de síntese proteica, o que leva à hipótese de que o teste para avaliar o aprendizado realizado neste trabalho já possa ser considerado uma MCP. Além disso, em estudo de Babin, Kolly e Kawecki (2014), que avaliou os efeitos da infecção com bactérias patogênicas no desempenho da aprendizagem olfativa aversiva em *Drosophila*, a resposta de 5 minutos após o condicionamento refletiu em MCP, enquanto que a resposta de 1 h correspondeu a memória de médio prazo.

De acordo com Rivera et al. (2019), uma DRG é capaz de levar a alterações na memória de moscas e pode acarretar em disfunções neurocomportamentais. Além disso, em estudo de Meichtry et al. (2020), foi observada uma redução significativa nos níveis de octopamina em moscas expostas a diferentes concentrações de gorduras adicionadas na dieta. Esse neurotransmissor em invertebrados está relacionado ao desempenho positivo na aprendizagem e memória em *Drosophila* (SCHWAERZEL et al., 2003; CLABEN; HENRIKE, 2018).

Ainda, os dados aqui obtidos vão de encontro com os de Teixeira et al. (2011), os quais demonstraram que a incorporação no tecido cerebral de apenas 0,33% de AGT advindos da dieta foi suficientemente forte para alterar parâmetros de memória e da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase no cérebro de roedores. Conforme Teixeira et al. (2011), uma membrana neuronal que apresenta elevada fluidez, também apresenta maiores atividades enzimáticas, como por exemplo da Na^+/K^+ -ATPase. Ela é responsável pela geração do potencial de membrana através do transporte ativo de Na e K, e é fundamental para manter o gradiente iônico para excitabilidade neuronal (MOBASHERI et al., 2000). Além disso, desempenha papel fundamental em processos de sinapse e na plasticidade neuronal, mediando processos de aprendizagem e memória (SCURI et al., 2007; ZHAN et al., 2004).

O sistema Cr/CP/CK também está envolvido em processos de sinapses e na homeostase energética cerebral (SCHLATTNER; TOKARSKA-SCHLATTNER; WALLIMANN, 2005). De acordo com Jost et al. (2002), esse sistema pode regular a velocidade dos potenciais de ação e a comunicação intracelular utilizada para processos de aprendizagem e memória. Esses dados estão de acordo com os resultados do presente estudo, os quais demonstraram que a adição de Cr na dieta foi eficaz na prevenção dos danos cognitivos apresentados pelo grupo GVH.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a Cr é capaz de proteger contra danos no aprendizado e memória causados por uma dieta rica em GVH em *Drosophila Melanogaster*, contudo, ainda são necessários mais estudos para elucidar os principais mecanismos de ação envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ALLAHYAR R; AKBAR, A.; IQBAL, F. Effect of creatine monohydrate supplementation on learning, memory and neuromuscular coordination in female albino mice. **Acta Neuropsychiatr**, v. 29, n. 1, 2017.
- ALI, Y. O. et al. Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in Drosophila Models of Neurodegeneration. **J Vis Exp**, n. 49, v. 2504, p. 1-6, 2011.
- ANTONIO, J. et al. Common questions and misconceptions about creatine supplementation: what does the scientific evidence really show? **J Int Soc of Sports Nutr**, v. 18, n. 13, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo, SP, 2016.
- AVGERINOS, K. I. Effects of creatine supplementation on cognitive function of healthy individuals: A systematic review of randomized controlled trials. **Exp Gerontol**, v. 15, n. 108, p. 166–173, 2018.
- BABIN, A.; KOLLY, S.; KAWECKI, T. J. Virulent bacterial infection improves aversive learning performance in Drosophila melanogaster. **Brain Behav Immun**, v. 41, p. 152-161, 2014.
- BALSOM, P. D.; SODERLUND, K.; EKBLAM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. **Sports Med**, v.18, n.4, p. 268-280, 1994.
- BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine. **Amino Acids**, v. 40, n. 5, p. 1305–13, maio. 2011.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications, **Adv Drug Deliv Ver**, v. 61, n.14, p. 1299–1315, 2009.
- BOUE, C. et al. Trans fatty acids in adipose tissue of French women in relation to their dietary sources. **Lipids**, v. 35, p. 561–566, 2000.
- BOURASSA, K.; DAVID, A. S. Body mass and cognitive decline are indirectly associated via inflammation among aging adults. **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 63-70, 2017.
- CLAßEN, G.; HENRIKE, S. Octopamine Shifts the Behavioral Response From Indecision to Approach or Aversion in Drosophila melanogaster. **Front Behav Neurosci**, v. 12, 2018.
- CORDNER, Z. A.; TAMASHIRO, K. L. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiol Behav**, v. 152 (Pt B), p. 363–71, 2015.
- CORDNER, Z. A., et al. Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. **Exp Neurol**, v. 318, p.92-100, 2019.

DAVIS, R. L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. **Annu Rev Neurosci**, v. 28, p. 275-302, 2005.

DEHNOW, A. H.; KRISHN, M. S. Creatine Supplement Effect Similar in Rotenone Induced and Transgenic PD Flies in *Drosophila Melanogaster*. **J Pharm Chem Biol Sci**, v. 7, n. 2, p. 84-93, jun/ago. 2019.

DHIBI, M. et al. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Nutr Metab**, v. 8, n. 65.

DOLAN, E.; GUALANO, B.; RAWSON, E.S. Beyond muscle: The effects of creatine supplementation on brain creatine, cognitive processing, and traumatic brain injury. **Eur J Sport Sci**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

DUTHEIL S. et al. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. **Neuropsychopharmacol**, v. 41, p. 1874–1887, 2016.

EDWARDS, A. C. Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genet**, v. 2, n. 9, p. 1386-1395, 2006.

ERECIN'SKA M.; SILVER I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v. 43, n. 1, p. 37–71, 1994.

HEINRICHSEN, E. T.; HADDAD, G. G. Role of High-Fat Diet in Stress Response of *Drosophila*. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 504-23, ago. 2010.

HOSAMANI, R.; RAMESH, S. R.; MURALIDHARA. Attenuation of Rotenone-Induced Mitochondrial Oxidative Damage and Neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* Supplemented with Creatine. **Neurochem Res**, v. 35, n. 9, p. 1402-12, jun. 2010.

KAHSAI, L.; ZARS, T. Learning and memory in *drosophila*: behavior, genetics, and neural systems. **Int Rev Neurobiol**, v. 99, 2011

KATCHE, C.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. Neurobiology of Learning and Memory Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. **Neurobiol Learn Mem**, v. 106, p. 40–47, 2013.

KREIDER, R. B. et al. International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. **J Int Soc of Sports Nutr**, v. 14, n. 18, 2017.

KREIDER, R. B.; STOUT, J. R. Creatine in Health and Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 2, 2021.

KOEMANS, T. S. et al. *Drosophila* Courtship Conditioning As a Measure of Learning and Memory. **J Vis Exp**, v. 124, 2017.

IZQUIERDO I. **Memória**. 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2018.

LABOUSSE, M. A. Chronic high fat diet consumption impairs sensorimotor gating in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2562-2574, 2013.

LIMA, K. R. Mecanismos dopaminérgicos envolvidos na modulação da persistência da memória induzida por diferentes estratégias comportamentais. In: LIMA, K. R. **Mecanismos dopaminérgicos envolvidos na modulação da persistência da memória induzida por diferentes estratégias comportamentais**. 2021. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2021. p. 32–37.

JOST, C. R. et al. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 10, 2002.

JUMP, D. B. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **J Biol Chem**, v. 277, n. 11, p. 8755–58, 2002.

KAZAMA, H. Systems neuroscience in *Drosophila*: Conceptual and technical advantages. **Neurosci J**, v. 296, p. 3–14, 18 jun. 2015.

KIM, S. et al. Creatine and taurine mixtures alleviate depressive-like behaviour in *Drosophila melanogaster* and mice via regulating Akt and ERK/BDNF pathways. **Sci Rep**, v. 10, n. 11370, 2020.

KRISHNA, S. et al. Neurochemical and electrophysiological deficits in the ventral hippocampus and selective behavioral alterations caused by high-fat diet in female C57BL/6 mice. **Neurosci J**, v. 297, p. 170–181.

KÜHNLEIN, R. P. The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 348–56, out. 2011.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 839–843, 2004.

LIU, Z.; HUANG, X. Lipid metabolism in *Drosophila*: development and disease. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 1, p. 44–50, 1 jan. 2013.

MARTIN, L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 107, p. 355–415, 2012.

MARQUES, E. P.; WYSE, A. T. S. Creatine as a Neuroprotector: an Actor that Can Play Many Parts. **Neurotox Res**, v. 36, p. 411-423, 2019.

MCGAUGH, J. L. Memory - A century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MEICHTRY, L. B. et al. Addition of Saturated and Trans-fatty Acids to the Diet Induces Depressive and Anxiety-like Behaviors in *Drosophila melanogaster*. **Neurosci J**, v. 443, p. 164-175, 2020.

MOBASHERI A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci Rep**, v. 20, n. 2, p. 51–91, 2000.

MONGUCHI, T. et al. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. **J Cardiol**, v. 70, n. 2, p. 121-27.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol rev**, v. 63, n. 2, p. 411-36, jun. 2011.

PASCHOAL, V.; NAVES, A. **Tratado de nutrição esportiva funcional**. Ed. Roca, 2014.

PASE, C. S. et al. Maternal trans fat intake during pregnancy or lactation impairs memory and alters BDNF and TrkB levels in the hippocampus of adult offspring exposed to chronic mild stress. **Physiol Behav**, v. 169, p. 114–23, fev. 2017.

PERALTA, J.; AMANCIO, O. M. S. Creatine as an ergogenic supplement for athletes. **Rev Nutr**, v.15, n.1, 2002.

RAE, C. D.; BRÖER, S. Creatine as a booster for human brain function. How might it work? **Neurochem Int**, v. 89, p. 249-59, 2015.

REDONDO, D. R. et al. The effect of oral creatine monohydrate supplementation on running velocity. **J Int Soc Sports Nutr**, v.6, n.3, p. 213-21, 1996.

REMING, V. et al. Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation. **J Am Diet Assoc**, v. 110, n. 4, p. 585-92, 2010.

RIVERA, O. et al. A high-fat diet impacts memory and gene expression of the head in mated female *Drosophila melanogaster*. **J Comp Physiol B**, v. 189, n. 2, p. 179-198, 2019.

ROSCHEL, H. et al. Creatine Supplementation and Brain Health. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 586, 2021.

SALOMONS, G. S. X-linked creatine transporter defect: an overview. **J Inherit Metab Dis**, v. 26, n. 2-3, p. 309-18, 2003.

SCHLATTNER, U.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 164-180, 2006.

SCHWAERZEL, M. et al. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. **Neurosci J**, v. 23, p. 10495–10502, 2003.

SCURI R. et al. Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. **Eur J Neurosci**, v. 25, n.1, p. 159–167, 2007.

SEMMA, M. Trans Fatty Acids: Properties, Benefits and Risks. **Int J Health Sci**, v. 48, n. 1, p. 7-1, 2002.

SESTILI, P. et al. Creatine as an antioxidant. **Amino Acids**, v. 40, p. 1385–1396.

SHEPPARD, K. W.; CHEATHAM, C. L. Omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and higher-order cognitive functions in 7- to 9-y-olds: a cross-sectional study. **Am J Clin Nutr**, v. 98, n. 3, p. 659-67, set. 2013.

STOCKLER, S.; HANEFELD, F.; FRAHM, J. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. **Lancet**, v. 348, n. 9030, p. 789-90, 1996.

STOCKLER, S., et al. Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. **Metabolism**, v. 46, n. 10, p. 1189–1193, 1997.

SUN, Y. et al. Aging Studies in *Drosophila Melanogaster*. **Methods Mol Biol**, v. 1048, p. 77–93, 2013.

TEIXEIRA, A. M. et al. Exercise affects memory acquisition, anxiety-like symptoms and activity of membrane-bound enzyme in brain of rats fed with different dietary fats: impairments of trans fat. **Neurosci J**, v. 195, p. 80-88, 2011.

VAN CUTSEM, J. et al. Can Creatine Combat the Mental Fatigue-associated Decrease in Visuomotor Skills? **Med Sci Sports Exerc**, v. 52, p. 120–130, 2020.

VARGAS, L. S. et al. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 329, p. 120-126, 2017.

WAINWRIGHT, P. E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proc Nutr Soc**, v. 61, n. 1, p. 61-9, 2002.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neurosci Res**, v. 42, p. 279–285, 2002.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 7, p. 1107-1213, jul. 2000.

YEHUDA, S., RABINOVITZ, S., MOSTOFISKY, D. I. Essential fatty acids and stress. In: **Nutrition, stress and medical disorders**, p. 99–100. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.

ZEMDEGS, J. et al. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **Br J Pharmacol**, v. 173, p. 2095 – 2110, 2016.

ZHAN H. et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. **Neurol Res**, v. 26, n. 1, p. 35 – 40, 2004.

ZHAO, B. et al. Long-term memory is formed immediately without the need for protein synthesis-dependent consolidation in *Drosophila*. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, 2019.