

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
CAMPUS URUGUAIANA**

**ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL INDUZ
COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO EM *Drosophila melanogaster*: AÇÃO
TERAPÊUTICA DO γ -ORIZANOL**

TESE DE DOUTORADO

STÍFANI MACHADO ARAUJO

Uruguaiana, RS, Brasil

2020

STÍFANI MACHADO ARAUJO

**ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL INDUZ
COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO EM *Drosophila melanogaster*: AÇÃO
TERAPÊUTICA DO γ -ORIZANOL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marina Prigol

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

Uruguaiana, RS, Brasil

2020

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

A663e Araujo, Stifani Machado

Estresse crônico moderado e imprevisível induz
comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*: Ação
terapêutica do y-orizanol / Stifani Machado Araujo.
143 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2020.

"Orientação: Marina Prigol".

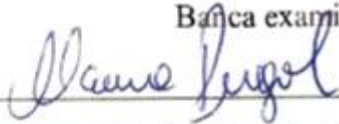
1. Serotonina. 2. Depressão. 3. Estresse crônico. 4.
Antioxidante. 5. *Drosophila*. I. Título.

STÍFANI MACHADO ARAUJO**Estresse crônico moderado e imprevisível induz comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*: Ação terapêutica do γ -orizanol**

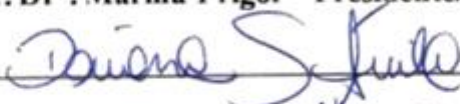
Tese apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.
Área de concentração: Bioprospecção molecular.

Tese defendida e aprovada em: 03 de março de 2020.

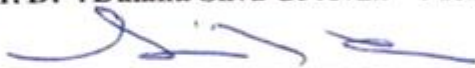
Banca examinadora:



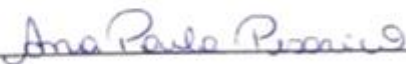
Prof. Dr^a. Marina Prigol – Presidente/Orientadora



Prof. Dr^a. Daiana Silva de Ávila – Membro efetivo



Prof. Dr^a. Simone Pinton – Membro efetivo



Prof. Dr^a. Ana Paula Pesarico – Membro efetivo



Prof. Dr^a. Thaís Posser – Membro efetivo

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, André e Maria Tereza que sempre me apoiam e não medem esforços para que eu possa realizar meus sonhos, são meus exemplos e maiores incentivadores, fontes inesgotáveis de inspiração, amor e compreensão, que me ensinaram, que é possível chegar sempre, aonde quer que seja, quando se deseja com o coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela vida, por iluminar meu caminho, por me proteger sempre e por me dar a oportunidade de conhecer pessoas extraordinárias nesta vida.

À minha família, meu pai André, minha mãe Maria Tereza, meu irmão Smalei, e minha Vó Dorvalina por estarem sempre ao meu lado, e acreditarem em mim e no meu trabalho, por me darem força e serem pilares para que eu seguisse em frente, obrigada por todo apoio. Amo vocês!

Ao meu amado noivo Evandro que desde o princípio desta caminhada tem estado ao meu lado em amor. Agradeço-te por toda parceria durante a construção deste trabalho, por me ajudar com os problemas “informatológicos”, por me ajudar com o desenvolvimento dos aparatos, por me acompanhar e ceder seus fins de semana me auxiliando com esse protocolo de estresse de dez dias. Agradeço-te pelo incentivo, companheirismo e paciência. Te amo para sempre!

Agradeço imensamente à minha orientadora Professora Marina por acreditar em meu potencial, por todo conhecimento transmitido, por toda dedicação, compreensão, paciência, ensinamentos que foram além do seu papel de orientadora pelo carinho e amizade e acima de tudo por ser esse exemplo de profissional e de mulher pesquisadora, ao qual me inspiras.

Agradeço a meus coorientadores Professor Gustavo e Professora Silvana pelos ensinamentos e contribuições na execução do projeto.

Sou grata eternamente ao Professor Cristiano Ricardo Jesse, que foi instrumento de transmissão de valiosos aprendizados, que me acompanhou desde o início da graduação (ministrando a primeira aula de nosso curso), obrigada por seus ensinamentos de cunho científico e pessoal e agradeço também ao Professor Mauro Oliveira que juntamente com o Professor Cristiano me inseriram no fascinante ramo da pesquisa, acreditando desde o princípio em meu potencial.

Agradeço imensamente ao Laftambio Pampa por ser meu “segundo lar” durante esses 9 anos, nós fomos de um laboratório improvisado na sala 202 para um laboratório não tão espaçoso mas que acolhe todo mundo, cada pessoa que passou por nosso Lab foi única, e sempre deixaram um pouco de si e levaram um pouco de nós, sou grata a todos alunos de iniciação e alunos de pós graduação que passaram e contribuíram com minha formação.

Agradeço à minhas amigas Vandrezza, Shanda, Márcia, Franciane, Luana, Fran Polet, Elize, Dienifer, Nathali, Fran Romero, Cristini, Magna, Micheli e o Mustafa, por todo o auxílio, companheirismo, compreensão e ensinamentos.

Agradecimento especial as minhas fiés escudeiras Deza, Shanda, Márcia, Franciane, “Mustafa”, vocês que participaram do processo, com amizade, trabalho, apoio, amizade, ideias, suporte, amizade, perrengues, e pelos indescritíveis momentos de alegria tornando essa jornada mais leve e este trabalho possível. Muito Obrigado!

A todos antigos colegas do Lab, especialmente à Mariane pelos incentivos, conselhos, amizade e ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica Alexandra, Liziane, Milena, Kauane, Jocemara, Larissa, Guilherme, por toda a ajuda no laboratório e pela amizade.

Agradeço a Universidade Federal do Pampa, instituição na qual há 10 anos eu ingressei, me dando uma formação profissional e humana pela qual sou imensamente agradecida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade e pela possibilidade de realização desse curso, e a seu corpo docente altamente qualificado que contribuíram para minha formação.

Agradeço aos funcionários da Unipampa Campus Itaquí, os técnicos, as moças da limpeza e os guardinhas, da por todo auxílio e parceria.

Agradeço a parceria, a disponibilidade e receptibilidade do Professor Jefferson Franco, Professora Thaís Posser, e suas alunas de Patrícia, Illana, Giulianna, do grupo CIPBIOTEC da Unipampa São Gabriel. Muito obrigada!

À CAPES e a FAPERGS, pelo auxílio financeiro.

À banca examinadora Professora Daiana Ávila, Professora Simone Pinton, Professora Thaís Posser e Professora Ana Pesarico por participarem da avaliação dessa tese.

Por fim, e não menos importante, minha integral consideração a todas as *Drosophila melanogaster* utilizadas neste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPIGRAFE

“Depression is frozen feeling. The mystery begins with our history. Although the physical body travels forward chronologically, one’s emotional consciousness always lingers at any point of departure. Before we can fully surrender to the mystery, we have to go back and heal the wounds and memories that obstruct us. This is the ‘power of then’. We’ve got to be there then, before we can be here now.”

Jeff Brown

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Estresse crônico moderado e imprevisível induz comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*: Ação terapêutica do γ -orizanol

Autora: Stéfani Machado Araujo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marina Prigol

Coorientador: Prof.^a Dr. Gustavo Petri Guerra

Local e data da defesa: Itaqui, 03 de março de 2020.

A depressão é uma doença grave, recorrente e uma condição psiquiátrica incapacitante que atinge mais de 350 milhões de indivíduos em todo mundo. O estresse crônico moderado e imprevisível é um modelo experimental que simula o desenvolvimento e a progressão da depressão clínica servindo como um protocolo para teste da eficácia de compostos candidatos a antidepressivos. γ -orizanol é um promissor candidato antidepressivo por ser um composto natural obtido do óleo do farelo do arroz e apresentar efeitos biológicos previamente descritos na literatura. O objetivo geral do trabalho foi investigar se o estresse crônico moderado e imprevisível induz comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster* e avaliar a ação terapêutica do γ -orizanol neste modelo. No primeiro momento (**Artigo Científico**) tínhamos como objetivo estabelecer/padronizar a *Drosophila melanogaster* como um modelo para investigar as alterações induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível que predizem o comportamento tipo depressivo, uma vez que não havia dados na literatura sobre comportamento semelhante à depressão em *Drosophila* desencadeada por estresse crônico, tampouco usando estressores que simulam o estresse da vida diária que empregam demandas adaptativas extensivas sobre o organismo. Os resultados deste artigo demonstraram que as moscas expostas ao protocolo de estresse por dez dias tiveram um maior tempo de imobilidade no teste de nado forçado, um comportamento anedótico no teste de preferência a sacarose, uma diminuição no comportamento de acasalamento e um comportamento

agressivo, além de alterações nos níveis de monoaminas envolvidas com o desenvolvimento da patologia depressiva. Sendo assim concluímos que embora a *Drosophila melanogaster* tenha suas limitações como um modelo animal de depressão, ela é capaz de satisfazer critérios para um modelo animal válido, como boa face e validade de construção para testar os efeitos dos candidatos a antidepressivos. Além disso, atende aos preceitos éticos por ser um modelo alternativo ao uso de mamíferos na experimentação. Com base nestes resultados, buscou-se investigar a ação terapêutica de γ -orizanol (**Manuscrito I**) nas moscas submetidas ao comportamento tipo depressivo, através do protocolo por nós validado acima. O γ -orizanol contém uma mistura de ésteres de ácido ferúlico, é descrito por possuir potente efeito antioxidante, entre outros, mas há uma escassez de dados sobre um possível efeito antidepressivo do γ -orizanol. Neste estudo, o γ -orizanol foi efetivo contra os sinais do tipo depressivos desenvolvidos pelas moscas expostas ao protocolo de estresse crônico avaliados através dos testes preditivos do comportamento depressivo, além da regulação de seus níveis monoaminérgicos. Evidências existentes sugerem que o estresse crônico prejudica o status antioxidante do tecido cerebral e pode estar relacionado ao desenvolvimento da depressão, portanto, o efeito do γ -orizanol sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (níveis de espécies reativas, peroxidação lipídica) foram demonstrados (**Resultados Preliminares**) onde γ -orizanol teve um efeito neuroprotetor, possivelmente relacionado a seu potencial antioxidante. Em conjunto, os resultados desta tese contribuem para tornar a *Drosophila* um modelo animal válido para o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo e assim auxiliar na compreensão das respostas comportamentais, e mecanismos fisiológicos desta patologia. Além disso, o tratamento com γ -orizanol demonstrou potencial efeito antidepressivo podendo ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da depressão.

Palavras-chave: Serotonina, Depressão, Estresse crônico, Antioxidante, *Drosophila*.

ABSTRACT

Doctoral thesis

Program of Post-Graduation in Biochemistry

Federal University of Pampa

Chronic unpredictable mild stress induces depressive-like behavior in *Drosophila melanogaster*: Action of γ -oryzanol

Author: Stífani Machado Araujo

Advisor: Dr^a. Marina Prigol

Coorientator: Dr. Gustavo Petri Guerra

Site and Date of Defence: Itaquí, march 03th, 2020.

Depression is a serious, recurring disease and a disabling psychiatric condition that affects more than 350 million individuals worldwide. Chronic unpredictable mild stress is an experimental model that simulates the development and progression of clinical depression and serves as a protocol for testing the effectiveness of candidate compounds for antidepressants. γ -oryzanol is a promising antidepressant candidate because it is a natural compound obtained from rice bran oil and has biological effects previously described in the literature. The general objective of the work was to investigate whether chronic unpredictable mild stress induces depressive behavior in the *Drosophila melanogaster* and to evaluate the therapeutic action of γ -oryzanol in this model. At first (**Scientific Article**) we aimed to establish/standardize *Drosophila melanogaster* as a model to investigate the changes induced by chronic unpredictable mild stress that predict depressive behavior, since there was no data in the literature on behavior similar to depression in *Drosophila* triggered by chronic stress, nor using stressors that simulate the stress of daily life that employ extensive adaptive demands on the body. The results of this article demonstrated that flies exposed to the stress protocol for ten days had a longer immobility time in the forced swim test, anecdotal behavior in the sucrose preference test, a decrease in mating behavior and an aggressive behavior, in addition to changes in monoamine levels involved in the development of depressive pathology. Thus, we conclude that although *Drosophila melanogaster* has its limitations as an animal model of depression, it is able to satisfy criteria for a valid animal model, such as good face and construction validity to test the effects of candidates for antidepressants. In addition, it meets the ethical precepts because it is an alternative model to the use of mammals in experimentation. Based on these results, we sought to investigate the therapeutic action of γ -oryzanol (**Manuscript I**) on flies subjected to depressive behavior, using the protocol we validated above. γ -oryzanol contains a mixture of ferulic acid esters, it is described as having a potent antioxidant effect, among others, but there is a lack of data on a possible

antidepressant effect of γ -oryzanol. In this study, γ -oryzanol was effective against the depressive-like signs developed by flies exposed to the chronic stress protocol assessed through predictive tests of depressive behavior, in addition to the regulation of their monoaminergic levels. Existing evidence suggests that chronic stress impairs the antioxidant status of brain tissue and may be related to the development of depression, therefore, the effect of γ -oryzanol on some parameters of oxidative stress (reactive species levels, lipid peroxidation) have been demonstrated (**Results Preliminaries**) where γ -oryzanol had a neuroprotective effect, possibly related to its antioxidant potential. Together, the results of this thesis contribute to making *Drosophila* a valid animal model for the development of depressive behavior and thus assist in understanding the behavioral responses and physiological mechanisms of this pathology. In addition, treatment with γ -oryzanol demonstrated a potential antidepressant effect and may be a therapeutic alternative for the treatment of depression.

Keywords: Serotonin, Depression, Chronic stress, Antioxidant, *Drosophila*.

LISTA DE FIGURAS

-REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Fatores multifatoriais desencadeadores da patologia depressiva. 5HT (serotonina); DA (dopamina).....	26
Figura 2. Ciclo de vida da mosca da fruta <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Figura 3. Correspondência existente entre os órgãos dos seres humanos e das moscas.....	35
Figura 4. Esquema dos tecidos de <i>Drosophila melanogaster</i> . Esquema de (em cima) uma vista dorsal e (em baixo) uma vista lateral de <i>Drosophila</i> adulta, mostrando as células, tecidos e órgãos envolvidos no metabolismo.....	35
Figura 5. Organização do sistema nervoso (medula ventral/espinal no tronco e nervos segmentares) de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
Figura 6. Estrutura cerebral organizada em centros funcionais, codificados por cores para comparativo entre o cérebro humano e da <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Figura 7. Imagem representativa das estruturas neuroquímicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Figura 8. Esquema comparando a sinalização do sistema neurotrófico de vertebrados e <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Figura 9. Testes comportamentais para mensurar respostas válidas relacionadas a um comportamento tipo depressivo em <i>Drosophila melanogaster</i> : Teste de Agressividade (Figura A); teste de acasalamento (Figura B); teste de preferência a sacarose (Figura C); teste de nado forçado (Figura D); teste claro/escuro (Figura E).	41
Figura 10. Estruturas químicas dos principais componentes de γ -orizanol.....	44

-ARTIGO CIENTÍFICO

Supplementary material

Figure S1. Arena for Forced Swim Test.....	61
Figure S2. Light/dark assay box.....	61
Figure S3. Effects of CUMS on Pearson's correlation analysis between monoamines and behaviors depressive like paradigms.....	62

-RESULTADOS PRELIMINARES

Figura 1. Efeito do γ -orizanol (ORY) na taxa de sobrevivência de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 10 dias. O número total de moscas (150 por grupo) representa a soma de três experiências independentes. A medida do tempo de vida foi determinada comparando-se as curvas de sobrevivência pelo teste Log-rank -Mantel-Cox.....110

Figura 2. Efeito do γ -orizanol (ORY) nos níveis de espécies reativas na cabeça (Gráfico 2A) e no corpo (Gráfico 2B) das moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; #Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS (P <0,05).....111

Figura 3. Efeito do γ -orizanol (ORY) na peroxidação lipídica na cabeça (Gráfico 3A) e no corpo (Gráfico 3B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle (P <0,05).....112

Figura 4. Efeito do γ -orizanol (ORY) na viabilidade celular na cabeça (Gráfico 4A) e no corpo (Gráfico 4B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS (P <0,05).....113

Figura 5. Efeito do γ -orizanol (ORY) na atividade de enzimas antioxidantes na cabeça da mosca, superóxido dismutase (SOD) (Gráfico 4A) e catalase (CAT) (Gráfico 4B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas cento e vinte moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de seis experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; #Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS; ^Diferença significativa do grupo ORY sozinho entre os grupos (P <0,05).....114

Figura 6. Efeitos do γ -orizanol (ORY) na função mitocondrial usando a respirometria de alta resolução (HRR) das moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). A função mitocondrial é apresentada com a abreviação do(s) complexo(s) envolvido(s), seguida pelo estado da respiração medido na presença de L-prolina + piruvato + malato (CI_{LEAK}), + ADP (CI_{OXPHOS}), + citocromo c (CI_{COXPHOS}), + succinato (CI_c + CII_{OXPHOS}), + FCCP (CI_c + CII_{ETS}), + rotenona (CII_{ETS}), + antimicina A (ROX), + TMPD/ascorbato (CIV).....115

-DISCUSSÃO

Figura 1. Desenvolvimento do comportamento tipo depressivo a *Drosophila melanogaster*, confirmado, após submissão destas aos testes comportamentais preditivos de depressão.....123

Figura 2. γ -orizanol (ORY) protege contra o desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo e redução níveis de neurotransmissores em *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS); 5HT (serotonina); DA (dopamina); OCT (octopamina).....125

Figura 3. γ -orizanol (ORY) demonstra potencial efeito antioxidante e protege contra o aumento de alguns parâmetros de estresse oxidativo espécies reativas (ER); peroxidação lipídica (LPO); superóxido dismutase (SOD) em *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) por dez dias.....127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CAT	Catalase
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CUMS	<i>Chronic unpredictable mild stress</i>
CV	Complexo V
cyt c	Citocromo exógeno c
DCF-DA	Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína
DNT1	<i>Drosophila</i> neurotrofina 1
DNT2	<i>Drosophila</i> neurotrofina 2
DNTs	<i>Drosophila</i> NTs
DSM-V	<i>The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
ERK	<i>Extracellular-regulated protein kinase</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETS	Transporte de elétrons
FCCP	Carbonil cianeto ρ -(trifluoro-metoxi) fenilhidrazona
FLX	Fluoxetina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMAOs	Inibidores da monoamina oxidase
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAPKS	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MDA	Malondialdeído
NGF	Nervous Growth factor

NPF	Neuropeptídio F
NPY	Neuropeptídeo Y
NT3	Neurotrofina 3
NT4	Neurotrofina 4
NTs	Neurotrofinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORY	γ -orizanol
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
Rox	Residual de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
Spz	Spätzle
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCAs	Antidepressivos tricíclicos
TMPD	Tetrametil-p-fenilenodiamina
Trk	Tropomyosin receptor kinase

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A- Autorização para reprodução do Artigo científico “ <i>Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in Drosophila melanogaster</i> ”	142
ANEXO B- Confirmação da submissão do Manuscrito I “ <i>γ-oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in Drosophila melanogaster</i> ”	143
ANEXO C- Resumo Gráfico da Tese.....	144

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1. Depressão: Histórico, Definição, Epidemiologia e Impacto Social	24
2.2. Fisiopatologia da Depressão.....	26
2.3. Estresse e a Depressão	29
2.4. Protocolos Experimentais de Estresse no Estudo da Depressão	30
2.5. Estresse Crônico Moderado e Imprevisível	32
2.6. <i>Drosophila melanogaster</i> modelo animal para estudo da Depressão.....	33
2.7. Neurobiologia da <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.8. Testes comportamentais preditivos de comportamento tipo depressivo em <i>Drosophila melanogaster</i>	40
2.9. Terapias convencionais da Depressão	42
2.10. γ -orizanol: Aspectos gerais e Funções biológicas.....	43
2.11. γ -orizanol e Depressão	45
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS.....	47
5. DESENVOLVIMENTO	49
5.1. ARTIGO CIENTÍFICO	49
5.2. MANUSCRITO I.....	64
5.3. RESULTADOS PRELIMINARES	102
6. DISCUSSÃO GERAL	122
7. CONCLUSÃO.....	128
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	128
9. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
10. ANEXOS	142

APRESENTAÇÃO

A presente Tese foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **OBJETIVOS** e a **JUSTIFICATIVA**. Na **parte II** constam o **ARTIGO CIENTÍFICO** e o **MANUSCRITO I**, nestes constam as seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*, estruturados de acordo com as normas da revista onde foi publicado ou submetido respectivamente. Estes representam a íntegra deste estudo. Ainda na parte II apresento alguns **RESULTADOS PRELIMINARES** divididos em: *Introdução, Material e Métodos, e os Resultados e Discussão Preliminares e Referências Bibliográficas* de nosso tratamento com γ -orizanol. Na **parte III** encontram-se a **DISCUSSÃO GERAL** dos resultados da tese, a **CONCLUSÃO** e as **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, sendo essas últimas referentes somente às citações utilizadas na Introdução e Referências Bibliográficas da tese.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios neuropsiquiátricos chamados de "distúrbios do cérebro" têm afetado a vida dos indivíduos, e nas últimas duas décadas fortes evidências apontam um aumento na sua frequência e no ônus atribuído a tais distúrbios em nível mundial (BANSAL *et al.*, 2016). A depressão é uma doença neuropsiquiátrica comum e mais de 300 milhões de pessoas vivem com esse transtorno mental no mundo, no Brasil cerca de 5,8% da população sofre de depressão (Organização Mundial da Saúde, 2017).

A patologia molecular da depressão ainda não é bem definida, muito dos tratamentos farmacológicos bem compreendidos e atuais baseiam-se na “teoria das monoaminas” onde uma desregulação nos níveis cerebrais de serotonina, noradrenalina ou dopamina são ditos como a principal causa na fisiopatologia da depressão (JIANG *et al.*, 2017; KOCH *et al.*, 2002). Além disso, outro fator contribuinte para o desenvolvimento desta doença seria um distúrbio nos fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro, estes são reguladores críticos da formação e plasticidade das redes neuronais, e evidências crescentes indicam que esses fatores são reconhecidos por serem importantes para uma compreensão mais profunda da depressão (WAN *et al.*, 2017). Há evidências também da ocorrência do estresse oxidativo estar relacionado ao desenvolvimento da depressão, causado pela disfunção mitocondrial, este é um "coquetel perigoso" aumentando o risco de desenvolvimento ou desencadeamento da patologia depressiva (CARUSO *et al.*, 2019).

O estresse tem um importante papel no desenvolvimento de várias doenças psiquiátricas, o estresse crônico moderado e imprevisível tem sido amplamente utilizado em animais para simular desordens semelhantes à depressão clínica, e é considerado um modelo válido. Neste teste os animais são expostos sequencialmente a uma variedade de estressores imprevisíveis suaves durante vários dias, e após essa exposição muitas alterações preditivas de comportamento depressivo em diferentes modelos animais podem se manifestar (LIU *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015).

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* nos fornece a oportunidade de estudar fenômenos neurobiológicos relevantes. É descrito que 75% dos genes de doenças humanas conhecidas têm uma correspondência reconhecível no genoma da mosca da fruta (JENNINGS *et al.*, 2011). Além disso, conserva neurotransmissores como dopamina e serotonina, que são

regulados por transportadores homólogos aos transportadores dos mamíferos (DENNO *et al.*, 2015), consolidando sua legitimidade como um organismo modelo para o estudo de doenças humanas, incluindo os distúrbios neuropsiquiátricos complexos como esquizofrenia, desordem bipolar, autismo, ansiedade bem como comportamento depressivo semelhante ao dos humanos com sintomas desenvolvidos sob estresse (JIANG *et al.*, 2017; O’KANE, 2011; RIES *et al.*, 2017). A *Drosophila* é, portanto um modelo promissor, para auxiliar na compreensão da neurobiologia dos comportamentos depressivos podendo levar à identificação de novos alvos terapêuticos, e ainda atende o princípio dos 3 R's de “redução, substituição e refinamento” ao uso de animais.

Tendo em vista que a incapacidade de tolerar efeitos adversos pelos pacientes deprimidos é um dos motivos para interrupção do tratamento com antidepressivos convencionais, faz-se necessário, estudos que investiguem as propriedades funcionais de compostos ricos em bioativos naturais que sejam de baixo custo e que apresentem poucos efeitos adversos como o γ -orizanol. O γ -orizanol é um composto extraído do óleo do farelo do arroz, é uma mistura de ésteres de ácido ferúlico com fitoesteróis e álcoois triterpênicos possui uma variedade de propriedades biológicas, incluindo efeito neuroprotetor (ARAÚJO *et al.*, 2015) e atividade antioxidante (XU *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002). Na literatura, há evidências do efeito antidepressivo do γ -orizanol, relacionado a um dos seus constituintes, o ácido ferúlico (ZHANG *et al.*, 2013; ZENI *et al.*, 2012). Tomados em conjunto os dados acima, o objetivo geral de nosso trabalho é investigar se o estresse crônico moderado e imprevisível induz comportamento tipo depressivo na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e avaliar a ação terapêutica de γ -orizanol neste modelo.

Nossa hipótese é que γ -orizanol sendo um composto natural obtido do óleo do farelo do arroz, seja efetivo e com poucos efeitos adversos, como outros compostos à base de plantas que são utilizados empiricamente na medicina popular, nos fornecendo assim feitos satisfatórios na terapia com antidepressivos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Depressão: Histórico, Definição, Epidemiologia e Impacto Social

No mundo ocidental, quem primeiro notou características depressivas e as sistematizou em torno de um nome foi Hipócrates, estabelecendo uma relação entre as características físicas e o comportamento mental, no século 4 a.C. Ele cunhou o nome melancolia (*Melankholia*) a partir de duas outras palavras: *mêlas*= negro e *kholê*= bile. Melancolia significa, portanto “bile negra”, segundo ele, um dos quatro humores que constituem o corpo humano, os outros seriam a bile amarela, o sangue e a fleuma. A cada um dos humores ele relacionou um sintoma psicológico, em seu estado normal, o homem teria os quatro bem equilibrados. O problema se daria em casos de excesso de um ou de outro, por exemplo, a bile amarelada demais causaria um temperamento raivoso, da mesma maneira que a bile negra em abundância provocaria a melancolia (MENDES *et al.*, 2013; MOURA, 2017).

O termo depressão é relativamente novo na história, tendo sido usado pela primeira vez em 1680, para designar um estado de desânimo ou perda de interesse. Em 1750, Samuel Johnson incorporou o termo ao dicionário. O desenvolvimento do conceito de depressão emergiu com o declínio das crenças mágicas e supersticiosas que fundamentavam o entendimento dos transtornos mentais, desse modo a história do conceito de depressão, tal como o concebemos na atualidade, tem seu início no século XVII (MONTEIRO, 2007; ROUSSEAU, 2000).

No início do século XX dois conceitos diferentes sobre a base e classificação da depressão estavam em discussão, o primeiro a formulação de depressão de Emil Kraepelin como doença, e o segundo a visão de Sigmund Freud considerando a depressão como uma manifestação de raiva e perda internalizadas comparando a depressão ao luto. Segundo ele, “ambos provocam uma depressão profundamente dolorosa, uma suspensão do interesse pelo mundo exterior, a perda da capacidade de amar e a inibição de toda a atividade”. A diferença seria que, enquanto o luto é a dor pela perda de alguém ou algo, o melancólico se ressentia da perda do “eu”, o que também traria uma diminuição da autoestima (BRIGITTA *et al.*, 2002; LEITE, 2014).

Foi o mérito de Sir Martin Roth no início dos anos 1950, que contribuiu para o entendimento de depressão: classificou as manifestações clínicas (de psicótico leve a grave) em uma forma categórica, separando-os em grupos distintos de subtipos “endógenos” e “reativos” da depressão. Esse conceito foi usado por décadas em pesquisas na psiquiatria biológica para identificar etiologicamente diferentes subtipos do transtorno (BRIGITTA *et al.*, 2002).

Atualmente para um diagnóstico apropriado é utilizado a classificação de acordo com critérios do *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, quinta edição (DSM-V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), onde se identifica a essência do transtorno depressivo maior sendo um curso clínico caracterizado por um ou mais episódios depressivos sem história de mania, por episódios mistos ou hipomaníacos, cinco dos nove sintomas seguintes do DSM-V devem ser presentes continuamente por um período mínimo de duas semanas: (i) humor deprimido; (ii) perda de interesse ou prazer; (iii) significativa alteração de peso ou apetite; (iv) insônia ou hipossomnia; (v) agitação ou retardo psicomotor; (vi) fadiga ou perda de energia; (vii) sentimentos de inutilidade; (viii) capacidade diminuída de pensar ou se concentrar ou indecisão; e (ix) ideação suicida (BRIGITTA *et al.*, 2002).

De acordo Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão se tornará em 2030 a principal causa de incapacidade em longo prazo (NABAVI *et al.*, 2017). Globalmente, mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de depressão, sendo reconhecida como uma das doenças mais onerosas da sociedade, uma pesquisa sobre saúde mental realizada em 17 países em 2008, constatou que 1 em cada 17 pessoas relataram pelo menos um episódio de depressão no ano anterior (JESULOLA *et al.*, 2018; KESSLER & USTUN, 2008; SU *et al.*, 2016).

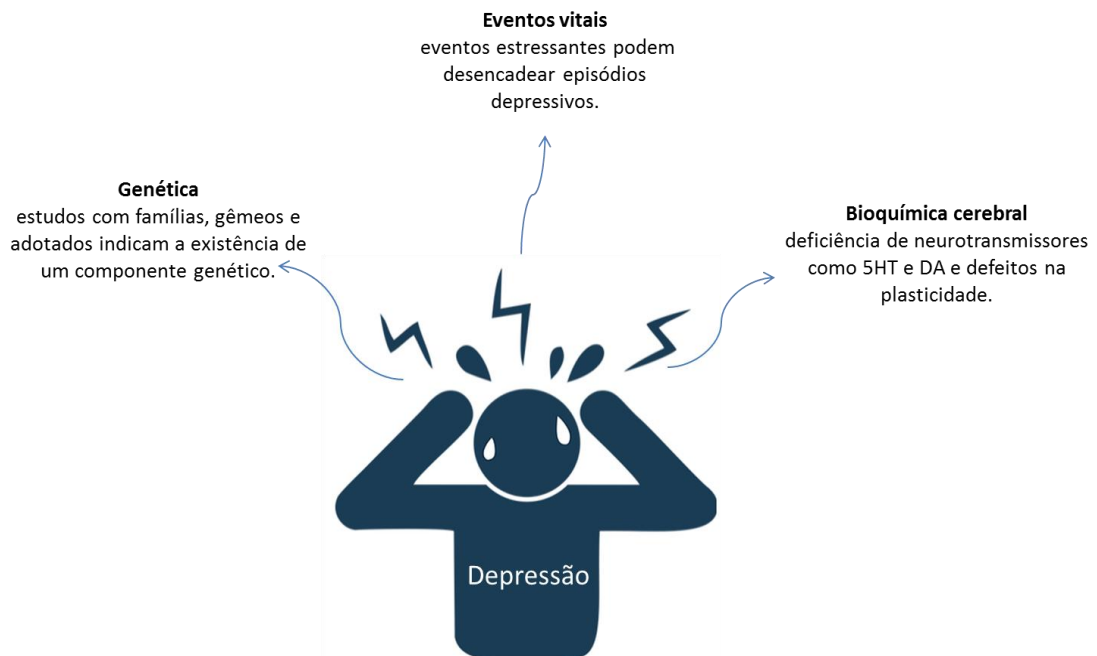
Segundo dados apontados em um relatório global sobre transtornos mentais, publicado pela OMS, o Brasil está em primeiro lugar no ranking latino-americano da depressão e em quinta posição no mundial, segundo as estimativas em 2015, cerca de 5.8% da população nacional sofria de depressão (OMS, 2017). Dependendo da gravidade da doença, ela afeta significativamente tanto a saúde quanto a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por esse distúrbio. Tais fatores impactam negativamente de tal forma que os indivíduos afetados são incapazes de efetivamente cumprir suas funções sociais e familiares, infelizmente, até 80% das pessoas deprimidas têm alguma forma de prejuízo no seu funcionamento diário e cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio a cada ano, sendo essa a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade entre 15 e 29 anos (JESULOLA *et al.*, 2018; PRATT & BRODY 2008).

Os custos subsequentes da depressão para sociedade são de vários bilhões de dólares por ano, e na sua maioria relacionados à implementação de ações preventivas e programas reabilitadores (FAKHOURY *et al.*, 2016). Ainda, é relatado que até 70% das pessoas que sofrem de depressão mostram uma melhora substancial, medida por escalas de avaliação comumente usadas, como a Escala de Avaliação de Hamilton para Depressão (HRSD), mas requerem contínuas intervenções psicossociais e farmacológicas adicionais para alcançar a remissão completa da doença (AL-HARBI, 2012).

2.2. Fisiopatologia da Depressão

Existem muitos dados científicos que sugerem fatores (Figura 1) multifatoriais e complexos envolvidos na fisiopatologia da depressão (DUNLOP & NEMEROFF, 2007; LEONARD *et al.*, 2007). Entre esses fatores podemos citar alterações na bioquímica cerebral em que a hipótese do neurotransmissor monoamínico serotonina estar envolvido com a fisiopatologia da depressão é a mais influente e estudada atualmente na tentativa de desenvolver novas estratégias de tratamento desta patologia. Essa teoria se fundamenta na hipótese de que uma redução nos níveis de serotonina aumenta o risco do indivíduo ser afetado pela depressão (ALBERT & BENKELFAT, 2013). Desde a sua formulação, muitos estudos validaram a ligação entre o sistema serotoninérgico e a depressão, sendo demonstrado que pacientes deprimidos exibem baixos níveis de serotonina em plaquetas sanguíneas, bem como níveis plasmáticos baixos de L-triptofano, um precursor de serotonina (HASLER, 2010, FAKHOURY *et al.*, 2016).

Figura 1- Fatores multifatoriais desencadeadores da patologia depressiva. Serotonina (5HT); Dopamina (DA).



Fonte: Arquivo próprio (2020).

Além da serotonina uma depleção nos níveis do neurotransmissor monoamínico dopamina no sistema nervoso central, também está relacionado com comportamento semelhante à depressão (CHAUDHURY *et al.*, 2012; van BOXELAERE *et al.*, 2017). Estudos em animais, com indução de modelo depressivo por reserpina ou hipotireoidismo em camundongos apoiam a evidência de que uma redução dos níveis de serotonina e dopamina no tecido cerebral desempenha um papel importante na fisiopatologia da depressão (BAUMEISTER *et al.*, 2003; BORTOLOTTI *et al.*, 2018).

Com base na hipótese do envolvimento destes neurotransmissores monoamínicos na depressão, a elevação dos níveis de monoamina nas fendas sinápticas tem sido a principal estratégia para o tratamento de pacientes depressivos nos últimos 60 anos (XU *et al.*, 2017). A maioria dos estudos se concentra no sistema serotoninérgico por causa da eficácia dos fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina no tratamento de depressão (COWEN, 2008; KUPFER, 2005).

Evidências também apontam para a plasticidade sináptica e estrutural alterada em pacientes com depressão, foi proposto que esta doença resulte de uma incapacidade do cérebro para fazer respostas adaptativas adequadas aos estímulos ambientais como resultado da plasticidade sináptica e estrutural prejudicadas (DUMAN *et al.*, 2016; THOENEN, 2000; VOSE & STANTON 2017). As neurotrofinas são uma família de citocinas essenciais para a diferenciação, crescimento e sobrevivência de neurônios serotoninérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos do sistema nervoso central e de neurônios simpáticos e sensoriais do sistema nervoso periférico durante a vida adulta (AGUIAR & PINHO, 2007). Assim uma alteração patológica do sistema de fatores neurotróficos pode não só levar a defeitos na manutenção e regeneração neural e, portanto, anormalidades estruturais no cérebro, mas também reduzir a plasticidade neural e prejudicar a capacidade de adaptação do indivíduo para situações de crise (THOENEN, 2000). Uma das neurotrofinas mais conservadas entre os vertebrados é o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF do inglês- *Brain-derived neurotrophic factor*), e alterações em BDNF correlacionam-se com ao desenvolvimento da depressão, ansiedade, epilepsia, transtorno do déficit de atenção, autismo, esquizofrenia e outros distúrbios cognitivos e psiquiátricos (ARANCIO & CHAO, 2007; CHEN *et al.*, 2006; FILHO *et al.*, 2015; HASHIMOTO *et al.*, 2005).

Outro fator fundamental no estudo de distúrbios psiquiátricos inclui a via da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK do inglês *extracellular- regulated protein kinase*) que é integrante da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKS do inglês- *Mitogen Activated Protein Kinases*), uma família de proteínas serina/treonina quinases que estão implicadas na regulação de múltiplos eventos celulares incluindo diferenciação, proliferação, morte celular,

adaptação e respostas imunes (JOHNSON & LAPADAT, 2002). A família MAPK inclui: c-Jun N-terminal quinase 1/2 (JNK1/2); proteína quinase de 38 kDa (p38MAPK), além de proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) sendo que a função e regulação destas proteínas são evolutivamente bem conservadas (JOHNSON & LAPADAT, 2002). Em especial a ERK 1/2 tem sido implicada em processos como a plasticidade neuronal e a resiliência em distúrbios psiquiátricos (PAULA et al., 2012; YUAN et al., 2010). Além das possíveis alterações em BDNF e na atividade das MAPK contribuírem para o desenvolvimento de depressão, o estresse oxidativo tem sido relato por contribuir ativamente com a progressão dessa doença. Sob condições normais, os efeitos deletérios da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo aeróbico são neutralizados pelo sistema antioxidante e, dessa maneira, o cérebro regula efetivamente seu consumo de oxigênio e capacidade de geração redox. Quando a produção de EROs excede a capacidade de eliminação do sistema de resposta antioxidante, ocorre extensa oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, causando dano oxidativo, degeneração celular e até declínio funcional (SALIM, 2016). As EROs produzidas durante o estresse oxidativo são subprodutos do metabolismo normal das mitocôndrias, formado em parte durante o processo de transferência de elétrons que ocorre ao longo da cadeia de transporte de elétrons, a fim de produzir energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP) durante a fosforilação oxidativa (OXPHOS) (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Além da produção de ATP, as mitocôndrias exercem funções essenciais para a célula, como o metabolismo energético, produção e eliminação de espécies reativas, sobrevivência e morte celular. Assim, as disfunções mitocondriais, como a diminuição capacidade oxidativa e defesa antioxidante, redução de OXPHOS e diminuição da produção de ATP estão relacionados a distúrbios metabólicos. Sabe-se que o cérebro, devido à sua alta taxa metabólica, é um dos órgãos mais vulneráveis aos efeitos nocivos das espécies reativas e este fato pode contribuir para a redução da proliferação celular, prejudicar a capacidade de remodelação, alterar a plasticidade estrutural e interromper a neurogênese, perturbando coletivamente a neurotransmissão sináptica normal contribuindo então para o envolvimento destas em várias doenças neuropsiquiátricas como a depressão (BHATTI *et al.*, 2017; BAJPAI *et al.*, 2014; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009; SALIM, 2016).

Em um estudo realizado por PALTA *et al.*, (2014) utilizou-se uma meta-análise conjunta de 23 estudos, e a depressão foi associada ao aumento do estresse oxidativo e menor estado antioxidante celular. Os achados dessa análise sugerem que o estresse oxidativo pode ser um fator mediador nas associações entre depressão e resultados negativos nos parâmetros relacionados a saúde, uma vez que várias linhas de evidências indicam o envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo na fisiopatologia da depressão.

Existem ainda alguns fatores genéticos que contribuem para o desenvolvimento da depressão, dados apontam para um grande número de investigações em estudos com famílias, gêmeos indicam a existência de um componente genético para depressão tanto unipolar como bipolar, estima-se que este componente genético represente cerca de 40% da susceptibilidade para desenvolver depressão unipolar e 70% para o transtorno bipolar (LAFER & FILHO, 1999; SHADRINA *et al.*, 2018). Mas ainda se perdurava a longa seca, sem muito progresso na compreensão da genética desta patologia que terminara recentemente uma vez que o consórcio CONVERGE (China, Oxford e VCU para Pesquisa Experimental em Epidemiologia Genética) concentrou-se em um subtipo homogêneo de depressão severa e recorrente, cuidadosamente fenotipada, e identificou dois *locos* genéticos (gene SIRT1 e gene LHPP) que excedem os níveis de significância em todo o genoma (CAI *et al.*, 2015; ORMEL *et al.*, 2019).

2.3. Estresse e a Depressão

Todos os sistemas fisiológicos vitais do corpo são inerentemente programados, através de um rigoroso refinamento alcançado durante a evolução, para preservar um estado estacionário predefinido, ou seja, homeostase ou *eustasis*, que é essencial para a vida e o bem-estar, este equilíbrio ideal é constantemente desafiado por forças adversas, as quais são intrínsecas ou extrínsecas, reais ou mesmo não percebidas, e são descritas como estressores (TSIGOS *et al.*, 2016).

A palavra 'estresse' é usada na física para se referir à interação entre uma força e a resistência para combater essa força, e foi Hans Selye quem primeiro incorporou esse termo ao léxico médico para descrever a “*resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda*”. Se voltarmos ao conceito original da Teoria Geral da Adaptação de Hans Selye, as três fases do estresse são reação de alarme, fase de resistência e, a terceira, fisiologicamente mais prejudicial, a exaustão (TAN & YIP, 2018; SELYE 1976; ENDRŐCZI, 1991). Embora todo o sistema nervoso central esteja direta ou indiretamente envolvido na preservação da homeostase global do corpo, áreas específicas do cérebro têm papéis críticos e distintos na orquestração da resposta ao estresse. Assim, os componentes centrais do sistema de estresse estão localizados no hipotálamo e no tronco encefálico e incluem os neurônios parvocelulares de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e os de arginina-vasopressina dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, e neurônios CRH dos núcleos paragigantocelular e parabranquial da medula oblonga, bem como o locus coeruleus e outros grupos celulares sintetizadores de norepinefrina, catecolaminérgicos da medula e ponte

(sistema nervoso central simpático), os membros periféricos do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, juntamente com o sistema simpático/adrenomedular eferente, constituem os componentes periféricos desse sistema interligado (CHROUSOS, 2009; TSIGOS *et al.*, 2000).

A resposta adaptativa de cada indivíduo para o estresse é determinada por uma multiplicidade de fatores genéticos, ambientais e de desenvolvimento, mudanças na capacidade de responder eficazmente a estressores (por exemplo: inadequados, excessivos e/ou reações prolongadas) podem levar à doença (TSIGOS *et al.*, 2000). Além disso, estressores altamente potentes e/ou crônicos como os eventos estressantes da vida podem ter efeitos prejudiciais sobre uma variedade de funções fisiológicas, incluindo crescimento, reprodução, metabolismo e desencadear ou induzir episódios depressivos (FUCHS & FLÜGGE, 2006).

Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, interrupções no funcionamento do sistema de estresse principalmente a nível pós-natal, podem interagir com vulnerabilidades cognitivas e psicossociais para aumentar a suscetibilidade ao início tardio da depressão (JOCA *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2001).

2.4. Protocolos Experimentais de Estresse no Estudo da Depressão

Modelos animais de depressão são avaliados por sua validade etiológica, para serem válidos, os comportamentos semelhantes à depressão precisam ser causados pelas mesmas etiologias que desencadeiam a depressão humana. Este é um requisito desafiador, dada à ausência de etiologias definitivas para a depressão humana (ABELAIRA *et al.*, 2013; KRISHNAN *et al.*, 2008).

Segundo McKINNEY, (1984) modelos animais são “preparações experimentais desenvolvidas em uma espécie para estudar fenômenos que ocorrem em outra espécie”. No caso de modelos animais de psicopatologia humana, procura-se desenvolver síndromes em animais que se assemelhem a dos humanos em certos aspectos, a fim de estudar aspectos selecionados da psicopatologia humana. Posteriormente, outros autores como WILLNER, (1991) e BOURIN, (2015) propuseram critérios adicionais, que modelos animais precisam contemplar para serem considerados, modelos de pesquisa adequados sendo necessário mostrar uma validade clara, validade preditiva e validade de construção.

Os primeiros modelos (protocolos experimentais) de estados depressivos em animais foram baseados em experimentos de separação materna de primatas jovens, e em roedores, onde era feita a manipulação do ambiente inicial da vida, como o estresse pré-natal, e com exposição ao predador, onde os filhotes são expostos à visão e ao cheiro de predador natural, este modelo produz mudanças

bio-comportamentais que persistem até a idade adulta, representando um fator de risco para a psicopatologia (ALKADHI, 2013; JESBERGER & RICHARDSON, 1985; SANCHEZ *et al.*, 2001; SHU *et al.*, 2015).

Outra abordagem comportamental para simular um estado depressivo humano em animais é o modelo de desamparo aprendido, que significa uma condição de perda de controle criado submetendo animais ou humanos a uma inevitável situação de vida emocionalmente negativa (como choques, privação relativa, conflito de papéis, etc). Ser incapaz de evitar ou fugir (fugir ou lutar) de uma situação aversiva por um longo período de tempo produz uma sensação de desamparo que generaliza a situações subsequentes (MAIER & SELIGMAN, 2016; KOOP & RÉTHELYI, 2004).

Outro modelo animal de depressão seria os modelos de diátese (modelo de lesão, modelo genômico, modelos genéticos) descritos por WILLNER & MITCHELL (2002). Tais modelos resumem os paradigmas que envolvem uma predisposição geneticamente determinada para a doença depressiva. Citamos também os modelos de dominância social que são aqueles que usam estressores sociais retirando animal de um alojamento em grupo, como protocolo do residente-intruso (que envolve ataque dentro do território desconhecido por um dominante masculino) ou ruptura da hierarquia social, (introduzindo um novo animal a um grupo socialmente estável) (ALKADHI, 2013, FUCHS & FLÜGGE, 2006).

Adicionalmente outro modelo que simula a depressão clínica é o estresse agudo ou crônico baseado na exposição de animais (geralmente ratos ou camundongos) a estressores incontrolláveis, sendo que esses procedimentos são considerados mais naturalistas e típicos da espécie do que os procedimentos de estímulo nocivos artificiais (ALKADHI, 2013, FUCHS & FLÜGGE, 2006). De todos os modelos disponíveis, o protocolo de estresse crônico moderado possui o maior número de atributos de depressão clínica, incluindo condições indutoras putativas e uma ampla variedade de mudanças comportamentais de longa duração (CASTAGNÉ *et al.*, 2009).

Como forma de “mensurar” as respostas relacionadas a um comportamento tipo depressivo de um animal submetido ao estresse leve ou crônico, são realizados testes comportamentais como o teste de natação forçada (FITZGERALD *et al.*, 2019; MONTEGGIA *et al.*, 2007), que quantifica o tempo de imobilidade em um banho de água (proposto para ser análogo ao "desespero comportamental" observado na depressão). Referimos também o teste de interação social (diminuições destas podem modelar condições relacionadas à depressão) (ENDO *et al.*, 2018, KRISHNAN *et al.*, 2007), além disso certas mudanças comportamentais provocadas pelo estresse ou pela manipulação genética se assemelham superficialmente a sintomas depressivos, por exemplo, o consumo diminuído de sacarose de um animal após estresse crônico é considerado modelo de anedonia (perda da capacidade de sentir prazer), (KRISHNAN & NESTLER, 2008,

SCHEGGI *et al.*, 2018), além disso o comportamento agressivo também parece estar significativamente associado a transtornos depressivos (VERDOLINI *et al.*, 2017), ou a auto-estimulação intracraniana, (medida operante do esforço que um animal gasta para estimular eletricamente circuitos de recompensa cerebral) (BERTON & NESTLER, 2006). Vários destes testes ou intervenções apresentam validade farmacológica, isto é, são sensíveis a compostos antidepressivos conhecidos administrados agudamente, o que permite o rastreamento rápido de agentes terapêuticos potencialmente novos (KRISHNAN & NESTLER, 2008).

2.5. Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

O modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS do inglês- *Chronic unpredictable mild stress*) foi proposto pela primeira vez por KATZ (1982). Está bem estabelecido que o estresse crônico atua como um fator predisponente e precipitante no início da depressão em humanos (OSSOWSKA *et al.*, 2004). Portanto entre os modelos animais, o modelo de CUMS é o mais utilizado e considerado um dos modelos mais perfeitos de depressão e transtornos relacionados ao estresse (BIALA *et al.*, 2018; van BOXELAERE *et al.*, 2017) sendo considerado um modelo válido, confiável e sensível (ISINGRINI *et al.*, 2010). Seu objetivo é imitar a exposição imprevisível ao estresse intermitente presente na natureza, a experiência do estresse sofrida pelos humanos (BIALA *et al.*, 2018) evocando deficiências comportamentais e fisiológicas que se assemelham a depressão clínica, dentre elas a diminuição da capacidade de resposta para recompensar estímulos (BELUJON *et al.*, 2017, OSSOWSKA *et al.*, 2004).

Neste modelo originalmente projetado para roedores há exposição em longo prazo dos animais experimentais a vários estressores imprevisíveis suaves como (restrição, inversão do ciclo claro-escuro, privação de água ou comida, ninho molhado) que estão relacionados com mudanças comportamentais significativas. Todas as alterações comportamentais induzidas em animais neste modelo podem ser revertidas pela administração de antidepressivos (BIALA *et al.*, 2018). Como já citamos o CUMS foi originalmente projetado para roedores desde início dos anos 80, mas, não há na literatura relatos deste modelo induzido na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, sendo que essa apresenta várias vantagens práticas e técnicas como modelo experimental.

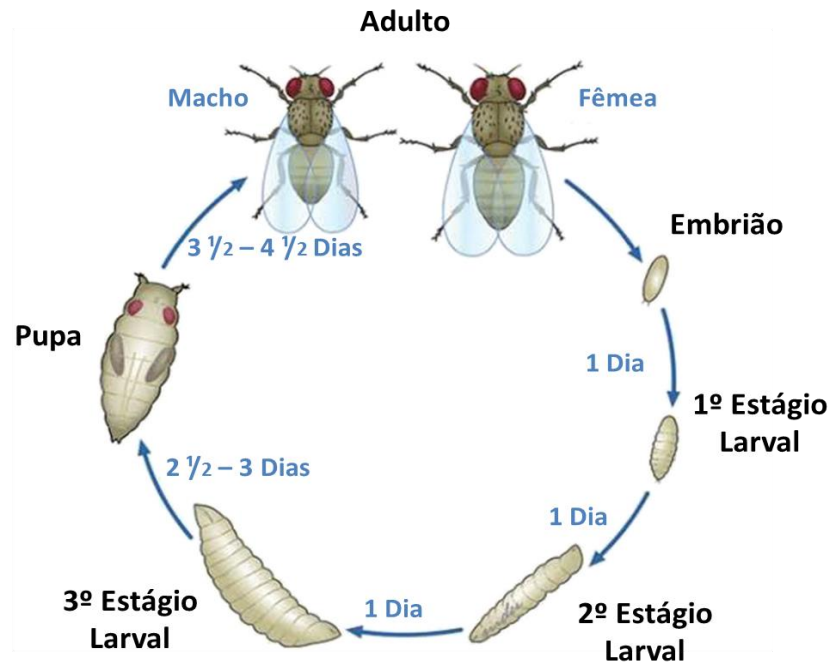
2.6. *Drosophila melanogaster* modelo animal para estudo da Depressão

O artrópode *Drosophila melanogaster*, pertencente à família *Drosophilidae*, é um inseto dipterano (isto é, um membro de uma ordem de insetos que contém as moscas de duas asas ou as chamadas moscas verdadeiras) (ABOLAJI *et al.*, 2013).

Drosophila melanogaster é uma espécie comensal humana que habita todos os continentes da Terra, exceto a Antártida. Cerca de 15.000 anos atrás, *Drosophila* migrou de sua faixa ancestral no sul da África Subsaariana para a Europa e posteriormente colonizou grande parte do resto do mundo (HALES *et al.*, 2015). O primeiro uso documentado de *Drosophila* no laboratório foi feito pelo grupo de William Castle em Harvard em 1901, embora o “pai” da pesquisa sobre a *Drosophila* seja, sem dúvida, Thomas Hunt Morgan. Morgan refinou bastante a teoria da hereditariedade proposta por Gregor Mendel, usando *Drosophila* para definir genes e estabelecer que eles fossem encontrados dentro dos cromossomos (muito antes de se estabelecer que o ácido desoxirribonucleico seja o material genético) (JENNINGS *et al.*, 2011).

Comparações entre a *Drosophila* totalmente sequenciada e os genomas humanos revelaram que aproximadamente 75% dos genes de doenças humanas conhecidas têm uma correspondência reconhecível no genoma da mosca da fruta, consolidando sua legitimidade como um organismo modelo para a pesquisa médica para a compreensão das bases neurobiológicas de uma série de comportamentos complexos (JENNINGS *et al.*, 2011). A mosca tem ciclo de vida curto (Figura 2). Quando adulta é um organismo muito sofisticado e complexo, não diferindo dos organismos superiores, possuindo organização corporal semelhante e estruturas como sistema circulatório, nervoso, digestivo, muscular, reprodutor, e excretor que realizam funções equivalentes do cérebro, coração, pulmão, rim, intestino e trato reprodutivo dos mamíferos (Figura 3 e 4) (PANDEY & NICHOLS, 2011).

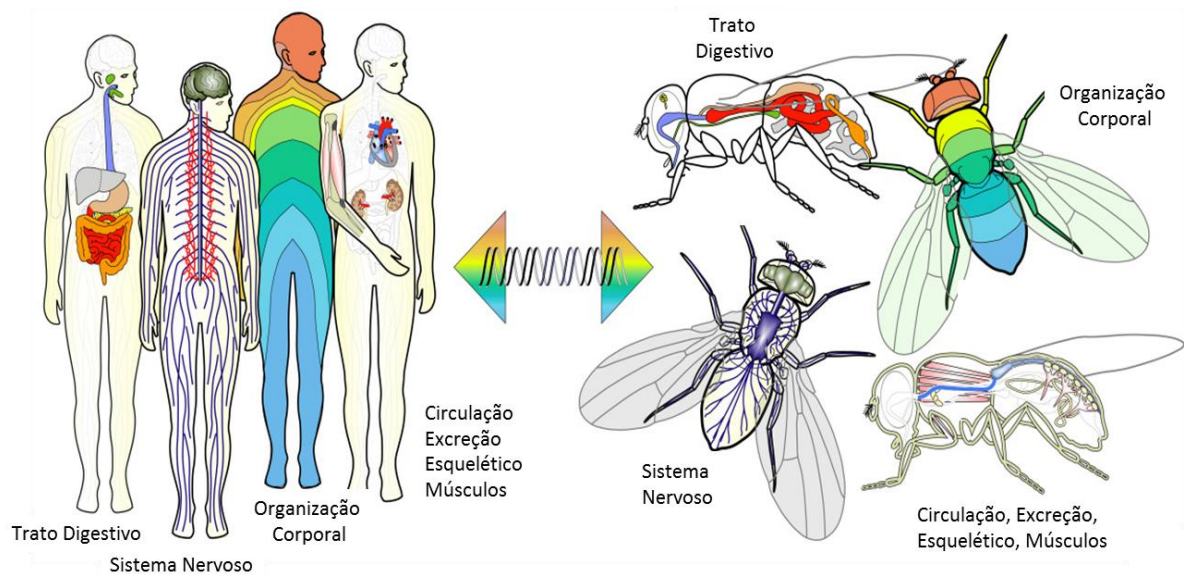
Figura 2. Ciclo de vida da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de ONG *et al.*, (2015).

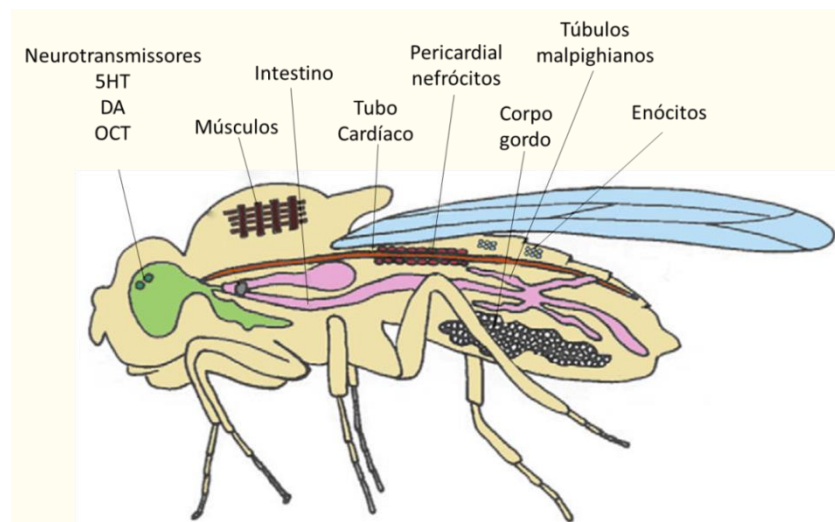
Durante décadas, a *Drosophila* tem sido usada como um organismo modelo para estudar doenças humanas como a doença de Parkinson (FEANY & BENDER, 2000), síndromes hereditárias/genéticas de neoplasias como o câncer, bem como doenças endócrinas, metabólicas, estudos toxicológicos (MACEDO *et al.*, 2017; PAULA *et al.*, 2012; READ *et al.*, 2005), distúrbios como obesidade e diabetes (MUSSELMAN *et al.*, 2011), funções moleculares de vírus (SABIN *et al.*, 2010).

Figura 3. Correspondência existente entre os órgãos dos seres humanos e das moscas.



Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de MANCHESTER FLY FACILITY, (2019).

Figura 4. Esquema dos tecidos de *Drosophila melanogaster*. Esquema de (em cima) uma vista dorsal e (em baixo) uma vista lateral de uma *Drosophila* adulta, mostrando as células, tecidos e órgãos envolvidos no metabolismo.

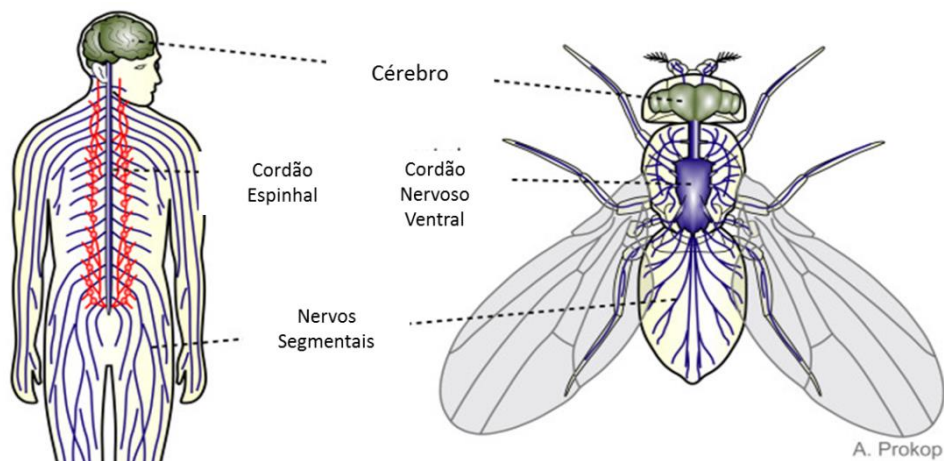


Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de HIRABAYASHI, (2016).

2.7. Neurobiologia da *Drosophila melanogaster*

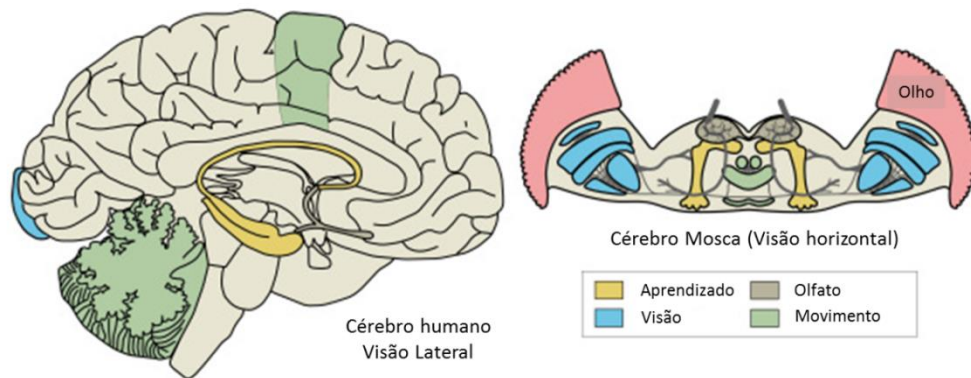
Drosophila melanogaster tem uma rede neuronal simples, seu sistema nervoso central contém mais de 100.000 neurônios na fase adulta, e estão organizados no cordão nervoso ventral e na região do protocerebro onde as informações são processadas para fornecer uma saída motora, (Figura 5). Estas medeiam comportamentos complexos, incluindo ritmos circadianos, sono, aprendizado e memória, olfato, visão, namoro, alimentação, agressão, e navegação de voo (Figura 6) (PANDEY & NICHOLS, 2011; SHIN *et al.*, 2018).

Figura 5. Organização do sistema nervoso (medula ventral/espinal no tronco e nervos segmentares) de *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de MANCHESTER FLY FACILITY, (2019).

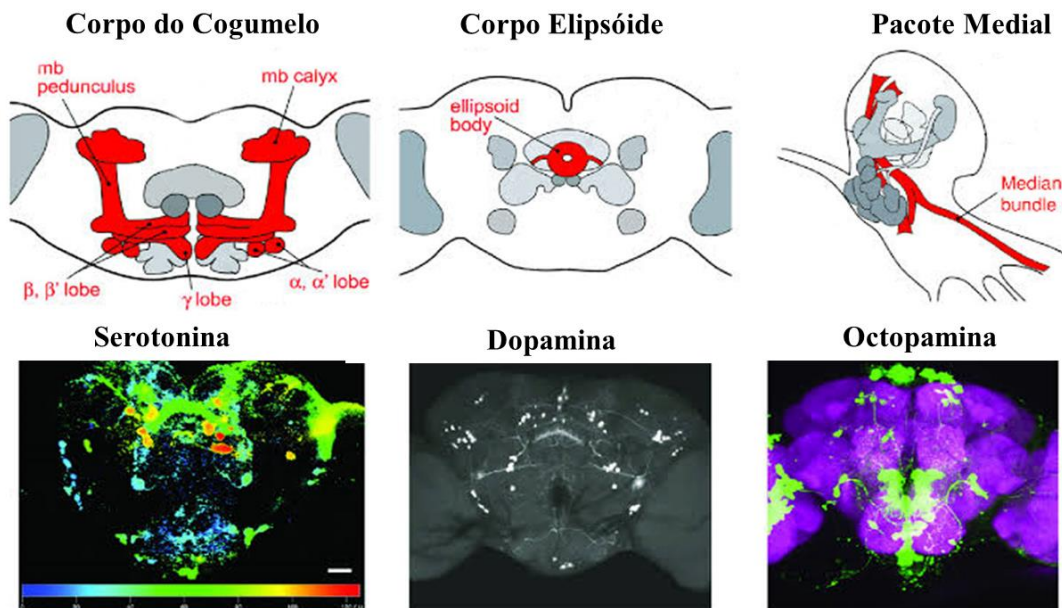
Figura 6. Estrutura cerebral organizada em centros funcionais, codificados por cores para comparativo entre o cérebro humano e da *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de MANCHESTER FLY FACILITY, (2019).

Como os sistemas de mamíferos, o sistema nervoso central de *Drosophila* utiliza neurotransmissores (Figura 7), que variam por região e esses tem semelhantes formas de armazenamento, lançamento e recaptação (SHIN *et al.*, 2018). A imunohistoquímica detectou cerca de 282 neurônios dopaminérgicos no cérebro adulto, localizados em 18 aglomerados dispersos e 10 aglomerados de neurônios de serotonina existentes no corpo do cogumelo de *Drosophila* (O' KANE, 2011; RIES *et al.*, 2017; SHIN *et al.*, 2018). A octopamina está presente em concentrações relativamente altas nos tecidos neuronais e não neuronais (hemolinfa) da *Drosophila* e é semelhante à epinefrina e noroepinefrina dos mamíferos tendo em torno de 150 neurônios no cérebro da mosca adulta regulando comportamentos de luta e fuga em animais sob estresse agudo (BUCKEMÜLLER *et al.*, 2017; FAROOQUI, 2012). Tanto em mamíferos quanto em invertebrados, a sinalização através de aminas biogênicas medeiam a resposta inicial ao estresse e a capacidade de aprender sobre os estressores que desencadeiam a resposta, modulando potencialmente as reações comportamentais e fisiológicas após exposição a esses estressores (EVEN *et al.*, 2012).

Figura 7. Imagem representativa das estruturas neuroquímicas de *Drosophila melanogaster*.



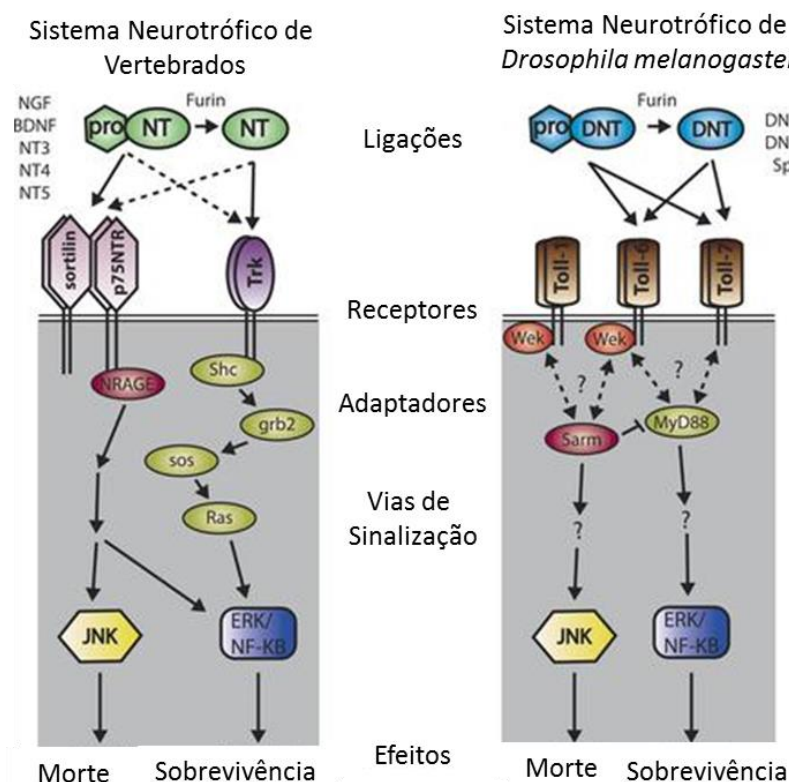
Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de OSTROWSKI & ZARS, (2014).

Assim como para a octopamina, a *Drosophila* possui o neuropeptídeo F (NPF) que mostra estrutura e função conservada com receptores homólogos ao neuropeptídeo Y (NPY) de mamíferos, responsável por ajudar a neutralizar as respostas comportamentais de estresse em humanos. Recentemente, foi demonstrado que NPF inibe as respostas a substâncias nocivas de estímulos externos, pelo menos em parte, regulando a excitação neuronal (EATON *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2010).

No sistema nervoso, a plasticidade do número de células está ligada à formação de circuitos neurais, ajustando o número neuronal aos requisitos funcionais (FOLDI *et al.*, 2017). Nos mamíferos, a família de proteínas da neurotrofinas (NTs) tem como membro como já citamos o BDNF, que também inclui o fator de crescimento nervoso (NGF), neurotrofina 3 (NT3) e neurotrofina 4 (NT4) (KOWIANSKI *et al.*, 2007). Um corpo de evidências em constante crescimento indica envolvimento do BDNF em uma ampla gama de processos neurofisiológicos. O principal ligante para o BDNF são os receptores de membrana celular tropomiosina quinase (Trk), em especial o TrkB, a ligação do receptor de BDNF no TrkB desencadeia a ativação de moléculas de sinalização como resultando no aumento da proliferação celular, resistência a apoptose, entre outros que contribuem com a plasticidade neuronal (MORAES *et al.*, 2019).

Existem evidências abundantes de que a plasticidade do número de células ocorre em *Drosophila melanogaster* assim como nos mamíferos, através dos chamados *Drosophila* NTs (DNTs), Spätzle (spz), *Drosophila neurotrofina 1* (DNT1) e *Drosophila neurotrofina 2* (DNT2) estes compartilham com as NTs de mamíferos suas estruturas e características conservadas e são necessárias para a sobrevivência dos neurônios motores e o crescimento dos axônios (Zhu *et al.*, 2008). Spz se assemelha ao NGF estrutural e bioquimicamente e, a ligação do seu receptor Toll-1 se assemelha à do NGF ao p75. DNT1 (também conhecido como spz2) foi descoberto por ter homologia com o BDNF. O DNT1, DNT2 e spz promovem a sobrevivência neuronal e são necessários para conectividade e sinaptogênese (FOLDI *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2008). É importante ressaltar que não há homólogos do receptor Trk em *Drosophila*. Um estudo de acompanhamento de MCILROY *et al.* (2013) mostra que, em vez de receptores Trk, DNT1 e 2 exibem interações físicas e genéticas entre os Toll-6 e -7 para promover a sobrevivência celular. Spz, DNT1 e DNT2 são ligantes para Toll-1,-7 e -6, (Figura 8) respectivamente, que funcionam como receptores de NT e promovem sobrevivência neuronal, conectividade de circuitos e plasticidade sináptica estrutural nas moscas (KEELER & DEPPMANN, 2017).

Figura 8. Esquema comparando a sinalização do sistema neurotrófico de vertebrados e *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Arquivo próprio (2020) adaptado de KEELER & DEPPMANN, (2017).

Com as bases citadas acima, este inseto tem forte validade para ser utilizado em estudos com modelos de distúrbios neuropsiquiátricos complexos, como autismo, esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Além disso, evidências demonstraram que *Drosophila* e os humanos têm comportamentos depressivos semelhantes com sintomas desenvolvidos sob estresse (O' KANE, 2011).

Em seu estudo JIANG *et al.* (2017) forneceram a *Drosophila melanogaster* uma dieta contendo levodopa ou clorpromazina e observaram se esta poderia induzir fenótipos semelhantes à depressão, como foi evidenciado por biomarcadores comportamentais e bioquímicos. Em outro trabalho RIES *et al.* (2017) usaram um protocolo de três dias de estresse vibratório para *Drosophila melanogaster*, reduzindo assim sua atividade comportamental voluntária, com isso houve uma redução na liberação de serotonina que pode ser revertida usando antidepressivos 5- hidroxil-L-triptofano ou sacarose. Em sua pesquisa, NECKAMEYER & NIETO, (2015) expuseram moscas fêmeas e machos imaturos e maduros a quatro estressores diferentes que representam populações distintas do ponto de vista comportamental, e relataram que os substratos neurais que mediam a percepção e a resposta ao estresse são diferencialmente expressos dependendo do estado hormonal do cérebro. Portanto, o modelo invertebrado *Drosophila melanogaster* têm se mostrado promissor nos estudos que predizem o comportamento depressivo.

2.8. Testes comportamentais preditivos de comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*

A capacidade de conectar a atividade neuronal ao comportamento requer um organismo modelo que se desenvolva rapidamente, que seja geneticamente flexível e tenha uma rede neuronal simples, assim como a *Drosophila*. Portanto, como supracitamos, vários testes comportamentais são encontrados na literatura para medir as respostas relacionadas à depressão, todavia em sua maioria para modelos de roedores. Assim sendo, realizamos uma busca bibliográfica com o intuito de encontrar alguns testes comportamentais adequados e de fácil executabilidade para que fosse possível mensurar respostas válidas relacionadas a um comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster* (Figura 9).

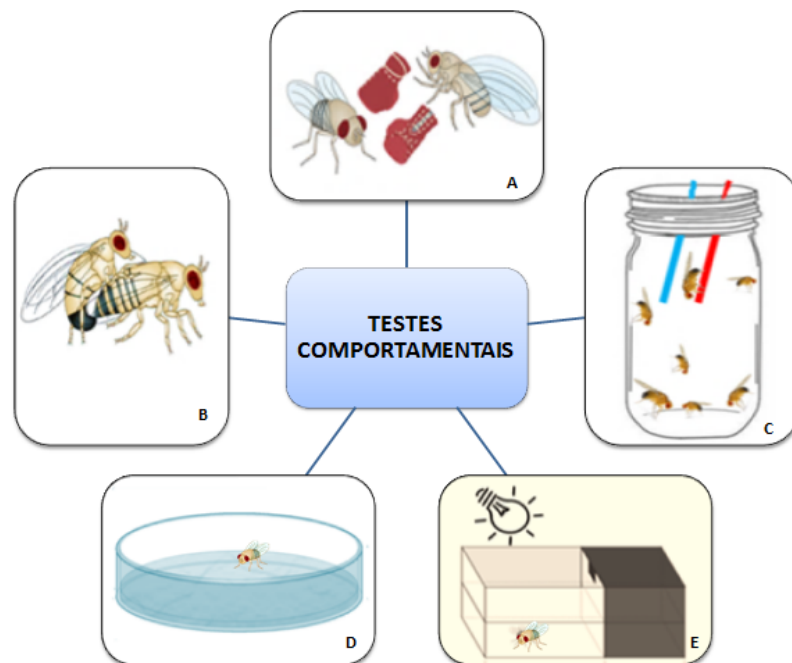
Podemos citar primeiramente o teste de nado forçado, indicador de resignação que tem como finalidade detectar o comportamento de “desespero comportamental” similarmente ao comportamento desempenhado por roedores em estudos com modelos tipo depressivos, este teste foi padronizado para uso em moscas por NECKAMEYER & NIETO, (2015), e adaptado para a linhagem Harwich por ARAUJO *et al.* (2018). Em conjunto citamos o comportamento de

acasalamento e virilidade masculina descrito por BECNEL *et al.* (2011) que também é de grande valia uma vez que a disfunção sexual ou falta de libido é consistentemente maior em pacientes com depressão do que na população em geral.

Encontramos também na literatura o teste de agressividade proposto por EDWARD *et al.*, (2006) e RAMIN *et al.*, (2014) considerado adequado pois sabe-se que o comportamento agressivo também está associado à patologia depressiva, uma vez que indivíduos depressivos podem desempenhar atos de agressividade impulsiva. Outro teste seria o teste de preferência pela sacarose descrito por MASEK *et al.* (2014) que é a medida mais utilizada de anedonia, e prediz comportamento do tipo depressivo. Ademais consideramos também o teste de claro e escuro, onde adaptações foram feitas neste paradigma para uso na *Drosophila* por NECKAMEYER & NIETO, (2015) este é um dos testes mais usados para medir a ansiedade, acredita-se que a resposta inicial à tensão crônica é a ansiedade seguida pelo desenvolvimento do comportamento depressivo.

Tomados em conjunto estes testes sugerem a observação de sinais análogos que podem ser usados como variáveis dependentes (medidas de ponto final), permitindo a avaliação comportamental de *Drosophila* sobre o comportamento tipo depressivo.

Figura 9. Testes comportamentais para mensurar respostas válidas relacionadas a um comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*. Teste de Agressividade (Figura A); teste de acasalamento (Figura B); teste de preferência a sacarose (Figura C); teste de nado forçado (Figura D); teste claro/escuro (Figura E).



Fonte: Arquivo próprio (2020).

2.9. Terapias convencionais da Depressão

Desde 1950, consistentes evidências têm sido obtidas acerca da eficácia do tratamento farmacológico na depressão, os medicamentos antidepressivos têm reduzido a morbidade e melhorado o desfecho clínico da doença (CUNHA & GANDINI, 2009).

Dos fármacos antidepressivos utilizados podemos citar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), estes tem maior aceitação por médicos especialistas e são considerados a primeira linha de tratamento, mas são eficazes apenas para remissão em 30% dos pacientes (COWEN, 2008; KUPFER, 2005). Atuam aumentando o nível extracelular de serotonina, inibindo sua recaptação na célula pré-sináptica, levando a melhor neurotransmissão e melhor humor, sendo que dentre esses podemos citar o citalopram, clomipramina, fluoxetina e sertralina (FAKHOURY *et al.*, 2016).

A fluoxetina ou cloridrato de fluoxetina (3-(p-trifluorometilfenoxi)-N-metil-3-fenilpropilamina; FLX) foi descrita pela primeira vez em uma revista científica em 1974 como “serotonina seletiva”. Após as publicações iniciais, demorou mais de 16 anos para sua aprovação para o tratamento da depressão pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 29 de dezembro de 1987, a FLX foi um dos primeiros membros de uma nova classe de medicamentos antidepressivos (e o primeiro a ser introduzido nos Estados Unidos) (WONG *et al.*, 2005).

Podemos mencionar também outras classes de antidepressivos como: antidepressivos tricíclicos (TCAs) são potentes bloqueadores de recaptação de noradrenalina, mas são fracos bloqueadores da recaptação de serotonina. Apontamos também os inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) os quais inibem a desaminação oxidativa de noradrenalina, dopamina e serotonina, são irreversíveis e não seletivos (inibem MAO-A e MAO-B) (KUPFER, 2005; NABAVI *et al.*, 2017). Estudos recentes demonstraram evidências crescentes em relação aos efeitos colaterais graves associados o uso clínico de fármacos antidepressivos, incluindo arritmias, tonturas, tremor, deficiências cognitivas, retenção urinária e disfunção sexual (NABAVI *et al.*, 2017). Portanto, durante as últimas décadas, a pesquisa tem se concentrado em apurar e desenvolver alternativas às drogas convencionais com alta eficácia e baixos efeitos colaterais (NABAVI *et al.*, 2017).

Há um interesse emergente no consumo de alimentos que são naturalmente ricos em moléculas bioativas para tratar ou prevenir doenças, uma dieta diária rica em antioxidantes pode ter uma abordagem terapêutica promissora, uma vez que há evidências da ocorrência de distúrbios oxidativos na depressão, como demonstrado por estudos de marcadores oxidativos e aqueles que examinam os efeitos antioxidantes dos antidepressivos (FELICITY *et al.*, 2008), além disso, estudos apontam que o consumo adequado de frutas, verduras, legumes e cereais integrais trazem

benéficos em reduzir a prevalência de depressão na população (BISHWAJIT *et al.*, 2017, PAYNE *et al.*, 2012), bem como a avaliação da ingestão e interações entre monoaminas e macronutrientes tem sido frequentemente mostradas (MEHDI *et al.*, 2015; TSUJI *et al.*, 2012).

2.10. γ -orizanol: Aspectos gerais e Funções biológicas

Grãos são os alimentos básicos mais comuns consumidos em todo o mundo, levando em conta que o arroz (*Oryza sativa L.*) constitui o principal grão na dieta humana e, por alimentar mais da metade população do mundo, é muito importante considerar a importância de seus constituintes (MINATEL *et al.*, 2016). O Brasil ocupa lugar de destaque, sendo o maior produtor americano de arroz, na escala mundial, está entre os dez primeiros, apesar de representar tão somente 2% no cômputo do total (JAHN, 2004). No Rio Grande do Sul a colheita da safra de arroz 2018/2019 alcançou 837.518 hectares, ou 85,1% do total semeado de 984.081 hectares. A produção é de 6.440.019 toneladas, com produtividade média de 7.689 quilos por hectares. A Fronteira Oeste tem a maior produção com 2.082.950 toneladas, área colhida de 264.237 ha (87,7%) e produtividade de 7.883 kg/hectares (INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ, 2019).

O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe, nas camadas do farelo e germe, está concentrada a maior parte dos lipídeos do grão de arroz, durante o descascamento, se obtém o farelo do arroz que representa de 5,0 a 5,5% do grão inteiro (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2007).

Um importante produto do farelo do arroz é o óleo do farelo de arroz, este tem um teor insaponificável alto, e é um óleo vegetal não convencional, acredita-se ser muito saudável sendo consumido em vários países asiáticos, incluindo o Japão e a China, por ser um dos mais nutritivos óleos devido à sua composição favorável de ácidos graxos e sua estabilidade aumentada devido à presença de um antioxidante ausente em outros óleos, o γ -orizanol (JOSHI *et al.*, 2016; MEHDI *et al.*, 2015).

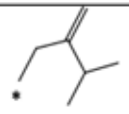
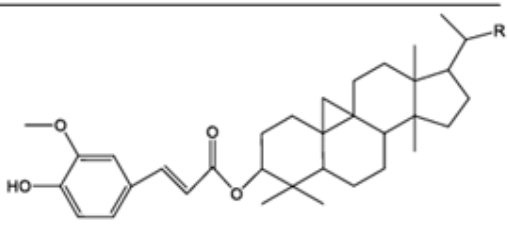
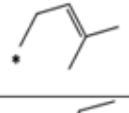
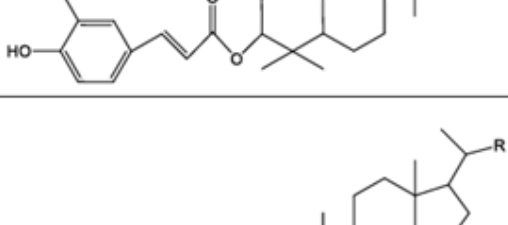
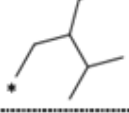
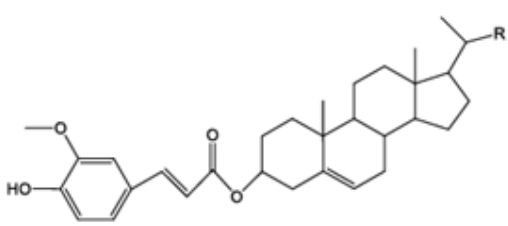
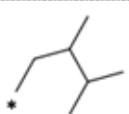
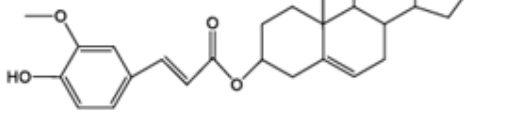
γ -orizanol é caracterizado como um pó branco ou levemente amarelo, cristalino, insípido, com pouco ou nenhum odor (CALHEIROS *et al.*, 2007), é o principal constituinte bioativo natural do óleo do farelo de arroz com seu conteúdo variando de 1,5 a 2,9%, (GHATAK & PANCHAL, 2012), como foi isolado do óleo obtido a partir do arroz e continha um grupo hidroxila em sua estrutura, foi convenientemente chamado de oryzanol, estudos posteriores revelaram que o oryzanol não é um composto simples e continha uma variedade de ésteres do ácido ferúlico chamados α -, β -, γ -oryzanol. Destes, o γ -orizanol tem sido o mais bem caracterizado (GRAF, 1992).

γ -orizanol é definido como uma mistura de ésteres do ácido ferúlico que consiste principalmente de cicloartenil ferulato, 24 metileno-cicloartanil ferulato, campesteril ferulato, β -sitosteril ferulato e cicloartanil ferulato, cujas estruturas estão representadas na (Figura 10), mas inclui também outros componentes menores como estigmastenil ferulato, estigmasteril ferulato, campestenil ferulato e sitostanil ferulato (EVERSHED *et al.*, 1988; XU & GODBER, 2001) identificados.

O ácido ferúlico (3- ácido metoxi-4-hidroxicinâmico) confere a função de antioxidante natural uma das principais propriedades de γ -orizanol, devido ao seu núcleo e uma cadeia fenólica lateral estendida, forma uma ressonância estabilizada radical fenoxi que responde por seu efeito contra os radicais livres (MARUF *et al.*, 2015). Possui uma variedade de propriedades biológicas, tais como efeitos de redução do colesterol (WILSON *et al.*, 2007), diminuição da agregação plaquetária (SEETHARAMAIAH *et al.*, 1990); aumento da massa muscular (ESLAMI *et al.*, 2014) prevenção de obesidade (SHIMABUKURO *et al.*, 2014) e diabetes (SON *et al.*, 2011), anti-inflamatório (AKIHISA *et al.*, 2000) propriedades anticâncer (YASUKAWA *et al.*, 1998) atividade neuroprotetora (ARAUJO *et al.*, 2015) e atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2002).

Embora a absorção de γ -orizanol tenha sido objeto de vários estudos, trabalhos recentes defendem a hipótese de que o γ -orizanol é hidrolisado em ácido ferúlico e liberado no intestino juntamente com álcoois triterpênicos ou esteróis como moléculas livres, o que poderia ser absorvido e ter efeitos sistêmicos (PEREZ-TERNERO *et al.*, 2017).

Figura 10. Estruturas químicas dos principais componentes de γ -orizanol.

Composto	R	Estrutura Molecular
24-Metilen-cicloartanilferulato		
Cicloartenilferulato		
β -Sitosterolferulato		
Campesterilferulato		

Fonte: LERMA-GARCÍA *et al.* (2009).

2.11. γ -orizanol e Depressão

O óleo do farelo do arroz rico em γ -orizanol é considerado uma fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), estes são componentes fundamentais dos lipídios de membrana no sistema nervoso central e também precursor de vários mediadores bioativos, uma redução no conteúdo de PUFAs tem sido implicado em comportamento de aprendizagem alterado, pois é capaz de reduzir a densidade das vesículas sinápticas no cérebro, particularmente no hipocampo que tem um grande papel na função de memória, portanto uma dieta rica em PUFAs pode ser benéfica para aprendizado e funções de memória e também no alívio dos efeitos do estresse (MEHDI *et al.*, 2015).

Desta forma, alguns estudos relatam um possível potencial antidepressivo de γ -orizanol, em particular do ácido ferúlico. Em sua pesquisa ZENI *et al.* (2012) forneceram as primeiras linhas de evidência de que o tratamento com ácido ferúlico teria um possível efeito antidepressivo quando realizaram a administração oral aguda de ácido ferúlico em camundongos, tomados em conjunto obtiveram como resultados que o ácido ferúlico exerceu efeito antidepressivo através da modulação do sistema serotoninérgico.

Em outro trabalho ZHANG *et al.* (2013), ao utilizar o modelo da díade dor-depressão induzida por reserpina estabeleceu uma relação dos efeitos do ácido ferúlico nesta díade. Os camundongos tratados com ácido ferúlico conseguiram proteger os danos causados pela dor-depressão, além disso, ácido ferúlico pode influenciar benéficamente no estresse oxidativo e nível de monoaminas como serotonina e noradrenalina.

Como descrito por CHEN *et al.* (2015) o tratamento com ácido ferúlico é capaz de elevar os níveis de serotonina e a norepinefrina, mas não os níveis de dopamina, no hipocampo e no córtex frontal de camundongos, essas alterações podem ser atribuídas à inibição das atividades da MAO-A nas mesmas regiões cerebrais.

Em outro estudo LI *et al.* (2015) examinaram o efeito sinérgico de baixas doses de ácido ferúlico combinada com a dose sublimiar de piperina, um intensificador de biodisponibilidade, em comportamentos semelhantes a depressão em camundongos, inferiram que a estratégia de combinação pode ser uma terapia alternativa no tratamento de transtornos psiquiátricos com alta eficácia e baixos efeitos adversos.

MEHDI *et al.* (2015) avaliaram o efeito da administração por 6 semanas de óleo do farelo do arroz em ratos submetidos ao estresse, e observaram uma redução de déficits comportamentais e neuroquímicos, descrevendo que estes efeitos benéficos do óleo do farelo do arroz podem ocorrer devido à presença de compostos antioxidantes presentes em sua composição e provocam efeitos

neuroprotetores, sugerindo ainda que o uso de óleo do farelo do arroz possa ser benéfico para função de memória e útil no combate aos eventos estressantes na vida cotidiana.

O efeito ansiolítico de γ -orizanol também foi investigado por AKTER *et al.* (2019) durante a exposição de camundongos a um protocolo de estresse por restrição, e o conjunto, seus resultados indicaram que γ -orizanol é um potencial candidato a medicamentos terapêuticos contra a ansiedade sob condições de estresse crônico.

Como se pode observar há poucos dados na literatura relacionados ao possível papel antidepressivo de γ -orizanol, acredita-se que este esteja envolvido com seu potencial antioxidante, uma vez que é bem descrito que mecanismos de estresse oxidativo têm sido implicados na patogênese dos transtornos psiquiátricos.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a depressão é um sério problema de saúde pública, é válida a utilização de modelos alternativos para auxiliar na compreensão das respostas comportamentais, mecanismos fisiológicos e genéticos de doenças humanas como a depressão. Assim sendo, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, é um organismo modelo bem estudado e altamente tratável, conserva muitas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas entre mamíferos embora existam muitas diferenças entre moscas e seres humanos. Este inseto continua na vanguarda da biologia, onde genes, técnicas genéticas e outras descobertas são frequentemente elucidadas tornando-a uma ferramenta extremamente valiosa no processo de descoberta como modelo para entender a biologia humana e os processos de doenças. Adicionalmente a *Drosophila* atende aos Princípios de Russell-Burch de “redução, substituição e refinamento” no uso de animais conhecido como Princípio dos 3R’s. Os modelos de estresse são comumente utilizados em modelos roedores e até o momento não existiam na literatura referências sobre modelo de CUMS em moscas. Aqui utilizamos com cronicidade estressores de vida diários como calor, fome, frio e alteração do sono e obtivemos resultados satisfatórios, onde a *Drosophila* foi capaz de satisfazer critérios para um modelo animal de comportamento tipo depressivo válido, como boa face e validade de construção para testar os efeitos de candidatos a antidepressivos.

Considerando os resultados promissores apontados acima para utilização de *Drosophila* como modelo animal para mimetizar um comportamento tipo depressivo e

sabendo-se que a incapacidade de tolerar efeitos adversos é o motivo para que 30% dos adultos tratados com antidepressivos comerciais interrompam o tratamento e, além disso, estes apresentam eficácia limitada, com altas taxas de responsividade parcial, atraso e até falta de resposta, fato este comprovado por vários ensaios clínicos, justifica-se avaliar a ação terapêutica de um candidato a antidepressivo, como o γ -orizanol. Nossa hipótese é que γ -orizanol sendo um composto natural obtido do óleo do farelo do arroz, já descrito na literatura por seu constituinte ter potencial efeito antidepressivo e ação ansiolítica em modelos de roedores, acreditamos portanto que γ -orizanol seja efetivo e com poucos efeitos adversos, como outros compostos à base de plantas que são utilizados empiricamente na medicina popular, nos fornecendo assim feitos satisfatórios na terapia com antidepressivos no modelo animal de *Drosophila melanogaster*, o que foi demonstrado em nosso trabalho.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar se CUMS induz comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster* e avaliar a ação terapêutica de γ -orizanol neste modelo.

Objetivos específicos

- Quantificar o percentual de sobrevivência das moscas expostas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Avaliar possíveis alterações motoras em *Drosophila melanogaster*, após submetê-las ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol;
- Analisar o comportamento de desespero comportamental das moscas, após submetê-las ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol;
- Avaliar o comportamento agressivo das moscas expostas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Verificar o comportamento de corte e acasalamento de *Drosophila melanogaster*, após submetê-las ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol;
- Avaliar a virilidade masculina/ou a capacidade de acasalamento, após submetê-los ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol;
- Avaliar o comportamento de anedonia das moscas expostas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;

- Avaliar o comportamento tipo ansiolítico, após submissão das moscas ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol.
- Determinar o peso corporal das moscas expostas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Determinar os níveis de monoaminas nas cabeças das moscas após submetê-las ao CUMS e ao tratamento com γ -orizanol;
- Analisar os marcadores de estresse oxidativo, estado antioxidante e viabilidade celular nas moscas expostas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol.

PARTE II

5. DESENVOLVIMENTO

Os dados que fazem parte desta Tese de Doutorado estão apresentados sob a forma de um Artigo Científico (5.1). Manuscrito I (5.2) e alguns Resultados Preliminares (5.3) de nosso tratamento com γ -orizanol.

5.1. ARTIGO CIENTÍFICO

Como sabemos o modelo de CUMS foi originalmente projetado para roedores desde início dos anos 80 e não havia na literatura relatos deste modelo induzido na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. Portanto, para construção de nosso estudo, primeiramente (Artigo Científico) avaliamos a possibilidade de estabelecer *Drosophila melanogaster* como modelo valido para investigar as alterações induzidas por CUMS que predizem comportamento tipo depressivo. O artigo está disposto na forma em que foi aceito para publicação em maio de 2018, na revista científica “*Behavioural Brain Research*”.

“Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*”

Stífani Machado Araujo, Márcia Rósula Poetini, Vandrezza Cardoso Bortolotto,
Shanda de Freitas Couto, Franciane Cabral Pinheiro, Luana Barreto Meichtry,
Francielli Polet de Almeida, Elize Aparecida Santos Musachio, Mariane Trindade de Paula,
Marina Prigol



Behavioural Brain Research, 351 (2018) 104–113

DOI:10.1016/j.bbr.2018.05.016



Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*



Stéfani Machado Araujo^a, Marcia Rósula Poetini^a, Vandrezza Cardoso Bortolotto^a, Shanda de Freitas Couto^{a,b}, Franciane Cabral Pinheiro^a, Luana Barreto Meichtry^a, Francieli Polet de Almeida^a, Elize Aparecida Santos Musachio^a, Mariane Trindade de Paula^a, Marina Prigol^{a,b,*}

^a Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LaftamBio Pampa), Universidade Federal do Pampa, Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brazil

^b Departamento de Nutrição, UNIPAMPA- Campus, Itaqui, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Forced swim test
Biogenic amines
Depression
Drosophila melanogaster
Behavioral paradigms
Mating assay

ABSTRACT

The etiopathogenesis of depression may involve repeated exposure to several unpredictable stressors. This study was conducted to investigate changes induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) and to assess behavioral and neurochemical changes that predict depressive-like behavior in *Drosophila melanogaster*. Male *Drosophila melanogaster* flies were exposed to CUMS with several stressors (cold, heat, starvation, and sleep deprivation) in an unpredictable and chronic manner for ten days. At the end of treatment, *in vivo* behavioral tests (open field, aggression, forced swimming, mating, light/dark box, male fertility evaluation, sucrose preference, weight evaluation) and *ex vivo* analyses (dopamine and serotonin levels) were performed. Using this CUMS model, we obtained results that contribute to the construction of a depressive model in *Drosophila*, where we reproduce some behavioral phenotypes corresponding to depressive symptoms, such as immobility in the forced swimming test, less exploration in the light/dark test, changes in mating behavior, changes in the aggressiveness test, reduced sucrose preference, and weight-loss, in addition to a significant reduction in the levels of serotonin and dopamine when compared to the control group. Fluoxetine was used in our study as a positive control to demonstrate that CUMS-induced depressive-like behaviors in flies can be reversed by antidepressants. In conclusion, male *Drosophila melanogaster* exposed to CUMS display a depressive-like phenotype, and, while this poses some limitations as an animal model for depression, it meets some of the criteria required to be a valid model, such as good face and construct validity.

1. Introduction

Depression is a multifaceted and complex psychiatric disorder defined by emotional and physical problems, including anhedonia, hopelessness, exacerbated guilt, loss of memory, interest or pleasure, low self-esteem, insomnia, and loss of appetite [1]. According to the World Health Organization [2], it is estimated that depression affects 350 million people worldwide. Stressful life events are associated with a five-fold increase in the risk of developing depression, identifying this factor as one of the most important external causes of this affective disorder [3]. Chronic unpredictable mild stress (CUMS), one of the most relevant stress paradigms in rodents, reproduces behavioral characteristics observed in patients with depression and related mood disorders, and has been used to study the effect and mechanism of action of

antidepressant candidates [4,5]. In the CUMS paradigm, animals are exposed, in a semi-random order for several days or weeks, to a variety of unpredictable mild stressors, thus triggering various behavioral and biochemical changes in these animals, and these changes are reversible by antidepressant treatments, e.g., selective serotonin reuptake inhibitors, such as fluoxetine, paroxetine, and sertraline [1,6]. In this study, our objective was to investigate the changes induced by CUMS, evaluating behavioral and neurochemical changes that predict depressive-like behaviors, in the simple invertebrate model the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Although the neuroanatomy of *Drosophila* and mammals differ considerably, the former is an attractive organism for studying neuropharmacological processes, and molecular and behavioral changes that are widely conserved in mammals [7]. *Drosophila* display a variety of complex behaviors that are regulated by the

* Corresponding author at: Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LaftamBio Pampa), CEP 97650-000 Itaqui, RS, Brazil.
E-mail address: marinaprigol@unipampa.edu.br (M. Prigol).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.016>

Received 22 January 2018; Received in revised form 9 April 2018; Accepted 15 May 2018

Available online 24 May 2018

0166-4328/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

neurotransmitters dopamine and serotonin. Therefore, they represent a powerful system to explore the mechanisms by which aminergic neurotransmission is regulated, and thereby indicate how changes in the pre-synaptic release of monoamines may influence behavior [8]. In the literature, some recent studies have used *Drosophila melanogaster* as an animal model to explore the molecular mechanisms that trigger depression. In one study, Ries et al. [9] used a three-day vibration-stress protocol in *Drosophila melanogaster*, which reduces voluntary behavioral activity, and reported that there was a reduction in the release of serotonin, which could be reversed using 5-hydroxy-L-tryptophan antidepressants or sucrose. In another study conducted by [10], it was found that feeding *Drosophila melanogaster* a diet containing levodopa or chlorpromazine could induce phenotypes similar to depression, as evidenced by behavioral and biochemical biomarkers. In their research, Neckameyer and Nieto [11] exposed immature and mature female and male *Drosophila* to four different stressors and reported that they represent behaviorally distinct populations, evidence that the neural substrates mediating the perception of, and response to, stress are differentially expressed depending on the hormonal status of the brain. Thus far, there is no data on the induction of depressive-like behavior in *Drosophila* triggered by CUMS using stressors that simulate daily life stress, which places extensive adaptive demands on the organism. Therefore, we aimed to establish *Drosophila melanogaster* as a model for investigating the CUMS-induced changes that predict depressive-like behavior.

2. Materials and methods

2.1. Materials and fly culture conditions

Sucrose (S5016), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; Cat. L3771), Hepes Minimum 99.5% (Titration, H3375), and Fluoxetine (FLX; PubChem CID: 3386) were obtained from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). All other chemicals and reagents used here are of the highest analytical grade from UNIPAMPA.

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. Both sexes were maintained in incubators at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, light photo-period of 12 h, and 60–70% relative humidity. The flies were kept in glass bottles containing 10 mL standard food: corn flour (76.59%), wheat germ (8.51%), sugar (7.23%), powdered milk (7.23%), salt (0.43%), an antifungal agent (Nipagin), and a pinch of dry yeast. All experiments were performed with the same strain.

2.2. Experimental protocol

2.2.1. Drug design and treatment

Male flies were divided into four groups of 50 flies (Fig. 1): [1] Control group (not stressed), [2] CUMS group, [3] FLX (10 μM) group (not stressed), [4] FLX (10 μM) group + CUMS. FLX (positive control drug) was dissolved in 1% sucrose (vehicle) [12], and was administered during the 10 days of treatment to the groups mentioned above. The diet during treatment consisted of 1% w/v yeast beer, 2% w/v sucrose, 1% w/v milk powder, 1% w/v agar, and 0.08% w/v Nipagin.

2.3. CUMS protocol

Male flies exposed to the CUMS regimen were subjected to several stressors in a chronic and unpredictable manner according to a random schedule over a period of 10 days. Stressors in the CUMS regimen were based on previously published protocols, including: (i) cold stress at -5°C for 30 min, adapted from [13], (ii) starvation stress with 5% sucrose on paper filter for 58 h [14], (iii) heat stress at 36°C for 4 h [14], and (iv) sleep deprivation with light/dark cycle inversion, adapted from [15]. After the end of CUMS, the insects were subjected to behavioral and neurochemical tests.

2.4. In vivo assays

After 10 days of treatment, male *D. melanogaster* flies underwent the different behavioral tests described below. All tests were performed between 10 A.M. and 4 P.M.

2.4.1. Open field arena

The locomotor behavior and exploratory activity of the flies were evaluated according to the method of [16], where 15 flies from each group were placed in a Petri dish divided by a square centimeter. The exploratory activity of the fly over a period of 60 s was evaluated according to the number of squares crossed / explored by each fly analyzed. The average speed of the flies was also evaluated and expressed in millimeters per second. The total number of flies (60 per group) represents four independent experiments.

2.4.2. Forced swim test (FST)

The FST test (Fig. S1) was performed according to the method of [11], with some adaptations. We used chambers with dimensions $45 \times 12 \text{ mm}^2$. Each chamber was filled with 4 mL of 0.04% SDS, and each fly was gently aspirated until it was installed in an individual chamber. Each fly was observed for 3 min. This test was manually marked in "real time," and the latency to the first period of immobility and its duration beyond the number of immobility bouts per min of the 3-min test period were recorded. Ten flies were tested for each experimental group. To ensure that the general locomotor activity for each fly was not compromised by the treatment or test, each fly was removed with the flat end of a spatula at the end of the test and moved gently to a napkin where it was assessed for its ability to walk and immediately climb out. Insects that were tested that failed to walk or climb normally after the test were excluded from the final analysis (details in Supplemental Video (FST)).

2.4.3. Aggression assay

The aggression test was performed using a pair of male flies from each group. They were left in test tubes for 90 min without food before the start of the test. They were then transferred (without anesthesia) to a circular combat chamber with a radius of 45 mm and a height of 12 mm, containing one drop of food. They were allowed to acclimatize for 2 min. The behavioral tests were performed at 22°C . After the acclimation period, the flies were observed for 5 min. The following behaviors were marked as aggressive encounters: leg extension from one fly to another resulting in physical contact, chase, fast loading approach that leads to direct orientation, wing-raising in response to proximity/approach of another fly, and high box impact interaction involving the front legs of both flies. The score corresponded to the number of encounters that exhibited aggressive behavior among experimental flies. Ten pairs of flies from each group were observed, with the total number of flies (30 per group) representing three independent experiments [17,18].

2.4.4. Courtship and mating assay

To evaluate the mating behavior of flies, we used the method described by [7], with some adaptations. One male fly from each group was paired with a virgin female and submitted to the test. They were transferred to the mating wheel, which is a circular structure of 12 mm thickness with a 45 mm diameter. All tests were performed at 25°C with a relative humidity of 70–80% and between 11 A.M. and 4 P.M. Heterosexual courtship in *D. melanogaster* involves a progression of behaviors occurring in a defined order: orientation of the male fly toward the female fly, tapping, wing song, licking of the female genitalia, and curling of the male fly (attempted copulation), with successful copulation occurring shortly thereafter. The latency up to first copulation, total copulation time, as well as total mating time were noted. We evaluated 10 pairs of flies, and the total number of flies (40 per group) represents four independent experiments.

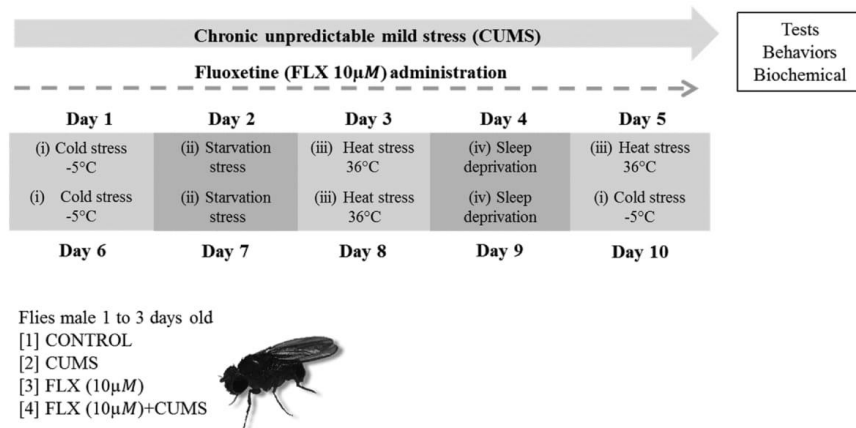


Fig. 1. Experimental design of the present study.

2.4.5. Male fertility assessment

To evaluate the mating and fertility capacity of male flies, sixteen virgin female flies were transferred to four vials with 10 mL of standard feed and three male flies from each experimental group were introduced after the experimental period. Four days later, male flies were discarded and female flies were transferred to fresh flasks with standard feed and a small drop of yeast to stimulate oviposition. After 72 h, these female flies were discarded and the cumulative hatching ratio until there were no more hatching (births) of flies was determined for each group.

2.4.6. Sucrose preference test per capillary feeder test

The volumetric consumption test described by [19] was used with some modifications to test the feeding preference of the male flies. The flies were allowed to drink two different solutions (water or 5% sucrose) that were presented in two different capillaries (Micron Glass-Vici Ltda. 1–1.5 mm, filament) attached to an empty food bottle. Vials were placed at a 45° angle. The capillary openings were aligned with the bottle ceiling. After a defined fasting period, 30 flies were placed in a flask and food consumption was measured. The volume consumed was calculated as the length of the missing liquid in the capillary multiplied by the cross section of the inner diameter of the capillary. All measurements were normalized to account for loss of liquid from evaporation using control capillaries without flies. Fluid consumption was measured every hour after flies were installed for the trial. Upon completion of the test, the flies were anesthetized and the number of flies in each flask was counted. After 6 h, the total fluid consumption per fly was measured by dividing the volume consumed in each capillary by the number of live flies in the flask. The preference index (PI) was calculated by dividing the difference in the volume of liquid consumed from the two capillary tubes by the total volume of liquid consumed.

2.4.7. Dry weight

To determine the dry weight of the body, 20 flies from each group were placed in an incubator at 80 °C for 5 days. They were then weighed in a balance with an accuracy of 1 µg [20]. Eight independent experiments were performed to analyze the body-weight of each group.

2.4.8. Light/dark exploration test

The box for the light/dark test (Fig. S2) consisted of a dark compartment made of black material and a light compartment made of white material. The two compartments were connected by an aperture.

The box was 12 cm in length, 8.2 cm in width, and 42 cm in height. The light intensity in the light compartment was 16 W. The test was performed with six flies from each group. At the beginning of the experiment, each fly was placed in the center of the illuminated box facing the port. During the 3-min test, a fly was considered to have entered the illuminated or dark compartment when both front legs were inside the compartment. The amount of time spent in each compartment was noted. This experiment was conducted as described by [11], with some adaptations.

2.5. Ex Vivo assays

2.5.1. Dopamine (DA) and serotonin (5HT) levels

DA and 5HT levels were determined using high precision liquid chromatography (HPLC), as described previously [21]. The heads of twenty flies per treatment group were homogenized in 100 µl of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), followed by centrifugation at 25,000 × g for 10 min at 4 °C. Six independent experiments were carried out to obtain 20 heads of flies per group to analyze two levels of 5HT and DA, which was used for injection HPLC 50 µl sample, all of which were performed at ambient temperature.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post hoc test, where appropriate. The main effects are presented only when the first order interaction was not significant. The percent eclosion (births) was determined using the Mantel-Cox log-rank test. A Pearson's correlation coefficient was used for the estimation of correlations between the parameters analyzed. Descriptive statistical data are expressed as the mean(s) ± standard deviation (S.D.). Differences with a P-value < 0.05 were considered statistically significant. GraphPad Prism software version 6 (San Diego, CA, USA) was used to perform these analyses.

3. Results

3.1. Evaluation of locomotor and exploratory performance in the open field test

The post-hoc analysis showed that the locomotor and exploratory behaviors of adult male flies were similar in all experimental groups

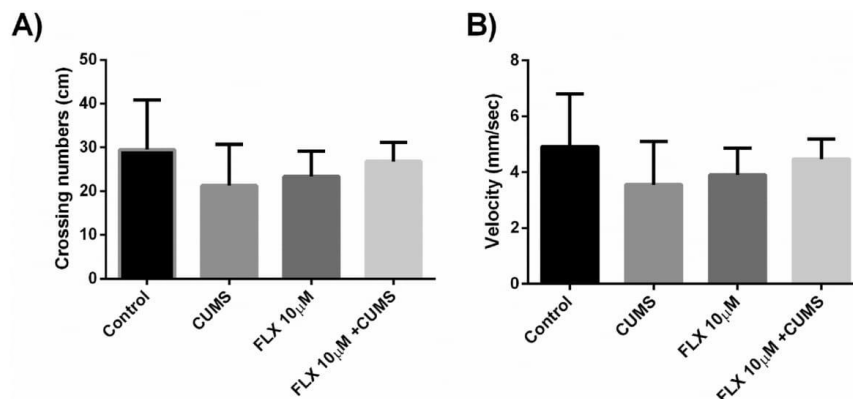


Fig. 2. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 μM) in the open field arena test. Distance (cm) traveled in the open field test (Graph 2A) and velocity (mm/sec) in the open field (Graph 2B). Sixty flies from each group were used, these values represent the sum of four independent experiments. Values are provided as mean $\pm$ SD. Significance determined by analysis of two-way variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test.

(Fig. 2A). A two-way ANOVA revealed no interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,12)} = 2.00$, $P = 0.1820$]. The post-hoc analysis showed that the velocity of adult male flies was also similar in all experimental groups (Fig. 2B). A two-way ANOVA revealed no interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,12)} = 2.00$, $P = 0.1820$].

3.2. Effects of CUMS in the FST

The post-hoc analysis demonstrated that exposure of flies to CUMS decreased the latency to the first period of immobility, and increased the immobility time in the FST. Flies that underwent CUMS had shorter swimming times compared to the control group. In the FLX group, the stress-induced increase in the latency to the first period of immobility was prevented. These flies showed a decreased immobility time and had a longer swimming time when compared to the CUMS group. The number of bout was not significantly different between the groups (Fig. 3A–D).

A two-way ANOVA revealed a significant interaction between CUMS and FLX for the immobility time [$F_{(1,12)} = 24.23$, $P = 0.0004$; Fig. 3B], latency to the first period of immobility [$F_{(1,28)} = 8.369$, $P = 0.0073$, Fig. 3A], and swimming time [$F_{(1,12)} = 6.145$, $P = 0.0289$; Fig. 3C]. During the analysis of number of bout there was no significant interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,12)} = 1.788$, $P = 0.2060$; Fig. 3D].

3.3. Effects of CUMS on aggressive behavior

The post-hoc analysis showed that flies exposed to CUMS had a greater number of aggressive events compared to control group flies. Flies that were treated with FLX and subsequently exposed to CUMS showed decreased aggressive behavior compared to the group exposed to CUMS only (Fig. 4).

A two-way ANOVA revealed a significant interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,8)} = 10.57$, $P = 0.0117$].

3.4. Effect of CUMS on mating behavior

The post-hoc analysis revealed that flies in the CUMS group showed deficits in mating behaviors, such as an increased latency to first copula, and decreased copulation and mating times compared to the control group. Treatment with FLX followed by exposure to CUMS

decreased the latency time to the first copula. However, when the coupling time and mating duration were observed in this group we can infer that there was no restoration of these behaviors, even after treatment with FLX (Fig. 5A–C).

A two-way ANOVA revealed a significant interaction between CUMS and FLX in relation to latency until copulation [$F_{(1,12)} = 20.29$, $P = 0.0007$; Fig. 5A], copulation time [$F_{(1,12)} = 9.856$, $P = 0.0085$; Fig. 5B], and mating duration [$F_{(1,12)} = 5.141$; $P = 0.0426$; Fig. 5C].

3.5. Effect of CUMS on male fertility

The results show 100% hatchings (births) in the control group and about 94% and 92% hatchings in the FLX and FLX + CUMS groups, respectively (Fig. 6). However, only 84% of hatchings were observed in the CUMS group at day 34 of the follow-up period. The log-rank test (Mantel-Cox) indicated that there was a significant difference in the percentage of hatchings between CUMS and FLX + CUMS ($P < 0.0001$).

3.6. Effect of CUMS on sucrose preference

The post-hoc analysis of the sucrose preference index indicated that the CUMS group showed a lower sucrose preference when compared to the control group. The FLX + CUMS group showed a partially significant reversal of the anhedonia induced by CUMS (Fig. 7).

A two-way ANOVA showed a significant effect of CUMS [$F_{(1,12)} = 9.914$, $P = 0.0084$].

3.7. Effect of CUMS on body-weight

The post-hoc analysis revealed that the body-weight of flies exposed to CUMS decreased markedly during the 10-day experimental period when compared to flies in the control group. Treatment with FLX before exposure to CUMS was effective in preventing weight loss in flies (Fig. 8).

A two-way ANOVA indicated a significant interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,28)} = 8.457$; $P = 0.007$].

3.8. Effect of CUMS in the light-dark box

The post-hoc analysis demonstrated that CUMS-exposed flies

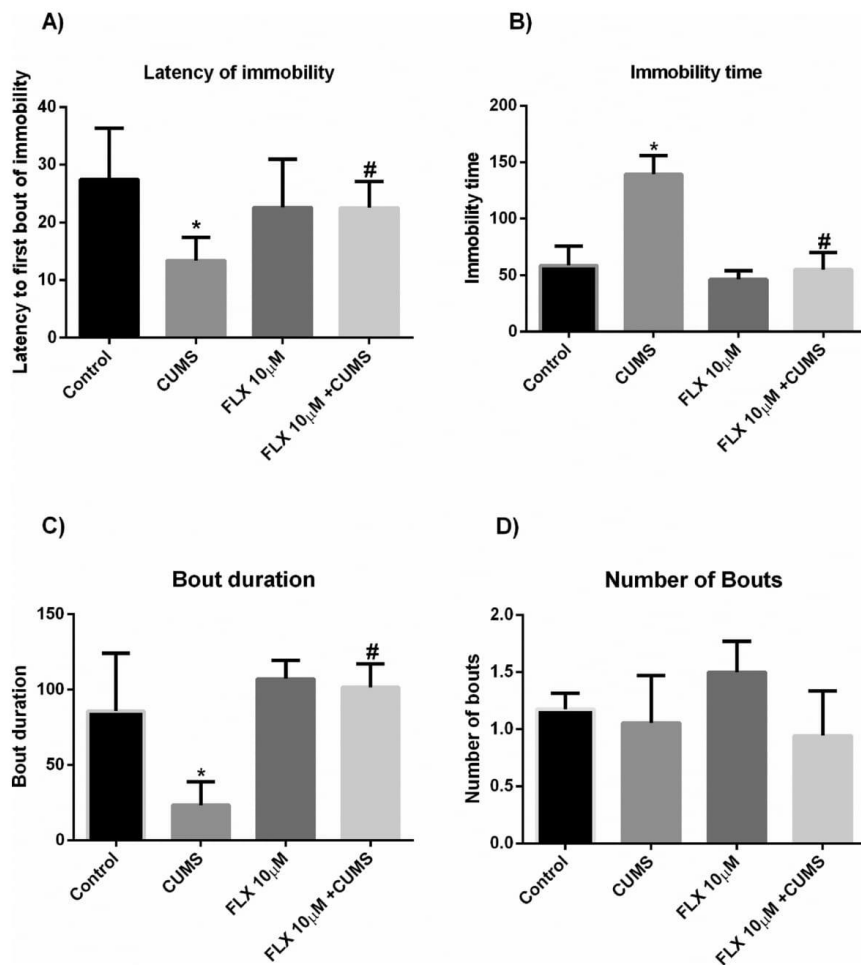


Fig. 3. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the forced swim test in male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 μM). Latency for the first immobilization (Graph 3A), Immobility time (Graph 3B), Swimming time (Graph 3C), and Number of bout (Graph 3D). Values are provided as mean + SD. Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and FLX + CUMS ($P < 0.05$).

remained in the dark compartment of the box longer than the control group flies. In the FLX + CUMS group, the time spent in the light compartment was longer than that for the CUMS group (Fig. 9).

A two-way ANOVA revealed a significant interaction between CUMS and FLX [$F_{(1,12)} = 5.129$; $P = 0.0428$].

3.9. Effect of CUMS on the levels of the biogenic amines 5HT and DA

The post-hoc analysis showed that exposure of flies to CUMS caused a reduction in the levels of 5HT and DA in the heads of flies compared to those of the control group. Flies treated with FLX and subsequently exposed to CUMS demonstrated restoration of serotonergic levels, whereas dopamine levels were only partially restored (Fig. 10A–B).

A two-way ANOVA revealed an interaction between CUMS and FLX with regard to serotonin levels in the heads of flies [$F_{(1,20)} = 4.446$;

$P = 0.00478$; Fig. 10A]. It also indicated an interaction between CUMS and FLX with regard to dopamine levels in the heads of flies [$F_{(1,20)} = 69.15$; $P < 0.0001$; Fig. 10B].

3.10. Pearson's correlations test (r) between biogenic amines and depressive-like behavior paradigms

The Pearson's correlation analysis (Table 1) showed a significant negative correlation between biogenic amine levels in the heads of the flies and depressive-like behavior. There was a significant negative correlation between DA and aggressive behavior ($r = -0.8957$; $P < 0.0001$), DA and immobility time in the FST ($r = -0.9084$, $P < 0.0001$), 5HT and aggressive behavior ($r = -0.8661$; $P = 0.0003$), and 5HT and immobility time in the FST ($r = -0.9125$; $P < 0.0001$). In addition, the Pearson's correlation analysis revealed a significant

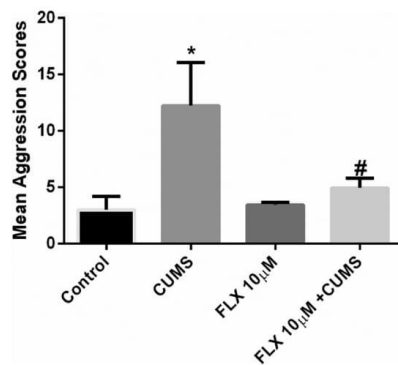


Fig. 4. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on mean aggression scores in male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Values are provided as mean + SD. Significance was determined by the analysis of two-way variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and FLX (10 µM) + CUMS ($P < 0.05$).

positive correlation between DA and mating time ($r = 0.5643$, $P = 0.0228$), sucrose preference ($r = 0.6188$; $P = 0.0106$), and the light-dark box test ($r = 0.6192$; $P = 0.0105$) in flies exposed to CUMS and treated with FLX. There were no significant positive correlations with 5HT (details in Fig. S3).

4. Discussion

The central point for most contemporary theories of depression is that stress can initiate cognitive and possibly biological processes that increase the risk for the development of this disorder [22]. In summary, the CUMS used for several days in flies in our work induced a state similar to depression, since it reduced their voluntary and innate behaviors by using four naturalist stressors that simulate the stress of daily life and place extensive adaptive demands on the organism (starvation, cold, heat, and sleep deprivation). Starvation is a type of stress common to all animal species and the primary response mechanisms appear to be conserved between flies and mammals [11]. Changing the circadian cycle using sleep deprivation alters the need for sleep in the fly and disrupts the response to stress, adult neurogenesis, and hippocampal function [11,23]. Temperature is ecologically the most important

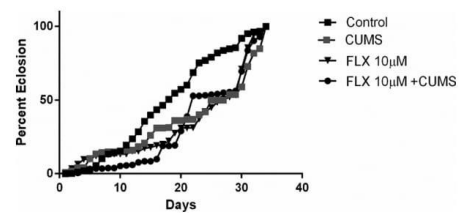


Fig. 6. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on male fertility *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Percent Eclosion was determined using the Mantel-Cox log-rank test, significant differences ($P < 0.05$).

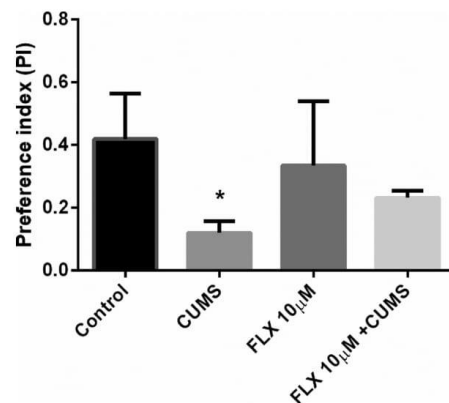


Fig. 7. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the test of preference index to sucrose in male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Values are provided as mean + SD. Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. * Significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$).

physical factor that has significant effects on the physiology of organisms, particularly ectotherms like *Drosophila*. The ability to withstand both hot and cold heat stress is considered to be of crucial importance for individual fitness and the survival of species [24,25].

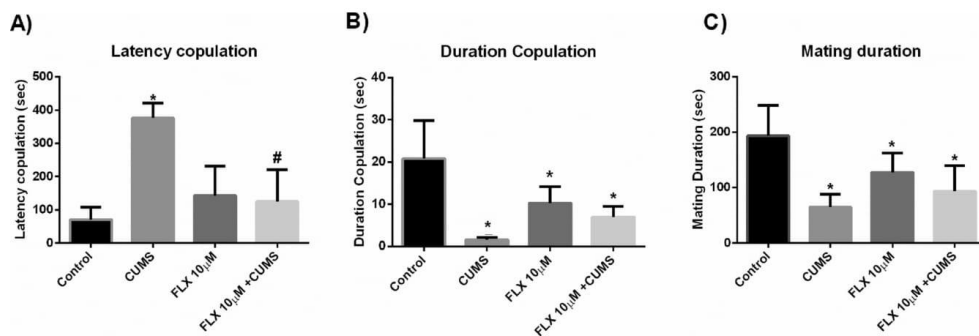


Fig. 5. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on mating behavior in male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Graph (5A) Latency until copulation, Graph (5B) and duration copulation, Graph (5C) Mating duration. Values are mean + SD ($n = 20$ flies per replicate, four replicates used). Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test, followed by Bonferroni post hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and (10 µM) + CUMS ($P < 0.05$).

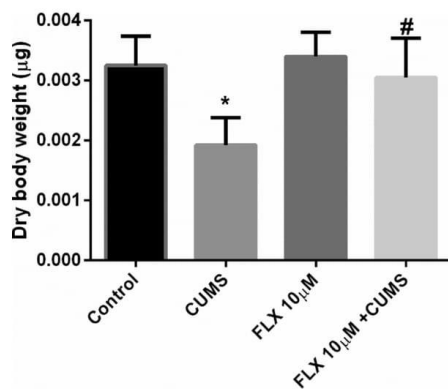


Fig. 8. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the body weight of male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Values are provided as mean + SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and FLX (10 µM) + CUMS ($P < 0.05$).

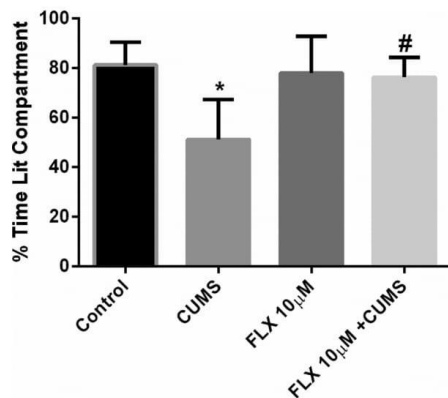


Fig. 9. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the percentage of compartment time in the light and dark test of male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Values are provided as mean + SD. Significance was determined by the analysis of two-way variance (ANOVA) followed by Bonferroni Post-hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and FLX (10 µM) + CUMS ($P < 0.05$).

In their work [14] and [11] simulate a stress model in flies using additional physical stressors, such as oxidative stress using paraquat herbicide. In our work, we only used physical stressors called "naturalists," as a way of simulating the stress of everyday life since stressful life events can be triggering factors for innumerable neuropsychiatric disorders, namely, anxiety, depression, and dementia [26]. In addition, acute/chronic stress has been used for half a century to model mood and anxiety disorders in laboratory animals. This extensive use stems from early observations that stress may be a risk factor in the etiology of depression and anxiety in some genetically and/or environmentally predisposed individuals [27]. In our CUMS model, we were able to obtain results that contribute to the construction of a depression model in *D. melanogaster*, whereby stress resulted in significantly reduced concentrations of 5HT and DA. In addition, we have reproduced some

behavioral phenotypes that are similar to the depressive state in humans, such as a lack of interest in pleasurable activities (anhedonia) [9]. Differences in the light-dark preference test and an increase in immobility in the FST were also demonstrated, though there were no stress-induced differences observed in the open-field test. This was previously discussed by [11], and although the validity of these tests has been contested, they are still a reliable index of general exploratory behavior or fugue in rodents and *Drosophila*, and serve as indicators of behavioral changes mediated centrally in response to a new environment or challenge. We were able to evoke behavioral changes that resemble those found in individuals with depressive disorders, such as decreased mating behaviors, increased aggressiveness, increased male infertility, and weight loss in the CUMS-exposed group. A significant negative correlation was observed between the levels of biogenic amines in the heads of flies and their aggressive behavior and immobility time in the FST. In addition, a significant positive correlation was found between DA levels in the heads of flies and the light / dark test, mating time, and sucrose preference test results.

Accumulating evidence points to a central role of the neurotransmitter 5HT in depressive disorders [28]. The fruit fly has a serotonergic system that has about 40 neurons per cerebral hemisphere, and mammalian 5HT transporter (dSERT) that display pharmacological properties broadly similar to those in humans [29,12]. In the present study, there was a significant decrease in 5HT levels in the brains of flies exposed to CUMS when compared to control group flies. This fact suggests that CUMS potentially represents a model of depression in the fly, since compromised serotonergic levels may induce similar symptoms to those observed in depression. Our results agree with [9] that using a stress protocol for three days (stress-vibration) reduced voluntary behavioral activity in *Drosophila*, and reduced 5HT release. In contrast, we demonstrated a protective effect of FLX in flies exposed to CUMS, where there was protection against the stress-induced decrease in 5HT levels. The antidepressant actions of FLX are mediated by blocking 5HT reuptake by its neuronal membrane reuptake pump, increasing 5HT actions on 5HT1A autoreceptors, and resulting in increased serotonergic signaling [30]. *D. melanogaster* has a dopaminergic system comprising more than a hundred neurons distributed in about 15 groups per adult cerebral hemisphere [31]. According to [32], adult female flies have a significantly higher DA content than male flies; thus, for the purposes of our research, we used male flies to avoid possible confounding effects related to dopaminergic levels. In our study, the levels of this biogenic amine were reduced in the group exposed to CUMS in comparison to controls. This fact is in agreement with the findings of [33], who exposed rodents to acute and chronic stress, and observed that their striated ventricular structures and dopaminergic levels responded critically to these stressors. Moreover, a study by [34] reports that rats exposed to stressors, both chronic and unpredictable, display prolonged reductions in their DA neuronal populations in the ventral tegmental area, and a decrease in activity occurring mainly in the reward-related area [35]. In his study, [36] reports that, in *Drosophila*, the complementary subgroups of dopaminergic neurons in the protocerebral anterior medial (PAM) cluster are responsible for performing this reward signaling. Treatment with FLX partially inhibited the decrease in DA levels in the heads of flies. In their study, [37] report that acute administration of FLX produces a small inhibition of DA neuron activity in the ventral tegmental area in rodents, presumably owing to the inhibitory effect of 5HT, which increases transmission upon administration of FLX, a selective 5HT reuptake inhibitor.

The open field test is commonly used to investigate locomotor activity, and exploratory and depressive-like behaviors in experimental animals [38]. As evidenced by our results, the locomotor and exploratory behavior of the treated groups, as well as the velocity employed by each group in the test were not significant. In the group treated with FLX, the ability of FLX to reduce immobility cannot be attributed to a psychostimulant action, since FLX did not produce changes in locomotor activity, as evaluated by the open field test. This

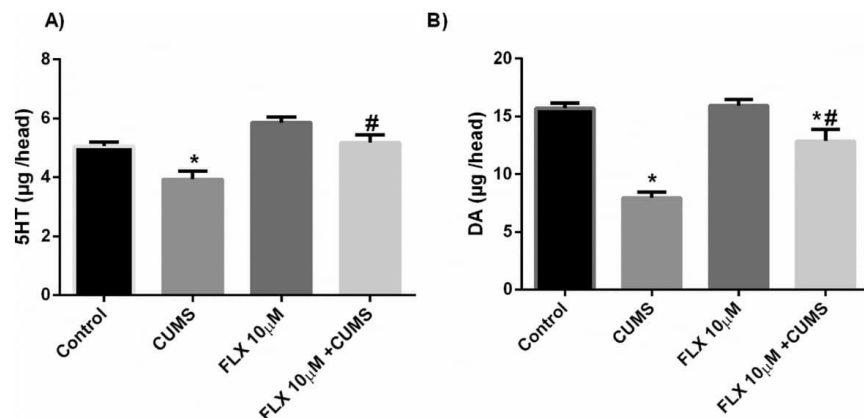


Fig. 10. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on levels of the biogenic amines serotonin (5HT) (Graphic 10 A) and dopamine (DA) (Graphic 10B) of male *Drosophila melanogaster* flies treated with fluoxetine (FLX 10 µM). Values are provided as mean + SD. Significance determined by analysis of two-way variance (ANOVA) followed by Bonferroni Post-hoc test. * Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and FLX 10 µM + CUMS ($P < 0.05$).

Table 1
Effects of CUMS on Pearson's correlation analysis (r) between biogenic amines and depressive-like behavior paradigms.

Biogenic amines and behaviors depressive like paradigms	r	P	n
DA × Mating duration	0.5643	0.0228*	16
DA × Sucrose preference	0.6188	0.0106*	16
DA × Aggressive Behavior	−0.8957	< 0.0001*	12
DA × Light/Dark Box	0.6192	0.0105*	16
DA × Immobility time in FST	−0.9084	< 0.0001*	16
5HT × Mating duration	0.2490	0.3523	16
5HT × Sucrose preference	0.2809	0.2920	16
5HT × Aggressive Behavior	−0.8661	0.0003*	12
5HT × Light/Dark Box	0.4549	0.0766	16
5HT × Immobility time in FST	−0.9125	< 0.0001*	16

Dopamine (DA); serotonin (5HT); forced swimming test (FST); Pearson's correlation analysis (r).

* $P < 0,05$ is considered significant.

lack of effect on locomotor activity in flies is fundamental to validating the results of this behavioral paradigm, indicating that behavioral changes in the tests presented here are not related to a stimulating psychomotor action.

The FST is widely used for the evaluation of antidepressant activity in rodents its classic version was described by [39], using a single parameter, i.e., the duration of immobility, which is considered a measure of behavioral despair and can be modified by the pharmacological activity of antidepressants. Some later adaptations were made by [40], whereby the FST involved an active (swimming and climbing) or passive (immobility) behavior score, and a reduction of passive behavior is interpreted as an effect similar to that of antidepressants. In our study, we used the FST previously adapted by [11] for use in *D. melanogaster* we evaluated latency for immobility, number and time of bout, as well as duration of fly immobility. In the CUMS group there was a decrease in the immobility latency, duration of immobility and duration of bout when compared to the control group. In rodent models, decreased immobility duration is an indicator of reliable antidepressant activity [41]. This has already been described in *Drosophila* by [11], where immobility behavior serves as an indicator of behavioral changes mediated centrally in response to a new environment or challenge. However, it may lack the pharmacological screening

capabilities of the FST, which, when performed in a reproducible and reliable manner, has clear potential to generate important molecular knowledge about depression. In contrast, the group receiving treatment with FLX demonstrated a reduction in immobility and increased swimming behavior in the FST. This fact may be related to the antidepressant activity of selective 5HT reuptake inhibitors, such as FLX [42,43].

Impulsive aggression has been associated with depression, as well as violent acts [44,45]. In the entire animal kingdom these aggressive behaviors are widely present, since aggressive actions are used to acquire territory, food, or companions, and for the defense of the individual or his offspring against predators or co-specific rivals [46,47]. As shown in our results (Fig. 4), the CUMS group showed an increase in aggressive behavior when compared to the control group. According to [46], a hypofunction of serotonergic and dopaminergic neurons may represent a biochemical trait that predisposes individuals to impulsive aggression and may be an important mechanism underlying the link between impulsive aggression and its comorbid disorders, such as depression. Aggressive behaviors were attenuated in our study after treatment with the antidepressant FLX, and this result is in line with that of [48], who showed that CUMS induces depressive-like behaviors in mice and that FLX reverses aggressive behaviors.

In our study, the CUMS group showed decreased mating ability, with an increased latency for copulation, shorter copulation duration, and shorter mating duration when compared to the control group. We also observed that CUMS-treated male flies were never near female flies, and in some cases the male flies avoided the female flies. As described by [49], there is broad consensus that the occurrence of sexual dysfunction or lack of libido is consistently greater in patients with depression than in the general population. This effect may be related to a decrease in DA levels, since our results, and those of others [50], demonstrate that DA may be responsible for instigating female mating and receptivity to male mating behavior in flies. According to experimental data reported by [51], the central dopaminergic system is a key element in the control of sexual function in male and female rodents. We also observed a significant decrease in mating activity in the FLX group in our study when compared to the control group (Fig. 5). It is reported that sexual dysfunction is a common side effect of antidepressants and can have a significant impact, especially in the recovery of patients. The main side-effects of antidepressants are a loss of libido, loss of orgasm, and late or absent ejaculation, which can lead to

infertility in adults [52,53]. Antidepressants can modulate 5HT concentrations, and elevated 5HT levels decrease sexual function, while biogenic amines inhibit the production of nitric oxide, which normally plays a role in smooth muscle relaxation, permitting the sexual response cycle [54].

To explore the underlying cause of male infertility in CUMS-exposed flies, we examined the mating behavior of male flies exposed to CUMS paired with virgin female control flies where, in assessing offspring generation ability, we deduced that there was decreased mating behavior in male flies exposed to CUMS because of fewer hatchings (births). According to [43], stress is considered an important factor contributing to infertility, causing decreased testicular function, decreased sperm counts and motility, and abnormal semen increases in mice exposed to CUMS. The group treated with FLX and subsequently exposed to CUMS also demonstrated a decrease in mating capacity, resulting in a decrease in their progeny. In their study, [55] confirm that prolonged ingestion of FLX produces adverse effects on fertility and the reproductive system in adult male rats, with a decrease in spermatogenesis and a decrease in plasma secretion of testosterone reported.

The sucrose preference test, which evaluates the inability to experience pleasure (anhedonia), is a behavioral paradigm that detects antidepressant effects [56]. In the *D. melanogaster* fly, sweet taste has often been used to study the value of appetitive reward [57]. The results presented in our study revealed that the group of flies subjected to CUMS displayed reduced sucrose solution consumption and preference when compared to the control group. Our results are in accordance with those reported by [58] in their study involving rodents undergoing CUMS, showing that the rodents had significantly reduced sucrose consumption. In his work, [9] also observed anhedonic behavior in male flies exposed to vibration stress. It is known that CUMS can alter levels of DA and 5HT, and induce conditional silencing of dopaminergic neurons in *D. melanogaster*, and, as described by [59], can reduce the probability of proboscis extension, while the increase in the activity of dopaminergic neurons increases the extent of the proboscis and the consumption of sucrose, but not bitter compounds or water. Vučković et al. [60] also reported that the preference for sucrose may be influenced by 5HT dysfunction. The increase in anhedonia described in the CUMS group here is reflected by the decrease in body-weight of flies exposed to chronic stress, as demonstrated in our results and those previously reported [61,62]. Stress is known to alter body-weight because it reduces responsiveness to rewarding stimuli. Treatment with FLX significantly increased body-weight in CUMS-exposed flies. FLX-treated patients tend to regain weight in the long term after experiencing initial short-term weight loss [63].

The light/dark exploration test, developed by [64], provides a means of examining behavior similar to anxiety in rodents. A large number of clinical data show that the coexistence of depression with anxiety disorders is more a rule than an exception [65], leading some authors to assume that high levels of anxiety is an important element in the development of mood disorders [66]. Adaptations were made by [11,67] to this paradigm for use in *D. melanogaster*. The fly has positive phototaxis and is therefore more active during the day, so under normal conditions it tends to remain on the light side of the box. In our study, the male flies exposed to CUMS preferred the dark side of the box and spent less time on the light side compared to the control flies. This suggests that there is a conflict between the desire to explore a new environment and the innate desire to escape predation in this paradigm in *Drosophila*, thus suggesting that anxiety may contribute to the development of major disorders, such as depression. Selective 5HT reuptake inhibitors, such as FLX, can be used to treat various anxiety disorders [68] treatment with FLX increased the percentage of time spent by flies in the clear box compartment, reflecting a decrease in anxiety-like behavior. In their study, [68] exposed male rats to mild and chronic stress, and in the light / dark test repeated administration of FLX produced anxiolytic effects in these animals.

5. Conclusion

Taken together, this study demonstrates that our CUMS model in male *D. melanogaster* meets some of the criteria for a valid animal model, such as good face and construct validity; however, it has limitations as an animal model of depression. CUMS caused a decrease in 5HT and DA levels, as well as behavioral changes in the FST, aggression test, and light /dark preference test. Male mating and fertility behavior were also affected by CUMS, as well as anecdotal behavior and weight loss, giving this model strong predictive value for testing the effects of antidepressants.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support received from FAPERGS and CNPq (Universal 483529/2013- 3). CAPES is acknowledged for financial support for doctoral student fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.016>.

References

- [1] J. Zhao, X.R. Qi, S.F. Gao, J. Lu, et al., Different stress-related gene expression in depression and suicide, *J. Psychiatr. Res.* 68 (2015) 176–185.
- [2] World Health Organization Depression, WHO, Geneva, 2017.
- [3] K. Kendler, L.M. Karkowski, C.A. Prescott, Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression, *Am. J. Psychiatry* 156 (6) (1999) 837–841.
- [4] D. Liu, K. Xie, Yang, et al., Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats, *Behav. Brain Res.* 264 (2014) 9–16.
- [5] N.N. Ayuob, L.A. El-Din, et al., Can Ocimum basilicum relieve chronic unpredictable mild stress induced depression in mice? *Exp. Mol. Pathol.* 103 (2) (2017) 153–161.
- [6] D.J. Christoffel, S.A. Golden, S.J. Russo, Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders, *Rev. Neurosci.* 22 (5) (2011) 535–549.
- [7] J. Becnel, O. Johnson, J. Luo, D.R. Nässel, C.D. Nichols, The serotonin 5-HT₇ receptor is expressed in the brain of *Drosophila*, and is essential for normal courtship and mating, *PLoS One* 6 (6) (2011) e20800.
- [8] H.Y. Chang, A. Grygoruk, E.S. Brooks, L.C. Ackerson, Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine, *Mol. Psychiatry* 11 (1) (2006) 99–113.
- [9] A.S. Ries, T. Hermanns, B. Poock, R. Strauss, Serotonin modulates a depression-like state in *Drosophila* responsive to lithium treatment, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15738.
- [10] M.D. Jiang, Y. Zheng, J.L. Wang, Drug induces depression-like phenotypes and alters gene expression profiles in *Drosophila*, *Brain Res. Bull.* 132 (2017) 222–231.
- [11] W.S. Neckameyer, A. Nieto, Response to stress in *Drosophila* is mediated by gender, age and stress paradigm, *Stress* 18 (2) (2015) 254–266.
- [12] Z.R. Majeed, E. Abdeljaber, R. Soveland, et al., Modulatory action by the serotonergic system: behavior and neurophysiology in *Drosophila melanogaster*, *Neural Plas.* 2016 (2016) 23.
- [13] E.T. Heinrichsen, G.G. Haddad, Role of high-fat diet in stress response of *Drosophila*, *PLoS One* 7 (8) (2012) e42587.
- [14] H.D. Wang, P. Kazemi-Esfarjani, S. Benzer, Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (34) (2004) 12610–12615.
- [15] K. Malki, Y.S. Mineur, M.G. Tosto, J. Campbell, P. Karia, I. Jumabhoy, et al., Pervasive and opposing effects of unpredictable chronic mild stress (UCMS) on hippocampal gene expression in BALB/cJ and C57BL/6J mouse strains, *BMC Genom.* 16 (2015) 262.
- [16] F. Hirth, *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration, *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 9 (2010) 504–523.
- [17] A.C. Edwards, S.M. Rollmann, T.J. Morgan, T.F.C. Mackay, Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*, *PLoS Genet.* 2 (9) (2006) e154.
- [18] M. Ramin, C. Domocos, D. Slawaska-Eng, Y. Rao, Aggression and social experience: genetic analysis of visual circuit activity in the control of aggressiveness in *Drosophila*, *Mol. Brain* 7 (2014) 55.
- [19] P. Masek, L.A. Reynolds, W.L. Bollinger, C. Moody, A. Mehta, et al., Altered regulation of sleep and feeding contributes to starvation resistance in *Drosophila*

- melanogaster, *J. Exp. Biol.* 217 (17) (2014) 3122–3132.
- [20] M. Kolss, K. Roshan, G.S. Vijendravarma, T.J. Kaweck, Life-history consequences of adaptation to larval nutritional stress in *Drosophila*, *Evolution* 63 (9) (2009) 2389–2401.
- [21] A. Dalpiaz, K. Filosa, P. Caprariis, G. Conte, F. Bortolotti, C. Biondi, et al., Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycosyl conjugate, *Int. J. Pharm.* 336 (2007) 133–139.
- [22] G.M. Slavich, M.R. Irwin, From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression, *Psychol. Bull.* 140 (3) (2014) 774–815.
- [23] K. Koh, W.J. Joiner, M.N. Wu, et al., Identification of SLEEPLESS, a sleep-promoting factor, *Science* 321 (2008) 372–376.
- [24] K. Fischer, A. Dierks, K. Franke, T.L. Geister, M. Liszka, S. Winter, C. Pflicke, Environmental effects on temperature stress resistance in the tropical butterfly *bicyclus anynana*, *PLoS One* 5 (12) (2010) e15284.
- [25] P. Klepsatel, M. Gálíková, Y. Xu, Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 33667.
- [26] B.S. McEwen, Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032 (2004) 1–7.
- [27] F. Chaouloff, Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell Tissue Res.* 354 (1) (2013) 179–190.
- [28] M. Fakhoury, Revisiting the serotonin hypothesis: implications for major depressive disorders, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 2778–2786.
- [29] U.B. Pandey, C.D. Nichols, Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery, *Pharmacol. Rev.* 63 (2011) 411–436.
- [30] Fluoxetine - DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00472>. (Accessed 20 March 2018).
- [31] C.J. O'Kane, *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 7 (2011) 37–60.
- [32] M.E. Denno, E. Privman, B.J. Venton, Analysis of neurotransmitter tissue content of *Drosophila melanogaster* in different life stages, *ACS Chem. Neurosci.* 6 (2015) 117–123.
- [33] E.J. Nestler, M. Barrot, D. Leone, R.J. Eisch, Gold S.J. AJ, L.M. Monteggia, Neurobiology of depression, *Neuron* 28 34 (1) (2002) 13–25.
- [34] C. Chang, A.A. Grace, Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity following chronic mild stress in rats, *Biol. Psychiatry* 76 (3) (2014) 223–230.
- [35] S. Ikemoto, Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex, *Brain Res. Rev.* 56 (1) (2007) 27–78.
- [36] N. Yamagata, T. Ichinose, Y. Aso, et al., Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2) (2015) 578–583 13:112.
- [37] E. Dremencov, M. Mansari, P. Blier, Effects of sustained serotonin reuptake inhibition on the firing of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area, *J. Psychiatr. Neurosci.* 34 (3) (2009) 223–229.
- [38] Y.Z. Zhou, L.L. Lu, Z.F. Li, X.X. Gao, J.S. Tian, L.Z. Zhang, et al., Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 236–244.
- [39] R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature* 266 (1977) 730–732.
- [40] D.A. Slattery, J.F. Cryan, Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents, *Res. Gate* 7 (2012) 1009–1014.
- [41] N.V. Kudryashov, T.S. Kalinina, T.A. Voronina, effects of unpredictable chronic mild stress on the effects of antidepressants in the forced swimming test, *Neurosci Behav Phys* 46 (2016) 601.
- [42] M.E. Page, M.J. Detke, A. Dalvi, L.G. Kirb, I. Lucki, Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test, *Psychopharmacology* 147 (1999) 162–167.
- [43] H.F. Sakr, A.M. Abbas, A. Elsamouidy, F.M. Ghoneim, Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression, *J. Physiol. Pharmacol.* 66 (4) (2015) 515–527.
- [44] O.K. Mammen, D.J. Kolko, P.A. Pilkonis, Negative affect and parental aggression in child physical abuse, *Child Abuse Negl.* 26 (2002) 407–424.
- [45] M.E. Newman, B. Shapira, B. Lerer, Evaluation of central serotonergic function in affective and related disorders by the fenfluramine challenge test: a critical review, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1 (1998) 49–69.
- [46] D. Seo, C.J. Patrick, P.J. Kennealy, Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders, *Aggress. Violent Behav.* 13 (5) (2008) 383–395.
- [47] L. Zwarts, M. Versteven, P. Callaerts, Genetics and neurobiology of aggression in *Dr. Fly* 6 (1) (2012) 35–48.
- [48] C.R. Yang, Y.Y. Bai, C.S. Ruan, et al., Enhanced aggressive behaviour in a mouse model of depression, *Neurotox. Res.* 27 (2) (2015) 129–142.
- [49] S.H. Kennedy, S. Rizvi, Sexual dysfunction, depression, and the impact of antidepressants, *J. Clin. Psychopharmacol.* 29 (2) (2009) 157–164.
- [50] A. Chen, F. Ng, T. Lebestky, A. Grygoruk, C. Djapri, H.O. Lawal, Dispensable, redundant, complementary, and cooperative roles of dopamine, octopamine, and serotonin in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 193 (1) (2013) 159–176.
- [51] F. Giuliano, J. Allard, Dopamine and male sexual function, *Eur. Urol.* 40 (6) (2001) 601–608.
- [52] A. Higgins, M. Nash, A.M. Lynch, Antidepressant-associated sexual dysfunction: impact, effects, and treatment, *Drug Healthc. Patient Saf.* 2 (2010) 141–150.
- [53] G.S. Shankar, Serotonin and sexual dysfunction, *J. Autacoids Horm.* 5 (2015) e129.
- [54] N.L. Keltner, K.M. McAfee, C.L. Taylor, Mechanisms and treatments of SSRI-induced sexual dysfunction, *Perspect. Psychiatr. Care* 38 (3) (2002) 111–116.
- [55] H.N. Bataineh, T. Daradka, Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats, *Neuro Endocrinol. Lett.* 28 (2007) 321–327.
- [56] S. Wan, M. Xu, L. Hu, T. Yan, B. He, F. Xiao, K. Bi, Y. Jia, Schisandrin rescues depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress via GDNF/ERK1/2/ROS and PI3K/AKT/NOX signaling pathways in mice, *Psychiatry Res.* 257 (2017) 230–237.
- [57] Y. Zhang, G. Liu, J. Yan, B. Li, D. Cai, Metabolic learning and memory formation by the brain influence systemic metabolic homeostasis, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6704.
- [58] C. Hu, Y. Luo, H. Wang, S. Kuang, G. Liang, et al., Reavaliação das inter-relações entre os testes comportamentais em ratos expostos ao estresse leve crônico imprevisível, *PLoS One* 12 (9) (2017) e0185129.
- [59] S. Marella, K. Mann, K. Scott, Dopaminergic modulation of sucrose acceptance behavior in *Drosophila*, *Neuron* 73 (5) (2012) 941–950.
- [60] M.G. Vučković, R.I. Wood, D.P. Holschneider, A. Abernathy, D.M. Togasaki, et al., Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of Basal Ganglia injury, *Neurobiol. Dis.* 32 (2) (2008) 319–327.
- [61] G. Ossowska, Z. Danilczuk, B. Klenk-Majewska, L. Czajkowski, I. Zebrowska-Lupina, Antidepressants in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced deficit of fighting behavior, *Pol. J. Pharmacol.* 56 (3) (2004) 305–311.
- [62] J.Y. Jeong, D.H. Lee, S.S. Kang, Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice, *Endocrinol. Metab.* 28 (4) (2013) 288–296.
- [63] T.N. Wise, D.G.S. Perahia, B.A. Pangallo, W.G. Losin, C.G. Wiltse, Effects of the antidepressant duloxetine on body weight: analyses of 10 clinical studies, *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 8 (5) (2006) 269–278.
- [64] J. Crawley, F.K. Goodwin, Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 167–170.
- [65] J.C. Ballenger, Anxiety and depression: optimizing treatments, *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 2 (3) (2000) 71–79.
- [66] A. Jindal, R. Mahesh, S. Bhatt, Etazolate rescues behavioral deficits in chronic unpredictable mild stress model: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and brain-derived neurotrophic factor level, *Neurochem. Int.* 63 (5) (2013) 465–475.
- [67] F. Mohammad, et al., Ancient anxiety pathways influence *Drosophila* defense behaviors, *Curr. Biol.* 26 (2016) 981–986.
- [68] M. Farhan, D.J. Haleem, Anxiolytic profile of fluoxetine as monitored following repeated administration in animal rat model of chronic mild stress, *Saudi Pharm. J.* 24 (5) (2016) 571–578.

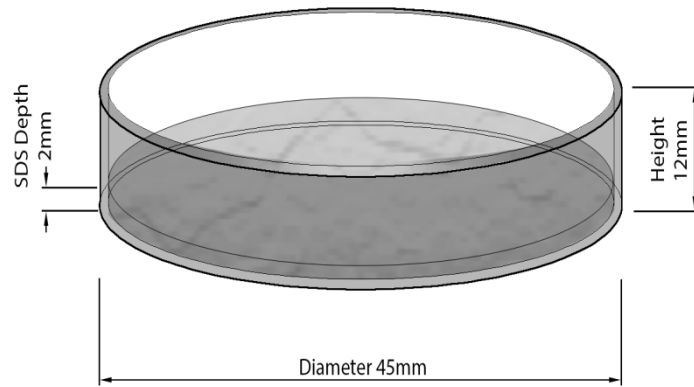
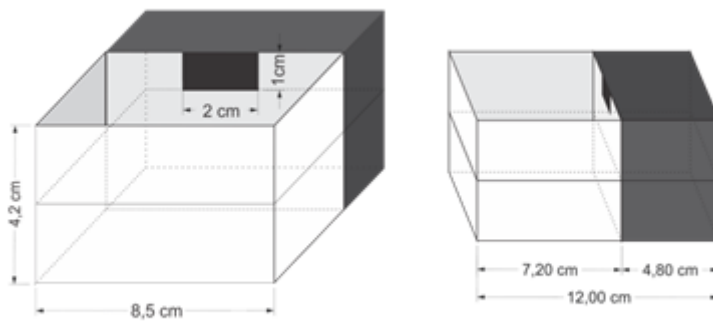
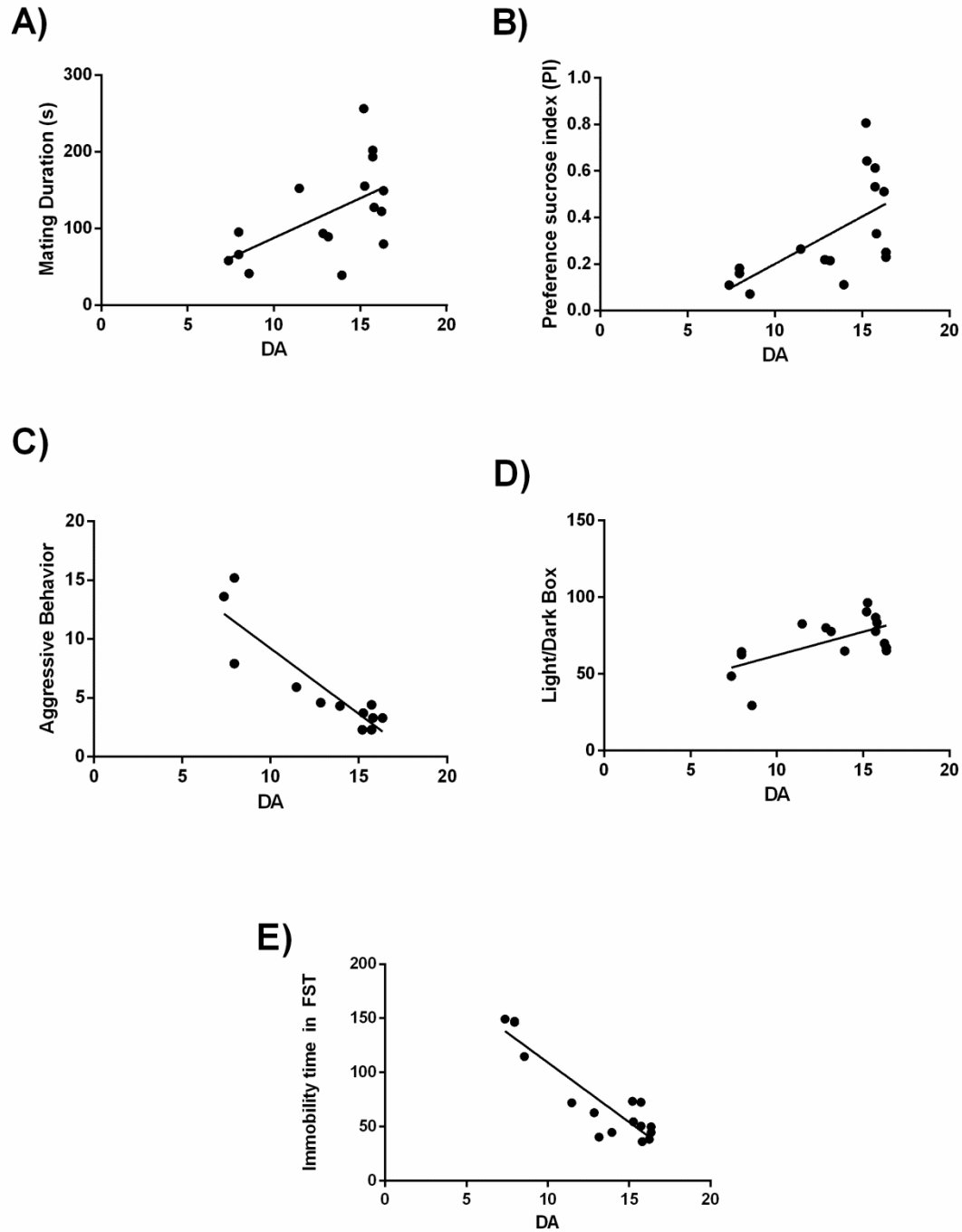
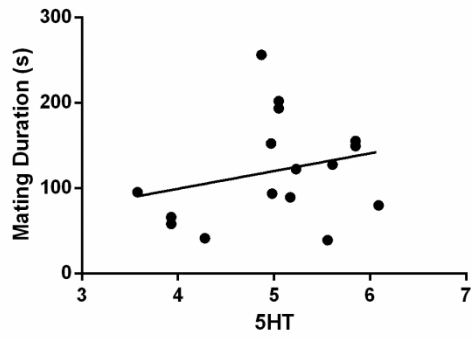
SUPPLEMENTARY MATERIAL**Figure S1.** Arena for Forced Swim Test.**Figure S2.** Light/dark assay box.

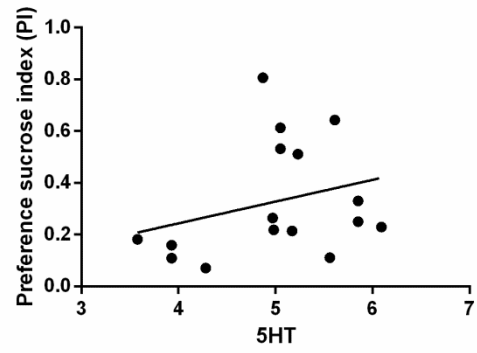
Figure S3. Effects of CUMS on Pearson's correlation analysis between monoamines and behaviors depressive like paradigms. Related behaviors dopamine (DA) (Graphic A-E) and related behaviors serotonin (5HT) (Graphic F-J).



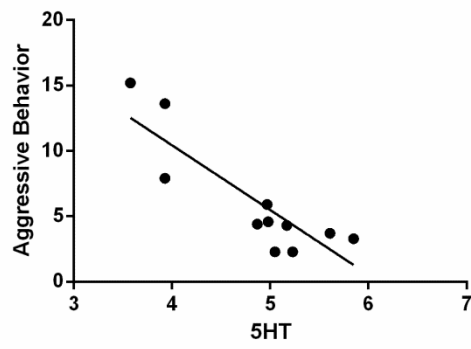
F)



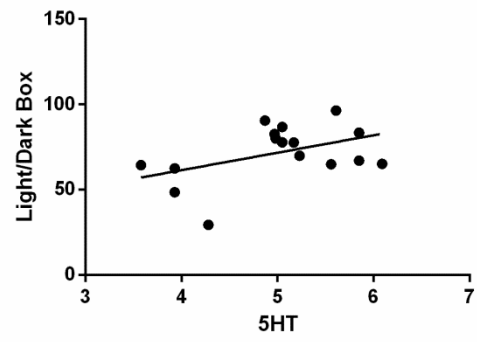
G)



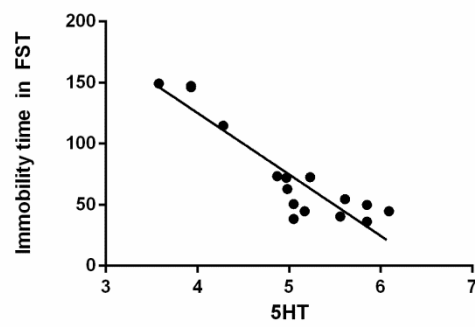
H)



I)



J)



5.2. MANUSCRITO I

Este manuscrito está dividido em *Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*, na forma em que foi submetido à revista *Stress*.

“ γ -oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster*”

Stéfani Machado Araujo, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Márcia Rósula Poetini, Mustafa Munir Mustafa Dahleh, Shanda de Freitas Couto, Franciane Cabral Pinheiro, Luana Barreto Meichtry, Elize Aparecida Santos Musachio, Bruna Piaia Ramborger, Rafael Roehrs, Gustavo Petri Guerra, Marina Prigol



Edited by James P. Herman
Volume 20
Number 5
2017
ISSN 1025-3816 (print)
ISSN 1360-0567 (online)



Stress



Edited by James P. Herman

ISSN 1021-0758 print
ISSN 1362-3019 online


γ -oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster*

Journal:	<i>Stress</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Araujo, Stifani; UNIPAMPA Bortolotto, Vandrezza; UNIPAMPA Poetini, Márcia; UNIPAMPA Dahleh, Mustafa; UNIPAMPA Couto, Shanda; UNIPAMPA Pinheiro, Franciane; UNIPAMPA Meichtry, Luana; UNIPAMPA Musachio, Elize; UNIPAMPA Ramborger, Bruna; UNIPAMPA Roehrs, Rafael; UNIPAMPA Guerra, Gustavo; UNIPAMPA Prigol, Marina; UNIPAMPA, ;
Keywords:	chronic unpredictable stress, behaviors, <i>Drosophila</i> , serotonin, dopamine, octopamine

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/gstr> Email: ISTS-peerreview@journals.tandf.co.uk

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SCHOLARONE™
Manuscripts

01/20/2020

Dear Editor,

We are sending you our manuscript titled " **γ -oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster***" by Stéfani Machado Araujo, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Márcia Rósula Poetini, Mustafa Munir Mustafa Dahleh, Shanda de Freitas Couto, Franciane Cabral Pinheiro, Luana Barreto Meichtry, Elize Aparecida Santos Musachio, Bruna Piaia Ramborger, Rafael Roehrs, Gustavo Petri Guerra, Marina Prigol, to be considered for publication, as an article in *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*.

This study was conducted to investigate the possible antidepressant effect of γ -oryzanol in the chronic unpredictable mild stress induced depressive model in *Drosophila melanogaster*. The manuscript and the data reported here have not been published previously and they are not under consideration for publication elsewhere. All listed authors have contributed significantly to the manuscript and consent to their names on the manuscript. There is no conflict of interest in the conduct and reporting of research (e.g., financial interests in a test or procedure, funding by pharmaceutical companies for drug research, etc.).

All authors have read the manuscript and have agreed to submit it in its current form for consideration for publication in the Journal.

I thank you in advance for your kind consideration.

Sincerely,

Marina Prigol
Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui
Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar,
Itaqui - Rio Grande do Sul - Brasil
CEP 97650-000
E-mail addresses: marinaprigol@gmail.com (M.Prigol)

- 1
2
3
4
5 1 γ -oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild
6 2 stress model of depression in *Drosophila melanogaster*
7
8 3
9
10 4 **Running title:** Antidepressant effect of γ -oryzanol
11 5
12
13 6 Stifani Machado ARAUJO^a araujofani@gmail.com
14 7
15 8 Vandrezza Cardoso BORTOLOTO^a vandreza.bortolotto@gmail.com
16 9
17 10 Márcia Rósula POETINI^a marciapoetini@gmail.com
18 11
19 12 Mustafa Munir Mustafa DAHLEH^a mustafamunir25@gmail.com
20 13
21 14 Shanda de Freitas COUTO^{a,b} shandacouto@gmail.com
22 15
23 16 Franciane Cabral PINHEIRO^a fcabralpinheiro@gmail.com
24 17
25 18 Luana Barreto MEICHTRY^a luanabm93@gmail.com
26 19
27 19 Elize Aparecida Santos MUSACHIO^a elizemusachio@gmail.com
28 20
29 20 Bruna Piaia RAMBORGGER^c bruna-pr@hotmail.com
30 21
31 21 Rafael ROEHRSC^c rafael.roehrs@gmail.com
32 22
33 22 Gustavo Petri GUERRA^a petriguerra@gmail.com
34 23
35 24 Marina PRIGOL^{a,b,*} marinaprigol@gmail.com
36 25
37 26
38 27 ^aLaboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations Applied to Bioactives
39 28 Molecules- LaftamBio- Federal University of Pampa, Itaqui, RS, Brazil.
40 29
41 29 ^bDepartment of Nutrition, Federal University of Pampa, Itaqui, RS, Brazil.
42 30
43 31 ^cInterdisciplinary Group of Research in Teaching Practice, Federal University of Pampa,
44 32 Uruguaiana, RS, Brazil.
45 33
46 33 *Corresponding author at: Laboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations
47 34 Applied to Bioactive Molecules- LaftamBio- Federal University of Pampa, Itaqui, CEP
48 35 97.650-000, RS, Brazil.
49 36
50 36 E-mail addresses: marinaprigol@gmail.com (M.Prigol)
51 37
52 37
53 38
54 38
55 38
56 38
57 38
58 38
59 38
60 38

Word Count: 6740 words

ABSTRACT

Chronic unpredictable mild stress (CUMS) is a valid model for inducing depression-like symptoms in animal models, causing predictive behavioral, neurochemical and physiological responses to this condition. The aim of this work is to evaluate the possible antidepressant effect of γ -oryzanol (ORY) in the CUMS-induced depressive model in male *Drosophila melanogaster*. Therefore, we will use the CUMS protocol in order to continue the study previously conducted by our research group, mimicking a depressive state in these insects. Male flies (n=50/group) were subjected to various stressors according to a 10-day randomized schedule and concomitantly treated with ORY or fluoxetine (FLX). After the experimental period, in vivo behavioral tests were performed (open field, forced swimming, aggressiveness test, mating test, male virility, sucrose preference index and light/dark test) and ex vivo analyzes measuring serotonin (5HT), dopamine (DA), octopamine (OCT) levels and body weight. We report here that ORY-treated flies and concomitant exposure to CUMS did not exhibit obvious behaviors such as prolonged immobility or increased aggressive behavior, reduced male mating and virility behavior, and anxiolytic behavior, in contrast to ORY, not altering sucrose preference and body weight flies exposed to CUMS. Regarding the monoamine levels in the heads of the ORY flies, it was effective in preventing 5HT and OCT reduction and we observed partial protection of ORY for DA levels. The data presented here are consistent and provide evidence for the use of ORY as a potential antidepressant compound.

Keywords: chronic unpredictable stress, behaviors, *Drosophila*, serotonin, dopamine, octopamine.

Lay summary

Flies treated with ORY and concomitant exposure to CUMS did not exhibit obvious depressive-like behaviors, such as prolonged immobility in the FST or increased aggressive behavior, or reduced mating behavior, male virility or anxiolytic behavior. ORY did not change the preference for sucrose and body weight of flies, in relation to the levels of monoamines in the heads of flies, ORY was effective in preventing reduction of 5HT and OCT and we had partial protection of ORY for reducing the levels of DA.

1. INTRODUCTION

Stress is an important precipitating factor of depressive pathology, the changes in the various body systems that occur in depression are similar to those observed in response to stress, producing a cascade of physiological and psychological effects (Biala et al., 2018). Exposure to unpredictable environmental stress is widely recognized as a major determinant of risk and severity in neuropsychiatric disorders such as depressive disorder, anxiety and post-traumatic stress disorder (Anderson et al., 2019). The model CUMS was originally designed for rodents since the early 1980s and a similar model using naturalist stressors was adapted for the *Drosophila melanogaster* fruit fly by Araujo et al., (2018) thus increasing the possibilities in identifying and defining behavioral phenotypes for a better understanding of the pathophysiology of depression.

The *Drosophila melanogaster* fruit fly alternative animal model it has proven to be a very effective model system meeting some criteria for the validity of an animal model of depression (face validity, construction validity and predictive validity). It is useful for investigating the molecular, genetic and epigenetic factors that can lead to pathways of depression and mechanisms of depressive pathology, in addition, about 70% of human disease genes have functional orthologs in *Drosophila*, they maintains mechanisms very similar to the release, reuptake and storage of neurotransmitters, including 5HT, DA, OCT, glutamate, acetylcholine and gamma-aminobutyric acid (Nichols, 2006). Moreover, this insect has been described to model neuropsychiatric disorders such as autism, schizophrenia, attention deficit disorder, hyperactivity (Jiang et al., 2017; Zhu et al., 2008).

According to Antoniuk et al. (2019) the pharmacological action of antidepressants is often delayed and these drugs may induce side effects that impair the continuity of treatment, therefore, taking into account the limitations of existing medicines, it is necessary to develop improved therapies, such as the use of compounds with natural bioactive, such as ORY. The

1
2
3
4 102 ORY is a natural compound obtained from rice bran oil, effective and free of adverse effects,
5
6 103 and has low cost, like other herbal compounds that are used empirically in folk medicine, thus
7
8 104 providing us with effects satisfactory in antidepressant therapy. The ORY has gained
9
10 105 particular interest, as it is reported in the literature for its benefits such as neuroprotective
11
12 106 activity (Araujo et al., 2015), antioxidant activity (Wang et al., 2002) and there is evidence of
13
14 107 its antidepressant effect in a study by Mehdi et al. (2014), which evaluated the effect of
15
16 108 administration of rice bran oil for six weeks in stressed rats, observing a reduction in
17
18 109 behavioral and neurochemical deficits, showing to be beneficial for memory function and
19
20 110 useful in combating stressful events in everyday life. In this study, we hypothesized that ORY
21
22 111 could exhibit antidepressant properties in widely accepted predictive models of depression,
23
24 112 such as forced swim test, sucrose preference test, and other behavioral tests that are used to
25
26 113 screen for new antidepressant drugs. Thus, the aim of this work is to evaluate the possible
27
28 114 antidepressant-like effect of ORY in the CUMS-induced depressive model in male
29
30 115 *Drosophila melanogaster*.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

117 2. MATERIAL AND METHODS

118 2.1. Chemicals

119 ORY was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and
120 FLX hydrochloride was obtained from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). All other
121 reagents were purchased from the Laboratory Laftambio Pampa Campus of UNIPAMPA
122 Itaquí.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

125 2.2. Fly strain and culture conditions

126 The wild-type of *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) was obtained from the
127 National Species Center, Bowling Green, Ohio, USA. Flies, both sexes, were kept in 4.5 x 8.5
128 cm bottles containing 10 ml standard cornmeal medium, packed under a light/dark cycle (12 h
129 light/12 h dark), under temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and humidity (60%) controlled.

130 2.3. Experimental design and Stress Protocol

131 For treatments, male flies aged 2 days were used, they were submitted to the CUMS
132 regimen concurrently with treatment with ORY or FLX for 10 days. The flies were divided
133 into four or *six groups (n = 50/group): (1) CONTROL, (2) CUMS, (3) ORY (25 μM), (4)
134 ORY (25 μM) + CUMS, (5)*FLX (10 μM), (6)*FLX (10 μM) + CUMS. Dietary treatment
135 during the 10 days consisted of 1% w/v yeast beer, 2% w/v sucrose, 1% w/v milk powder, 1%
136 agar w/v, and 0.08% w/v methylparaben. ORY was diluted in 1% sucrose (vehicle) and had as
137 final concentration 25 μM by (Araujo et al., 2015). For positive control *FLX was used only
138 in forced swim test (immobility time); hatching (male virility test), sucrose preference test and
139 body weight assessment), and it was diluted in 1% sucrose and had the final concentration 10
140 μM (Araujo et al., 2018).

141 To implement the CUMS paradigm, flies were subjected to various stressors in a
142 chronic and unpredictable manner, according to a randomized scheme over a period of 10
143 days described by (Araujo et al., 2018). Stressors in the CUMS regimen were based on
144 previously described protocol including: (a) cold stress (0°C , 30 min; adapted (Araujo et al.,
145 2018), (b) starvation stress (5% sucrose on paper filter for 58 h), (c) heat stress (36°C , 4 h)
146 and (d) sleep deprivation (light/dark cycle inversion). In (b) the flies of the ORY and FLX
147 groups continue to receive treatment on the filter paper for 58h. After the end of CUMS, the

insects undergo behavioral tests, all performed between 10AM and 4PM, and subsequent neurochemical analyzes predicting the depressive model.

2.4. Forced Swim Test (FST)

This test was performed according to Neckameyer and Nieto, (2015) with some adaptations of (Araujo et al., 2018). Individual cameras were used for each fly of each experimental group, each chamber was filled with 4 mL of 0.04% SDS. The latency time to first immobility, swimming time, immobility time and combat number of each fly were recorded during five minutes of test. To establish that the general locomotor activity for each fly was not compromised by treatment or stress, each fly was removed from the FST and placed on a napkin and evaluated for walking and exiting ability immediately. Insects tested that were unable to walk or climb normally after the tests were excluded from our final analysis. Ten flies were tested for each experimental group, and four independent experiments were performed. To evaluate the locomotor activity the open field test was performed, where twenty-five flies from each experimental group, they were placed in a Petri dish divided into quadrants of one square centimeter, acclimatized for five minutes and the resulting fly exploratory activity was counted in sixty seconds according to the number of squares crossed at this time (Hirth, 2010 with adaptations by Araujo et al., 2015). The total number of flies (n=25/group) represents the sum of five independent experiments.

2.5. Aggressiveness Test

Flies from each experimental group were deprived of food for ninety minutes before the start of the test, after two males from each group were transferred (without anesthesia) to a circular combat chamber containing 5% sucrose-soaked filter paper in the center. These were allowed to acclimate for two minutes. After the acclimatization period, the flies were observed for five minutes and aggressive matches were counted, the score matched the

1
2
3
4 172 number of aggressive matches used by each pair. Ten pairs from each group were observed,
5
6 173 representing five independent experiments (Edwards et al., 2006).
7
8
9

10 174 *2.6. Mating Behavior and Male Virility Assessment*

11
12
13 175 To evaluate the mating behavior of the flies, one male from each experimental group
14
15 176 was matched with one virgin control female, the couple were transferred to a circular arena
16
17 177 covered by a petri dish, kept at 25 ± 1 °C and 60% humidity and allowed to acclimate for two
18
19 178 minutes. Then, the ten-minute test was started, which recorded the latency until the first
20
21 179 touch, the total copulation time and the total mating time. Five independent experiments were
22
23 180 performed. Method described by (Becnel et al., 2011) with adaptations of (Araujo et al.,
24
25 181 2018). To assess male virility or the ability of males in the experimental groups to mate
26
27 182 sixteen virgin females were transferred to four jars with 10 ml of standard cornmeal medium
28
29 183 and three males from each experimental group were introduced after the 10-day experimental
30
31 184 period. Four days later, the males were discarded and the females were transferred to new
32
33 185 standard feed jars and a small drop of yeast to stimulate oviposition. After 72 h, these females
34
35 186 were discarded and the cumulative hatching rate until no more flies hatched (births) were
36
37 187 determined for each group.
38
39
40
41
42

43 188 *2.7. Sucrose Preference Index (PI)*

44
45
46 189 Thirty flies from each experimental group were deprived of food for ninety minutes
47
48 190 and then transferred without anesthesia to the capillary feeding test that measures volumetric
49
50 191 consumption and tests the feeding preference of flies. The flies were left for six hours in a
51
52 192 glass tube to drink two different solutions (water and 5% sucrose) that were in two separate
53
54 193 capillaries (Micron Glass-Vici Ltd., 1.5 mm, filament) placed at a 45° angle. After six hours,
55
56 194 total fly consumption was measured by dividing the volume consumed in each capillary by
57
58 195 the number of live flies in the flask. The PI was calculated by dividing the difference in the
59
60

196 volume of fluid consumed in the two capillaries by the total volume of fluid consumed. Four
 197 independent experiments were performed (Masek et al., 2014). To measure body weight flies
 198 were transferred to 1% agar vials overnight. In the morning 10 flies from each group were
 199 anesthetized and weighed in tared tubes, weighed on a 1 µg resolution scale. Three
 200 independent experiments were performed (Gill et al., 2015).

201 2.8. Light/dark test

202 Ten flies from each experimental group were used for the light/dark test, which
 203 consists of a box with two compartments one dark and one illuminated (light) connected by
 204 an opening. The flies were transferred to the test box and allowed to acclimate for five
 205 minutes, after each fly was placed in the center of the lighted box facing the opening, and
 206 were observed for three minutes, the amount of time spent in the light compartment was
 207 accounted for. Five independent experiments were performed. This test was performed as
 208 described by (Neckameyer and Nieto, 2015), with some adaptations by (Araujo et al., 2018).

209 2.9. Measurement of Monoamines 5HT, DA and OCT

210 As described by Soares et al. (2019), the levels of these monoamines were determined
 211 by high performance liquid chromatography (HPLC YL9100). Thirty flies per treatment
 212 group had their heads homogenized in 400 µl NaCl (0.9%) and 0.5 M HCl (96: 4% v/v),
 213 followed by centrifugation at 7840 g for 10 minutes at 4 °C, 20µl of supernatant formed after
 214 centrifugation was used to determine 5HT, DA and OCT levels. These were injected into the
 215 HPLC system by an auto sampler and the system consisted of a vacuum degasser and a
 216 quaternary pump connected to a reverse phase column (Fusion-RP 80 Å 250 x 4.60 mm;
 217 Phenomenex) together with a diode array detector (DAD). Detection was performed at 198
 218 nm. Four independent experiments were performed.

2.10. Statistical analysis

Prior to primary analysis, normality was assessed with the Shapiro-Wilk test and subsequently performed with one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc Tukey or Bonferroni test, respectively, when appropriate. In the case of non-normal data distribution, the nonparametric Scheirer-Ray-Hare test was used. The main effects are presented only when the first order interaction was not significant. The hatching percentage was determined by Kaplan-Meier curve and Logrank Mantel-Cox statistical significance. Descriptive statistics were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Probability values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered statistically significant. Analyses were performed on GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. ORY treatment and CUMS exposure do not affect *Drosophila* locomotor capacity

To evaluate the locomotor activity and exploratory capacity of *Drosophila* we used the open field test, where we obtained measurements of the entire trajectory traveled by the fly in a circular arena. Post hoc analysis showed that the exploratory behavior of flies was similar in all experimental groups (**Figure 1**). Two-way ANOVA revealed no interaction between CUMS and ORY (25 μ M) [$F_{(1,16)} = 1,314$; $P = 0.2685$].

3.2. ORY treatment prevents behavioral despair behavior in forced swim test after *Drosophila melanogaster* exposure to CUMS

Post hoc analysis showed that flies exposed to CUMS had a shorter latency time until first immobilization (**Figure 2A**), a shorter swimming time (**Figure 2B**) and an increased immobility period (**Figure 2C**) compared to animals in the control group. The group that received the ORY (25 μ M) treatment was able to increase the swimming time and prevent the increase in the fly immobility time. Also to evaluate the immobility time of the flies, a pharmacological approach with FLX antidepressant was used as a positive control, which showed not to protect against the increase of CUMS-induced immobility time. The number of bouts were not significantly different between the groups (**Figure 2D**). Two-way ANOVA revealed significant interactions between groups at latency to first immobility [$F_{(1,12)} = 4,816$,

P = 0.0486; **Figure 2A**], at swimming time [$F_{(1,12)} = 5,351$, $0.01 < P < 0.025$; **Figure 2B**], and immobility time [$F_{(2,18)} = 5.862$, $0.01 < P < 0.025$; **Figure 2C**], but showed no significant interaction between groups in the number of bouts [$F_{(1,12)} = 0.3095$; $P = 0.5882$; **Figure 2D**].

3.3. ORY treatment prevents Aggressive behavior after exposure of *Drosophila melanogaster* to CUMS

Post hoc analysis showed that flies exposed to CUMS had a higher number of aggressive events compared to flies in the control group. Flies that were treated with ORY (25 μ M) and subsequently exposed to CUMS showed decreased aggressive behavior compared to the CUMS group alone (**Figure 3**). Two-way analysis ANOVA showed a significant interaction between groups [$F_{(1,16)} = 5,910$, $0.01 < P < 0.025$].

3.4. ORY treatment prevents behavioral changes in mating test and male virility after exposure of *Drosophila melanogaster* to CUMS

Post hoc analysis revealed that CUMS group flies had deficits in mating behavior, such as increased first-touch latency, decreased mating time and mating duration compared to the control group. Treatment with ORY (25 μ M) and concomitant exposure to CUMS decreases latency time until first touch, partially increases male fly copulation time and increases mating time (**Figure 4A-C** respectively). Two-way ANOVA revealed significant interactions between groups regarding latency until first touch, [$F_{(1,12)} = 19.06$, $P = 0.0009$; **Figure 4A**], the duration of copulation [$F_{(1,12)} = 11.10$, $P = 0.0060$; **Figure 4B**] and mating duration [$F_{(1,12)} = 19.67$, $P = 0.0008$; **Figure 4C**]. Regarding the assessment of male fertility the results show that there was a reduction in hatching up to 34 days of observation in the groups exposed to CUMS alone and concomitant treatment with FLX. However, treatment with ORY and concomitant exposure to CUMS was able to increase the number of fly hatching, demonstrating the potential of ORY to protect male virility. The log-rank test (Mantel-Cox) indicated that there was a significant difference in hatching percentage (**Figure 4D**; $P < 0.0001$).

3.5. ORY treatment prevents partially anecdotal behavior after exposure of *Drosophila melanogaster* to CUMS

Post hoc analysis of sucrose preference index indicated that the CUMS group had lower sucrose preference when compared to the control group. The ORY (25 μ M) + CUMS and FLX (10 μ M) + CUMS groups showed partially significant efficacy in restoring the

1
2
3
4 278 anhedonia paradigm caused by CUMS (**Figure 5**). Two-way ANOVA showed significant
5
6 279 interaction between groups [$F_{(2,18)} = 8.271$, $P = 0.0028$].
7

8
9 280 *3.6. ORY treatment does not affect body weight after exposure of Drosophila melanogaster to*
10 281 *CUMS*

11
12 282 Post hoc analysis showed that there was a change in body weight of flies exposed to
13 283 CUMS compared to the control group (**Figure 6**). ORY treatment showed no effect on body
14 284 weight of flies after ten days of stress and FLX treatment did not prevent CUMS-induced fly
15 285 weight loss. Two-way ANOVA does not indicate significant interaction between groups [$F_{(2,6)}$
16
17
18 286 = 1,334; $P = 0.3316$].
19
20

21
22 287 *3.7. ORY treatment prevents anxiolytic behavior after exposure of Drosophila melanogaster*
23 288 *to CUMS*

24
25 289 Post hoc analysis shows that flies exposed to CUMS spent less time in the light box
26 290 compartment compared to control group flies. In the group treated with ORY (25 μ M) and
27 291 exposed to CUMS, the time spent in the light compartment was longer than that of the CUMS
28 292 group alone (**Figure 7**). Two-way ANOVA revealed significant interaction between groups
29
30 293 [$F_{(1,16)} = 5,378$, $P = 0.0340$].
31
32
33

34 294 *3.8. ORY treatment prevents reduction of monoamine levels following exposure of Drosophila*
35 295 *melanogaster to CUMS*

36
37
38 296 Post hoc analysis showed that exposure of flies to CUMS caused a reduction in 5HT, DA and
39 297 OCT levels in fly heads compared to the control group. The flies treated with ORY (25 μ M)
40 298 and subsequently exposed to CUMS demonstrated prevention against reduction of
41 299 serotonergic and octopaminergic levels, while dopaminergic levels in the head of flies were
42 300 partially restored (**Figure 8A-C**). Two-way ANOVA revealed no significant interaction at
43 301 5HT levels in the fly heads between groups [$F_{(1,10)} = 1.154$; $P = 0.3079$; **Figure 8A**]. Two-way
44 302 ANOVA indicated significant interaction between groups regarding DA and OCT levels in fly
45 303 heads [$F_{(1,12)} = 18.04$; $P = 0.0011$; **Figure 8B**]; [$F_{(1,12)} = 4,447$; $P = 0.0567$; **Figure 8C**]
46 304 respectively.
47
48
49

50 305 **4. DISCUSSION**

51
52 306 The objective of this work was to evaluate the possible antidepressant effect of ORY
53 307 in the depressive model induced by CUMS in male *Drosophila melanogaster*. We report here
54
55
56
57
58
59
60

that the flies treated with ORY and the concomitant exposure to CUMS did not exhibit obvious neurochemical behaviors and changes, predictive of depressive behavior.

In insects the physiological stress responses involve the action of OCT this acts as neurotransmitter, neuromodulator and neurohormone in the *Drosophila* nervous system. In our results, flies exposed to CUMS had reduced levels of OCT because, just like adrenaline, OCT mediates the initial stress response reaching a peak activity in 2 minutes and having a half-life of 15 minutes or less in insect hemolymph (Rolff & Reynolds 2009; Raabe 1989). Therefore, our exposure of flies to chronic stress (for 10 days) results in a decrease in brain OCT levels, the exact mechanisms responsible for decreased OCT release are not well understood, we believe our results are possibly related to a depletion in the synthesis of OCT and its storage which may reflect a reduction in its levels in hemolymph. ORY treatment in flies concomitantly exposed to CUMS prevented a reduction in brain OCT levels, which may have been reflected in the release of this hemolymph neurohormone by mediating the response to fight or flight stress (Even et al., 2012).

In their study, Mehdi et al. (2014) submitted rats to a restriction stress protocol and used rice bran oil rich in antioxidants such as ORY, the treatment prevented the reduction of 5HT, demonstrating a neuroprotective effect of ORY. In addition, Zeni et al. (2012) performed acute oral administration of ferulic acid (antioxidant portion of ORY) in mice, which were subjected to tests widely used to screen antidepressants, so ORY demonstrated interaction with N-methyl-D receptor-aspartate, influencing serotonergic neurotransmission, and glutamatergic important in neurobiology and in the treatment of depression. In addition, we can mention the study by Chen et al. (2015) in which ORY acts in the inhibition of monoamine oxidase A (MAO-A) in the brain regions, contributing to high levels of monoamines and consequently antidepressant effects. While it is clear that the role of

1
2
3
4 332 monoamine oxidation in flies has not been so fully documented and that an MAO equivalent
5
6 333 is absent in the *Drosophila* genome, MAO-like activity in the use of active drugs as
7
8 334 monoamine oxidase inhibitors in mammals is reported it also shows real-time activity in flies
9
10 335 (Yellman et al., 1997). Therefore, ORY has a possible useful and potent natural antidepressant
11
12
13 336 approach in the treatment of depression.

14
15
16 337 For the validation of the behavioral tests mentioned in this article, it is important that
17
18 338 there are no effects of treatments on the locomotor activity of the flies. Therefore, when
19
20 339 performing the open field test, we demonstrate that the changes in the tests presented here are
21
22 340 not related to a stimulating action or stressful CUMS or ORY. Behavioral experiments are
23
24 341 crucial to assess whether the compound exhibits antidepressant activity and the results of the
25
26 342 present study showed that ORY was consistently effective in assessing its effectiveness in
27
28 343 FST, a classic behavioral model that has face value, as a diminished struggle can be
29
30 344 interpreted as lack of motivation or despair in *Drosophila*, behaviors common among patients
31
32 345 with depression, so ORY produced a reduction in immobility time, demonstrating a possible
33
34 346 antidepressant activity of ORY. The ORY shows greater efficiency than the classic FLX
35
36 347 antidepressant, which had no anti-immobility effect. The same was observed in the work of
37
38 348 Yabe et al., (2010) who subjected rats to the protocol of chronic stress and used treatment
39
40 349 with ferulic acid, which was able to increase the expression of the hippocampal brain-derived
41
42 350 neurotrophic factor (BDNF). Therefore, we believe that ORY acts by promoting an increase
43
44 351 in the expression of *Drosophila Neurotrophin 1* (DNT1) mRNA that presents homology with
45
46 352 mammalian BDNF and, thus, contributes to the increase of neuronal and synaptic plasticity
47
48 353 (Zhu et al., 2008).

49 354 According to Mosienko et al. (2012) depressive disorders are characterized by
50
51 355 destructive behaviors, such as aggression, violence, impulsivity and anger attacks and have
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 356 been reported to be associated with serotonin dysfunction, 5HT responds quickly to stress and
6
7 357 plays an important role in inhibiting the regulation of aggressive interactions. Flies in the
8
9 358 CUMS group developed depressive behavior with a greater number of aggressive encounters
10
11 359 than those in the control group. In their study (Hoyer et al., 2008) reports that OCT, a
12
13 360 neurotransmitter known to modulate aggressive behavior in several species of insects, when
14
15 361 their levels are reduced in male mutant flies without OCT, it shows abolished aggressive
16
17 362 behavior, in our work we found reduced levels of OCT in the stressed group, this fact did not
18
19 363 reflect in the less aggressive behavior of the flies. ORY treatment was effective in preventing
20
21 364 aggressive behavior, we credit this fact to the restoration of 5HT levels, labeled as "civilizing
22
23 365 neurohumor" and compounds like ORY that demonstrate the ability to prevent the depletion
24
25 366 of this neurotransmitter is able to control adaptive and pathological forms of aggressive
26
27 367 behavior in flies (Takahashi and Miczek, 2014).
28
29
30
31

32
33 368 Psychophysiological changes associated with the sexual response cycle can be a
34
35 369 symptom of depressive illness. In our work, we observed a reduction in mating behavior in
36
37 370 flies exposed to CUMS. This fact was reflected in our assessment of male virility, that is, the
38
39 371 interest that males would have to mate with virgin control females, males from the CUMS
40
41 372 group and the FLX group had a decrease in offspring, which point to decreased sexual desire,
42
43 373 erectile difficulties and ejaculation as a symptom of a depressive illness or side effect of
44
45 374 antidepressants, such as FLX, which agrees with what was described by Habr et al. (2009)
46
47 375 and Araujo et al. (2018). ORY treatment was effective in increasing the behavior of mating
48
49 376 and birth of offspring, we believe that the effect of ORY is associated with its partial
50
51 377 prevention of decreased monoamine levels, in which several studies suggest that DA plays a
52
53 378 central role in expression male sexual behavior, both in terms of motivation and copulatory
54
55 379 capacity in mammals (Hull et al., 2004). According to Becnel et al. (2011), 5HT is involved in
56
57 380 male sexual orientation of *Drosophila* and modulates male arousal and visual perception
58
59
60

1
2
3
4 381 during heterosexual mating, in his study, after pharmacological and genetic approach,
5
6 382 described that the activity of the 5-HT₇Dro receptor is essential for normal shearing and
7
8 383 mating behavior, where it appears to mediate levels of interest in males and females.
9
10

11
12 384 The lost preference for fresh water (anhedonia) is interpreted as a depressive
13
14 385 symptom; in our results, only the CUMS group exhibited anecdotal behavior. Anhedonia is
15
16 386 considered a particularly difficult symptom to treat, our treatment with ORY was not effective
17
18 387 in reducing anhedonia in flies exposed concomitantly to CUMS, we can infer that this is the
19
20 388 result of partial protection in reducing the levels of DA performed by ORY, since the group of
21
22 389 dopaminergic neurons in the protocerebral anterior medial are responsible for the sugar
23
24 390 reward signaling in *Drosophila*, as reported by Liu et al. (2012) in their study. OCT is also
25
26 391 involved in insect reward signaling and is necessary for flies to form short-term memories of
27
28 392 sweet-tasting appetite; however, we infer that it is unable to reverse this behavior of
29
30 393 anhedonia because OCT-dependent memories also require DA signaling (Burke et al., 2013).
31
32 394 In addition, current clinical evidence suggests that standard antidepressants, such as FLX, do
33
34 395 not achieve remission in reward processing deficits in the majority of depressed patients with
35
36 396 anhedonia (Price et al., 2009). In our results, we observed a significant difference in body
37
38 397 weight between the control group and the stressed group, we consider this lack of effect of
39
40 398 ORY a beneficial factor, because traditional long-term antidepressant treatments, such as
41
42 399 FLX, result in a reduction in body weight, as demonstrated in the study by Keenan et al.,
43
44 400 (2018).
45
46
47
48
49
50

51
52 401 The light/dark test paradigm has been used to assess behaviors similar to anxiety, an
53
54 402 important element in the (development of) depression, in the present work, flies exposed to
55
56 403 CUMS demonstrated a behavior of centrophobism as reported by Neckameyer and Nieto,
57
58 404 (2015) this can be interpreted as anxiolytic-like behavior. Our treatment group ORY was
59
60

effective in protecting the development of this anxiolytic behavior in flies, since monoaminergic systems play a central role in regulating anxiety-like behaviors, as described by Zarrindast, (2015), and ORY was effective in protecting partial reduction of these monoamines. As described by Antoniuk et al. (2019), the success rates of first-line anxiety treatment drugs as selective 5HT reuptake inhibitors are limited, which demonstrates the importance of effective new natural therapies with few side effects.

5. CONCLUSION

The present study we report that exposure to male *Drosophila melanogaster* flies to CUMS is accompanied by significant changes in the levels of major neurotransmitters involved with depressive pathology and chronic stress response (5HT, DA, OCT), which results in behavioral changes. With prolonged FST immobility time, increased aggressive behavior, decreased mating behavior, and additionally flies showed traits of anxiety behavior. The data presented here provide evidence for the use of ORY as a potential antidepressant therapeutic compound for the treatment of these aforementioned behavioral disorders, as it has been shown that ORY has modulated serotonergic, dopaminergic and octopaminergic systems in the brain regions of CUMS-exposed flies and possibly contribute to synaptic plasticity. Finally, further research will be needed to further clarify the possible mechanisms by which ORY induces a possible antidepressant effect.

Geolocation information

All behavioral procedures of the study were conducted at the Federal University of Pampa Unipampa Campus Itaqui/Brazil at the Laboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations Applied to Bioactives Molecules (LaftamBio). The neurochemical analyzes were performed at the Federal University of Pampa Unipampa Campus

1
2
3
4 430 Uruguiana/Brazil at the Interdisciplinary Group of Research in Teaching Practice, Federal
5
6 431 University of Pampa, Uruguiana, RS, Brazil.
7
8
9 432
10
11
12 433 **Acknowledgments and Funding details**
13
14
15 434 The authors gratefully acknowledge financial support received from Conselho
16
17 435 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (307099/2017-2), and
18
19 436 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). This study
20
21 437 was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
22
23 438 (CAPES) - Finance Code 001, and for the support of research grants provided by CAPES.
24
25
26
27 439
28
29
30 440 **Declaration of interests**
31
32
33
34 441 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
35
36 442 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.
37
38
39 443
40
41 444 **Notes on contributor**
42
43 445 Prigol, M access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the
44
45 446 data and the accuracy of the data analysis.
46
47 447 Araujo, S.M and Prigol, M conceived and designed the project.
48
49 448 Araujo, S.M, Bortolotto, V.C, Poetini, M.R, Dahleh, M.M.M, Couto, S.F, Pinheiro, F.C.,
50
51 449 Meichtry, L.B, and Musachio, E.A.S performed the behavioral experiments.
52
53 450 Roehrs, R and Ramborger, B.P measurement of monoamine levels and aid in statistical
54
55 451 analysis.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

452 Araujo, S.M, Bortolotto,V.C, Poetini, M.R, Dahleh, M.M.M performed the biochemical
453 measurements and acquisition of data.

454 Araujo, S.M, Guerra, G.P and Prigol, M interpreted of data and statistical analysis.

455 Araujo, S.M drafting of the manuscript.

456 Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Guerra, G.P and
457 Prigol,M.

458

459 6. REFERENCES

460 ANDERSON, E.M., Gomez, D., Caccamise, A., McPhail, D., Hearing M., 2019.Chronic
461 unpredictable stress promotes cell-specific plasticity in prefrontal cortex D1 and D2
462 pyramidal neurons. *Neurobiol Stress*.10:100152. doi:10.1016/j.ynstr.2019.100152.

463 ANTONIUK, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., Wlodarczyk, J., 2019. Chronic unpredictable
464 mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neurosci*
465 *Biobehav Rev*. 99:101–16. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.12.002.

466 ARAUJO, S.M., Poetini, M.R., Bortolotto, V.C., de Freitas Couto, S., Pinheiro F.C., Meichtry
467 L.B., Prigol, M., et al., 2018. Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like
468 behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*.
469 *Behav Brain Res*. 351:104–13. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.016.

470 ARAUJO, S.M., Paula, M.T., Poetini, M.R., Meichtry L.B., Bortolotto, V.C., Zarzecki, M.S.,
471 Jesse, C.R., Prigol, M., 2015. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits,
472 dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's
473 disease induced by rotenone. *Neurotoxicology*. 51:96–105. doi:10.1016/j.neuro.2015.09.003.

- 1
- 2
- 3
- 4 474 BECNEL, J., Johnson, O., Luo, J., Nässel, D.R., Nichols, C.D., 2011. The serotonin 5-HT₇dro
- 5
- 6 475 receptor is expressed in the brain of *Drosophila*, and is essential for normal courtship and
- 7
- 8 476 mating. PLoS One. 6:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0020800.
- 9
- 10
- 11
- 12 477 BIALA, G., Pekala, K., Boguszevska-Czubara, A., Michalak, A., Kruk-Slomka, M., Grot, K.,
- 13
- 14 478 et al., 2018. Behavioral and Biochemical Impact of Chronic Unpredictable Mild Stress on the
- 15
- 16 479 Acquisition of Nicotine Conditioned Place Preference in Rats. Mol Neurobiol. 55:3270–89.
- 17
- 18 480 doi:10.1007/s12035-017-0585-4.
- 19
- 20
- 21
- 22 481 BURKE, C.J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Michael, J., Das, G., et al., 2012.
- 23
- 24 482 Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. Nature. 492,
- 25
- 26 483 433–437 doi:10.1038/nature11614
- 27
- 28
- 29
- 30 484 CHEN, J., Lin, D., Zhang, C., Li, G., Zhang, N., Ruan, L., et al., 2015. Antidepressant-like
- 31
- 32 485 effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinergic systems. Metab Brain
- 33
- 34 486 Dis. 30:129–36. doi:10.1007/s11011-014-9635-z.
- 35
- 36
- 37
- 38 487 EDWARDS, A.C., Rollmann, S.M., Morgan, T.J., Mackay, T.F.C., 2006. Quantitative
- 39
- 40 488 Genomics of Aggressive Behavior in *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet 2006;2:1386–95.
- 41
- 42 489 doi:10.1371/journal.pgen.0020154.
- 43
- 44
- 45
- 46 490 EVEN, N., Devaud, J.M., Barron, A.B. General stress responses in the honey bee, 2012.
- 47
- 48 491 Insects. 3:1271–98. doi:10.3390/insects3041271.
- 49
- 50
- 51 492 GALLO, V.P., Accordi F., Chimenti C., Civinini A., Crivellato E., 2016. Catecholaminergic
- 52
- 53 493 System of Invertebrates: Comparative and Evolutionary Aspects in Comparison With the
- 54
- 55 494 Octopaminergic System. Elsevier Inc. vol. 322. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.12.006.
- 56
- 57
- 58 495 GILL, et al., 2015. Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in
- 59
- 60 496 *Drosophila*. Science. Vol. 80; 347:1265–9.doi:10.1126/science.1256682.

- 1
2
3
4 497 HABR, S.F., Dias, R.G., Teodorov, E., Bernardi, M.M., 2009. Sexual experience did not
5
6 498 affect the long-term sexual behavior inhibition of male rats treated with fluoxetine. Psychol
7
8 499 Neurosci. 2:67–73. doi:10.3922/j.psns.2009.1.10.
9
10
11
12 500 HIRTH, F., 2010. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. CNS
13
14 501 Neurol Disord -Drug Targets. Vol. 9:504–23. doi:10.2174/187152710791556104.
15
16
17 502 HOYER, S.C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S.A., Hardie, S.L., et al., 2008.
18
19 503 Octopamine in Male Aggression of *Drosophila*. Curr Biol.18:159–67.
20
21 504 doi:10.1016/j.cub.2007.12.052.
22
23
24
25 505 HULL, et al., 2004. Dopamine and serotonin: Influences on male sexual behavior. Physiol
26
27 506 Behav. 83:291–307. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.018.
28
29
30 507 JIANG, M.D., Zheng, Y., Wang, J.L., Wang, Y.F., 2017. Drug induces depression-like
31
32 508 phenotypes and alters gene expression profiles in *Drosophila*. Brain Res Bull. 132:222–31.
33
34 509 doi:10.1016/j.brainresbull.2017.06.009.
35
36
37
38 510 KEENAN, R.J., Chan, J., Donnelly, P.S., Barnham, K.J., Jacobson, L.H., 2018. The social
39
40 511 defeat/overcrowding murine psychosocial stress model results in a pharmacologically
41
42 512 reversible body weight gain but not depression - related behaviours. Neurobiol Stress. 9:176–
43
44 513 87. doi:10.1016/j.ynstr.2018.09.008.
45
46
47
48 514 KIM, Y.R., Park, B.K., Kim, Y.H., Shim, I., Kang, I.C., Lee, M.Y., 2018. Antidepressant
49
50 515 Effect of Fraxinus rhynchophylla Hance Extract in a Mouse Model of Chronic Stress-Induced
51
52 516 Depression. Biomed Res Int.2018. doi:10.1155/2018/8249563.
53
54
55
56 517 LIU, C., Plaaais, P.Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B, et al., 2012. A
57
58 518 subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. Nature.
59
60 519 488:512–6. doi:10.1038/nature11304.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 520 MASEK, P., Reynolds L.A, Bollinger W.L, Moody C., Mehta A., Murakami K., et al., 2014.
- 521 Altered regulation of sleep and feeding contributes to starvation resistance in *Drosophila*
- 522 *melanogaster*. J Exp Biol. 217:3122–32. doi:10.1242/jeb.103309.
- 523 MEHDI, B.J., Tabassum, S., Haider,S., Perveen, T., Nawaz ,A., Haleem, D.J, 2014.
- 524 Nootropic and anti-stress effects of rice bran oil in male rats. J Food Sci Technol. 52:4544–
- 525 50. doi:10.1007/s13197-014-1489-1.
- 526 MOSIENKO, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., et al., 2012.
- 527 Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. Transl
- 528 Psychiatry. 2:e122-9. doi:10.1038/tp.2012.44.
- 529 NECKAMEYER, W.S, Nieto, A., 2015. Response to stress in *Drosophila* is mediated by
- 530 gender, age and stress paradigm. Stress. 18(2):254-66. doi: 10.3109/10253890.2015.1017465.
- 531 NICHOLS, C.D., 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and
- 532 how the fly can inform central nervous system drug discovery. Pharmacol Ther. 112:677–700.
- 533 doi:10.1016/j.pharmthera.2006.05.012.
- 534 PRICE, J., Cole, V., Goodwin, G.M., 2009. Emotional side-effects of selective serotonin
- 535 reuptake inhibitors: Qualitative study. Br J Psychiatry. 195:211–7.
- 536 doi:10.1192/bjp.bp.108.051110.
- 537 RAABE, M., 1989. Recent Developments in Insect Neurohormones. Ed.Springer US. 254 pg.
- 538 ROLFF, J., Reynolds, S, 2009. Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology, and
- 539 Mechanisms. OUP Oxford, 254 pg.
- 540 SOARES, J.J., Rodrigues, D.T., Gonçalves, M.B., Lemos, M.C., Gallarreta, M.S.,
- 541 Bianchini,M.C., Gayer, M.C., Puntel, R.L., Roehrs, R., Denardin, E.L.G., 2017. Paraquat

- 1
2
3
4 542 exposureinduced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila*
5
6 543 *melanogaster*: Neuroprotective effect of Bougainvillea glabra Choisy. Biomed. Pharmacother.
7
8 544 95, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.073>
9
10
11
12 545 TAKAHASHI, A., Miczek K., 2014. Neurogenetics of Aggressive Behavior – Studies in
13
14 546 Rodents. Curr Top Behav Neurosci. 17:3–44. doi:10.1007/7854.
15
16
17 547 WANG, T., Hicks, K., Moreau, R., 2002. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and
18
19 548 other phytosterol conjugates. JAOCS, J Am Oil Chem Soc. 79:1201–6. doi:10.1007/s11746-
20
21 549 002-0628-x.
22
23
24
25 550 YABE, T., Hirahara, H., Harada, N., Ito, N., Nagai, T., Sanagi, T., et al., 2010. Ferulic acid
26
27 551 induces neural progenitor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Neuroscience. 165:515–24.
28
29 552 doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.023.
30
31
32
33 553 YELLMAN, C., Tao, H., He, B., Hirsh, J., 1997. Conserved and sexually dimorphic
34
35 554 behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA.
36
37 555 94:4131–6. doi:10.1073/pnas.94.8.4131.
38
39
40
41 556 ZARRINDAST, M., 2015. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior.
42
43 557 Arch Iran Med. 18:591–603.
44
45
46 558 ZENI, A.L., Zomkowski, A.D., Maraschin, M., Rodrigues A.L.C.I.T., Rodrigues S., Tasca
47
48 559 C.I., 2012. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice :
49
50 560 Evidence for the involvement of the serotonergic system. Eur J Pharmacol. 679:68–74.
51
52 561 doi:10.1016/j.ejphar.2011.12.041.
53
54
55
56 562 ZHU, B., Pennack, J.A, McQuilton, P., Forero, M.G., Mizuguchi, K., Sutcliffe, B., et al.,
57
58 563 2008. *Drosophila* neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation.
59
60 564 PLoS Biol. 6:2476–95. doi:10.1371/journal.pbio.0060284.

Figures captions:

Figure 1. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M) in the open field arena test. Crossing number/Distance (cm) traveled in the open field test. Twenty-five (n=25) from each group were used, these values represent the sum of five independent experiments. Values are provided as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test.

Figure 2. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on forced swim testing in male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M) or fluoxetine (FLX 10 μ M). Latency for first immobilization (Graphic 2A), Swim Time (Graphic 2B); Immobility Time (Graphic 2C), and Number of bout (Graphic 2D). Values are provided as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and ORY (25 μ M) + CUMS (P <0.05).

Figure 3. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on aggressiveness test in male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M). Values are provided as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and ORY (25 μ M) + CUMS (P <0.05).

Figure 4. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on mating behavior and male virility assessment (hatching percentage) of male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M) or fluoxetine (FLX 10 μ M). First Touch Latency (Graphic 4A), Copulation Duration (Graphic 4B), Mating Duration (Graphic 4C), Hatching percentage (Graphic 4D). Values are given as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and ORY (25 μ M) + CUMS (P <0.05). The hatching percentage was determined using the Mantel-Cox log-rank test, significant differences (P <0.05).

Figure 5. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the test of preference index (PI) to sucrose in male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M) or fluoxetine (FLX 10 μ M). Values are given as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group.

Figure 6. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on body weight in male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M) or fluoxetine (FLX 10 μ M). Values are given as mean $\pm$ SD. Significance determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; @Significant difference in relation to the ORY (25 μ M) group (P <0.05).

Figure 7. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on the percentage of compartment time in the light/dark test of male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -oryzanol (ORY 25 μ M). Values are given as mean $\pm$ SD. Significance was determined by

two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and ORY (25 μ M) + CUMS ($P < 0.05$).

Figure 8. Effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) on levels of the monoamines serotonin (5HT) (Graphic 8A); dopamine (DA) (Graphic 8B) and octopamine (OCT) (Graphic 8C) of male *Drosophila melanogaster* flies treated with γ -orizanol (ORY 25 μ M). Values are given as mean $\pm$ SD. Significance was determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. *Significant difference in relation to the control group; #Significant difference between CUMS and ORY (25 μ M) + CUMS ($P < 0.05$).

For Peer Review Only

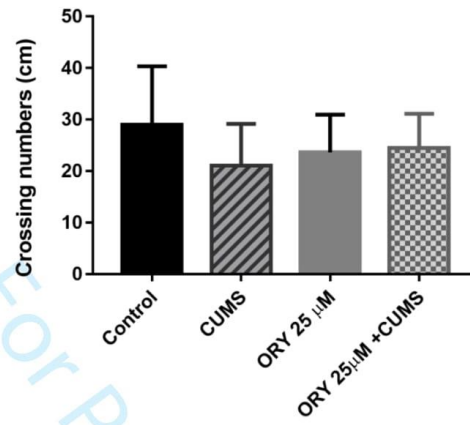
Figure 1.

Figure 2.

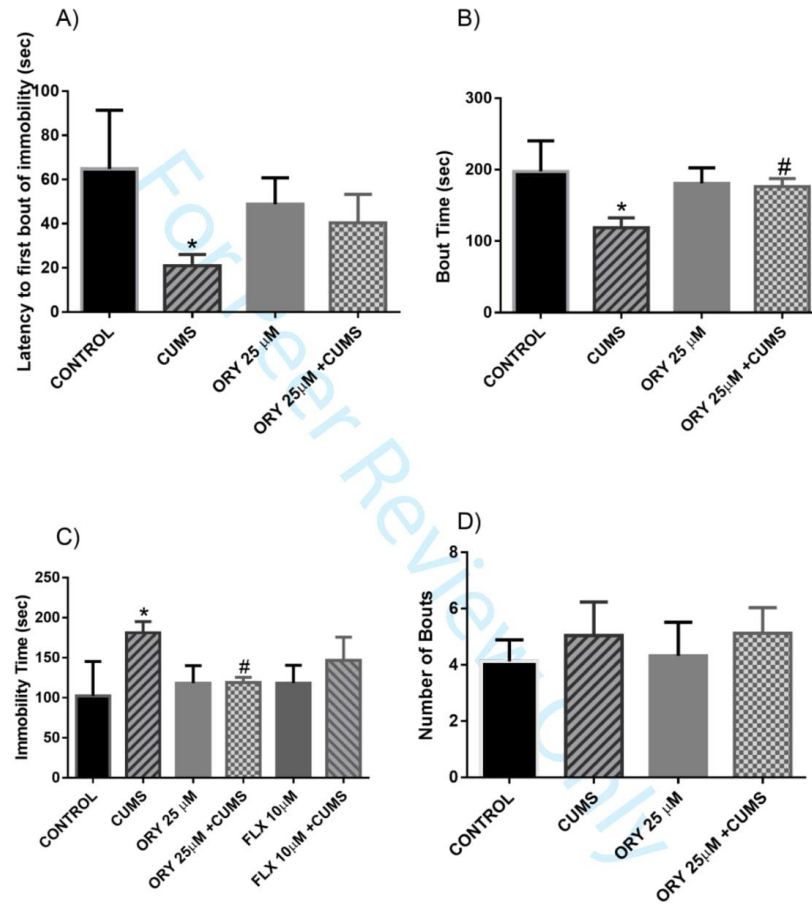


Figure 3.

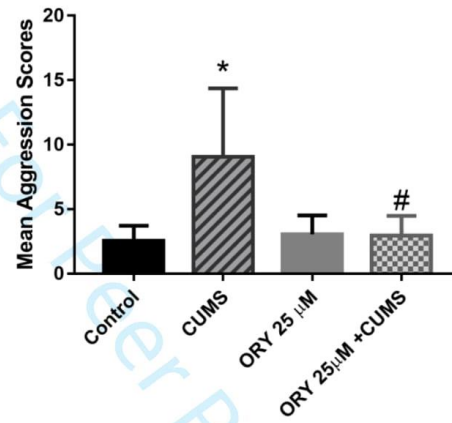


Figure 4.

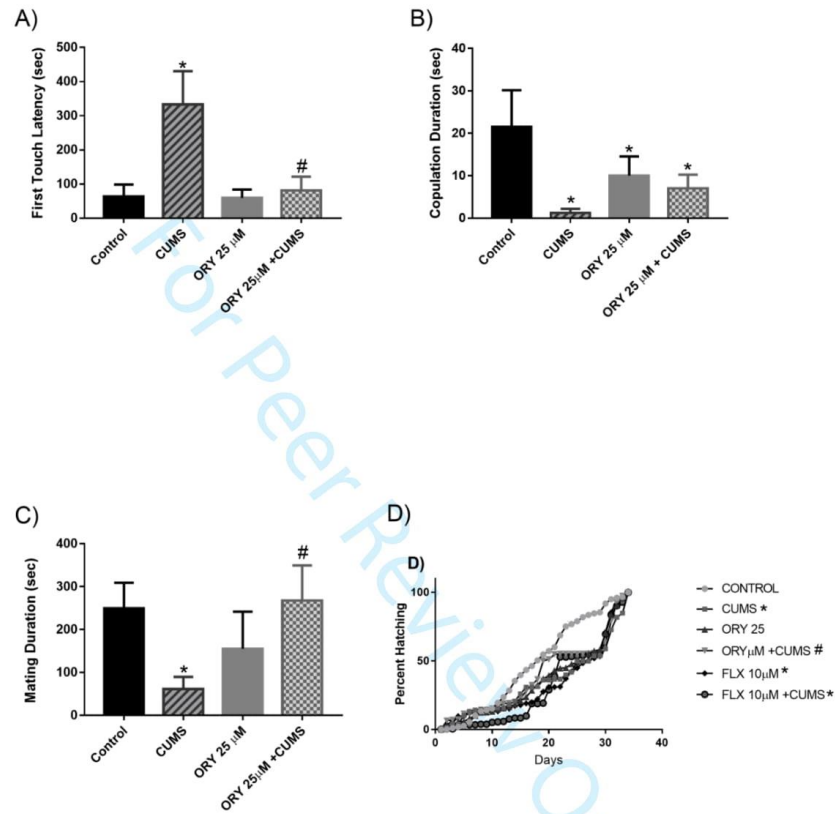


Figure 5.

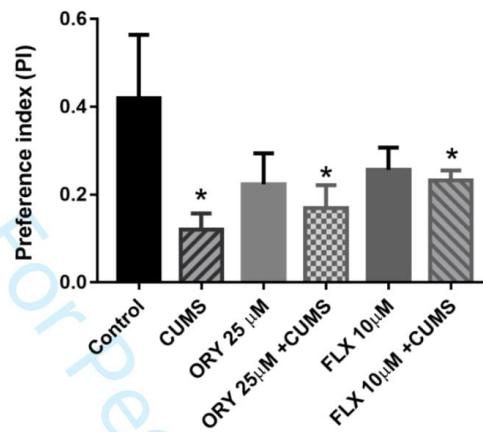


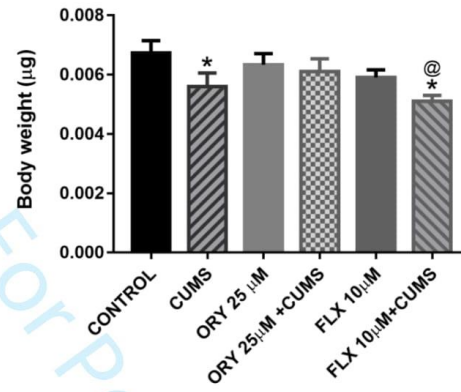
Figure 6.

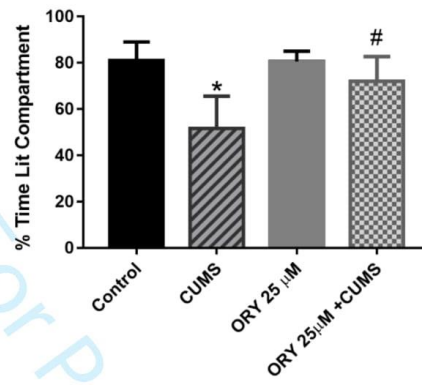
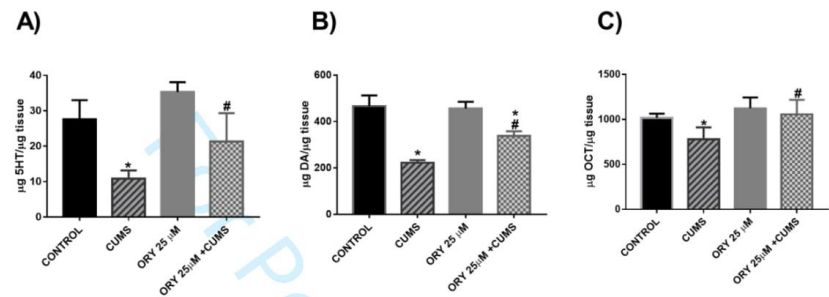
Figure 7.

Figure 8.

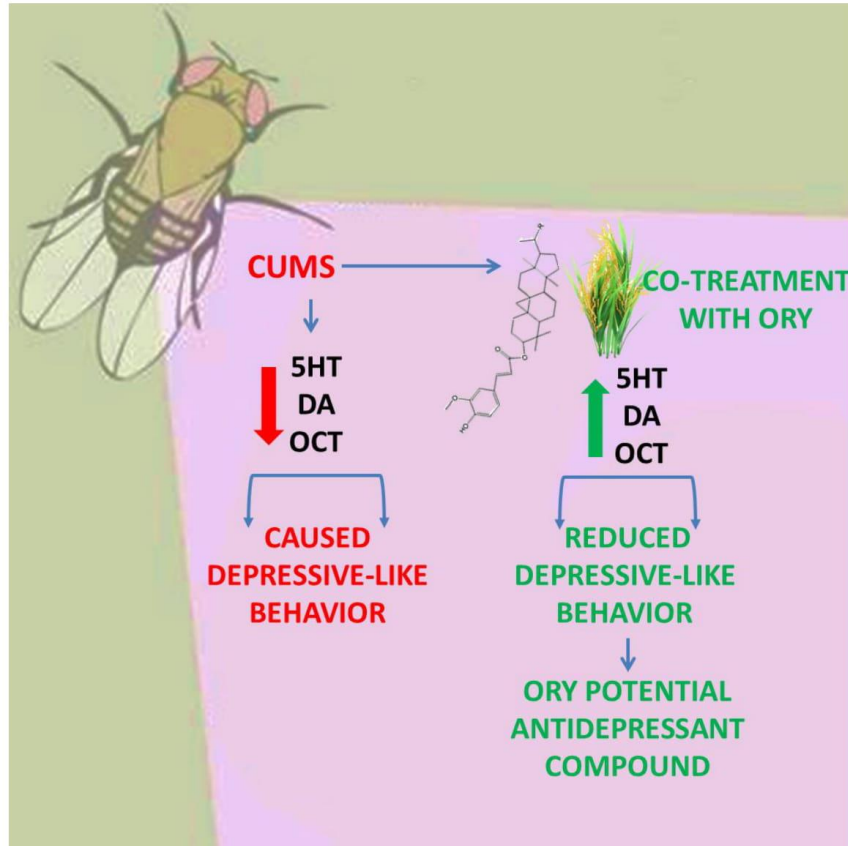


Highlights

- CUMS alters monoamine levels and behaviors in *Drosophila*.
- ORY prevents CUMS induced depressive-like behavior in *Drosophila*.
- ORY modulates monoamine levels in *Drosophila*.
- ORY acts as a potential antidepressant therapeutic compound.

For Peer Review Only

Graphical Abstract



5.3. RESULTADOS PRELIMINARES

Estes resultados estão dispostos em tópicos como: *Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão Preliminares, Referências Bibliográficas.*

*“O papel de γ -orizanol sobre marcadores de estresse oxidativo induzido pelo comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster* exposta ao estresse crônico moderado e imprevisível”*

Stéfani Machado Araujo^a, Vandrezza Cardoso Bortolotto^a, Shanda de Freitas Couto^{a,b}, Márcia Rósula Poetini^a, Mustafa Munir Mustafa Dahleh^a, Francielli Polet de Almeida^a, Elize Aparecida Santos Musachio^a, Luana Barreto Meichtry^a, Jeferson Luis Franco^c, Gustavo Petri Guerra^a, Marina Prigol^{a,b,*}

^aLaboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas a Moléculas Bioativas - LaftamBio - Universidade Federal do Pampa, Itaqui, RS, Brasil.

^bDepartamento de Nutrição, Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, RS, Brasil.

^cGrupo de Pesquisa sobre Estresse Oxidativo e Sinalização Celular, Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia – CIPBIOTEC, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, RS, Brasil.

*Autor correspondente: Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas a Moléculas Bioativas - LaftamBio - Universidade Federal do Pampa, Itaqui, CEP 97.650-000, RS, Brasil. Endereços de e-mail: marinaprigol@gmail.com (M.Prigol)

1. INTRODUÇÃO

A palavra estresse implica uma experiência de emoções negativas que decorre de antecipações fisiológicas, bioquímicas, alterações cognitivas e comportamentais que trabalham para alterar o estressor ou fazer ajustes em seus efeitos (KHAN & KHAN, 2017). Com base nessa observação, a exposição ao estresse crônico imprevisível leva ao desenvolvimento de um estado semelhante à depressão e é amplamente reconhecido como um dos principais determinantes de risco e gravidade dos distúrbios neuropsiquiátricos (BALE, 2005).

A depressão é uma doença neuropsiquiátrica grave, com uma prevalência variando de 11% em países de baixa renda a 15% em países de alta renda sendo que aproximadamente 350 milhões de pessoas são afetadas pela depressão em todo o mundo (ELHADIDY *et al.*, 2019). A etiologia da depressão não é bem compreendida e muitos fatores foram atribuídos, incluindo fator hereditário, histórico familiar e estresse oxidativo (BARANKEVICZ, 2015; NECKAMEYER & NIETO, 2015). É amplamente relatado que o estresse crônico imprevisível prejudica o status antioxidante do tecido cerebral, presumivelmente gerando espécies reativas de oxigênio (ERO_s) de forma excessiva e, assim, aumentando o estresse oxidativo. Embora o cérebro metabolize 20% do oxigênio total no corpo, ele possui uma quantidade limitada de capacidade antioxidante, por isso é particularmente vulnerável à produção de EROs (XU *et al.*, 2014).

Evidências existentes sugerem que o estresse oxidativo pode estar relacionado ao desenvolvimento da depressão, causado pela disfunção mitocondrial, é um "coquetel perigoso" aumentando o risco de desenvolvimento ou desencadeamento da patologia depressiva (CARUSO *et al.*, 2019). ERO_s são subprodutos do metabolismo mitocondrial normal, que é a força motriz da célula produtora de trifosfato de adenosina (ATP), utilizando eficientemente oxigênio e substratos como glicose e piruvato, atendendo a 92% da demanda de energia do corpo por fosforilação oxidativa (OXPHOS) (BANSAL & KUHAD, 2016), portanto, uma disfunção mitocondrial não apenas prejudica as células para atender às necessidades de energia, mas também resulta em uma redução na frequência respiratória com um sistema OXPHOS mitocondrial comprometido e/ou uma inibição dos complexos mitocondriais, juntamente com a diminuição do transporte de elétrons (ETS) (RODRIGUES *et al.*, 2018). Podendo estar envolvido na comunicação neuronal prejudicada e na resiliência celular, subjacentes a distúrbios psicóticos e de humor (BANSAL & KUHAD, 2016). Assim,

é descrita a existência um metabolismo energético prejudicado em pacientes deprimidos, indicando que uma disfunção mitocondrial sutil pode desempenhar um papel importante em vários aspectos da depressão (BANSAL & KUHAD, 2016).

As mitocôndrias desempenham um papel importante na neuroplasticidade, que se refere a um processo de adaptação de neurônios em resposta a mudanças no ambiente interno ou externo, causando mudanças nas vias neurais e sinapses, e é bem estudado que o estresse leva a danos estruturais e físicos em várias regiões cerebrais de pacientes deprimidos, levando à neuroplasticidade prejudicada devido à OXPHOS afetada, interferindo em várias vias intracelulares, incluindo processos que têm alto consumo de energia como a plasticidade sináptica e mecanismos de transdução de sinal (SHELIN *et al.*, 2003).

Portanto, sabendo que os processos que causam estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese da depressão, acreditamos na necessidade de estudos com compostos naturais com potencial antioxidante, como o γ -orizanol (ORY). ORY possui uma porção de ácido ferúlico que lhe confere potencial antioxidante, principalmente por promover o acesso molecular a componentes hidrofóbicos mais suscetíveis à destruição oxidativa das células (GRAF, 1992), pois aumenta a extensão da hidroxilação de seus anéis aromáticos (CALHEIROS, 2007). Apesar da considerável expansão para as causas da depressão e dos possíveis tratamentos nos últimos anos, o manejo desse transtorno de humor ainda é um desafio, portanto, o uso de novas alternativas terapêuticas naturais com a ORY poderia contribuir para aliviar os sintomas e prevenir episódios depressivos de recorrência e atraso no início do efeito terapêutico, o principal problema relatado pelos pacientes que fazem uso dos antidepressivos tradicionais.

As linhagens de *Drosophila* e os humanos divergiram várias centenas de milhões de anos atrás, e apesar de suas diferenças óbvias, moscas e seres humanos compartilham vários processos celulares e neurobiológicos fundamentais (O'KANE, 2011). As semelhanças incluem mecanismos de sinalização neuronal, arquitetura cerebral subjacente conservada e principais classes de sistemas de neurotransmissores. A *Drosophila melanogaster* também possui um repertório comportamental sofisticado que inclui habilidades extensivas para se adaptar às experiências e a outras circunstâncias e, portanto, é suscetível ao mesmo tipo de insultos que podem causar distúrbios neuropsiquiátricos em humanos (O'KANE, 2011). Assim sendo utilizamos a *Drosophila* como modelo experimental para o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo através de sua exposição ao estresse crônico moderado

imprevisível (CUMS) por dez dias, culminando em nosso objetivo de avaliar o efeito da ORY sobre os parâmetros de estresse oxidativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação das Moscas e Materiais

O tipo selvagem de *Drosophila melanogaster* (Harwich) foi obtido no National Species Center, Bowling Green, Ohio, EUA. Moscas de ambos os sexos, foram mantidas em frascos contendo 10 ml de meio padrão de farinha de milho, mantidas em ciclo claro / escuro (12 h claro/12 h escuro), sob temperatura de 25 ± 1 ° C e umidade (60%) controlada. O γ -orizanol foi adquirido da Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tóquio, Japão). Todos os outros reagentes foram adquiridos no Laboratório Laftambio Pampa Campus da UNIPAMPA Itaqui.

2.2 Protocolo Experimental e Protocolo de CUMS

Para os tratamentos, as moscas adultas de dois dias de idade foram submetidas ao regime CUMS em combinação com o tratamento com ORY por dez dias. O ORY foi diluído em sacarose a 1% (veículo) e teve uma concentração final de 25 μ M (ARAUJO *et al.*, 2015). As moscas (macho) foram divididas em quatro grupos (n= 50): [1] Controle, [2] ORY 25 μ M, [3] CUMS [4] ORY 25 μ M + CUMS. As moscas foram submetidas a vários estressores de maneira crônica imprevisível em tempo aleatório. Os estressores no regime CUMS foram baseados no protocolo descrito por (ARAUJO *et al.*, 2018) que incluem: estresse por frio a 0 ° C por 30 minutos (adaptado de ARAUJO *et al.*, 2018), estresse por calor a 36 ° C por 4 horas estresse de inanição com adição de sacarose 5% em papel de filtro por 58 horas e inversão de ciclo claro/escuro por 10 dias. Todas as moscas no grupo de estresse são expostas ao mesmo estressor simultaneamente em um único dia. Após 24 horas do final do CUMS, os insetos foram anestesiados e homogeneizados para análises bioquímicas.

2.2 Taxa de sobrevivência

A cada 24 horas após o início do tratamento, as moscas foram contadas e os valores foram expressos como uma porcentagem de moscas vivas em relação ao número total. O número total corresponde a três experiências independentes, as curvas de sobrevivência foram comparadas usando o teste de long rank de Mantel-Cox.

2.3 Análises bioquímicas:

2.3.1. Preparação das amostras

Para as amostras foram utilizadas 20 moscas por grupo e se necessário foram separadas (cabeça e corpo). Estas foram imobilizadas em gelo e homogeneizadas em tampão Hepes 20 mM, pH 7, os homogenatos foram centrifugados a 1000g por 5 ou 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi removido para prosseguimento das análises bioquímicas.

2.3.2. Níveis de espécies reativas (ER)

Os níveis de ER foram determinados com a quantificação da oxidação de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), como um índice geral de estresse oxidativo, de acordo com o protocolo de PÉREZ-SEVERIANO *et al.*, (2004). A emissão de fluorescência do DCF resultante da oxidação do DCF-DA foi monitorada após uma hora a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e a um comprimento de onda de emissão de 530 nm no fluorímetro. Para os resultados, foram utilizadas as médias de quatro experimentos independentes, e cada tratamento foi realizado em duplicata. Os resultados são expressos como porcentagem de controle da formação de DCF.

2.3.3. Níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Foram mensurados o índice de LPO, através da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o método de OHKAWA *et al.*, (1979) com pequenas modificações. O sobrenadante foi incubado em ácido acético 0,45 M / tampão HCl pH 3,4, ácido tiobarbitúrico 0,28%, SDS 1,2%, a 95 °C por 60 min e a absorbância foi medida a 532 nm. Os valores de TBARS foram normalizados pela concentração de proteínas das respectivas regiões da cabeça/corpo das moscas. Os resultados representam a média de quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos de acordo com os níveis de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de tecido) que é indicador da LPO.

2.3.4. Ensaio de redução de resazurina

O método baseia-se na capacidade das células viáveis de reduzir a resazurina a resorufina, uma molécula fluorescente (FRANCO *et al.*, 2009). O sobrenadante de amostras de cabeça e corpo foram incubados em placas ELISA com tampão 20 mM Hepes (pH 7,0) e resazurina por uma hora. A absorbância foi registrada usando o leitor de placas multimodo

EnsPireR (Perkin Elmer, EUA) a 573 nm. Foram utilizados quatro experimentos independentes e os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

2.3.5. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi analisada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por MISRA & FRIDOVICH (1972) com pequenas modificações. Este método baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da epinefrina ao adrenocromo. Alíquotas de 6, 12, 18 µl de sobrenadante foram adicionadas em um tampão de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (57,7 mM; pH 10,3) e a reação enzimática foi iniciada pela adição de epinefrina (6 mM). A atividade enzimática foi expressa em unidades UI/mg de proteína, ou seja, em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% a auto-oxidação espontânea de formação do adrenocromo por ação da epinefrina. A absorbância foi obtida usando o leitor de placas multimodo EnsPireR (Perkin Elmer, EUA) a 480 nm. Foram utilizados seis experimentos independentes.

2.3.6. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por AEBI (1984) com pequenas modificações. A reação enzimática foi iniciada adicionando sobrenadante e o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 0,5 M) em um meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para monitorar o desaparecimento de H₂O₂. A atividade enzimática foi expressa em unidades UI/mg de proteína. A absorbância foi obtida usando o leitor de placas multimodo EnsPireR (Perkin Elmer, EUA) a 240 nm.

2.3.7. *Respirometria de alta resolução (HRR)

Alterações nos padrões de bioenergética mitocondrial foram avaliadas por HRR usando Oxygraph-2k (O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), de acordo com (RODRIGUES *et al.*, 2018). As preparações das amostras para o isolamento das mitocôndrias de *Drosophila* foram obtidas de acordo com protocolos publicados anteriormente por CARVALHO *et al.* (2017). Para cada preparação mitocondrial, 50 moscas de cada experimento foram anestesiadas em gelo e homogeneizadas em 2 mL de tampão de isolamento contendo sacarose 250 mM, 0,1% de albumina sérica bovina, 2 mM de EGTA e 5 mM de Tris-HCl (pH 7,4). O homogenato foi filtrado com uma membrana de filtro e centrifugado a 200g por 3 min. O sobrenadante foi coletado e uma centrifugação adicional a

9000g por 10 min foi realizada. Em seguida, o sedimento mitocondrial foi cuidadosamente ressuspenso em 2 mL de meio de isolamento isento de albumina gelado, seguido por centrifugação a 9000g por 10 min. Este sedimento final foi ressuspenso em 100 μ L de meio de isolamento isento de albumina; esta ressuspensão continham mitocôndrias isoladas e foi utilizado na ensaio da respiração. Todos os procedimentos acima foram realizados a 4 °C. A concentração de proteína foi determinada usando um ensaio de Bradford (1976).

As mitocôndrias isoladas ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) foram transferidas para 2 mL de solução de MiR05 (sacarose 110 mM, K-lactobionato 60 mM, contendo EGTA 0,5 mM, MgCl_2 3 mM, taurina 20 mM, KH_2PO_4 10 mM, HEPES 20 mM e 0,1% de ácidos graxos BSA, pH 7,1). Todas as experiências foram realizadas a 24 °C usando Software DatLab 4.0 (Oroboros Inc., Áustria), com agitação contínua a 750 rpm. Através de protocolos de titulação, as habilidades de uma série de substratos e inibidores foram utilizados para influenciar a função mitocondrial, como reflexo na diferença de estados respiratórios avaliados. L -prolina + piruvato + malato + succinato + ascorbato e tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD) foram usados como substrato oxidável em todas as experiências. Taxas respiratórias, alterações na cadeia respiratória mitocondrial e nos complexos, a integridade da membrana mitocondrial foram determinadas. Após a estabilização do sinal, a respiração basal suportada por substratos endógenos, e a respiração do vazamento mediado pelo complexo I (CI) (LEAK) foi determinado usando piruvato 5mM, L -prolina 5mM e 1mM malato. OXPHOS mediada por CI (OXPHOS) foi determinada usando adenosina difosfato (ADP) (2,5 mM). Após a estabilização do sinal, a respiração basal suportada por endógenos substratos, a respiração do vazamento mediado pelo complexo I (CI) (LEAK) foi determinado usando piruvato 5mM, L -prolina 5mM e 1mM malato. OXPHOS mediada por CI (OXPHOS) foi determinada usando ADP (2,5 mM). A integridade funcional da membrana mitocondrial externa ($\text{CI}_{\text{OXPHOS}}$) foi determinado pela adição de citocromo exógeno c (cyt c) (10 μ M). A ruptura da membrana mitocondrial externa está associada à liberação do cyt c; então, a respiração estimulada após a adição do cyt c é proporcional ao dano da membrana. O fluxo convergente de elétrons durante a respiração máxima do OXPHOS ($\text{CIc} + \text{CII}_{\text{OXPHOS}}$) foi determinado com substratos de CIc e CII (succinato 10mM). A respiração do ETS representa a respiração não acoplada usando carbonil cianeto p -(trifluoro-metoxi) fenilhidrazona (FCCP) (concentração ótima alcançada entre 0,5 e 1,5 μ M); $\text{CIc} + \text{CII}$ mediando a respiração do ETS ($\text{CIc} + \text{CII}_{\text{ETS}}$). A respiração e ETS mediada pelo CII (CII_{ETS}) foi determinada com adição de rotenona 0,5 μ M. E a adição de 2,5 μ M de antimicina A inibiu o complexo III, resultando em respiração não-mitocondrial,

com o consumo residual de oxigênio (Rox) com pequenas contribuições do vazamento de elétrons no estado desacoplado. A respiração do CIV foi determinada adicionando ascorbato 0,5 mM e TMPD 1 mM. *Para HRR, apenas uma preparação mitocondrial de cada grupo experimental foi realizada.

2.3.8. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina bovina como padrão.

2.3.9. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e subsequentemente realizada as análises de variância unidirecional ou bidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey ou Bonferroni, respectivamente. No caso da não normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Scheirer-Ray-Hare. A porcentagem de sobrevivência foi determinada pela curva de Kaplan-Meier e significância estatística de Logrank Mantel-Cox. A estatística descritiva foi expressa como média $\pm$ DP. Valores de probabilidade menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas no GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

2.3.10. Considerações éticas

Drosophila melanogaster é livre de preceitos éticos por fazer parte do grupo de invertebrados na classe de insetos.

3. RESULTADOS PRELIMINARES

3.1. Efeito de ORY na taxa de sobrevivência de moscas expostas ao CUMS

A exposição de moscas ao CUMS resultou em letalidade ao longo dos 10 dias de protocolo experimental quando comparado aos valores do grupo controle (Log-rank-Mantel-Cox, $P=0.0008$). Quando comparado com grupo CUMS sozinho, a taxa de mortalidade foi menor para as moscas tratadas simultaneamente com ORY, indicando sua capacidade de proteger contra a letalidade de CUMS (Log-rank-Mantel-Cox, $P=0.0315$).

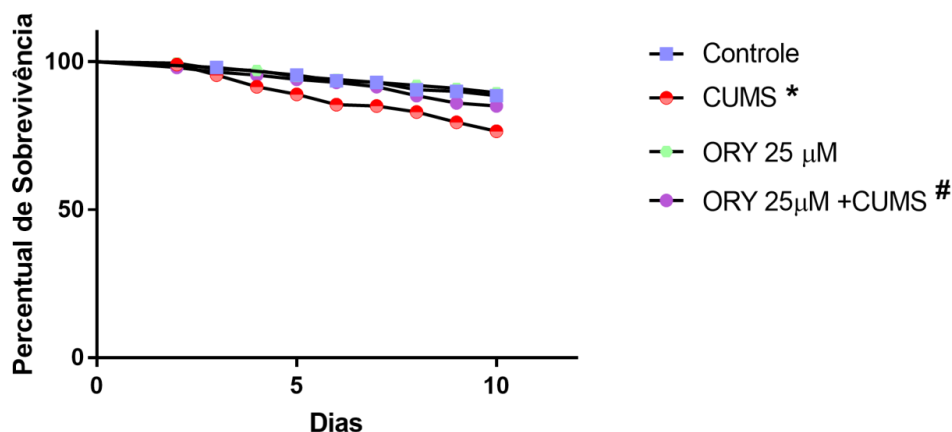


Figura 1. Efeito do γ -orizanol (ORY) na taxa de sobrevivência de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 10 dias. O número total de moscas (150 por grupo) representa a soma de três experiências independentes. A medida do tempo de vida foi determinada comparando-se as curvas de sobrevivência pelo teste Log-rank -Mantel-Cox.

3.2. Efeito de ORY nos níveis de ER na cabeça e no corpo das moscas expostas ao CUMS

O estresse oxidativo tem sido atribuído como um fator importante na progressão da patologia depressiva. Aqui quantificamos os níveis de ER como um indicador de estresse oxidativo. A análise post-hoc mostrou que as moscas expostas ao CUMS tiveram um aumento da produção de ER na cabeça em comparação ao grupo controle. A ANOVA bidirecional revelou uma interação significativa entre CUMS e ORY [$F_{(1,12)} = 9.228$, $P = 0.0103$; Fig. 2A]. O tratamento com ORY conseguiu reduzir os níveis de ER na cabeça das moscas expostas ao CUMS. Em relação aos níveis de ER no corpo não houve diferenças significativas entre os grupos. A ANOVA bidirecional não revelou uma interação significativa entre CUMS e ORY [$F_{(1,13)} = 2.983$, $P = 0.1078$; Fig. 2B].

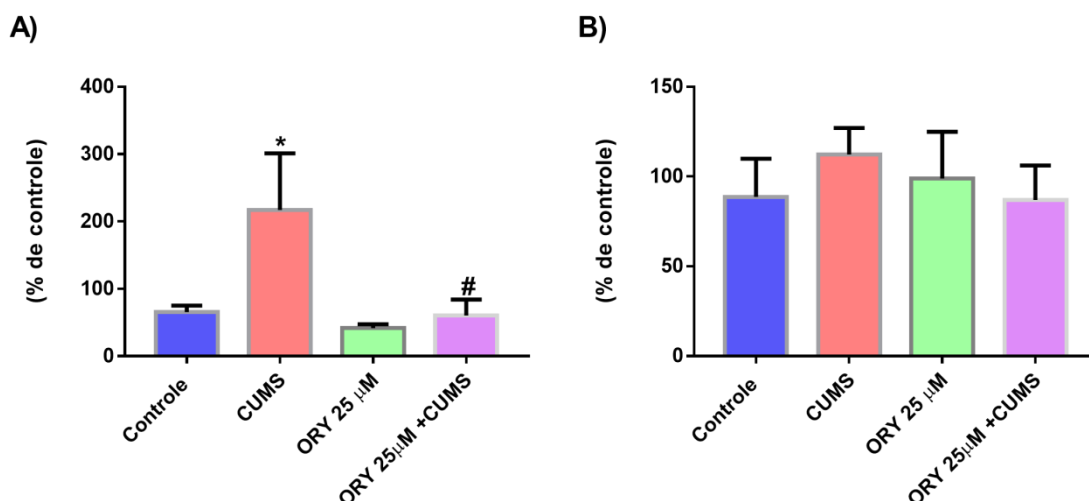


Figura 2. Efeito do γ -orizanol (ORY) nos níveis de espécies reativas na cabeça (Gráfico 2A) e no corpo (Gráfico 2B) das moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS ($P < 0,05$).

3.3. Efeito de ORY nos níveis de MDA na cabeça e no corpo das moscas expostas ao CUMS

A análise post-hoc mostrou que as moscas expostas ao CUMS tiveram um aumento nos níveis de MDA indicador de LPO em suas cabeças quando comparado ao grupo controle. A co-exposição com ORY não conseguiu reduzir significativamente o dano induzido pelo CUMS nas cabeças das moscas. Não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis MDA no corpo das moscas.

A ANOVA bidirecional revelou uma interação significativa entre CUMS e ORY, nos níveis de MDA na cabeça das moscas [$F_{(1,13)} = 8.202$, $P = 0.0133$; Fig. 3A]; mas não obtivemos uma interação significativa entre CUMS e ORY no corpo das moscas [$F_{(1,16)} = 0.4103$, $P = 0.5309$; Fig. 3B].

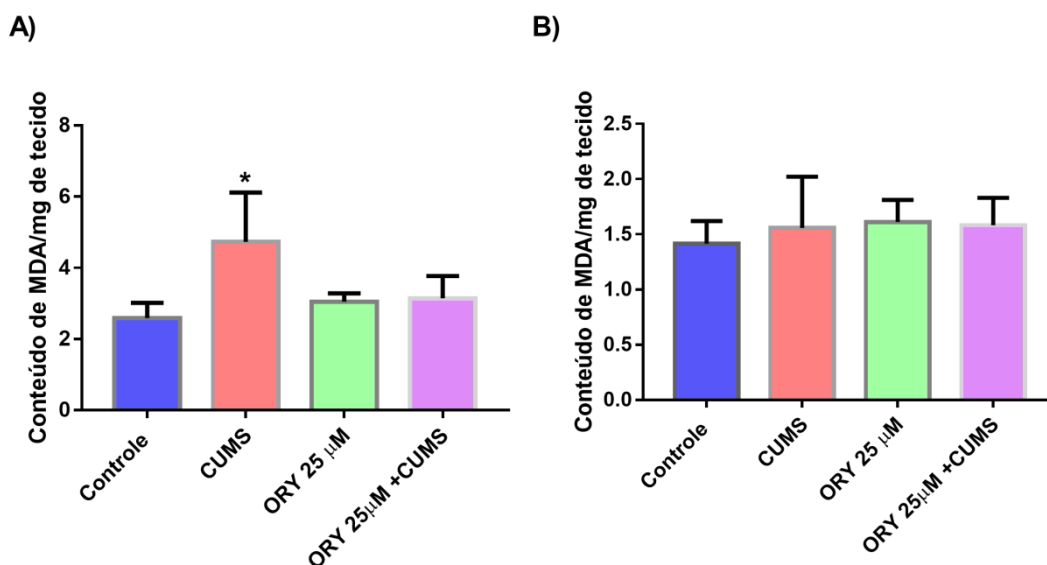


Figura 3. Efeito do γ -orizanol (ORY) na peroxidação lipídica na cabeça (Gráfico 3A) e no corpo (Gráfico 3B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05).

3.4. Efeito de ORY na viabilidade celular das moscas expostas ao CUMS

A análise post-hoc mostrou que a viabilidade celular medida pelo teste de redução de resaruzina mostrou uma queda significativa na viabilidade celular no corpo das moscas e uma tendência para redução na viabilidade na cabeça das moscas no grupo exposto ao CUMS comparado ao grupo controle. E este dano celular foi prevenido por um tratamento com ORY no corpo das moscas.

A ANOVA bidirecional revelou uma interação significativa entre CUMS e ORY, na viabilidade celular no corpo das moscas [$F_{(1,12)} = 23.06$, $P = 0.0004$; Fig. 4B]; mas não obtivemos uma interação significativa entre CUMS e ORY no cabeça das moscas [$F_{(1,12)} = 6.651$, $P = 0.0241$; Fig. 4A].

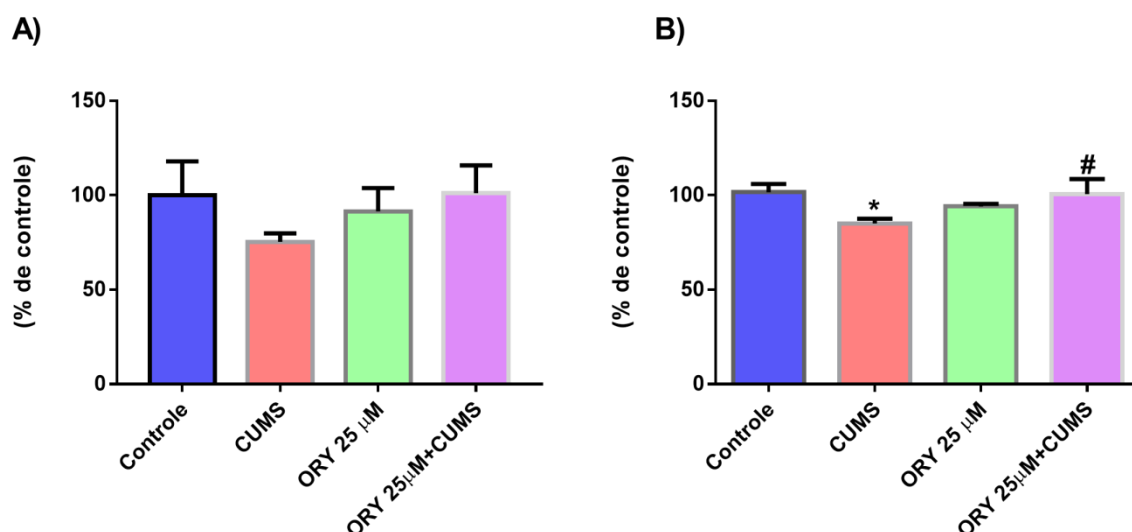


Figura 4. Efeito do γ -orizanol (ORY) na viabilidade celular na cabeça (Gráfico 4A) e no corpo (Gráfico 4B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas oitenta moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de quatro experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS ($P < 0,05$).

3.5. Efeito de ORY na atividade de enzimas antioxidantes na cabeça e no corpo das moscas expostas ao CUMS

A análise post-hoc mostrou que as moscas expostas ao CUMS demonstraram uma inibição da atividade da SOD quando comparado ao grupo controle. O tratamento com ORY foi eficaz para reduzir a inibição da SOD. Em relação à atividade da CAT o grupo ORY sozinho demonstrou atividade per se mostrando diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratamento. A ANOVA bidirecional não revelou uma interação significativa entre CUMS e ORY na atividade da SOD [$F_{(1,19)} = 3.349$, $P=0.0830$; Fig.5A], mas demonstrou interação na atividade de CAT [$F_{(1,13)} = 14.31$, $P=0.0023$; Fig. 5B].

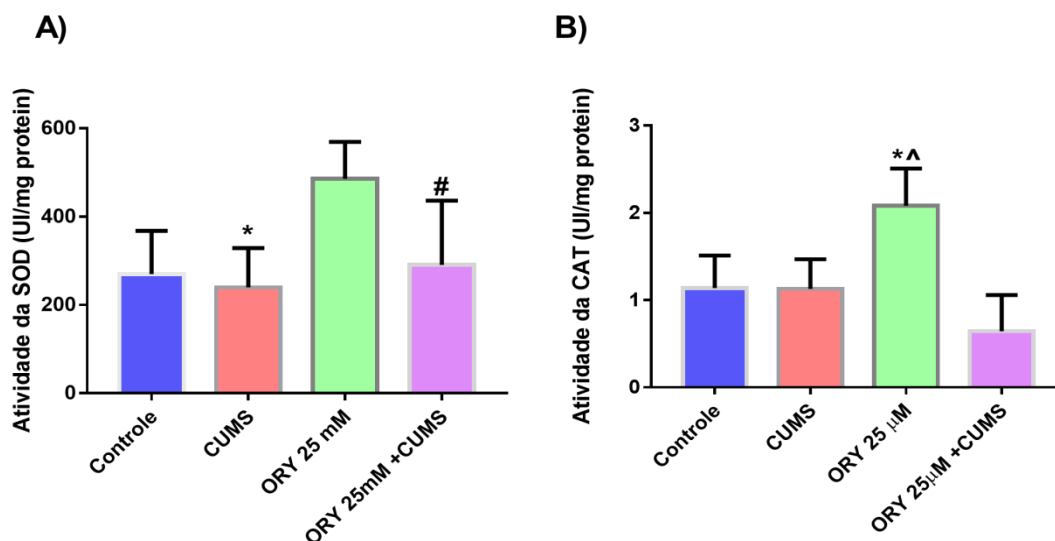


Figura 5. Efeito do γ -orizanol (ORY) na atividade de enzimas antioxidantes na cabeça da mosca, superóxido dismutase (SOD) (Gráfico 4A) e catalase (CAT) (Gráfico 4B) de moscas expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS). Foram utilizadas cento e vinte moscas de cada grupo, esses valores representam a soma de seis experimentos independentes. Os valores são fornecidos como média $\pm$ DP. Importância determinada pela análise da variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY 25 μ M + CUMS; ^Diferença significativa do grupo ORY sozinho entre os grupos ($P < 0,05$).

3.6. Efeito de ORY na função mitocondrial das moscas expostas ao CUMS

Conseguimos realizar apenas uma preparação mitocondrial de cada grupo experimental para determinarmos a função bioenergética mitocondrial, usando HRR (Figura 6). Portanto com os resultados obtidos até o momento não conseguiremos concluir definitivamente o efeito de ORY sobre a função mitocondrial das moscas expostas ao CUMS.

Mas como podemos observar nos resultados obtidos desta única análise, a respiração basal e CI_{LEAK} mostraram reduções do fluxo de oxigênio. A adição ADP para induzir OXPHOS indicou que a exposição das moscas ao CUMS ($410 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) era capaz de diminuir a respiração de CI_{OXPHOS} e $CI_c + CII_{OXPHOS}$ quando comparado ao grupo ORY sozinho ($524 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) e ao grupo tratamento ($499 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), mas não difere do grupo controle ($410 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Da mesma forma, a adição de FCCP para desacoplar respiração indicou uma diminuição significativa no ETS no $CI_c + CII_{ETS}$ e CII_{ETS} no grupo CUMS ($557 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) quando comparado ao grupo ORY ($680 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1}$

mg^{-1}) sozinho e ao grupo tratamento ($620 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), mas não difere do grupo controle ($221 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). A adição de antimicina A, usada para avaliar o consumo de Rox, diminuiu o fluxo de oxigênio para os níveis basais de CUMS ($-10 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) e do grupo controle ($-9 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), e há uma redução no fluxo de oxigênio no grupo ORY sozinho ($50 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) e no grupo tratamento ($42 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Com a adição de TMPD + ascorbato disponível para a respiração do CIV houve um consumo baixo de oxigênio entre os grupos.

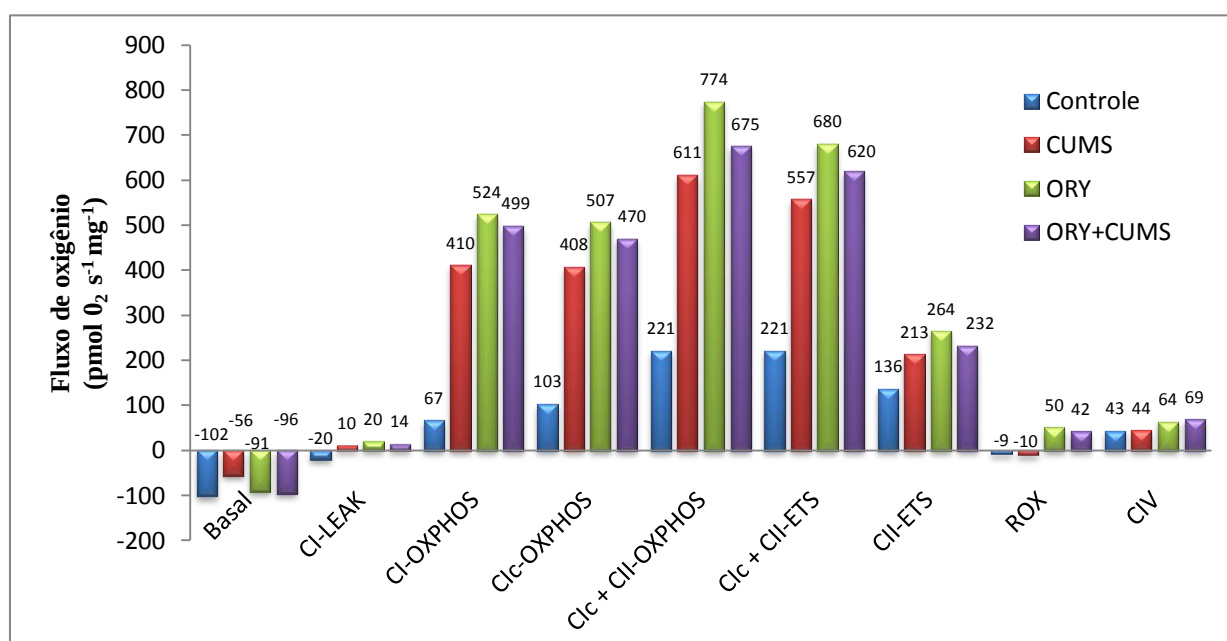


Figura 6. Efeitos do γ -orizanol (ORY) na função mitocondrial das moscas (HRR) expostas ao estresse leve imprevisível crônico (CUMS). A função mitocondrial é apresentada com a abreviação do(s) complexo(s) envolvido(s), seguida pelo estado da respiração medido na presença de L-prolina + piruvato + malato (CI_{LEAK}), + ADP ($\text{CI}_{\text{OXPHOS}}$), + citocromo c ($\text{CIc}_{\text{OXPHOS}}$), + succinato ($\text{CIc} + \text{CII}_{\text{OXPHOS}}$), + FCCP ($\text{CIc} + \text{CII}_{\text{ETS}}$), + rotenona (CII_{ETS}), + antimicina A (ROX), + TMPD/ascorbato (CIV).

4. Apresentamos de forma preliminar a discussão de alguns resultados promissores, tais como:

Como podemos ver, houve um aumento nos níveis de ER nas cabeças das moscas expostas ao CUMS comparadas ao grupo controle. E o tratamento com ORY foi eficaz na prevenção desse dano. É amplamente relatado que o CUMS é presumivelmente prejudicial ao

gerar ER excessivas e aumentar o estresse oxidativo a nível cerebral (XU *et al.*, 2014). Possivelmente, a prevenção de ORY ocorre devido ao seu potencial antioxidante, causando assim efeitos neuroprotetores. Na literatura, encontramos um corpo crescente de dados relatando que antioxidantes (por exemplo, vitamina C, rutina, ácido cafeico e ácido rosmarínico) têm atividade antidepressiva com doses relativamente mais baixas do que os antidepressivos comumente usados, como imipramina ou FLX. O mecanismo de ação dos antioxidantes no sistema nervoso central não é bem conhecido; no entanto, a rutina demonstrou exercer sua atividade antidepressiva de maneira semelhante aos antidepressivos convencionais, aumentando a disponibilidade de serotonina e norepinefrina na fenda sináptica (XU *et al.* 2014).

Em nossos resultados, o CUMS resultou em um aumento nos níveis de MDA, que é um marcador da LPO na cabeça das moscas, de acordo com VAVÁKOVÁ *et al.* (2015) com este dano os neurônios, reduzem a expressão de neurofilamentos, a estabilidade da membrana e a atividade dos canais iônicos, afetando a liberação de neurotransmissores e a conexão da serotonina com as membranas neuronais. Nosso tratamento com ORY mostra uma tendência a reduzir os níveis de MDA/LPO, possivelmente devido à proteção antioxidante, evitando danos às membranas neuronais. Corroborando com nossos resultados o estudo de ZHANG *et al.* (2009) ao submeter camundongos a um protocolo de estresse leve crônico imprevisível (UCMS) estes tiveram capacidade antioxidante total reduzida e uma redução do conteúdo de glutathiona, além da diminuição das atividades de SOD e CAT, e o tratamento com *Rehmannia glutinosa* Libosch considerada uma erva medicinal com potencial antioxidante conseguiu reverter estes insultos. Em seu estudo DINIZ *et al.* (2018) forneceu evidências robustas do desequilíbrio entre os danos do estresse oxidativo, em particular a LPO e as defesas antioxidativas como um mecanismo relacionado a depressão tardia e o comprometimento cognitivo, em uma população que compreendia 77 indivíduos com depressão tardia e 47 indivíduos não deprimidos (controles).

Nossos resultados demonstram atividade reduzida da enzima antioxidante SOD no grupo CUMS quando comparado ao grupo controle e no grupo em que houve a co-exposição ORY + CUMS, foi impedida a redução da atividade dessa enzima na cabeça da mosca. Nas células saudáveis, a resistência ao estresse oxidativo é alcançada através de um complexo sistema de defesa composto por componentes enzimáticos e não enzimáticos, cuja principal função é quebrar e/ou neutralizar as EROs. Esse complexo de defesa inclui SOD, CAT e glutathiona peroxidase. A SOD é uma enzima antioxidante chave envolvida na desintoxicação

de superóxido no metabolismo celular e é amplamente expressa em diferentes populações neuronais. ZHANG *et al.* (2009) relatam que foi observada diminuição da atividade da SOD no hipocampo de ratos expostos ao estresse crônico, fato que corrobora com nossos resultados. Após a atividade da SOD, a CAT e a glutathione peroxidase removem o H_2O_2 do ambiente intracelular convertendo-o em água, em nossos resultados, observamos um aumento *per se* na atividade de CAT no grupo ORY isoladamente.

Acreditamos que este aumento no estresse oxidativo causado por CUMS resultou dano oxidativo nas células destas moscas culminando na redução da sobrevivência no grupo CUMS quando comparado ao grupo controle. Uma possível resposta para esse fato seria a ativação de uma via de apoptose, como relatado por RODRIGUES *et al.* (2018) ao submeterem as moscas a um de protocolo de privação de sono obtiveram como resultado uma elevação na atividade das caspases 3/7 consideradas pró-apoptóticas. Em outro trabalho utilizando um protocolo de estresse moderado crônico (CMS) como um modelo de depressão em ratos por cinco semanas obtiveram que o estresse crônico/depressão, além de suprimir a neurogênese, desencadeou apoptose celular (BACHIS *et al.*, 2008). Nosso tratamento com ORY protegeu contra a letalidade do CUMS, em seu estudo HUANG *et al.* (2020) relatou que o pré-tratamento com ORY de células hepáticas *in vitro* expostas ao H_2O_2 inibiu a ativação das caspases 9 e 3. Esses achados indicam que o ORY exerce ação antioxidante e efeitos anti-apoptóticos, capaz de suprir a morte celular. Outra hipótese seria a disfunção mitocondrial sutilmente observada no grupo CUMS na análise de HRR, que atuaria causando um colapso energético celular e indutor de apoptose.

Além disso, também observamos que as moscas expostas ao estresse crônico tiveram percentuais de viabilidade reduzidos no corpo e uma tendência de redução nas cabeças das moscas, vários estudos descobriram que tanto o estresse por calor quanto o por frio induzem apoptose nos tecidos de insetos, onde os mecanismos de proteção em uma célula exposta ao estresse não são capazes de impedir o acúmulo de danos macromoleculares, e as células afetadas então ativam vias do suicídio apoptótico (LEE *et al.*, 2006, YI *et al.*, 2007). O tratamento com ORY foi eficaz na prevenção da diminuição da viabilidade celular no corpo induzida pelo estresse crônico potencialmente por atuar moderando a via do estresse oxidativo e da morte celular. Assim como no estudo de SOLANKI *et al.* (2017) que avaliou o efeito de antioxidantes presentes em algumas variedades de uvas sobre a exposição de ratos a um protocolo de derrota social, como resultados observaram que os antioxidantes resveratrol e a

quercetina foram protetores contra o estresse oxidativo fato que refletiu em uma maior viabilidade celular e a regulação da expressão do fator indutor de apoptótico.

Nossos resultados preliminares demonstram serem promissores uma vez que ORY demonstrou diminuir o estresse oxidativo, reduzindo os níveis de ER e de LPO (mesmo que não significativamente) na cabeça das moscas, em contra partida prevenindo a redução da atividade da enzima antioxidante SOD. Além disso, ao observarmos os resultados obtidos até o momento na análise de respirometria, ORY sugere uma prevenção contra a disfunção mitocondrial induzida por CUMS mantendo elevado o fluxo de oxigênio. Portanto, o efeito neuroprotetor do ORY pode estar relacionado ao seu efeito antioxidante e pode ser incorporado à dieta como um suplemento nutricional para aumentar as defesas do organismo contra o estresse oxidativo causado pela patologia depressiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v.105, p.121–126, 1984.

ARAUJO, S.M.; PAULA, M.T.; POETINI, M.R.; *et al.* Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **Neurotoxicology**, v.1862, p.1-29, 2015.

ARAUJO, S.M.; POETINI, M.R.; BORTOLOTTI, C.V.; *et al.* Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*. **Behavioural Brain Research**, v.351, p.104–113, 2018.

BACHIS, A.; CRUZ, M.I.; NOSHENY, R.L *et al.* Chronic Unpredictable Stress Promotes Neuronal Apoptosis in the Cerebral Cortex. **Neurosci Lett**, v.442, n.2, p.104–108, 2008.

BALE, T.L. Sensitivity to stress: Dysregulation of CRF pathways and disease development. **Hormones and Behavior**, v.48 p.1-10, 2005.

BANSAL, Y.; KUHAD, A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. **Current Neuropharmacology**, v.14, p.610-618, 2016.

BARANKEVICZ, G.B. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão.** Piracicaba, 2020. Originalmente apresentada como Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248–254, 1976.

CALHEIROS, M.N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz.** Florianópolis, 2020. Originalmente apresentada como Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. 2007.

CARUSO, G.; BENATTI, C.; BLOM, J.M.C.; *et al.* The Many Faces of Mitochondrial Dysfunction in Depression: From Pathology to Treatment. **Front. Pharmacol**, p.10-995, 2019.

DE CARVALHO, N.R.; RODRIGUES, N.R.; MACEDO, G.E.; *et al.* Eugenia uniflora leaf essential oil promotes mitochondrial dysfunction in *Drosophila melanogaster* through the inhibition of oxidative phosphorylation. **Toxicol Res (Camb)**, v.6, n.4, p.526-534, 2017.

DINIZ, B.S.; MENDES-SILVA, A.P.; SILVA, L.B.; *et al.* Oxidative stress markers imbalance in late-life depression. **Journal of Psychiatric Research**, v.102, p.29-33, 2018.

ELHADIDY, M.; SALAMA, A.; EL-KASSABY, M.; *et al.* "Protective effect of Hypericum perforatum on dexamethasone-induced diabetic depression in rats." **Journal of The Arab Society for Medical Research**, v.14, n.1, p.25, 2019.

FRANCO, J.L.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; *et al.* Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radic. Biol. Med.** v.47, p.449–457, 2009.

GRAF, E. Antioxidant Potential of Ferulic Acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.13, p.345-448, 1992.

HUANG, L.; JIANG, W.; ZHU, L.; *et al.* γ -Oryzanol suppresses cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathway in H₂O₂-stimulated L02 cells. **Biomed Pharmacother.** v.121, n.109554, 2020.

KHAN, S.; KHAN, R.A. Chronic Stress Leads to Anxiety and Depression. **Ann Psychiatry Ment Health**, v.5, n.1, p.1091, 2017.

LEE, R.J.; DAMODARAN, K.; YI S.X.; *et al.* Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. **Cryobiology**, v.52, p.459-463, 2006.

MISRA, H.P. & Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p.3170-3175, 1972.

RODRIGUES, N.R.; MACEDO, G.E.; MARTINS, I.K.; *et al.* Short-term sleep deprivation with exposure to nocturnal light alters mitochondrial bioenergetics in *Drosophila*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.120, p.395–406, 2018.

NECKAMEYER, W.S. & NIETO, A. Response to stress in *Drosophila* is mediated by gender, age and stress paradigm. **Stress**, v.18, n.2, p.254–266, 2015.

OHAKAWA, H.; OHISHI, U.; YAGI, K. Assay of lipid peroxidation in rat tissues by thiobarbituric reaction. **Anal. Biochem**, v.95, p.145–149, 1979.

O'KANE, C.J. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. **Curr Top Behav Neurosci**, v.7, p.37-60, 2011.

PÉREZ-SEVERIANO, F.; SANTAMARIA, A.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; *et al.* Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. **Neurochem. Res.** v.29, n.4, p.729–733, 2004.

SHELIN, Y.I.; GADO, M.H.; KRAEMER, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **Am J Psychiatry**, v.160, n.8, p.1516-8, 2003.

SOLANKI, N.; SALVI, A.; PATKI, G.; SALIM, S. Modulating Oxidative Stress Relieves Stress-Induced Behavioral and Cognitive Impairments in Rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.20, n.7, p.550–561, 2017.

VAVÁKOVÁ, M.; ĎURAČKOVÁ, Z.; TREBATICKÁ, J. Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, Article ID 898393, 12 pages. 2015.

XU, Y.; WANG, C.; KLABNIK, J.J.; *et al.* Novel Therapeutic Targets in Depression and Anxiety: Antioxidants as a Candidate Treatment. **Current Neuropharmacology**, v.12, p.108-119, 2014.

YI, S.; MOORE, C.W.; LEE, R.E. Rapid cold-hardening protects *Drosophila melanogaster* from cold-induced apoptosis. **Apoptosis**, v.12, p.1183–1193, 2007.

ZHANG, D.; WEN, X.S.; WANG, X.Y.; *et al.* Antidepressant effect of Shudihuang on mice exposed to unpredictable chronic mild stress. **J. Ethnopharmacol**, v.123, n.1, p.55-60, 2009.

PARTE III

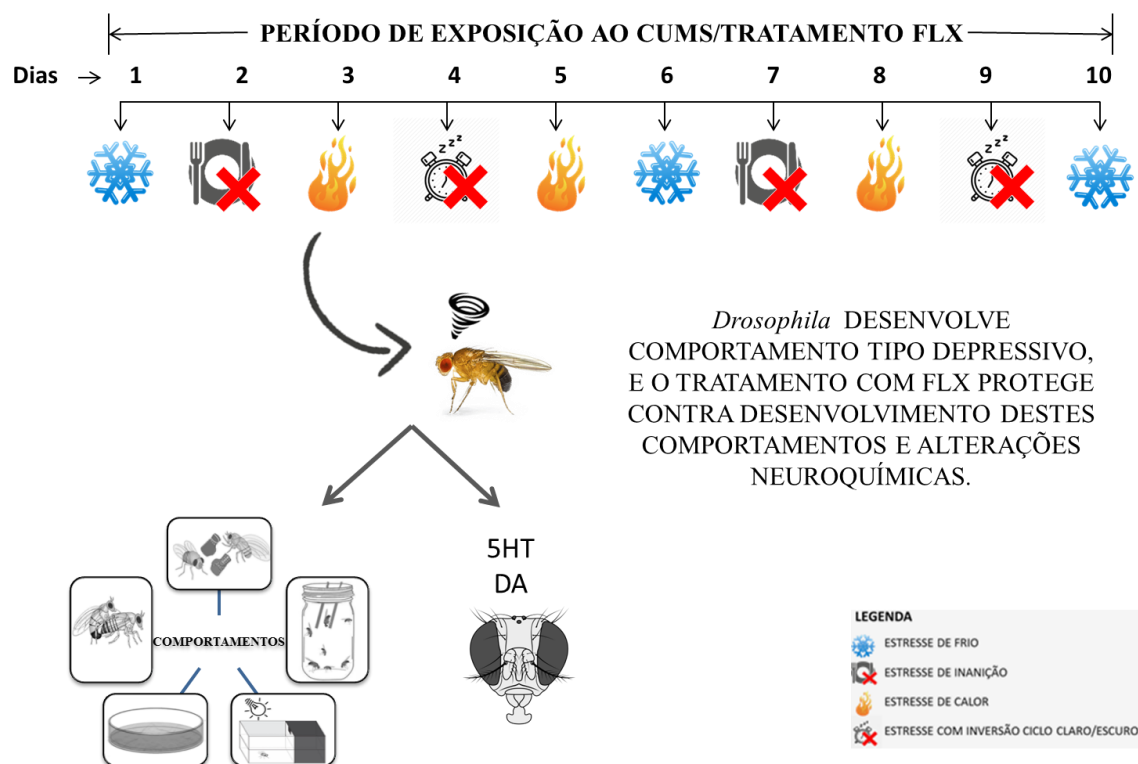
6. DISCUSSÃO GERAL

A depressão é um distúrbio mental e emocional muito comum, e sua alta taxa de recorrência leva a um declínio na qualidade de vida e à alta mortalidade (OMS, 2017). Esta patologia tem sido associada à neurotransmissão prejudicada principalmente dos caminhos serotoninérgicos e dopaminérgicos (CHEN, 2015), além disso, um dos fatores contribuintes significativos para o desenvolvimento de vários distúrbios neurológicos é o estresse crônico, este pode levar a prejuízos cognitivos severos (JAGADEESAN *et al.*, 2019).

Na presente tese utilizamos o protocolo de CUMS já definido a mais de duas décadas e considerado um método clássico empregado para induzir comportamentos semelhantes à depressão, déficits cognitivos e estudo dos mecanismos subjacentes em uma vastidão de trabalhos comumente utilizando modelos de roedores (JAGADEESAN *et al.*, 2019).

Assim sendo nosso trabalho buscou no primeiro momento (**Artigo Científico, pg.50**) tornar o modelo alternativo *Drosophila melanogaster* capaz de mimetizar um modelo tipo depressivo induzido por CUMS, uma vez que até o momento não haviam dados sobre comportamento semelhante à depressão em *Drosophila* desencadeado por um protocolo usando estressores que simulam o estresse da vida cotidiana, e tratamento com controle positivo ISRS a FLX (Figura 1).

Figura 1. Desenvolvimento do comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*, confirmado, após submissão destas aos testes comportamentais preditivos de depressão. CUMS (estresse crônico moderado e imprevisível); FLX (fluoxetina); 5HT (serotonina); DA (dopamina).



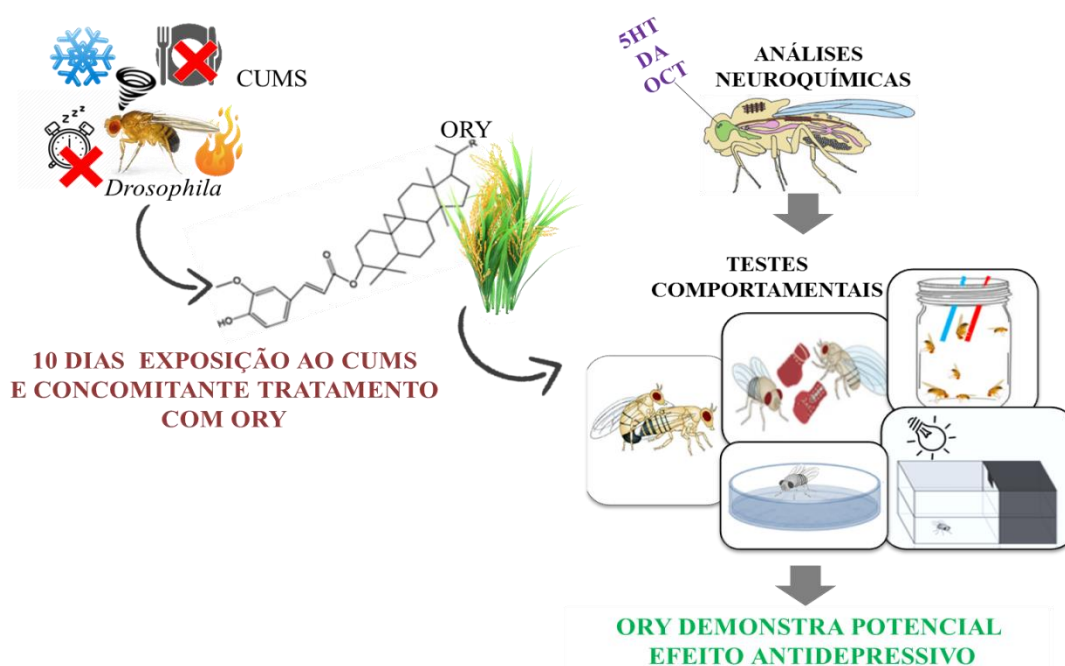
Fonte: Arquivo próprio (2020).

Sendo assim ao avaliarmos as alterações comportamentais e neuroquímicas de resposta das moscas expostas ao estresse crônico, inferimos que estas demonstraram atender aos critérios para a validade de um modelo animal de depressão como descrito por ABELAIRA *et al.* (2013) tendo validade de face (onde as manifestações comportamentais devem ser semelhantes aos sintomas observados em pacientes com depressão); validade de construção (onde as alterações fisiopatológicas que ocorrem em pacientes com depressão, também devem ocorrer em animais); e validade preditiva (onde mudanças comportamentais devem ser revertidas por tratamento efetivo (antidepressivos e/ou eletroconvulsoterapia) como em nosso caso utilizamos a FLX como controle positivo.

Os animais têm sido utilizados para investigar os princípios básicos da vida, e para desenvolvimento de uma melhor compreensão da anatomia animal e humana, com a fisiologia, patologia e farmacologia em estudos e pesquisas há milênios na história da humanidade (ANDERSEN & WINTER, 2017). Aqui a *Drosophila* demonstrou a possibilidade mimetizar condições biológicas de doenças humanas como a depressão reforçando o desenvolvimento de métodos científicos e a criação do conceito de modelos biológicos de animais alternativos. Considerando a necessidade de utilizar um menor número de mamíferos em experimentação, devido a questões éticas, de custo e de manejo, a utilização de modelos animais alternativos que possam ser preditivos para análises em seres humanos é necessária.

Avaliando os dados obtidos em nosso primeiro trabalho onde a *Drosophila* mostrou ser um modelo promissor para estudo da patologia depressiva induzida por CUMS, e por ser sabido que os antidepressivos comerciais comumente apresentam efeitos adversos, em nosso segundo trabalho (**Manuscrito I, pg.65**) utilizamos o γ -orizanol composto natural extraído do óleo do farelo do arroz, posto que, compostos naturais estão ganhando cada vez mais atenção devido ao seu amplo espectro de propriedades promotoras de saúde, incluindo funções antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e reduzidos efeitos adversos. Portanto avaliamos o potencial efeito antidepressivo de γ -orizanol nas moscas com comportamento tipo depressivo induzido por dez dias de CUMS. A exposição destas ao CUMS desencadearam mudanças fundamentais nos níveis monoaminérgicos fato que se refletiu a nível comportamental comprovando mais uma vez a validade deste modelo animal de depressão. Importaneamente, o tratamento com o γ -orizanol protegeu dos efeitos induzidos pelo estresse crônico, exercendo efeitos semelhantes aos antidepressivos comerciais (como a FLX utilizada no Artigo Científico). Por exemplo, no paradigma de desespero comportamental no teste de nado forçado, acreditamos que por atuar modulando o sistema monoaminérgico central da *Drosophila* principalmente prevenindo a redução dos níveis serotoninérgicos, octopaminérgicos e parcialmente disponibilidade sináptica dopaminérgica exerceu efeito anti-imobilidade neste teste. Assim, o tratamento com γ -orizanol pode ser adjuvante natural útil na terapia antidepressiva até mesmo desempenhando um efeito neuroprotetor (Figura 2).

Figura 2. γ -orizanol (ORY) protege contra o desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo e redução níveis de neurotransmissores em *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS); 5HT (serotonina); DA (dopamina); OCT (octopamina).



Fonte: Arquivo próprio (2020).

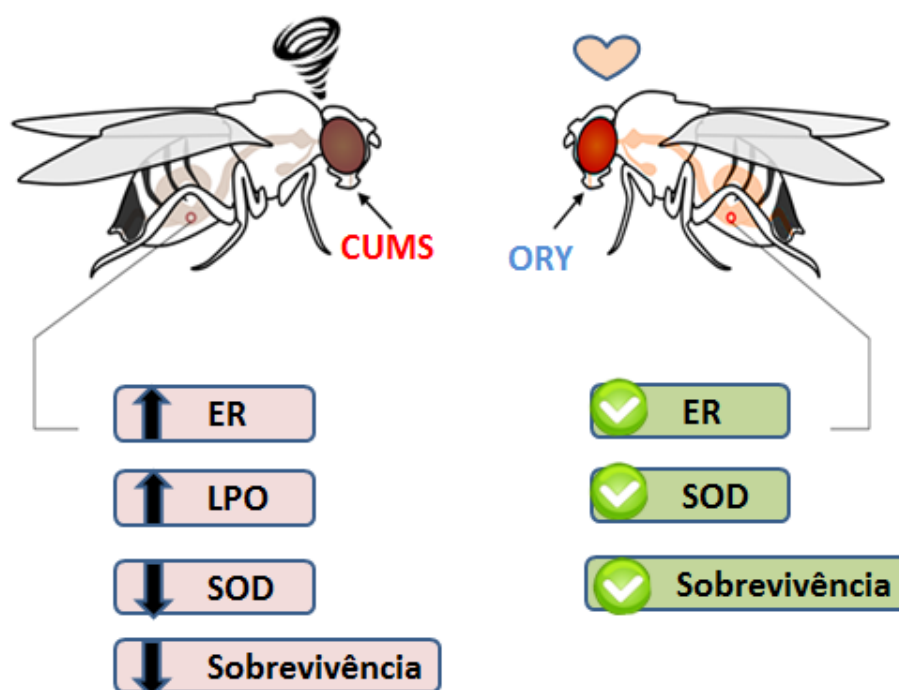
Outros aspectos importantes para elucidar alguns pontos importantes em relação a um possível efeito neuroprotetor de γ -orizanol foram demonstrados (**Resultados preliminares, pg. 102**) durante nossas análises de alguns marcadores de estresse oxidativo. Postula-se que o dano oxidativo como o aumento ER e níveis reduzidos de antioxidantes estejam envolvidos na etiopatogenia de distúrbios psiquiátricos como depressão e ansiedade e o comprometimento cognitivo, uma vez que o cérebro é especialmente sensível ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos prontamente oxidáveis, alto consumo de oxigênio e baixos níveis de antioxidantes (BHATTACHARYA & MURUGANANDAM, 2003; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2017; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2015).

E estes dados nunca estiveram tão em pauta, em estudos realizados a mais de 20 anos pelo grupo de pesquisa do professor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e coordenador do Programa de Tratamento do Transtorno de Humor Bipolar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Flávio Kapczinski, afirmam que os problemas da mente são biológicos, e á medida que uma pessoa desenvolve depressão, progridem também os casos de inflamações pelo corpo e de estresse oxidativo (*que causa envelhecimento precoce, em razão da morte das células*) (DINIZ *et al.*, 2018, UDINA *et al.*, 2015).

Portanto, o aprimoramento do sistema antioxidante pode ser eficaz no combate do estresse oxidativo, e vários antioxidantes naturais podem ser eficazes contra essas complicações de saúde mental induzidas pelo estresse, como visto anteriormente, γ -orizanol atua como antioxidante natural onde sua porção de ácido ferúlico é conhecida como um *scavenger* de radicais hidroxila e peroxila e, portanto, induz defesas antioxidantes aprimoradas resultando em diminuição da lesão oxidativa (SULTANA *et al.*, 2012). Além disso, linhas de evidência mostram que γ -orizanol, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em sua forma intacta e exerce efeitos benéficos na função cerebral de camundongos (RUNGRATANAWANICH *et al.*, 2019).

Fato que acreditamos estar envolvido com a redução dos níveis de ER, uma tendência na redução da LPO, um aumento na atividade da SOD, principalmente nas cabeças das moscas e uma redução da mortalidade observada em nosso grupo tratado com γ -orizanol (Figura 3).

Figura 3. γ -orizanol (ORY) demonstra potencial efeito antioxidante e protege contra o aumento de alguns parâmetros de estresse oxidativo espécies reativas (ER); peroxidação lipídica (LPO); superóxido dismutase (SOD) em *Drosophila melanogaster* expostas ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) por dez dias.



Fonte: Arquivo próprio (2020).

Os resultados desta tese sustentam que os modelos animais alternativos são um recurso crítico para ajudar no entendimento e delinear metas de tratamento e meios farmacológicos para melhorar nossa capacidade de gerenciar o comportamento depressivo induzido por CUMS. E estes comportamentos demonstraram estar associados a um complexo de antecedentes fisiopatológicos, incluindo neurotransmissão serotoninérgica, dopaminérgica, e octopaminérgica prejudicada, bem como um aumento de indicadores de estresse oxidativo, o que reflete no desenvolvimento de comportamentos preditivos da patologia depressiva nestas moscas. Modelos animais também são um recurso crítico para ajudar a delinear metas de tratamento e meios farmacológicos para melhorar nossa capacidade de gerenciar o risco de suicídio. O tratamento com ORY podem ajudar a prevenir o desenvolvimento dos sinais depressivos, como co-adjuvante ou como tratamento de suporte em combinação com outras

abordagens terapêuticas. De fato, considerando que os antidepressivos convencionais têm efetividade limitada e são inadequados para muitos indivíduos, especialmente por apresentarem diversos efeitos adversos, a descoberta de novas estratégias e compostos capazes de melhorar as terapias atuais e o manejo da depressão são necessárias e assim ampliar nossa compreensão da patogênese dos transtornos do humor.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos observar que:

a- Desenvolvemos pela primeira vez um protocolo de CUMS utilizando um compilado de estressores naturalistas fazendo uso de um modelo animal alternativo a *Drosophila melanogaster*.

b- A *Drosophila* demonstrou atender os critérios para se tornar um modelo animal válido para o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo.

c- O tratamento com γ -orizanol demonstrou ter potencial efeito antidepressivo nas moscas com comportamento tipo depressivo induzido por nosso protocolo de CUMS.

d- O tratamento com γ -orizanol prevenção das alterações neuroquímicas, bioquímicas e comportamentais das moscas com comportamento tipo depressivo induzido por CUMS, sendo portanto um futuro candidato adjuvante para o tratamento da patologia depressiva.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A próxima etapa é elucidar alguns mecanismos que contribuam para um melhor entendimento da atividade de γ -orizanol na proteção contra o desenvolvimento das alterações tipo depressivas induzida por CUMS.

Para isso pretendemos:

- Realizar análises de respirometria de alta resolução, das moscas submetidas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol, para inserção na estatística nos resultados preliminares para confecção do manuscrito II.

- Realizar a análise Western Blotting *Drosophila Neurotrophin 1* (DNT1) das moscas submetidas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Realizar a expressão gênica de proteínas através da técnica de PCR em tempo real, com *primers* específicos para *Drosophila Neurotrophin 1* (DNT1) das moscas submetidas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Determinar a modulação da fosforilação e expressão de proteínas MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 e P38), das moscas submetidas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol;
- Imunohistoquímica cerebral para avaliação da sinalização neuronal dos clusters de neurônios serotoninérgicos, dopaminérgicos, octopaminérgicos e neuropeptídeo F das moscas submetidas ao paradigma CUMS e tratadas com γ -orizanol.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELAIRA, H.M.; RÉUS, G.Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.35, p.S112–S120, 2013.
- ABOLAJI, A.O.; KAMDEM, J.P.; FAROMBI, E.O. *Drosophila melanogaster* as a Promising Model Organism in Toxicological Studies. **Arch. Bas. App. Med**, v.1, p.33-38, 2013.
- AGUIAR, A.S.; PINHO, R. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Rev Bras Med Esporte**, v.13, n.5, 2007.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; YAMAURA, M.; *et al.* Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **J Agric Food Chem**, v.48, p. 2313–2319, 2000.
- AKTER, S.; SASAKI, H.; UDDIN, K.R.; *et al.* Anxiolytic effects of γ -oryzanol in chronically- stressed mice are related to monoamine levels in the brain. **Life Sciences**, v.216, p.119–128, 2019.
- ALBERT, P.R.; BENKELFAT, C.; DESCARRIES, L. The neurobiology of depression-revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.368, 2013.
- AL-HARBI, K.S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. **Patient preference and adherence**, v.6, p.369-388, 2012.
- ALKADHI, K. Brain Physiology and Pathophysiology in Mental Stress. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Physiology**, v.2013, p.23, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2013.
- ANDERSEN, M.L.; & LUCILE M.F. WINTER. Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.91, 2019.
- ARANCIO, O.; CHAO, M. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Curr Opin Neurobiol**, v.17, p.325–330, 2007.
- ARAUJO, S.M.; PAULA, M.T.; POETINI, M.R.; *et al.* Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **Neurotoxicology**, v.1862, p.1-29, 2015.
- ARAUJO, S.M.; POETINI, M.R.; BORTOLOTTI, C.V.; *et al.* Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*. **Behavioural Brain Research**, v.351, p.1104–113, 2018.
- BAJPAI, A.; VERMA, A.K.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, R. Oxidative stress and major depression. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n.12, p-CC04–CC7, 2014.

BAUMEISTER, A.A.; HAWKINS, M.F.; UZELAC, S.M. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. **J Hist Neurosci**, v.12, n.2, p.207–220, 2003.

BECNEL, J.; JOHNSON, O.; LUO, J.; *et al.* The serotonin 5-HT₇ receptor is expressed in the brain of *Drosophila*, and is essential for normal courtship and mating. **PLoS One**, v.6, n.6, 2011.

BELUJON, P.; GRACE, A.A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, v.20, n.12, p.1036–1046, 2017.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Rev Neurosci**, v.7, p.137–151, 2006.

BHATTACHARYA, S.K.; MURUGANANDAM, A.V. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, p.547–555, 2003.

BHATTI, J.S.; BHATTI, G.K.; REDDY, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v.1863, n.5, p.1066–1077, 2017.

BIALA, G.; PEKALA, K.; BOGUSZEWSKA-CZUBARA, A.; *et al.* Behavioral and Biochemical Impact of Chronic Unpredictable Mild Stress on the Acquisition of Nicotine Conditioned Place Preference in Rats. **Molecular Neurobiology**, v.55, n.4, p.3270–3289, 2018.

BISHWAJIT, G.; O'LEARY, D.P.; GHOSH, S.; *et al.* Association between depression and fruit and vegetable consumption among adults in South Asia. **BMC Psychiatry**, v.17, p.15, 2017.

BORTOLOTTI, V.C.; PINHEIRO, F.C.; ARAUJO, S.M.; *et al.* Chrysin reverses the depressive-like behavior induced by hypothyroidism in female mice by regulating hippocampal serotonin and dopamine. **European Journal of Pharmacology**, v.822, p.78–84, 2018.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci**, v.17, n.3, p.295–303, 2015.

BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.4, n.1, p.7–20, 2002.

BUCKEMÜLLER, C.; SIEHLER, O.; GÖBEL, J.; ZEUMER, R.; ÖLSCHLÄGER, A.; EISENHARDT, D. Octopamine underlies the counter-regulatory response to a glucose deficit in Honeybees (*Apis mellifera*). **Front. Syst. Neurosci.** 11:63, 2017.

CAI, N.; BIGDELI, T.; KRETZSCHMAR, W. *et al.* Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. **Nature**, v.523, p. 588–591, 2015.

CALHEIROS, M.N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. Florianópolis, 2020. Originalmente apresentada como Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. 2007.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; PORSOLT, R.D. **Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents**. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 6. 2009.

CHAUDHURY, D.; WALSH, J.J.; FRIEDMAN, A.K.; *et al.* Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. **Nature**, v. 493, p.532–536, 2013.

CHEN, J.; LIN, D.; ZHANG, C. Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. **Metab Brain Dis**, v.30, n.1, p.129-36, 2015.

CHEN, Z.Y.; JING, D.; BATH, K.G.; *et al.* Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. **Science**, v. 314, p.140–143, 2006.

CHROUSOS, G.P. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol**, v.5, n.7, p.374-81, 2009.

COWEN, P.J. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? **Trends Pharmacol. Sci**, v.29, p.433–436, 2008.

CUNHA, M.F.; GANDINI, R.C. Adesão e Não-Adesão ao Tratamento Farmacológico para Depressão. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.25, n.3, p.409-418, 2009.

DENNO, M.E.; PRIVMAN, E.; VENTON, B.J. Analysis of the content of neurotransmitter tissue in *Drosophila melanogaster* at different stages of life. **Chemical Neuroscience of ACS**, v.6, n.1, p.117-123, 2015.

DINIZ, B.S.; MENDES-SILVA, A.P.; SILVA, L.B.; *et al.* Oxidative stress markers imbalance in late-life depression. **Journal of Psychiatric Research**, v.102, p.29-33, 2018.

DUMAN, R.S.; AGHAJANIAN, G.K.; SANACORA, G.; *et al.* Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nat Med**, v.22, n.3, p.238–249, 2016.

DUNLOP, B.W.; NEMEROFF, C.B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch Gen Psychiatr**, v.64, n.3, p.327–37, 2007.

EATON, K.; SALLEE, F.R.; SAH, R. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. **Curr TopMed Chem**, v.7, p.1645–1659, 2007.

EDWARDS, A.C.; ROLLMANN, S.M.; MORGAN, T.J.; *et al.* Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*, **PLoS Genet**, v.2, n.9, 2006.

ENDO, N.; UJITA, W.; FUJIWARA, M.; *et al.* Multiple animal positioning system shows that socially-reared mice influence the social proximity of isolation-reared cagemates. **Commun Biol**, v.1, p.225, 2018.

ENDRŐCZI, E. Stress and Adaptation, **Akadémia, Budapest**, 1991.

ESLAMI, S.; ESA, N.M.; MARANDI, S.M.; *et al.* Effects of gamma oryzanol supplementation on anthropometric measurements & muscular strength in healthy males following chronic resistance training. **The Indian Journal of Medical Research**, v.139, n.6, p.857-863, 2014.

EVEN, N.; DEVAUD, J.M.; BARRON, A.B. General Stress Responses in the Honey Bee. **Insects**, v.3, p.1271-1298, 2012.

EVERSHED, R.P.; SPOONER, N.; PRESCOTT, M.C.; GOALD, L.J. Isolation and characterization of intact sterol ferulates from seeds. **Journal of Chromatography, Amsterdam**, v.440, p.23-35, 1988.

FAKHOURY, M. Revisiting the Serotonin Hypothesis: Implications for Major Depressive Disorders. **Mol Neurobiol**, v.53, n.5, p.2778-2786, 2016.

FAROOQUI, T. Review of octopamine in insect nervous system. **Open Access Insect Physiology**, v. 4. n. 1, 2012.

FEANY, M.B.; BENDER, W.W.A. *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v.404, p.394-398, 2000.

FELICITY, N.G.; BERK, M.; DEAN, O.; *et al.* Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.11, n.6, p.851-876, 2008.

FILHO, C.B.; JESSE, C.R.; DONATO, F.; *et al.* Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and $\text{Na}^{(+)}, \text{K}^{(+)}\text{-ATPase}$ activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v.19, n.289, p.367-80, 2015.

FITZGERALD, P.J.; YEN, J.Y.; WATSON, B.O. Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. **PLOS ONE**, v.14, n.4, e0215554, 2019.

FOLDI, I.; ANTHONY, N.; HARRISON, N.; *et al.* Three-tier regulation of cell number plasticity by neurotrophins and Tolls in *Drosophila*. **J. Cell Biol.** v.216, p.1421-1438, 2017.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.8, n.3, p.323-333, 2006.

GHATAK, S.B.; PANCHAL, S.J. Anti-hyperlipidemic activity of oryzanol, isolated from crude rice bran oil, on Triton WR-1339-induced acute hyperlipidemia in rats. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** v.22, n.3, 2012.

GRAF, E. Antioxidant Potential of Ferulic Acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.13, p.345-448, 1992.

HALES, K.G.; CA, K.; LARRACUENTE, A.M.; *et al.* Genetics on the Fly: a primer on the *Drosophila* model system. **Genetics**, v.3, p.815-842, 2015.

HASHIMOTO, T.; BERGEN, S.E.; NGUYEN, Q.L.; *et al.* Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. **J Neuroscience**, v.25, p.372–383, 2005.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**, p.155–61, 2010.

HE, C.; YANG, Y.; ZHANG, M.; *et al.* Regulation of Sleep by Neuropeptide Y-Like System in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, v.8, n.9, 2013.

HIRABAYASHI, S. “The interplay between obesity and cancer: a fly view.” **Disease Models & Mechanisms**, v.9; p.917-926, 2016.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Produtores gaúchos concluem colheita do arroz**. Disponível em: <<https://irga.rs.gov.br/produtores-gauchos-concluem-colheita-do-arroz>>. Acesso em: 10/03/2020.

ISINGRINI, E.; CAMUS.; VGUIQUET, A.M.; *et al.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, v.5, n.4, e10404, 2010.

JAGADEESAN, S.; CHIROMA, S.M.; BAHARULDIN, M.T.H.; *et al.* Centella asiatica prevents chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes in rats. **Biomed. Res. Ther.**, v.6, n.6, p.3233-3243, 2019.

JAHN, G.B. **Extração supercrítica de óleo de farelo de arroz e obtenção de frações enriquecidas em γ -oryzanol**. Florianópolis, 2020. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, 2004.

JENNINGS, B.H. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. **Material today**, v.14, n.5, p.190-195, 2011.

JESBERGER, J.A.; RICHARDSON, J.S. Animal models depression: parallels and correlates to serve depression in humans. **Biol Psychiatry**, v.20, p.764-784, 1985.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I.J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model- are we there yet? **Behav Brain Res**, v.2, n.341, p.79-90, 2018.

JIANG, M.D.; ZHENG, Y.; WANG, J.L. Drug induces depression-like phenotypes and alters gene expression profiles in *Drosophila*. **Brain Research Bulletin**, v.132, p.222-231, 2017.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev. Bras. Psiquiatr**, São Paulo , v. 25, supl. 2, p. 46-51, 2003.

JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v.6, n.298, p.1911-2, 2002.

JOSHI, M.; KAUR, R.; KANWAR, P.; *et al.* To evaluate antioxidant activity of γ - oryzanol extracted from rice bran oil. **Int. J. Life Sci. Pharm. Res**, v.6, p.17-25, 2016.

KATZ, R.J. Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.16, p.965-968, 1982.

KEELER, A.B.; DEPPMANN, C.D. The evolutionary origins of antagonistic neurotrophin signaling. **The Journal of Cell Biology**, v.216, n.5, p.1223-1225, DOI: 10.1083/jcb.201702115, 2017.

KESSLER, R.C.; USTUN, T.B. The WHO world mental health surveys global perspectives on the epidemiology of mental disorders. **Geneva: World Health Organization**, 2008.

KOCH, S.; PERRY, K.W.; NELSON, D.L.; CONWAY, R.G. R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.6, p.949-59, 2002.

KOOP, M.S.; RÉTHELYI, J. Where psychology meets physiology: chronic stress and premature mortality—the Central-Eastern European health paradox, **Brain Research Bulletin**, v.62, p.351–367, 2004.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.333–343, 2009.

KOWIANSKI, P.; LIETZAU, G.; CZUBA, E.; *et al.* BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. **Cell Mol Neurobiol**, v.38, n.3, p.579e93, 2018.

KRISHNAN, V.; HAN, M.H.; GRAHAM, D.L.; *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, n.131, p.391–404, 2007.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v.16, n. 455(7215), p. 894–902, 2008.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology (Berl)**, v.214, n.4, p.819-28, 2011.

KUPFER, D.J. The pharmacological management of depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.7, n.3, p.191-205, 2005.

LAFER, B.; VALLADA FILHO, H.P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr**, v.21, supl.1, p.12-17, 1999.

LEITE, J.G.P. **Da perda não elaborada: a melancolia em Sigmund Freud**. Anais do seminário dos estudantes de pós-graduação em filosofia da UFSCar.10ª edição ISSN (Digital): 2358-7334, 2014.

LEONARD, B.E. Inflammation, depression and dementia: are they connected? **Neurochem Res**, v.32, n.10, p.1749–1756, 2007.

- LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; *et al.* Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v.115, n.2, p.389–404, 2009.
- LI, G.; RUAN, L.; CHEN, R.; *et al.* Synergistic antidepressant-like effect of ferulic acid in combination with piperine: involvement of monoaminergic system. **Metabolic brain disease**, v.30, n.6, p.1505-1514, 2015.
- LIU, D.; XIE, K.; YANG, X.; *et al.* Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v.264, p.9-16, 2014.
- MACEDO, G.E.; GOMES, K.K.; RODRIGUES, N.R.; *et al.* Senecio brasiliensis impairs eclosion rate and induces apoptotic cell death in larvae of *Drosophila melanogaster*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.198, p.45-57, 2017.
- MAIER, S & SELIGMAN, M. Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. **Psychological Review**, v.123. p. 349-367, 2016.
- MANCHESTER FLY FACILITY: Project droso4schools, 2019. Disponível em: <https://droso4schools.wordpress.com/>. Acesso em: 30 jan. 2020.
- MARUF, A.A.; HO, Y.P.; HORACE, W. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v.234, n.5, p. 96-104, 2015.
- MASEK, P.; REYNOLDS, L.A.; BOLLINGER, W.L.; *et al.* Altered regulation of sleep and feeding contributes to starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol**, v.217, n.17, p.3122–3132, 2014.
- MCILROY, G.; FOLDI, I.; AURIKKO, J.; *et al.* Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the *Drosophila melanogaster* CNS. **Nat Neurosci**, v.16, p.1248–1256, 2013.
- McKINNEY, W.T. Animal models of depression: an overview. **Psychiatr Dev**, v.2, p.77-96, 1984.
- MEHDI, B.J.; TABASSUM, S.; HAIDER, S.; *et al.* Nootropic and anti-stress effects of rice bran oil in male rats. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.7, p.4544-4550, 2015.
- MENDES, E.D.; VIANA, T.C.; BARA, O. Melancolia e Depressão: Um Estudo Psicanalítico. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.30, n.4, p.423-431, 2014.
- MEYER, S.E.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. Major depression and the stress system: a life span perspective. **Dev Psychopathol**, v.13, n.3, p.565-80, 2001.
- MINATEL, I.; FRANCISQUETI, F.V.; CORRÊA, C.R. Antioxidant Activity of Oryzanol: A Complex Network of Interactions. **Int. J. Mol. Sci**, v.17, p.1107, 2016.
- MONTEGGIA, L.M.; LUIKART, B.; BARROT, M.; *et al.* Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. **Biol Psychiatry**, v.61, p.187–197, 2007.

MONTEIRO, K.C.; CAVALCANTE, L.; VIEIRA, A.M. Depressão: uma 'psicopatologia' classificada nos manuais de psiquiatria. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 27, n. 1, p. 106-119, Mar. 2007.

MORAES, J.K. **Estudo do papel da via de sinalização BDNF/TrkB na carcinogênese bucal**. Piracicaba, 2020. Originalmente apresentada como Tese à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 2019.

MOURA, M.H.D. **Melancolia e criação literária: veredas psicanalíticas em Guimarães Rosa**. Paraíba, 2020. Originalmente apresentada como Dissertação de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Letras do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, da Universidade Federal da Paraíba, 2017.

MUSSELMAN, L.P.; FINK, J.L.; NARZINSKI, K.; *et al.* A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. **Dis Model Mech**, v.4, p.842–849, 2011.

NABAVI, S.M.; DAGLIA, M.; BRAIDY, N.; *et al.* Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. **Nutr Neurosci**, v.20, p.180–194, 2017.

NECKAMEYER, W.S.; NIETO, A. Response to stress in *Drosophila* is mediated by gender, age and stress paradigm. **Stress**, v.18, n.2, 254–266, 2015.

O'KANE, C.J. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. **Curr Top Behav Neurosci**, v.7, p.37-60, 2011.

OMS Genebra: Organização Mundial da Saúde. Depressão e outros transtornos mentais comuns: estimativas globais de saúde, 2017)

ONG, C.; YUNG, L.Y.L.; CAI, Y.; *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v.9, n.3, p.396-403, 2015.

ORMEL, J.; HARTMAN, C.A. & SNIEDER, H. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges. **Transl Psychiatry**, v.9, p. 114, 2019.

OSSOWSKA, G.; DANILCZUK, Z.; KLENK-MAJEWSKA, B. Antidepressants in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced deficit of fighting behavior. **Pol J Pharmacol**, v.56, n.3, p.305-11, 2004.

OSTROWSKI D.; ZARS T. “Place memory,” in **Handbook of Behavior Genetics of *Drosophila melanogaster*: Behavioral Phenotypes and Models of Neurobehavioral Disorders**, ed. Dubnau J.; editor. (Cambridge, MA: Cambridge University Press), p.125–134, 2014.

PALTA, P.; SAMUEL, L.J.; MILLER, E.R.; *et al.* Depression and Oxidative Stress: Results From a Meta-Analysis of Observational Studies. **Psychosomatic medicine**, v.76, n.1, p.12-19, 2014.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Barker EL, ed. Pharmacological Reviews**, v.63, n.2, p.411-436, 2011.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; SILVA, L.H.; SANT'ANA, A.S.; *et al.* Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanol. **J Sci Ind Res**, v.63, 2007.

PAULA, M.T.; ZEMOLIN, A.P.P.; VARGAS, A.P.; *et al.* Effects of Hg(II) Exposure on MAPK. Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*. **Environ Toxicol**, v.29, n.6, p.621-630, 2012.

PAYNE, M.E.; STECK, S.E.; GEORGE, R.R.; *et al.* Vegetable and Antioxidant Intakes are Lower in Older Adults with Depression. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v.112, n.12, p.2022-2027, 2012.

PEREZ-TERNERO, C.; SOTOMAYOR, M.A.; HERRERA, M.D. Contribution of ferulic acid, γ -oryzanol and tocotrienols to the cardiometabolic protective effects of rice bran. **Journal of Functional Foods**, v.32, p.58–71, 2017.

PRATT, L.A.; BRODY, D.J. Depression in the United States household population, 2005-2006. United States of America: **NCHS Data Brief**, v.7, p.1-8, 2008.

RAMIN, C. M.; SLAWASKA-ENG DOMOCOS, D.; RAO, Y. Aggression and social experience: genetic analysis of visual circuit activity in the control of aggressiveness in *Drosophila*, **Mol. Brain**, v.7, n.55, 2014.

READ, R.D.; GOODFELLOW, P.J.; MARDIS, E.R.; *et al.* A *Drosophila* model of multiple endocrine neoplasia type 2. **Genetics**, v.171, p.1057–1081, 2005.

RIES, A.S.; HERMANN, T.; POECK, B.; *et al.* Serotonin modulates a depression-like state in *Drosophila* responsive to lithium treatment. **Nature Communications**, v.8, n.15738, 2017.

ROUSSEAU, G. Depression's forgotten genealogy: notes towards a history of depression. **Hist Psychiatry**, v.11, n.41, p.71-106, 2000.

RUNGRATANAWANICH, W.; CENINI, G.; MASTINU, A.; *et al.* γ -Oryzanol Improves Cognitive Function and Modulates Hippocampal Proteome in Mice. **Nutrients**, v.11, p.753, 2019.

SABIN, L.R.; HANNA, S.L.; CHERRY, S. Innate antiviral immunity in *Drosophila*. **Curr Opin Immunol**, v.22, p.4–9, 2010.

SALIM, S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. **Current Neuropharmacology**, v.12, p.140-147, 2014.

SAMARGHANDIAN, S.; AZIMI-NEZHAD, M.; BORJI, A.; *et al.* Protective effects of carnosol against oxidative stress induced brain damage by chronic stress in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, n.1, 2017.

SAMARGHANDIAN, S.; AZIMI-NEZHAD, M.; SAMINI, F. Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. **Exp Anim**, v.64, p.65–71, 2015.

SANCHEZ, M.M.; LADD, C.O.; PLOTSKY, P.M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol**, v.13, p.419-449, 2001.

SCHEGGI, S.; DE MONTIS, M.G & GAMBARANA, C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.21, n.11, p.1049–1065, 2018.

SEETHARAMAIAH, G.S.; KRISHNAKANTHA, T.P.; CHANDRASEKHARA, N. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats, **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo), v.36, n.3, p.291-7, 1990.

SELYE, H. Stress in Health and Disease, **Betterworth**, 1976.

SHADRINA, M.; BONDARENKO, E.A.; SLOMINSKY, P.A. Genetics Factors in Major Depression Disease. **Front Psychiatry**, v.9, p.334, 2018.

SHIMABUKURO, M.; MORITAKE H.; RIE, K.; *et al.* Effects of the brown rice diet on visceral obesity and endothelial function: the BRAVO study. **The British journal of nutrition**, v.111, n.2, p.1-11, 2014.

SHIN, M.; JEFFREY, M.; COPELAND, JILL V.B. *Drosophila* as a model system for neurotransmitter measurements, **ACS Chem Neurosci**. 2018.

SHU, C.; XIAO, L.; TANG, J.; *et al.* Blunted behavioral and molecular responses to chronic mild stress in adult rats with experience of infancy maternal separation, **Tohoku J. Exp. Med**, v.235, n.2, p.81–87, 2015.

SON, M.J.; RICO, C.W.; NAM, S.H.; *et al.* Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet. **J Food Sci**, v.76, p.H7–H10, 2011.

SU, Q.; TAO, W.; WANG, H.; *et al.* Umbelliferone attenuates unpredictable chronic mild stress induced-insulin resistance in rats. **IUBMB Life**, v.6, n.5, p.403-9, 2016.

SULTANA, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1822, p.748–752, 2012.

TAN, S.Y.; YIP A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. **Singapore Med J**, v.59, n.4, p.170–171, 2018.

THOENEN, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. **Progress in Brain Research**, v.128, p.183-191, 2000.

TSIGOS, C.; KYROU, I.; KASSI, E.; *et al.* **Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology**. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health, 2000.

TSUJI, M.; TAKEUCHI, T.; MIYAGAWA, K.; *et al.* Role of brain 5-HT₇ receptors as a functional molecule involved in the development of stress adaptation. **Jap J Psychopharmacol**, v.32, n.4, p.187–93, 2012.

UDINA, M.; NAVINÉS, R.; EGMOND, E.; *et al.* Glucocorticoid Receptors, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Serotonin and Dopamine Neurotransmission are Associated with Interferon-Induced Depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.20, n.4, 2016.

van BOXELAERE, M.; CLEMENTS, J.; CALLAERTS, P.; *et al.* Unpredictable chronic mild stress differentially impairs social and contextual discrimination learning in two inbred mouse strains. **PLoS ONE**, v.12, n.11, e0188537, 2017.

VERDOLINI, N.G.; PERUGI, G.L.; MURRU, S. Aggressiveness in depression: a neglected symptom possibly associated with bipolarity and mixed features. **Acta Psychiatr Scand**, v.136, n.4, p.362-372, 2017.

VOSE, L.R.; STANTON, P.K. Synaptic Plasticity, Metaplasticity and Depression. **Curr Neuropharmacol**, v.15, n.1, p.71–86, 2017.

WAN, S.; XU, M.; HU, L. Schisandrin rescues depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress via GDNF/ERK1/2/ROS and PI3K/AKT/NOX signaling pathways in mice. **Psychiatry**, v.257, p.230-237, 2017.

WANG, T.; HICKS, K.B.; MOREAU, R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. **J Am Oil Chem Soc**, v.79, p.1201–1206, 2002.

WILLNER, P. & MITCHELL, P.J. Animal models of depression: a diathesis/stress approach. **Biological Psychiatry**, p.703-726, 2002.

WILLNER, P. Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives. **Cambridge University Press**; 1991.

WILSON, T.A.; NICOLosi, R.J.; KOTYLA, T.; *et al.* Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations greater than soy protein with isoflavones compared with casein in hypercholesterolemic hamsters. **Nutrition Research**, n.27, p.498–504. 2007.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nat Rev Drug Discov**, v.4, n.9, p.764-74. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Depression, Geneva: WHO, 2017.

XU, J.; LI, M.; SHEN, P. A G-protein-coupled neuropeptide Y-like receptor suppresses behavioral and sensory responses to multiple stressful responses in *Drosophila*. **J Neurosci**, v.30, p.2504–2512, 2010.

XU, Y.Y.; LIANG, J.; XIA, Q.R. Novel insights into the pharmacological effects of resveratrol on the management of depression: a short review. **Pharmazie**, v.72, p.499–502, 2017.

XU, Z.; GODBER, J. S. Antioxidant activities of major components of γ - oryzanol from rice bran using a linolenic acid model. **Journal of the American Oil Chemists Society, Champaign**, v.78, n.6, p.645-649, 2001.

XU, Z.M.; HUA, N.; GODBER, J.S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by

2,29-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride. **J Agric Food Chem**, v.49, p.2077–2081, 2001.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; *et al.* Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biol Pharm Bull**, v.21, p.1072–1076, 1998.

YUAN, P.; ZHOU, R.; WANG, Y.; *et al.* Altered Levels of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Proteins in Postmortem Frontal Cortex of Individuals with Mood Disorders and Schizophrenia. **Journal of affective disorders**, v.124, n.1-2, p.164-169, 2010.

ZENI, A.L.; DIAS, E.A.; ZOMKOWSKI, A.; *et al.* Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, v.679, p.68–74, 2012.

ZHANG, D.; WEN, X.S.; WANG, X.Y.; *et al.* Antidepressant effect of Shudihuang on mice exposed to unpredictable chronic mild stress. **J. Ethnopharmacol**, v.123, n.1, p.55-60, 2009.

ZHANG, L.; WANG, Q.D.; SHI, H.M.; *et al.* [Influência do ácido ferúlico na diáde dor depressão induzida por reserpina]. **Yao Xue Xue Bao**, v.48, n.1, p.327, 2013.

ZHAO, J.; QI, X.R.; GAO, S.F.; *et al.* Different stress-related gene expression in depression and suicide. **J. Psychiatr Res**, v.68, p.176-85, 2015.

ZHU, B.; PENNACK, J.A.; MCQUILTON, P.; *et al.* *Drosophila* Neurotrophins Reveal a Common Mechanism for Nervous System Formation. **PLoS Biol**, v.6, n.11, 2008.

10. ANEXOS

ANEXO A- Autorização para reprodução do Artigo científico “*Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in Drosophila melanogaster*” publicado na revista *Behavioural Brain Research*, 351 (2018) 104–113.

20/01/2020

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Sign in



Create Account



Chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior and dysregulation of brain levels of biogenic amines in *Drosophila melanogaster*

Author:
Stifani Machado Araujo, Marcia Rósula Poetini, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Shanda de Freitas Couto, Franciane Cabral Pinheiro, Luana Barreto Meichtry, Francieli Polet de Almeida, Elize Aparecida Santos Musachio, Mariane Trindade de Paula, Marina Prigol

Publication: Behavioural Brain Research

Publisher: Elsevier

Date: 1 October 2018

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

ANEXO B- Confirmação da submissão do Manuscrito I “*γ-oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster**” na revista *Stress*.

20/01/2020

ScholarOne Manuscripts



Stress

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Stress

Manuscript ID

EDS-2625

Title

γ-oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster*

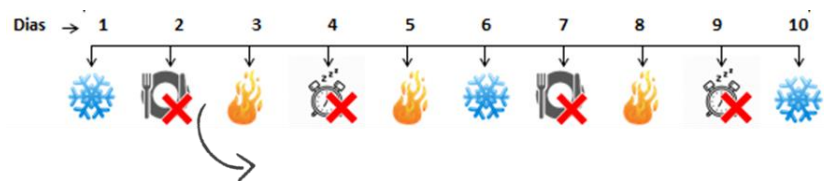
Authors

Araujo, Stifani
 Bortolotto, Vandreza
 Poetini, Márcia
 Dahleh, Mustafa
 Couto, Shanda
 Pinheiro, Franciane
 Meichtry, Luana
 Musachio, Elize
 Ramborger, Bruna
 Roehrs, Rafael
 Guerra, Gustavo
 Prigol, Marina

Date Submitted

20-Jan-2020

ANEXO C- Resumo Gráfico da Tese.



é um modelo válido
para indução de comportamento
tipo depressivo em *Drosophila*



ORY causa efeito
antidepressivo

