AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA Y- ORIZANOL SOBRE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL EM DROSOPHILA MELANOGASTER

Mustafa Munir Mustafa Dahleh [1]

Márcia Rósula Poetini [2]

Shanda de Freitas Couto [3]

Elize Aparecida Santos Musachio [4]

Marina Prigol [5]

Stífani Machado Araujo [6]

Resumo:

A depressão é caracterizada como uma síndrome neuropsiquiátrica responsável por causar alterações celulares e moleculares sutis e distribuídas nos circuitos neurais. O estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) é um modelo animal válido para induzir a fisiopatologia da depressão, ele é responsável por simular desordens semelhantes à depressão clínica. Nesse sentido, a Drosophila melanogaster é um modelo válido para o estudo de transtornos psiquiátricos uma vez que conserva estruturas e mecanismos nervosos semelhantes a mamíferos. Na busca por compostos ricos em bioativos naturais para o tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos como a depressão, fizemos uso de -orizanol que contém uma mistura de ésteres de ácido ferúlico e álcoois triterpênicos, na literatura é descrito por possuir potente efeito antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor, mas há uma escassez de dados na literatura sobre um possível efeito antidepressivo do -orizanol. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito terapêutico do -orizanol sobre o modelo de estresse crônico moderado e imprevisível em machos de Drosophila melanogaster. Para os tratamentos moscas adultas machos de 1 a 4 dias foram divididas em 6 grupos com 50 moscas cada: (1) Grupo Controle, (2) grupo CUMS, (5) ORY (25 M) , (6) ORY (25 M) + CUMS e submetidas ao protocolo de CUMS (estresse inanição, frio, calor, privação sono). Ao final do tratamento foram realizados testes comportamentais de campo aberto, teste de nado forçado, e avaliado os níveis de serotonina. Como resultados as moscas submetidas ao CUMS tiveram uma diminuição em seus níveis de serotonina, gerando assim, um maior tempo de imobilidade no teste de nado forçado o que é caracterizado como desespero comportamental, ao ser submetida a um novo ambiente ou desafio. O tratamento com ORY (25 M), foi capaz de prevenir parcialmente a diminuição dos níveis de serotonina bem como foi efetivo em diminuir o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Tomados em conjunto nossos resultados ORY (25 M) pode nos fornecer um tratamento viável sobre o protocolo CUMS, possibilitando, assim, efeitos satisfatórios como adjuvante na terapia como um antidepressivo uma vez que, por ser um composto natural é livre de efeitos adversos, baixo custo, e pode ser uma nova alternativa a utilização de antidepressivos convencionais.

Palavras-chave: drosophila, estresse crônico, y-orizanol

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA Y- ORIZANOL SOBRE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL EM DROSOPHILA MELANOGASTER

[1] Aluno de graduação. mustafamunir25@gmail.com. Autor principal

[2] Pós-graduação. marciapoetini@gmail.com. Co-autor

[3] Pós-graduação. shandacouto@gmail.com. Co-autor

[4] Pós-graduação. elizemusachio@gmail.com. Co-autor

[5] Docente. marinaprigol@unipampa.edu.br. Orientador

[6] Pós-graduação. araujofani@gmail.com. Co-orientador

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA γ- ORIZANOL SOBRE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL EM *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUÇÃO

Com o avançar dos tempos novas formas de produção de trabalho foram desenvolvidas, os moldes da sociedade contemporânea em que vivemos mudaram, foram atribuídas novas funções, novas tarefas e principalmente a instituição de uma grande produtividade induzida ao trabalho, atribuído à isso novas doenças surgiram, como a depressão (CUNHA, 2015). A patologia depressiva no mundo contemporâneo é amplamente discutida em aspectos internacionais, sendo caracterizada como uma síndrome neuropsiquiátrica que mais alteram a saúde mental na maioria dos indivíduos que apresentam dimensões afetivas negativas em suas vidas (PAIS-RIBEIRO et al., 2004). Concomitantes a isso formas de se induzir a fisiopatologia da depressão vem sendo estudadas em modelos animais, uma delas é estresse crônico moderado imprevisível, que amplamente utilizado em animais para simular desordens semelhantes à depressão clínica e acarreta em modificações nos níveis serotoninérgicos (LIU et al., 2014; VEDOVATO et al., 2014).

A alta prevalência ao longo da vida dessa condição incapacitante induzida pela depressão, associada a limitações nos medicamentos existentes, exige o desenvolvimento de terapias aprimoradas, como o uso de compostos com bioativos naturais, como o γ-orizanol. O γ-orizanol extraído do óleo do farelo do arroz, é descrito na literatura por proporcionar benefícios antioxidantes (JULIANO et al., 2005) e neuroprotetores (CHENG et al., 2008) entre outros. No entanto, há uma escassez de dados na literatura sobre eficácia de γ-orizanol relacionado a um possível efeito antidepressivo.

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, é considerada um modelo válido para estudo de comportamentos depressivos e já foi utilizada para modelar transtornos psiquiátricos complexos, adicionalmente, este inseto apresenta vantagens como modelo experimental, pois conserva mecanismos muito semelhantes aos de armazenamento, liberação e a recaptação de neurotransmissores com os mamíferos, possui um sistema serotoninérgico, com cerca de 40 neurônios por hemisfério cerebral, e uma membrana transportadora de serotonina que mostra propriedades farmacológicas amplamente similares aos humanos (JIANG et al., 2017; O'KANE, 2011). Portanto para mensurarmos respostas válidas relacionadas a um comportamento tipo depressivo em *Drosophila melanogaster*, utilizamos o teste de nado forçado, indicador de resignação que tem como finalidade detectar o comportamento semelhante ao desespero comportamental em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito terapêutico de γ-orizanol sobre o modelo de estresse crônico moderado e imprevisível em machos de *Drosophila melanogaster*.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais e Condições de Cultura

O γ-oryzanol foi adquirido de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Foram utilizadas moscas da fruta *Drosophila melanogaster* tipo selvagem (Harwich), estas foram mantidas em incubadora com temperatura controlada de 25 °C e umidade de 30-50% em ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentadas com meio padrão (farinha de milho, levedura, germe de trigo, sacarose, leite em pó e metilparabeno).

2.2. Delineamento experimental e estresse crônico leve imprevisível (CUMS)

Moscas macho adultas de 1 a 4 dias de idade foram submetidas ao esquema CUMS concomitante com o tratamento com γ-orizanol durante 10 dias. O γ-orizanol (ORY) foi diluído em sacarose a 1% (veículo) e teve uma concentração final de (25μM). As moscas foram divididas em 4 grupos com 50 moscas cada: (1) Controle, (2) CUMS, (3) ORY (25 μM), (4) ORY (25 μM) + grupo CUMS . Para implementar o paradigma CUMS de acordo com (ARAUJO et al., 2018), as moscas foram submetidas a vários estressores de forma crônica e imprevisível incluindo: privação de sono pela reversão do ciclo claro/escuro, inanição (5% sacarose), exposição ao frio (-5 ºC) por 30 minutos e exposição ao calor (36 ºC) por 4 horas.

2.3. Análise Comportamental e Neuroquímica

O comportamento locomotor das moscas foi avaliado de acordo com o teste de campo aberto descrito por HIRTH, (2010) quatro experimentos independentes foram realizados. E o teste de nado forçado, onde foram utilizados recipientes que continham 4 mL de dodecil sulfato de sódio a 0,04%. Cada mosca foi colocada no recipiente e iniciada a cronometragem de 3 minutos em tempo real, foi determinando a sua latência até a primeira imobilidade, o tempo de imobilidade e o número de combates contra o estado de inércia. Dez moscas foram testadas para cada grupo experimental, e cinco experimentos independentes foram realizados (NECKAMEYER & NIETO, 2015). Foram analisados os níveis de serotonina na cabeça das moscas por cromatografia líquida de alta eficiência. Quatro experimentos independentes foram realizados (DALPIAZ et al., 2007).

2.4. Análise estatística

Foi realizada utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Newman Keuls. A estatística descritiva foi expressa como a média (s) ± S.D. Valores de probabilidade menores que 0,05 (P <0,05) foram considerados estatisticamente significantes. O software GraphPad Prism versão 6 foi usado para realizar essas análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise post-hoc mostrou que o comportamento locomotor no teste de campo aberto de machos adultos foi semelhante em todos os grupos experimentais (Figura 1). A ANOVA de uma via não revelou interação entre CUMS e ORY (25μM) [$F_{(3,12)} = 0,5851$, $P = 0,6362$]. Este resultado é benéfico, uma vez que não demonstra nenhum possível efeito psicoestimulante ou fatigante em nenhum dos grupos experimentais, o que invalidaria os demais testes.

Em relação ao teste de nado forçado (Figura 2A-C) a análise post-hoc demonstrou que as moscas expostas ao CUMS apresentaram um maior tempo de imobilidade em relação ao controle (Figura 2B), e o grupo tratamento (ORY 25 μM + CUMS) previne esse quadro de maneira significativa em relação ao grupo CUMS. O tempo de latência para a primeira imobilidade (Figura 2A) e o número de combates (Figura 1C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A ANOVA de uma via revelou interações significativas entre os grupos, no tempo de imobilidade das moscas [$F_{(3,16)} = 5,806$, $P = 0,0070$; Figura 2B], mas não demonstra diferenças significativas entre os grupos na latência para a primeira imobilidade [$F_{(3,16)} = 1,595$, $P = 0,2352$; Figura 2A] e número de combates [$F_{(3,16)} = 1,144$, $P = 0, 3616$; Figura 2C]. As moscas expostas ao estresse apresentaram um maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle induzindo assim a percepção de que qualquer evento precoce ou estressante ao modelo estudado, pode causar efeitos nocivos e danosos a sua cinesia, de forma que essa resposta comportamental é resultada de uma ameaça induzida por aquele efeito causado, semelhante a uma intimidação ambiental caracterizado por desespero comportamental em *Drosophila* (RANG et al., 2003; NECKAMEYER & NIETO,

2015). O teste de nado forçado é um modelo amplamente utilizado para a avaliação da atividade antidepressiva de compostos e o tratamento com ORY (25µM) demonstra sua possível capacidade de reverter esta medida de desespero. Ao avaliar os níveis de 5HT na cabeça das moscas a análise post hoc mostrou que a exposição de moscas ao CUMS causou uma redução destes níveis na cabeça de moscas em comparação com o grupo de controle. Moscas tratadas com ORY (25µM) e concomitantemente expostas à CUMS demonstraram a restauração parcial dos níveis serotoninérgicos (Figura 3). ANOVA de uma via revelou uma interação significativa nos níveis de 5HT na cabeça das moscas entre os grupos [$F_{(3,12)}$ = 28,66; P <0,0001; Figura 3]. A exposição de moscas ao CUMS causa uma redução nos níveis de 5HT constatando a perspectiva que os níveis alterados influenciem possíveis modificações comportamentais na mosca, demonstrando que a resposta dos complexos deste neurotransmissor respondem conforme o efeito danoso causado ao invertebrado. Junto à isso foi demonstrado a parcial eficácia de diminuição destes níveis por conta do ORY (25µM), referenciando possíveis efeitos dos marcadores antidepressivos que são usados em humanos, atuando diretamente na secreção funcional desta monoamina (VISMARI et al., 2008).

Figura 1 – Avaliação da atividade locomotora de *Drosophila melanogaster*

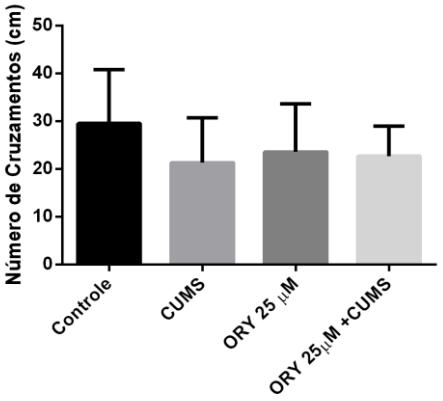


Figura 1. Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) em moscas macho de *Drosophila melanogaster* tratadas com γ-orizanol (ORY 25 µM) na distância (cm) percorrida no teste de campo aberto. Os valores são fornecidos como média ± SD. Significância determinada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste post- hoc de Newman Keuls.

Figura 2 - Teste de nado forçado de *Drosophila melanogaster*

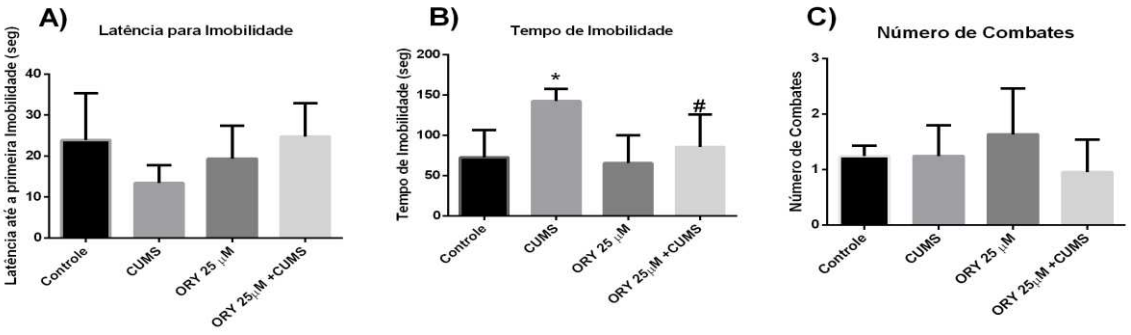


Figura 2. Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) em moscas macho de *Drosophila melanogaster* tratadas com γ-orizanol (ORY 25 µM) no teste de nado forçado.

Latência para a primeira imobilização (Gráfico A), Tempo de Imobilidade (Gráfico B), Número de Combates (Gráfico C). Os valores são fornecidos como média ± SD. Significância determinada pela análise de análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste post- hoc de Newman Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY + CUMS (P <0,05).

Figura 3 - Níveis de serotonina (5HT) em *Drosophila melanogaster*

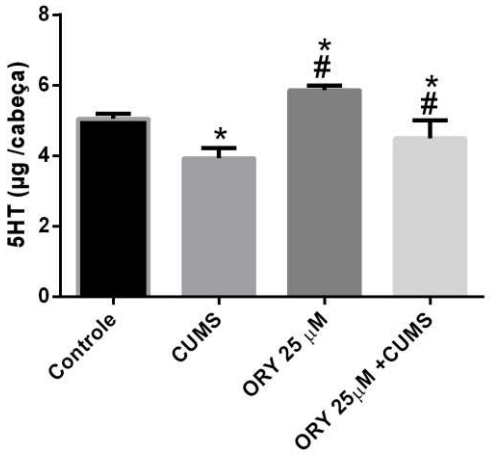


Figura 3. Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS) no nível de serotonina (5HT) em moscas macho de *Drosophila melanogaster* tratadas com γ-orizanol (ORY 25 µM). Os valores são fornecidos como média ± SD. Significância determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman Keuls. *Diferença significativa em relação ao grupo controle; # Diferença significativa entre CUMS e ORY + CUMS (P <0,05).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As moscas submetidas ao CUMS desenvolveram alterações em seus níveis de serotonina (5HT) gerando assim, uma relação de mudança em seu comportamento habitual resultado em maior tempo de imobilidade no teste de nado forçado o que é caracterizado como desespero comportamental, ao ser submetida a um novo ambiente ou desafio. Houveram melhoras significativas com a utilização de ORY (25 µM), originando uma resposta positiva prevenindo parcialmente a diminuição dos níveis de 5HT bem como foi efetivo em diminuir o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Tomados em conjunto nossos resultados ORY (25 µM) pode nos fornecer um tratamento viável sob o CUMS, possibilitando, assim, efeitos satisfatórios na terapia como um antidepressivo uma vez que, é um composto natural obtido do óleo do farelo do arroz, e deve ser livre de efeitos adversos, além de ter bom custo benefício.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, S.M.; POETINI, M.R.; BORTOLOTTO, 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.

CHENG, C.Y., SU, S.Y., TANG, N.Y., HO, T.Y., CHIANG, S.Y., HSIEH, C.L. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting of ICAM-1 mRNA expression in rats. **Brain Res**., v.13, p.136–150, 2008.

CUNHA C.; Depressão: O mal-estar da sociedade contemporânea. São Paulo: **UOL**, 2015. Disponível em: <https://vestibular.uol.com.br/resumo-das-disciplinas/atualidades/depressao-o-mal-estar-da-sociedade-contemporanea.htm>. Acesso em: 03 set. 2018.

DALPIAZ, A.; FILOSA, R.; DE CAPRARIIS, P.; CONTE, G.; BORTOLOTTI, F.; BIONDI, C.; et al. Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycosyl conjugate, **Int. J. Pharm**, v. 336, p.133–139, 2007.

HIRTH F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. CNS **Neurol Disord Drug Targets**;9:504–23, 2010.

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.

JULIANO, C., COSSU, M., ALAMANNI, M.C., PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **Int. J. Pharm**. v. 299, p.146–154, 2005.

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.

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.

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.

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.

PAIS-RIBEIRO, J. L.; HONRADO, A.; LEAL, I. Contribution to the adaptation study of the portuguese adaptation of the lovibond and lovibond depression anxiety stress scales (eads) with 21 items. **PSICOLOGIA, SAÚDE & DOENÇAS**, v.5, n.2, p.229-239, 2004.

VEDOVATO, K.; TREVIZAN, A. R.; ZUCOLOTO, C. N.; BERNARDI, M. D. L.; ZANONI, J. N.; MARTINS, J. V. C. P. O eixo intestino-cérebro e o papel da serotonina. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama**, v. 18 n. 1, p.33-42, 2014.

VISMARI, L; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem. **Rev Psiq Clín**, v. 35, n.5, p.196-204, 2008.

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