



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Fabiola Boz Eckert

A influência do sexo nas respostas ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina em
Drosophila melanogaster

Florianópolis

2024

Fabiola Boz Eckert

A influência do sexo nas respostas ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina em
Drosophila melanogaster

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de doutora em Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Cilene Lino de Oliveira
Coorientadora: Prof^a Dr^a Daniela Cristina De Toni

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Eckert, Fabiola Boz

A influência do sexo nas respostas ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina em *Drosophila melanogaster* / Fabiola Boz Eckert ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira, coorientadora, Daniela Cristina de Toni, 2024.

110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Estresse. 3. Antidepressivos. 4. Substituição. I. Lino de Oliveira, Cilene. II. de Toni, Daniela Cristina. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Fabiola Boz Eckert

A influência do sexo nas respostas ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina em
Drosophila melanogaster

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 20 de junho de 2024 pela
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Helena Iturvides Cimarosti
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Marina Prigol
Universidade Federal do Pampa

Dr.^a Camila Ângela Zanella
Universidade Harvard

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado
para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Dr.^a Cilene Lino de Oliveira
Orientadora

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado nos últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, principalmente meus pais, cujo apoio incondicional me proporcionaram todas as oportunidades necessárias para alcançar este marco. Tudo que conquistei até hoje devo a vocês. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões, e me encorajando a não desistir dos meus sonhos. Também agradeço às minhas tias e a minha irmã Carol, que sempre estiveram ao meu lado dando suporte quando precisei.

Agradeço também à minha orientadora Cilene, que há 10 anos me recebeu em seu laboratório, primeiramente para uma disciplina de “Vivência em laboratório” durante minha graduação, e que, desde então, se dispôs a me orientar de forma extremamente paciente e dedicada. Agradeço também à Dani, minha coorientadora, que aceitou participar do “Projeto Fly”, e contribui com sua experiência em estudar as mosquinhas. Obrigada por incentivarem a continuação deste projeto, mesmo em circunstâncias não tão animadoras, e por me manterem motivada. Devo muito do meu crescimento profissional, bem como do crescimento deste projeto, a elas.

Aos colegas e amigos que fiz nesses anos de LabNec, tanto os que já seguiram outros rumos, quanto os que estiveram todos esses anos de doutorado ao meu lado. Obrigada Tami, Fabi, Ju, Patrick, Johnny e Karol. A companhia, os conselhos, e também os pitacos que deram nos projetos, quali, e apresentações durante essa jornada foram fundamentais.

Aos amigos que fiz no PPG durante estes anos, principalmente Malu, Ariela, Luci, Filipe e Marcela, a companhia e trocas durante esses anos tiveram muita contribuição, tanto para a minha vida acadêmica, quanto pessoal. Agradeço também aos professores do PPG Farmacologia que tive a oportunidade de conhecer, a contribuição de vocês foi significativa para minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus amigos que me acompanham desde a graduação, Gabi, Léo, Duda, Kelly, Theo, Dani, Gabriel, sou extremamente grata pela amizade que construímos e que conseguimos manter mesmo em meio ao caos que é a pós-graduação. Minha sincera gratidão por estarem ao meu lado nesta etapa, compartilhando as alegrias, e tornando os momentos de frustração mais leves. Um agradecimento especial à Gabi e ao Léo, por terem vivenciado de perto um início de doutorado em meio a uma pandemia, o apoio de vocês foi fundamental nesse momento.

Agradeço muito a professora Karla Kaun, que aceitou me receber em seu laboratório no período de doutorado sanduíche, e que me orientou e auxiliou muito em meu projeto durante os seis meses que estive lá. Também agradeço aos colegas do laboratório Kaun, principalmente

ao Reza, a Amanda e ao Tariq, que me acolheram no laboratório, e me ajudaram imensamente em meus experimentos. Agradeço também a todos os amigos que fiz em Providence, durante o doutorado sanduíche, especialmente ao Alisson, Ana, Gui, Léo, Eduardo e Gunjan. Foi um período incrível, de alegrias e dificuldades, de descobertas e também de saudades de casa. Agradeço muito a companhia de vocês, e obrigada por tornarem esta experiência mais leve e enriquecedora.

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

“There is only one way to understand the universe and all within it, however imperfectly, and that is through science” (WILSON, E. O., 2013).

RESUMO

Drosophila melanogaster é usada na genética há mais de 100 anos e, recentemente, vêm sendo usada na neurociência e na farmacologia. Moscas possuem estruturas neurobiológicas semelhantes às encontradas em vertebrados. Estudos indicam que elas também respondem ao estresse, diminuindo a locomoção e a ingestão de alimento, e que a reversão das sequelas do estresse pode ser feita com fármacos antidepressivos. Neste trabalho, avaliou-se, por meio de uma revisão sistemática da literatura, como moscas *D. melanogaster* são usadas para o estudo de fármacos antidepressivos. Além disso, avaliou-se o comportamento de moscas machos e fêmeas expostas ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina (FLX), e se a FLX revertia as respostas induzidas pelo estresse. Por fim, avaliou-se qual o efeito do estresse e do tratamento com FLX na neurotransmissão serotoninérgica. Os resultados da revisão sistemática mostraram que há maior prevalência de estudos em machos, o fármaco mais usado é a FLX e os comportamentos mais estudados são locomoção, cópula e imobilidade. Na etapa experimental deste trabalho, a locomoção e a preferência por sacarose foram avaliadas no labirinto com raias e no campo aberto. No experimento 1, os animais foram expostos a um protocolo de estresse crônico leve de 9 dias, com privação alimentar, inversão de ciclo, frio e calor. Não houve efeito do estresse na locomoção e na preferência por sacarose, ou efeito do sexo. Houve efeito do tempo do teste sobre a locomoção com aumento da distância percorrida no final do teste comparado ao início. No experimento 2, os animais foram expostos ao estresse crônico leve de 3 dias, com os mesmos estressores, além de um período adicional de privação alimentar antes do teste de preferência por sacarose. Ainda, um grupo de cada sexo, apenas privado de alimento foi adicionado. Não houve efeito do estresse na locomoção. Houve efeito do sexo e do tempo do teste em todos os grupos, i.e., diminuição da locomoção nos períodos finais do teste comparados aos iniciais. Houve efeito do sexo, da condição experimental e do tempo na preferência por sacarose. Machos estressados e machos privados de alimento apresentaram preferência maior que machos controle (alimentados) nos primeiros períodos de teste. Em fêmeas, esse aumento foi observado apenas nas estressadas. Machos estressados e privados de alimentos testados em grupos apresentaram diminuição da locomoção e aumento da preferência por sacarose. Em fêmeas controle e estressadas houve aumento da preferência por sacarose. No experimento 3, os animais foram expostos ao protocolo de estresse crônico leve de 3 dias, e um ensaio de imuno-histoquímica para serotonina (5-HT) foi realizado com o cérebro dos animais. Observou-se efeito em fêmeas, com aumento de células 5-HT positivas nas estressadas quando comparadas às controle e às privadas de alimento. No experimento 4, os animais foram tratados com FLX 5 μ M, 10 μ M e 30 μ M por 9 dias. Não houve efeito do tratamento na locomoção. Efeitos do tempo do teste, e interação entre os fatores tempo e sexo foram observados na locomoção, com aumento da distância percorrida no final do teste quando comparado ao início. Não houve efeito do sexo, do tratamento ou do tempo do teste na preferência por sacarose. No experimento 5, os animais foram tratados com FLX 10 mM por 24h, 48h 72h e seus cérebros usados num ensaio de imuno-histoquímica. Fêmeas tratadas por 72h, há um aumento de células 5-HT positivas, e o oposto foi observado em machos tratados por 72h. No experimento 6, os animais foram expostos ao protocolo de estresse crônico leve de 3 dias e tratados com veículo ou FLX 2,5 mM, 5 mM e 10 mM pelo mesmo período. Na locomoção, observou-se efeito do sexo e do tempo entre animais tratados com FLX ou veículo. Na preferência por sacarose observou-se efeito apenas do tempo. Efeitos do tratamento não foram observados em ambos os desfechos. Sugere-se que fêmeas são mais suscetíveis ao estresse e ao tratamento com FLX do que machos.

Palavras-chave: Antidepressivos; Dimorfismo sexual; Serotonina.

ABSTRACT

Drosophila melanogaster has been used in genetics for over 100 years and has recently been used in neuroscience and pharmacology. Flies have neurobiological structures similar to those found in vertebrates. Studies indicate that they also respond to stress by reducing locomotion and food intake, and the effects of stress can be reversed with antidepressant drugs. Here, we evaluated how *D. melanogaster* flies are used to study antidepressant drugs through a systematic literature review. In addition, we evaluated the behavior of male and female flies exposed to mild chronic stress and treatment with fluoxetine (FLX), and whether FLX reversed stress-induced responses. Finally, we evaluated the effect of stress and FLX treatment on serotonergic neurotransmission. The systematic review results showed a higher prevalence of studies in males; the most commonly used drug is FLX, and the most studied behaviors are locomotion, copulation, and immobility. In the experimental stage of this study, locomotion and sucrose preference were evaluated in the lane maze and the open field. In experiment 1, the animals were exposed to a 9-day mild chronic stress protocol, with food deprivation, cycle reversal, cold, and heat. There was no effect of stress on locomotion and sucrose preference, or effect of sex. There was an effect of the test time on locomotion, with an increase in the distance traveled at the end of the test compared to the beginning. In experiment 2, the animals were exposed to 3-days mild chronic stress, with the same stressors, plus an additional period of food deprivation before the sucrose preference test. Furthermore, a group of each sex, only food deprived, was added. There was no effect of stress on locomotion. There was an effect of sex and test time in all groups, i.e., decreased locomotion in the final periods of the test compared to the initial ones. There was an effect of sex, experimental conditions, and time on sucrose preference. Stressed males and food-deprived males showed a greater preference than control (fed) males in the first test periods. In females, this increase was observed only in stressed females. Food-deprived and stressed males tested in groups showed decreased locomotion and increased sucrose preference. In control and stressed females, there was an increase in sucrose preference. In experiment 3, the animals were exposed to the mild chronic stress protocol for three days, and an immunohistochemical assay for serotonin (5-HT) was performed using their brains. An effect was observed in females, with an increase in 5-HT-positive cells in stressed females when compared to control and food-deprived females. In experiment 4, animals were treated with FLX 5 μ M, 10 μ M, and 30 μ M for nine days. There was no effect of treatment on locomotion. Effects of test time and interaction between time and sex were observed in locomotion, with increased distance traveled at the end of the test compared to the beginning. There was no effect of sex, treatment, or test time on sucrose preference. In experiment 5, animals were treated with FLX 10 mM for 24h, 48h, and 72h, and their brains were used in an immunohistochemical assay. Females treated for 72h showed an increase in 5-HT positive cells; the opposite was observed in males treated for 72h. In experiment 6, animals were exposed to a 3-day mild chronic stress protocol and treated with vehicle or FLX 2.5 mM, 5 mM, and 10 mM for the same period. In locomotion, an effect of sex and time was observed between animals treated with FLX or vehicle. In sucrose preference, only an effect of time was observed. Treatment effects were not observed in either outcome. It is suggested that females are more susceptible to stress and FLX treatment than males.

Keywords: Antidepressants; Sexual dimorphism; Serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Conservação do sistema serotoninérgico entre mamíferos e <i>D. melanogaster</i> ...	23
Figura 2	–	Representação esquemática da neurotransmissão serotoninérgica sob efeito ou não de fármaco antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina.....	24
Figura 3	–	Ambiente de filmagem.....	30
Figura 4	–	Ambiente de filmagem - flyGrAM.....	31
Figura 5	–	Labirinto com raias.....	32
Figura 6	–	Aspirador entomológico.....	32
Figura 7	–	Campo aberto.....	33
Figura 8	–	Protocolo de estresse crônico leve de 10 dias.....	35
Figura 9	–	Placa para o estresse de calor.....	35
Figura 10	–	Aparato para o estresse de inversão de ciclo.....	36
Figura 11	–	Protocolo de estresse crônico leve de 9 dias.....	37
Figura 12	–	Linha do tempo do experimento 1.....	39
Figura 13	–	Linha do tempo do experimento 2.....	39
Figura 14	–	Linha do tempo do experimento 3.....	40
Figura 15	–	Linha do tempo do experimento 4.....	41
Figura 16	–	Linha do tempo do experimento 5.....	42
Figura 17	–	Linha do tempo do experimento 6.....	43
Figura 18	–	Fluxograma PRISMA.....	46
Figura 19	–	Gráfico em floresta dos estudos que avaliaram a preferência por sacarose em moscas adultas.....	48
Figura 20	–	Gráfico em floresta dos estudos que avaliaram a locomoção em moscas adultas.....	49
Figura 21	–	Efeitos do estresse crônico leve de 9 dias na locomoção.....	54
Figura 22	–	Efeitos do estresse crônico leve de 9 dias no índice de preferência por sacarose.....	56
Figura 23	–	Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção.....	58
Figura 24	–	Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose.....	62
Figura 25	–	Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção no teste em grupo.....	65
Figura 26	–	Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose no teste em grupo.....	66
Figura 27	–	Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias sob as células 5-HT positivas.....	68

Figura 28 – Efeitos do tratamento com fluoxetina por 9 dias na locomoção.....	70
Figura 29 – Efeitos do tratamento com fluoxetina por 9 dias no índice de preferência por sacarose.....	72
Figura 30 – Efeitos do tratamento com fluoxetina por 24h, 48h e 72h nas células 5-HT positivas.....	74
Figura 31 – Efeitos do tratamento com fluoxetina e do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção.....	76
Figura 32 – Efeitos do tratamento com fluoxetina e do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose.....	78
Figura 33 – Desenho esquemático representando os principais resultados obtidos.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desfechos secundários avaliados na revisão sistemática.....	50
Tabela 2 – Taxa de mortalidade no experimento piloto 1.....	51
Tabela 3 – Taxa de mortalidade no experimento piloto 3.....	52
Tabela 4 – Taxa de mortalidade no experimento 1.....	53
Tabela 5 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção - experimento 1.....	55
Tabela 6 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a locomoção – experimento 1.....	55
Tabela 7 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 1.....	57
Tabela 8 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção – experimento 2.....	59
Tabela 9 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a locomoção – experimento 2.....	59
Tabela 10 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 2	63
Tabela 11 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a preferência por sacarose - experimento 2.....	63
Tabela 12 – Dados obtidos na ANOVA de 2 vias para a locomoção em grupos – experimento 2.....	65
Tabela 13 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a locomoção em grupos – experimento 2.....	65
Tabela 14 – Dados obtidos teste de Kruskal-wallis para a preferência por sacarose no teste em grupos – experimento 2.....	66
Tabela 15 – Dados do teste <i>post-hoc</i> para a preferência por sacarose no teste em grupos – experimento 2.....	67
Tabela 16 – Dados obtidos na ANOVA de 2 vias para o experimento 3.....	68
Tabela 17 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para o experimento.....	68
Tabela 18 – Taxa de mortalidade no experimento piloto 5.....	69
Tabela 19 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção – experimento 4.....	71
Tabela 20 – Dados do teste de <i>post-hoc</i> para a locomoção – experimento 4.....	71
Tabela 21 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 4.....	73

Tabela 22 – Dados obtidos na ANOVA para o experimento 5.....	74
Tabela 23 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para o experimento 5.....	75
Tabela 24 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção em animais estressados – experimento 6.....	77
Tabela 25 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a locomoção em animais estressados – experimento 6.....	77
Tabela 26 – Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose em animais estressados – experimento 6.....	79
Tabela 27 – Dados obtidos no teste <i>post-hoc</i> para a preferência por sacarose em animais estressados.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FLX	Fluoxetina
5- HT	5-hidroxitriptamina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
SERT	Transportador de serotonina
dSERT	Transportador de serotonina de <i>Drosophila</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Organismos modelo em pesquisa	19
1.2	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo para o estudo do estresse.....	20
1.3	O papel da serotonina no comportamento: de vertebrados à invertebrados.....	22
1.4	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo para o estudo de fármacos antidepressivos.....	25
2	HIPÓTESE.....	26
3	OBJETIVO GERAL	26
3.1	Objetivos específicos.....	26
4	ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	Revisão sistemática da literatura.....	27
5.1.1	Estratégia de busca.....	27
5.1.2	Seleção dos estudos e critérios de inclusão e exclusão.....	28
5.1.3	Extração e análise dos dados qualitativos e quantitativos.....	28
5.2	Experimentos <i>in vivo</i>.....	29
5.2.1	Materiais e condições de cultivo dos animais.....	29
5.2.2	Ambientes de filmagem dos testes comportamentais.....	30
5.2.3	Teste de preferência por sacarose no labirinto com raias.....	31
5.2.4	Teste de preferência por sacarose no campo aberto.....	33
5.2.5	Protocolo de imuno-histoquímica.....	33
5.3	Protocolos experimentais - Padronizações dos protocolos de estresse.....	34
5.3.1	Experimento piloto 1 - Padronização do protocolo de estresse de privação alimentar.....	34
5.3.2	Experimento piloto 2 - Protocolo de estresse crônico leve de 10 dias.....	35
5.3.3	Experimento piloto 3 - Padronização do protocolo de estresse crônico leve de 9 dias.....	36

5.3.4	Experimento piloto 4 - Padronização do protocolo de estresse de calor.....	37
5.4	Desenhos experimentais após pilotos do protocolo de estresse.....	37
5.4.1	Experimento 1 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 9 dias.....	37
5.4.2	Experimento 2 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias.....	39
5.4.3	Experimento 3 – Neurotransmissão serotoninérgica após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias.....	40
5.5	Padronização do tratamento farmacológico.....	40
5.5.1	Experimento piloto 5 - Método de administração do fármaco.....	40
5.5.2	Experimento 4 – Respostas comportamentais após tratamento com fluoxetina por 9 dias.....	41
5.5.3	Experimento 5 – Neurotransmissão serotoninérgica após tratamento com fluoxetina.....	42
5.6	Experimento 6 – Respostas comportamentais das moscas após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias e tratamento com fluoxetina.....	42
5.7	Cálculo amostral.....	43
5.8	Análise dos testes comportamentais.....	44
5.9	Cálculo do índice de preferência.....	45
5.10	Análise estatística.....	45
6	RESULTADOS.....	46
6.1	Dados obtidos na revisão sistemática da literatura.....	46
6.1.1	Análise qualitativa dos dados.....	46
6.1.2	Análise quantitativa dos dados.....	47
6.2	Dados obtidos nos experimentos <i>in vivo</i>	50
6.2.1	Experimento piloto 1 - Padronização do estresse de privação alimentar.....	50
6.2.2	Experimento piloto 2 - Protocolo de estresse crônico leve de 10 dias.....	51
6.2.3	Experimento piloto 3 - Padronização do protocolo de estresse crônico leve de 9 dias.....	51

6.2.4	Experimento piloto 4 - Padronização do protocolo de estresse de calor.....	52
6.2.5	Experimento 1 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 9 dias.....	53
6.2.6	Experimento 2 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias.....	57
6.2.7	Experimento 3 – Neurotransmissão serotoninérgica após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias.....	67
6.2.8	Experimento piloto 5 – Método de administração do fármaco.....	69
6.2.9	Experimento 4 – Respostas comportamentais após tratamento com fluoxetina por 9 dias.....	69
6.2.10	Experimento 5 – Neurotransmissão serotoninérgica após tratamento com fluoxetina.....	73
6.2.11	Experimento 6 – Respostas comportamentais das moscas após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias e tratamento com fluoxetina.....	75
7	DISCUSSÃO.....	79
7.1	Uso de <i>D. melanogaster</i> para o estudo de fármacos antidepressivos: revisão sistemática da literatura.....	79
7.2	Respostas de <i>D. melanogaster</i> ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina.....	81
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	90
9	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE A- Gráfico em floresta dos estudos realizados em larvas.....	102
	APÊNDICE B - Gráfico em floresta dos estudos realizados em adultos para o desfecho imobilidade no teste de nado forçado.....	103
	APÊNDICE C - Gráfico em floresta dos estudos realizados em adultos para outros desfechos.....	104
	APÊNDICE D Tabela de dados extraídos dos estudos que avaliaram o desfecho cópula/acasalamento.....	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Organismos modelo em pesquisa

Organismos modelo são espécies não humanas usadas para entender fenômenos biológicos aplicáveis a outros organismos, geralmente aqueles que, de alguma forma, são mais complexos que os originais (LEONELLI; ANKENY, 2013). O uso de diferentes organismos modelo, e o advento de técnicas moleculares e genéticas, contribuíram para que novas descobertas científicas fossem realizadas (BROWN, 2021; ERICSSON *et al.*, 2013). São exemplos de organismos modelo animais mamíferos (e.g. ratos e camundongos), e animais não- mamíferos, como o peixe zebra (*Danio rerio*), o nematódeo (*Caenorhabditis elegans*) e a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) (LEONELLI; ANKENY, 2013).

Diferentes aspectos biológicos ou doenças humanas podem ser estudados nestes organismos. Para isso, modelos animais são utilizados. Os modelos animais são procedimentos que, quando aplicados a animais de laboratório, geram mudanças comportamentais ou fisiológicas, que visam reproduzir em grande parte os aspectos da doença estudada (WILLNER, 1990; MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Entretanto, no que se refere ao estudo de doenças humanas e de potenciais alvos terapêuticos para essas doenças, a validade desses modelos deve ser avaliada. A validade se refere ao quanto esses modelos são úteis para prever quais fármacos devem ou não alcançar a etapa de estudos clínicos em humanos (MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Existe um conjunto de critérios proposto para avaliar modelos animais de distúrbios do sistema nervoso central, mas que podem ser úteis para modelos de outras áreas (WILLNER, 1984; MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Entre os critérios estão a validade de face, que são as similaridades entre o modelo e a condição clínica sendo estudada; a validade de construto, ou seja, se a biologia subjacente entre a doença e o modelo da doença é semelhante; e a validade preditiva, que visa responder se o modelo identifica corretamente os tratamentos, e se tem resposta semelhante a agentes terapêuticos clinicamente eficazes (MCGONIGLE; RUGGERI, 2014; WILLNER, 1984).

Os modelos animais são aplicados, na maioria das vezes, em animais vertebrados. Entretanto, o uso destes animais vem sofrendo críticas do ponto de vista da ética e do bem-estar animal, além de apresentar algumas desvantagens relacionadas ao custo financeiro e ao espaço necessário para criação, quando comparados a outros animais (HUET; DE HAAN, 2014). Com isso, já existem iniciativas que visam diminuir o número de animais vertebrados utilizados em pesquisa, e o conjunto dessas iniciativas é conhecido como 3Rs (redução, refinamento e substituição) (RUSSELL, 1995). Os animais vertebrados podem ser substituídos por ferramentas *in silico* ou *in vitro*, sendo estas consideradas substituições totais, pois não

utilizam nenhuma espécie animal, ou por animais invertebrados, sendo esta considerada uma substituição parcial (THE 3R). Os modelos *in vivo*, quando comparados às triagens de drogas baseadas em modelos *in vitro* ou *in silico*, oferecem algumas vantagens. Estes modelos são úteis para avaliar o efeito de drogas em um contexto fisiológico, e fornecem informações importantes como farmacocinética, farmacodinâmica e a toxicidade de uma substância (BULTERIJS; BRAECKMAN *et al.*, 2020). Entretanto, o uso de modelos *in vivo* em roedores em etapas iniciais dos estudos demanda mais tempo e recursos financeiros, quando comparados aos modelos *in silico* e *in vitro*. Assim, o uso de animais invertebrados como o *C. elegans* e *D. melanogaster* pode ser uma alternativa economicamente viável nestes estudos. Essas espécies têm como vantagem serem organismos menores, de fácil manutenção, e que requerem menos recursos financeiros para criação (BULTERIJS; BRAECKMAN *et al.*, 2020).

1.2 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para o estudo do estresse

D. melanogaster, popularmente conhecida como mosca-da-fruta, é um organismo usado em pesquisas de genética clássica há mais de cem anos (MORGAN, 1915). Ela está relacionada a descobertas marcantes no campo da genética e do desenvolvimento embrionário, como o conceito de herança genética ligada ao sexo (MORGAN, 1915; MORGAN *et al.*, 1923), e a descoberta dos genes *notch* (MORGAN, 1917; POULSON, 1937) e *hedgehog*, descritos também em humanos (BORGGREFE; OSWALD, 2009; NÜSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980; ECHELARD *et al.*, 1993).

O uso de *D. melanogaster* em pesquisas apresenta vantagens, como a facilidade de criação, o baixo custo de manutenção, e o genoma totalmente descrito (JENNINGS, 2011). Na farmacologia, as moscas podem ser usadas, por exemplo, em estudos de neoplasias (GONZALEZ, 2013), disfunções cardiovasculares (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016), inflamatórias (YOUNES *et al.*, 2020), endócrinas (MUSSELMAN; KÜHNLEIN, 2018), e neuropsiquiátricas (JEIBMANN; PAULUS, 2009).

Em relação aos transtornos neuropsiquiátricos, a *D. melanogaster* vem sendo usada em estudos de Alzheimer (TSUDA; LIM, 2018), Parkinson (ARYAL; LEE, 2019) e epilepsia (LASKO; LÜTHY, 2021). Alguns estudos também mostram o potencial uso de *D. melanogaster* no estudo de outros transtornos, como a depressão (JIANG *et al.*, 2017; MOULIN *et al.*, 2021).

Modelos animais de depressão são frequentemente aplicados em roedores (HAO *et al.*, 2019; WILLNER, 2017). Entretanto, os modelos de depressão em roedores apresentam limitações, como o tempo de exposição dos animais aos protocolos, o número de animais

necessários e às taxas de mortalidade (HAO *et al.*, 2019). Com isso, a padronização de novos modelos animais de depressão, utilizando outros organismos modelo, se faz cada vez mais necessária.

Em roedores, um dos modelos de depressão mais usado é o de estresse crônico moderado (HAO *et al.*, 2019; WILLNER, 2017). Neste modelo, os animais são expostos a diferentes estressores, como privação alimentar, privação de sono e alterações de temperatura, de forma leve e crônica (HAO *et al.*, 2019; WILLNER, 2017). As mudanças comportamentais de animais de laboratório após a exposição a agentes estressores podem ser avaliadas utilizando testes de procura e consumo de alimentos palatáveis, e locomoção. Roedores expostos a condições de estresse incontrolável e inescapável diminuem a fuga ou esquiva em resposta ao estímulo estressor, e esta mudança comportamental é conhecida como desamparo aprendido (VOLLMAYR; GASS, 2013). O desamparo aprendido é utilizado como modelo para o estudo da neurobiologia dos transtornos do humor e da psicofarmacologia dos antidepressivos (SHERMAN; SACQUITNE; PETTY, 1982). Em laboratório, animais submetidos a situações estressantes são tratados com antidepressivos, a fim de observar os efeitos destes fármacos sobre os seus comportamentos (LIU *et al.*, 2009). A reversão de respostas comportamentais induzidas pelo estresse em animais de laboratório pode ser usada para prever a atividade antidepressiva de novos agentes farmacológicos (WILLNER, 2017). Um fármaco comumente utilizado com este objetivo é a fluoxetina (LAPMANEE *et al.*, 2013; DOMINGUES *et al.*, 2019). A fluoxetina é comumente utilizada para o tratamento de distúrbios psicológicos como depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo (HAMILTON *et al.*, 2016).

Estudos mostram que, assim como os roedores, as moscas também são capazes de responder a diferentes situações de estresse, apresentando alterações comportamentais comparáveis às aquelas observadas em roedores, como o desamparo aprendido (BROWN *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2013), a diminuição na preferência por sacarose (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020) e o aumento da imobilidade no nado forçado (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020; JIA *et al.*, 2021; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020). Ainda, elas também são suscetíveis aos modelos de depressão induzidos por fármacos como levodopa, um precursor de dopamina, e clorpromazina, um antagonista dopaminérgico (JIANG *et al.*, 2017; MOULIN *et al.*, 2021).

Resultados preliminares indicam que as moscas também são sensíveis a situações estressantes, como imobilização e anestesia por CO₂ (ECKERT, 2017), e que podem alterar seus comportamentos de busca por alimento quando submetidas a estas situações. Além disso, um estudo prévio do laboratório, mostrou que a privação alimentar também é um fator de

estresse que influencia nas respostas comportamentais de exploração do ambiente e de busca por alimentos palatáveis (ECKERT *et al.* 2023). Em mamíferos, machos e fêmeas apresentam diferentes respostas comportamentais frente a estímulos estressores (YANG *et al.*, 2013). *D. melanogaster* também apresenta dimorfismos sexuais em alguns aspectos comportamentais, como a locomoção (YANG *et al.*, 2013; MAJEED *et al.*, 2016). Entretanto, estudos com *D. melanogaster* que avaliem as respostas comportamentais ao estresse em indivíduos de ambos os sexos ainda são pouco recorrentes.

1.3 O papel da serotonina no comportamento: de vertebrados à invertebrados

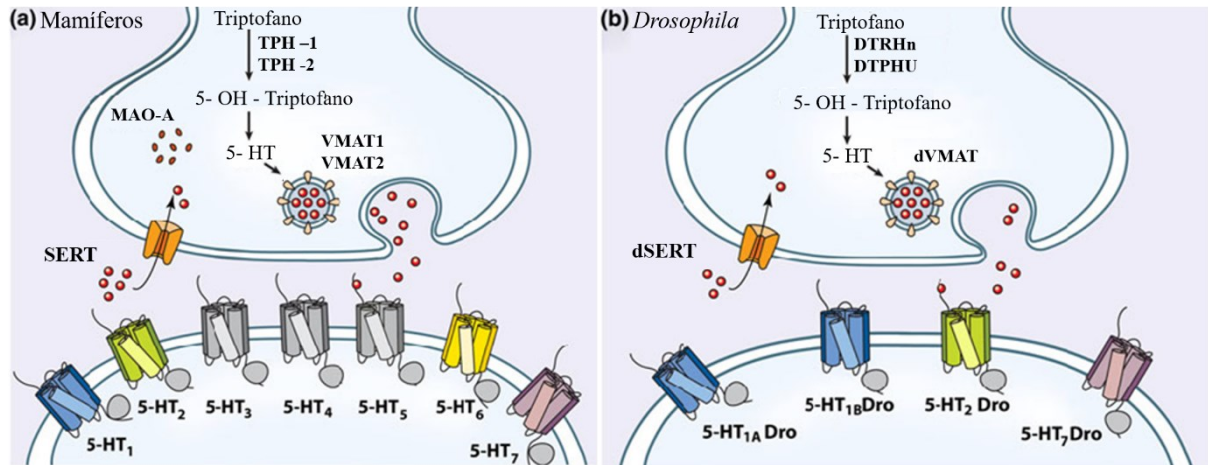
A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma importante monoamina neurotransmissora tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Essa monoamina foi primeiramente identificada como a substância dos extratos cerebrais que produziam vasoconstrição periférica (RAPPORT, 1948). Posteriormente, mostrou-se que ela era idêntica a uma substância contrátil isolada das células enterocromafins da mucosa gastrointestinal de vertebrados (ERSPAMER; ASERO, 1952). Já em invertebrados, a ação da 5-HT foi primeiramente estudada usando o tecido cardíaco de moluscos (TWAROG, 1953). Posteriormente, Welsh e Morehead (1960) observaram a presença de 5-HT no sistema nervoso de diferentes invertebrados, como polvo e caranguejos.

Tanto nos animais vertebrados quanto nos invertebrados, a 5-HT tem diferentes efeitos no sistema nervoso central e na periferia. Em mamíferos, essa monoamina tem um importante papel em diferentes sistemas, como na regulação cardiovascular, respiração e termorregulação. A 5-HT é responsável por regular o ritmo circadiano, o ciclo de sono, o apetite, a agressão, o comportamento sexual e o aprendizado (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT 2008).

Apesar da distância filogenética entre vertebrados e invertebrados, o sistema serotoninérgico é conservado entre esses organismos (JENNINGS, 2011; TIERNEY, 2018). Assim como em mamíferos, em moscas a serotonina é um neurotransmissor envolvido em diferentes comportamentos, como alimentação, sono, locomoção, agressão, entre outros (NICHOLS *et al.*, 2002). Além disso, os mecanismos de armazenamento, liberação e reciclagem destas moléculas são semelhantes entre moscas e mamíferos (O'KANE, 2011; MARTIN; KRANTZ, 2014). Dentre os sete receptores serotoninérgicos descritos em mamíferos, cinco receptores homólogos já foram descritos em *D. melanogaster* (CURRAN; CHALASANI, 2012). Ainda, *D. melanogaster* possui um transportador de serotonina,

conhecido como dSERT, que é homólogo ao transportador de serotonina de humanos (hSERT) e de roedores (rSERT) (DEMCHYSHYN *et al.*, 1994, Figura 1).

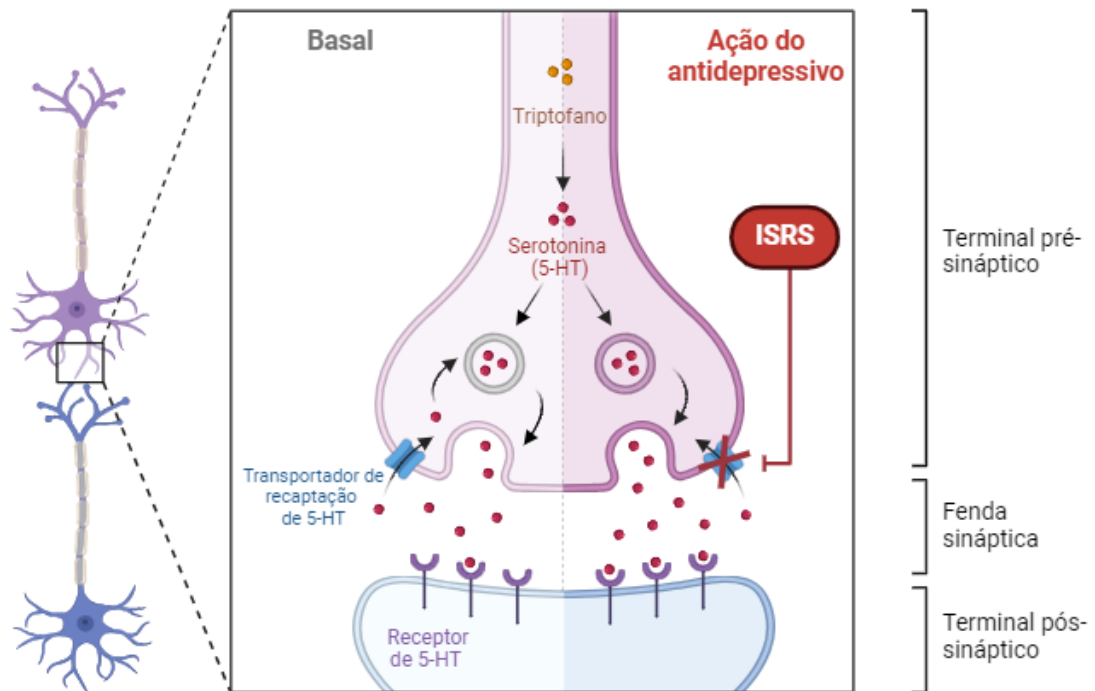
Figura 1. Conservação do sistema serotoninérgico entre mamíferos e *D. melanogaster*



Legenda: TPH-1 e TPH-2 = triptofano hidroxilase, DTRHn = triptofano hidroxilase de *Drosophila*, DTPHU = triptofano-fenilalanina hidroxilase de *Drosophila*, 5-HT = serotonina, MAO-A = enzima monoamina oxidase A, VMAT = transportador vesicular de monoamina, dVMAT = transportador vesicular de monoamina de *Drosophila*, SERT = transportador de serotonina, dSERT = transportador de serotonina de *Drosophila*. A enzima monoamina oxidase já foi detectada em *D. melanogaster*, mas em níveis baixos (DEWHURST *et al.*, 1972), assim, não foi representada na Figura 1 b. Figura adaptada de Curran; Chalasani (2012).

Além disso, a 5-HT também está envolvida nas respostas dos organismos a estímulos estressores. Em humanos e em animais de laboratório, esse neurotransmissor está diminuído quando estes organismos são expostos a situações de estresse (MAHAR *et al.*, 2014). Ainda, sugere-se que, em humanos, a diminuição nos níveis de 5-HT esteja atrelada ao desencadeamento de sintomas depressivos (PANNU; GOYAL, 2023). Assim, atualmente, os principais fármacos antidepressivos utilizados na clínica têm como mecanismo de ação a inibição da recaptação de serotonina, aumentando a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da neurotransmissão serotoninérgica sob efeito ou não de fármaco antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina



Legenda: ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Figura criada pelo *software* Biorender®.

Em *D. melanogaster*, a 5-HT também desempenha papéis importantes na resposta ao estresse. Quando moscas são expostas a condições estressantes, como aumento da temperatura do ambiente, a 5-HT pode modular a locomoção (MAJEED *et al.*, 2016) ou a preferência por sacarose (ARAUJO *et al.* 2018;2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020). Em *D. melanogaster* também já foi demonstrada a diminuição de 5-HT em animais estressados, assim como é observado em outros organismos (ARAUJO *et al.* 2018; RIES *et al.* 2017).

Desta forma, entende-se que estudar o papel do sistema serotoninérgico na resposta ao estresse e no tratamento com fármacos antidepressivos em *D. melanogaster* é de grande valia para o desenvolvimento de novos modelos de depressão, a fim de reduzir o uso de vertebrados em pesquisa. Algumas vantagens já supracitadas, como o sistema serotoninérgico altamente conservado nesta espécie, além de respostas comportamentais robustas, permitem o estudo dos mecanismos atrelados aos efeitos do estresse, e de compostos com potencial ação antidepressiva nesses animais, de forma eficaz e mais rápida do que em outros organismos. Além disso, o fato de, em humanos, mulheres serem os indivíduos mais acometidos com depressão, também mostra a importância deste trabalho.

1.4 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para o estudo de fármacos antidepressivos

Atualmente, os principais fármacos usados para o tratamento do transtorno depressivo maior em humanos são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina e o citalopram (FERGUSON, 2001; PEREZ-CABALLERO *et al.*, 2019). Estes fármacos têm como mecanismo de ação a inibição dos transportadores de serotonina, e sua ação leva a um aumento da concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica (RACAGNI; POPOLI, 2010).

Estudos indicam que, assim como é observado em mamíferos, a fluoxetina também tem afinidade pelos transportadores de serotonina das moscas (dSERT) (COREY *et al.*, 1994; DEMCHYSHYN *et al.*, 1994). Além disso, alguns estudos mostram que as moscas também podem apresentar alterações comportamentais quando tratadas com estes fármacos (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020; RASTI *et al.*, 2020; RIES *et al.*, 2017), tornando-as organismos interessantes a serem usados em pesquisas nesta área. Um estudo recente demonstrou que, quando o cordão nervoso ventral de *D. melanogaster* é exposto a diferentes fármacos antidepressivos da classe dos ISRS há alterações na concentração de serotonina (DUNHAM; VENTON, 2022). O estudo demonstrou que a paroxetina aumentou a liberação de serotonina, a fluoxetina apenas retardou a recaptação deste neurotransmissor, enquanto o citalopram e o escitalopram aumentaram a liberação e retardaram a recaptação de serotonina (DUNHAM; VENTON, 2022).

Assim, a presença de mecanismos neurobiológicos em *D. melanogaster* semelhantes aos encontrados em vertebrados indica que essa espécie é suficientemente complexa para o estudo da neurobiologia do humor e dos fármacos antidepressivos. Entretanto, a quantidade de estudos nesta área ainda é escassa. Uma revisão sistemática conduzida por nosso grupo de pesquisa identificou apenas 12 publicações que avaliaram as respostas comportamentais de *D. melanogaster* submetidas ao tratamento com fármacos antidepressivos (dados não publicados). Ainda, essa revisão identificou que o fármaco mais utilizado foi a fluoxetina, e que a maior parte dos estudos foi realizada em moscas macho. Sabe-se que há alta prevalência de mulheres tratadas com antidepressivos em todo o mundo (MARASINE *et al.*, 2021), demonstrando-se assim a importância do estudo da neurobiologia e psicofarmacologia destes fármacos também em fêmeas. O uso de fêmeas como animais experimentais nos estudos de fármacos antidepressivos ainda é incipiente tanto em *Drosophila*, quanto em roedores. Percebe-se assim a importância do presente trabalho, que teve como intuito avaliar as respostas ao tratamento com antidepressivo tanto em moscas machos como em fêmeas.

2 HIPÓTESE

O estresse crônico leve diminui a preferência por sacarose e a neurotransmissão serotoninérgica, e aumenta a imobilidade em *D. melanogaster*, e estas mudanças são revertidas com o tratamento com fluoxetina

3 OBJETIVO GERAL

Investigar se o estresse crônico leve e o tratamento com fluoxetina afetam as respostas comportamentais e a neurotransmissão serotoninérgica de moscas *D. melanogaster*, e se estas respostas são sexualmente dimórficas.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar como moscas *D. melanogaster* são usadas para o estudo de fármacos antidepressivos em estudos na literatura
- b) Investigar se há dimorfismo sexual nas respostas comportamentais das moscas submetidas ao estresse crônico leve
- c) Investigar se há dimorfismo sexual nas respostas comportamentais das moscas submetidas ao tratamento com fluoxetina
- d) Investigar se há dimorfismo sexual na neurotransmissão serotoninérgica das moscas submetidas ao estresse crônico leve
- e) Investigar se há dimorfismo sexual na neurotransmissão serotoninérgica das moscas submetidas ao tratamento com fluoxetina
- f) Investigar se o tratamento com fluoxetina é capaz de reverter os efeitos induzidos pelo estresse crônico leve

4 ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Para avaliar como o tratamento com fármacos antidepressivos em moscas *D. melanogaster* é conduzido por outros grupos de pesquisa uma revisão sistemática da literatura foi conduzida

As moscas foram submetidas a protocolos de estresse crônico leve de 9 e 3 dias, com o intuito de avaliar o efeito do estresse sobre os comportamentos de locomoção e preferência por sacarose, e se há dimorfismo sexual nestes comportamentos. Para isso, o comportamento dos animais foi avaliado no labirinto com raias (teste individual) e no campo aberto (teste em grupos).

Para avaliar se há efeito do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento de locomoção e preferência por sacarose, e se este efeito é sexualmente dimórfico, os animais

foram tratados com as concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 30 μ M durante 9 dias. O comportamento dos animais foi avaliado no labirinto com raias (teste individual).

Para avaliar se há efeito do estresse crônico de 3 dias ou do tratamento com fluoxetina 10 mM sobre a presença de células serotonina positivas no cérebro de moscas, e se este efeito é sexualmente dimórfico, o cérebro dos animais nestas condições foi usado em um ensaio de imuno-histoquímica.

Para avaliar se o tratamento com fluoxetina é capaz de reverter os efeitos induzidos pelo estresse, animais estressados por 3 dias e tratados com fluoxetina nas concentrações 2,5 mM, 5 mM e 10 mM foram avaliados no labirinto com raias (teste individual).

Em todos os testes comportamentais foram avaliados os comportamentos de locomoção e preferência por sacarose. O protocolo de estresse crônico leve foi adaptado de Araujo *et al.* (2018;2020), e o tratamento com fluoxetina foi adaptado de Ries *et al.* (2017) e Ramos-Hryb *et al.* (2020).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Revisão sistemática da literatura

O protocolo da revisão sistemática foi elaborado de acordo com a ferramenta *Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation* (SYRCLE) (DE VRIES *et al.*, 2015), baseado em protocolos previamente publicados (DOS SANTOS *et al.*, 2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2019). Após estabelecido, o protocolo foi publicado na plataforma PROSPERO (ECKERT *et al.*, 2020).

5.1.1 Estratégia de busca

A estratégia de busca foi elaborada após estudos pilotos usando combinações de palavras-chave de protocolos publicados previamente (DOS SANTOS *et al.*, 2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2019). As palavras-chave usadas na busca foram elaboradas seguindo a estrutura PICO (do inglês Population, Intervention, Control e Outcome) sendo os termos relacionados à população (*Drosophila melanogaster* ou flies #1), intervenção (monoaminergic antidepressants #2) e o desfecho primário (behavior #3). A busca foi realizada em quatro bases de dados (“Medline (via PubMed)”, “Web of Science”, “Scopus” e “EMBASE”).

As buscas foram realizadas de forma independente por dois revisores (FBE e FFT), e as publicações obtidas em cada busca foram exportadas para uma biblioteca no gerenciador de referências EndNote X7.

5.1.2 Seleção dos estudos e critérios de inclusão e exclusão

A triagem das publicações obtidas nas buscas ocorreu em três etapas: 1- exclusão de duplicatas, 2- análise do título e resumo e 3- análise do texto completo. Os critérios de inclusão dos estudos foram definidos previamente, e consistiram em: qualquer tipo de estudo controlado, independente de randomização ou cegamento, usando *D. melanogaster*, independente do sexo, linhagem, idade, genótipo ou fenótipo; tratadas com antidepressivos por qualquer via de administração, dose, ou esquema de tratamento; comparadas com um grupo controle não-tratado ou veículo; submetidas a qualquer tipo de teste comportamental. Os critérios de exclusão foram: duplicatas, revisões, revisões sistemáticas, meta-análises, não-controlados, estudos com outras espécies, com intervenções não incluídas na lista de palavras-chave ou co-tratamentos. Não houve restrição de idioma, data de publicação, revista ou autor. A seleção foi realizada dois revisores independentes (FBE e FFT), e as discrepâncias entre estes revisores foram checadas e resolvidas por um terceiro revisor (JMC). Os revisores não foram cegados para autor, data ou revista dos artigos incluídos nesta revisão.

5.1.3 Extração e análise dos dados qualitativos e quantitativos

Para análise qualitativa as seguintes informações foram extraídas de cada publicação incluída: o nome dos autores e o ano de publicação; randomização ou cegamento; linhagem, idade, sexo; fármaco, dose, tempo de tratamento, via de administração; tipo de teste comportamental realizado e desfecho; outros tipos de intervenção aplicados (e.g. estresse); condições de alojamento dos animais. Qualquer análise não-comportamental foi considerada desfecho secundário e incluída nesta revisão.

Para análise quantitativa as seguintes informações foram extraídas de cada publicação incluída: número de grupos experimentais, média, desvio ou erro padrão da média, e tamanho da amostra dos grupos experimental e controle. Quando os dados brutos não estavam disponíveis no texto do artigo, a média e o desvio ou erro padrão da média foram extraídos usando a ferramenta de medição do Adobe Acrobat DC. Quando apenas a mediana e o interquartil estavam disponíveis, estes dados foram extraídos, e a média e o desvio padrão foram estimados (WAN *et al.*, 2014). Dados quantitativos (média, desvio padrão, e tamanhos de amostra) foram usados para calcular os tamanhos de efeito de cada estudo (ES, g de Hedges), os tamanhos de efeito combinados (CES, g de Hedges), e seus respectivos intervalos de confiança (95%). Os dados foram agrupados de acordo com a idade dos animais (larvas ou adultos) e desfechos primários (testes de cópula/acasalamento, teste de preferência por sacarose, locomoção, teste do nado forçado, e outros). Os dados foram então agrupados em

subgrupos de acordo com o fármaco administrado, a dose, o tempo de tratamento, a linhagem ou a métrica usada para avaliar cada desfecho.

Todas as análises foram realizadas no software R Studio utilizando os pacotes, “meta”, “metafor” e “forestplot”. A diferença média padronizada (Hedges g) foi usada para calcular o ES e seus respectivos intervalos de confiança (95%) (BUTTON *et al.*, 2013; RAMOS-HRYB *et al.*, 2019). Todos os dados foram calculados a partir do modelo de efeitos aleatórios, e os estudos mais precisos (maiores tamanhos amostrais) tiveram um maior peso no modelo (LAIRD; WARE, 1982; DERSIMONIAN; LAIRD, 1986; COHEN, 1992). Valores positivo de ES ou do CES indicam um efeito a favor da intervenção, enquanto valores negativos indicam efeito a favor dos grupos controle.

5.2 Experimentos *in vivo*

5.2.1 Materiais e condições de cultivo dos animais

Foram utilizados espécimes selvagens (Canton-S), machos e fêmeas, da mosca *Drosophila melanogaster*. Os estoques de animais foram obtidos do *Stock Center Tucson, Arizona* e do *Bloomington Stock Center*, Estados Unidos da América, e foram criados nos Laboratórios de Neurobiologia do Comportamento- Universidade Federal de Santa Catarina e Kaun- Universidade Brown, Estados Unidos da América.

No laboratório de Neurobiologia do Comportamento, os animais foram acondicionados em frascos de vidro de 300 mL, vedados com uma rolha de espuma de densidade 28, e contendo o meio de cultivo padrão utilizado no laboratório, feito à base de farinha de milho. No interior dos frascos foram colocados alguns grânulos de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, Fleischmann®) que têm por função fornecer nutrição para as larvas de moscas. Além disso, todos os frascos possuíam um papel filtro de aproximadamente 8 x 1,5 cm, que regula o excesso de umidade do meio, e propicia um local para que as moscas pousem e copulem. No laboratório Kaun, os animais foram acondicionados em frascos de plástico de 200 mL, contendo meio de cultivo feito à base de farinha de milho e ágar.

Os espécimes utilizados neste estudo eram adultos recém eclodidos, coletados de 6h-24h após eclodirem. Os animais experimentais coletados foram separados por sexo e alocado em tubos de plástico (7,5 cm x 1,1 cm) com meio de milho. Para a coleta os animais foram anestesiados no frio (Laboratório de Neurobiologia do Comportamento) ou utilizando CO₂ (Laboratório Kaun). Cada tubo continha de 8 a 10 animais, e era considerado como um animal experimental ($n=1$), ou seja, apenas uma mosca de cada tubo era utilizada nos testes comportamentais ou de imuno-histoquímica. Moscas com qualquer sinal de danos nas patas ou

asas foram excluídas dos testes comportamentais. Outra mosca do mesmo tubo experimental foi utilizada quando estes danos eram observados.

Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura de $\pm 24^{\circ}\text{C}$, 60% - 80% de umidade relativa do ar e ciclo de 12h de iluminação (Laboratório de Neurobiologia do Comportamento), ou 14h de iluminação (Laboratório Kaun).

5.2.2 Ambientes de filmagem dos testes comportamentais

Os experimentos 1, 2 e 5 foram realizados no Laboratório de Neurobiologia do Comportamento. O ambiente de filmagem para estes experimentos consistiu em um aparato plástico para suporte da câmera, envolto por uma cortina plástica preta, a fim de diminuir a incidência de luz externa. Os aparatos utilizados nos testes foram suspensos por uma base de sustentação de acrílico. A base possui 30 centímetros de comprimento e 4,5 cm de altura. Para fixar os aparatos foram feitos pequenos furos na base de acrílico e inseridos apoios de plástico, confeccionados com filamentos de plástico ABS (*Acrylonitrile butadiene styrene*) e auxílio de impressora 3D (modelo GTMax3D Pro Core H4). Para a iluminação interna do ambiente de filmagem, necessária para permitir a melhor visualização dos animais nos vídeos, um cordão de lâmpadas de LED foi inserido nas laterais do banco e abaixo da base de sustentação do aparato. A filmagem de todos os experimentos foi realizada com uma câmera do tipo *Digital Microscope* – Lenovo® acoplada na parte superior do banco (Figura 3).

Figura 3. Ambiente de filmagem

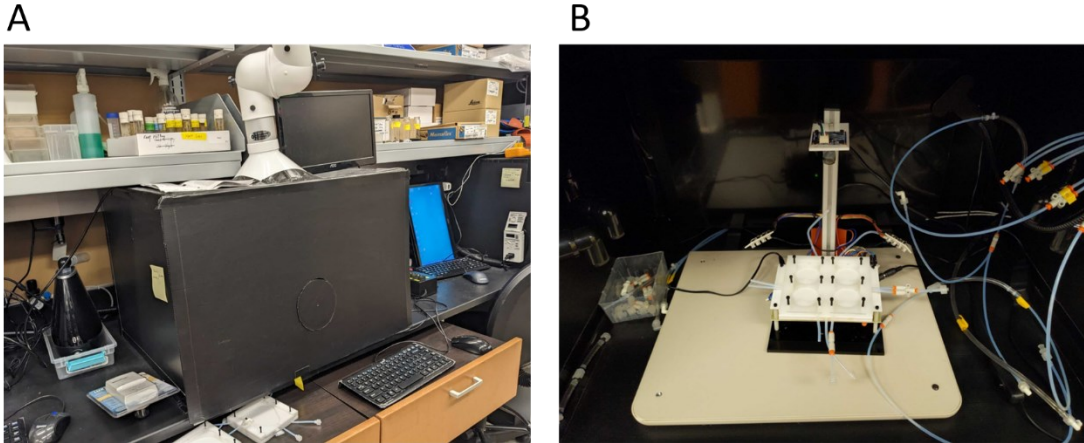


Legenda: a) Câmera. b) Suporte plástico para câmera. c) Cortina plástica preta. d) Aparato para teste comportamental. e) Suporte de acrílico para aparato do teste comportamental. f) Cordão de diodo emissor de luz para iluminação. Fonte: De autoria própria.

Os experimentos 3 e 4 foram realizados no laboratório Kaun e filmados em um ambiente denominado “flyGram” (SCAPLEN *et al.*, 2020). Este ambiente consiste em uma caixa plástica

escura, uma câmera USB e um espaço para a disposição da arena abaixo da câmera. A câmera utilizada nestes experimentos conta com filtro infravermelho, o que permitiu rastrear os movimentos das moscas no escuro, apenas com o uso da luz infravermelha (Figura 4).

Figura 4. Ambiente de filmagem - flyGrAM

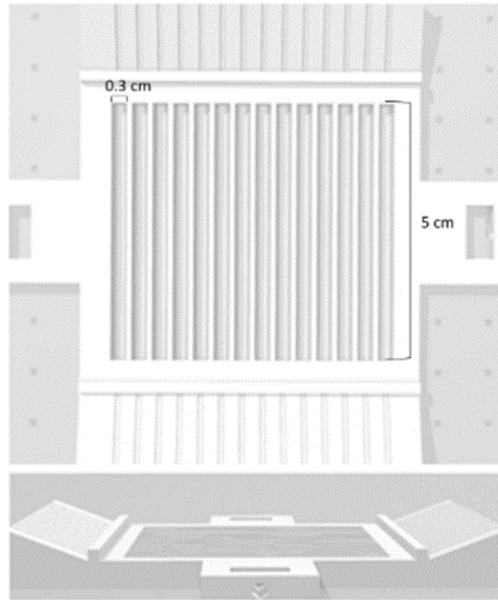


Legenda: A. Caixa plástica. B. Ambiente com câmera, iluminação e aparato para teste comportamental. Fonte: Laboratório Kaun.

5.2.3 Teste de preferência por sacarose no labirinto com raias

Um aparato denominado “labirinto com raias” foi utilizado para este teste (ECKERT *et al.*, 2020, (Figura 5). O aparato foi confeccionado utilizando-se filamentos de plástico ABS (*Acrylonitrile butadiene styrene*) com o auxílio de uma impressora 3D. Nas extremidades de cada raia foram ofertadas solução de ágar 1% ou solução de sacarose (concentração de acordo com o experimento) adicionadas a uma solução de ágar para solidificar. Os animais podiam se movimentar livremente pelo labirinto para escolher uma das soluções, entretanto, devido ao espaço do mesmo, o voo foi um comportamento suprimido durante o teste.

Figura 5. Labirinto com raia



Fonte: De autoria própria.

No piloto 3, e nos experimentos 1 e 2, os animais foram primeiramente anestesiados no frio (-5°) por aproximadamente dois minutos, e em seguida colocados, individualmente, no aparato. Esta foi tampada com uma placa de acrílico e colocada no ambiente de filmagem. Os testes tiveram início com os animais ainda desacordados e tiveram duração de aproximadamente 50 minutos. No piloto 3 e nos experimentos 1 e 2, os comportamentos foram analisados por um período de 40 minutos após a recuperação da anestesia de cada animal. A partir do experimento 3, os animais foram inseridos na arena sem anestesia, usando um aspirador entomológico (Figura 6), e os comportamentos foram analisados por 40 min a partir do início do vídeo.

Figura 6. Aspirador entomológico

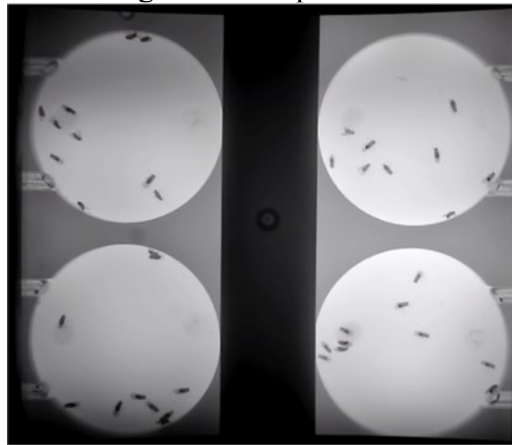


Fonte: De autoria própria.

5.2.4 Teste de preferência por sacarose no campo aberto

Para esse teste foi utilizado um aparato contendo quatro arenas de 3,2 cm de diâmetro (Figura 7). Em cada arena foram pipetadas soluções de ágar 1% ou sacarose 2M, adicionadas a uma solução de ágar para solidificar, em lados opostos. Com um aspirador entomológico, nove a onze animais foram inseridos em cada arena, e esta foi tampada com placa de acrílico e inserida no ambiente de filmagem. Os testes tiveram duração de 5 minutos. Os animais podiam se movimentar livremente pela arena para escolher uma das soluções, entretanto, devido ao espaço da mesma, o voo foi um comportamento suprimido durante o teste.

Figura 7. Campo aberto



Fonte: De autoria própria.

5.2.5 Protocolo de imuno-histoquímica

Um ensaio de imuno-histoquímica foi realizado para avaliar a quantidade de células serotonina-positivas no cérebro dos animais. O ensaio foi adaptado de Ries *et al.* (2017) e de Petruccelli *et al.* (2018). Foram utilizados cérebros inteiros de moscas de cada grupo experimental. Os cérebros foram dissecados em solução de PBS sob um microscópio estereoscópio, transferidos para tubos contendo 200 μ L de solução PFA 2% (paraformaldeído/PBS) e mantidos por até 24h em um rotador a 4° C. Após esse período, as amostras passaram por três lavagens com PBTx-0,5% (0,5% PBS, Triton-X100), com intervalos de 10 min entre elas. Durante os intervalos os tubos com as amostras foram mantidos em um rotador a 25° C. Após as três lavagens, retirou-se a solução de PBTx-0,5%, e as amostras foram incubadas com solução bloqueadora (5% de soro de cabra em PBT 0,5%) por 1h em um rotador a 25° C. Ao final do período de incubação, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários (*rabbit anti-5-HT*, 1:400, *Immunostar*, catálogo nº 20080; *mouse anti-BRP*, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, 1:30) por 48h em rotador a 4° C. Após 48h, as

amostras passaram por cinco lavagens com PBTx-0,5% (0,5% PBS, Triton-X100), com intervalos de 10 min entre elas. Em seguida às lavagens, as amostras foram incubadas com os anticorpos secundários (*anti-rabbit*, Alex Fluor 488, 1:500; *anti-mouse*, Alex Fluor 647, 1:500) por 24h em rotador a 4° C. Ao final da incubação com os anticorpos secundários, as amostras passaram por três lavagens com PBTx-0,5% (0,5% PBS, Triton-X100), com intervalos de 10 min entre elas. Em seguida, os cérebros foram montados em lâmina com glicerol 50%/PBS e analisados em microscopia confocal.

As imagens foram obtidas em um microscópio invertido de fluorescência (Nikon CSU-W1 SoRA, Tóquio, Japão) disponível no departamento de Biologia e Medicina, Universidade Brown (Providence, EUA), com objetiva de ar de 20x. Foram utilizadas seções Z de 0,2 µm, e os *lasers* utilizados foram determinados para cada canal (laser 488 nm para anti-5-HT e laser 640 para nc82), e mantidos constantes em todas as amostras avaliadas. As imagens foram obtidas utilizando o *software* NIS-elements. A análise das imagens foi realizada utilizando o *software* Fiji (ImageJ). Para a análise, a ferramenta 'Max Intensity Projection' (projeção de intensidade máxima) foi utilizada para combinar as seções Z em uma imagem 2D representativa. A quantificação da expressão de 5-HT foi realizada medindo a intensidade de fluorescência nas imagens projetadas. As regiões de interesse (ROIs) foram selecionadas manualmente, e a intensidade média foi calculada para cada ROI.

5.3 Protocolos experimentais - Padronizações dos protocolos de estresse

5.3.1 Experimento piloto 1 - Padronização do protocolo de estresse de privação alimentar

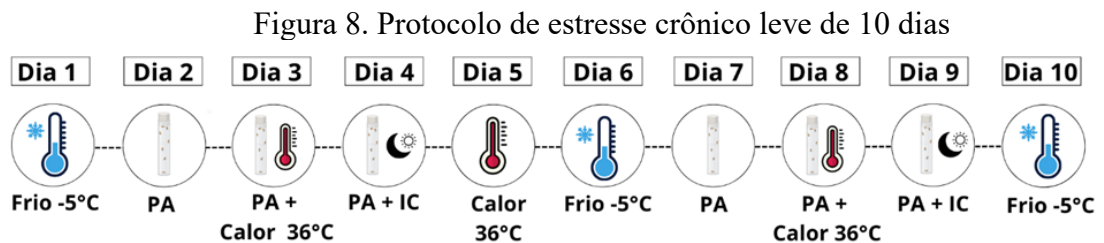
Este protocolo teve por objetivo avaliar qual o melhor método para realizar a privação alimentar. Para isso, um tempo de privação alimentar de 58h foi definido, baseado no tempo estabelecido no protocolo de estresse crônico de Araujo *et al.* (2018). Os animais foram divididos em três grupos, sendo eles: ágar 1%, papel filtro embebido em 200 µL de água e papel filtro embebido em 200 µL de solução de sacarose 5%. Cada tubo continha inicialmente 2-5 animais (machos ou fêmeas). Os animais foram mantidos nestas condições por 58h. Posteriormente foram transferidos para tubos contendo meio de milho onde permaneceram por mais 58h, e em seguida eram colocados novamente nos tubos para privação alimentar, totalizando duas exposições de 58h a tubos sem alimento. Ao final de cada etapa, foram contabilizadas as mortes em cada grupo experimental.

5.3.2 Experimento piloto 2 - Protocolo de estresse crônico leve de 10 dias

As moscas foram submetidas a um protocolo de estresse crônico de 10 dias, adaptado de Araujo *et al.* (2018) (Figura 8). O protocolo incluiu quatro diferentes estressores: frio, calor, privação alimentar e inversão de ciclo. As moscas foram designadas aleatoriamente para cada grupo.

No estresse de frio, as moscas foram colocadas em tubos plásticos (7,5 cm x 1,1 cm) contendo meio de milho. Estes tubos foram colocados num banho de gelo a aproximadamente -5°C , onde permaneceram por 30 min. As moscas do grupo controle foram transferidas para tubos com as mesmas condições, no mesmo ambiente, mas não foram colocadas no banho de gelo.

No estresse de privação alimentar, as moscas foram transferidas para tubos contendo 0,5 mL de solução de ágar 1%, enquanto as moscas do grupo controle foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho. Os animais permaneceram nestas condições por 58h.



Legenda: PA= privação alimentar. IC= inversão do ciclo. Fontes: Canva ® e Biorender ®.

No estresse de calor, as moscas foram colocadas em tubos contendo meio de milho ou 0,5 mL de solução de ágar 1%, quando este estresse sobrepunha o estresse de privação alimentar. Os tubos foram colocados em uma placa de acrílico, e esta foi imersa em um banho quente a 36°C (Figura 9). As moscas do grupo controle foram transferidas para tubos nas mesmas condições e mantidas em um ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Os animais permaneceram nestas condições por 4h.

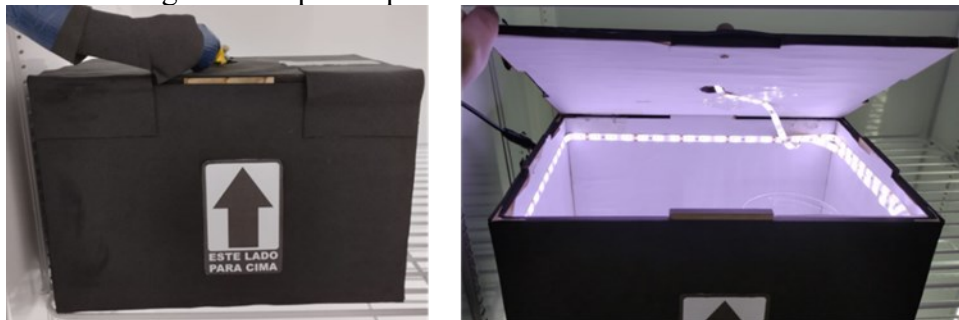
Figura 9. Placa para o estresse de calor



Fonte: De autoria própria.

No estresse de inversão do ciclo as moscas foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho, e estes foram mantidos em uma caixa contendo cordão de luz de LED em toda a parte interna (Figura 10). O ciclo de luz foi invertido, com luzes acesas às 18h e apagadas às 6h. Os animais do grupo controle foram transferidos para tubos com as mesmas condições, mas em um ambiente sem alteração no ciclo de luz, ou seja, luzes acesas às 6h e apagadas às 18h. As moscas foram transferidas de um tubo para outro, sempre que possível, usando o geotropismo negativo, característica desta espécie, para evitar outra fonte de estresse. Neste experimento, cada tubo possuía, inicialmente, 5 moscas, machos ou fêmeas.

Figura 10. Aparato para o estresse de inversão do ciclo



Fonte: De autoria própria.

5.3.3 Experimento piloto 3 - Padronização do protocolo de estresse crônico leve de 9 dias

Em virtude da alta mortalidade observada no experimento piloto 2 (ver seção de resultados 6.1.2), o protocolo de estresse crônico leve foi modificado, consistindo em três blocos sequenciais com quatro fatores de estresse em cada bloco, mas sem sobreposição dos estressores (Figura 9). O protocolo incluiu quatro diferentes fatores de estresse: frio, calor, privação alimentar e inversão de ciclo. As moscas foram designadas aleatoriamente para cada grupo.

No estresse de frio, as moscas foram colocadas em tubos plásticos (7,5 cm x 1,1 cm) contendo meio de milho. Estes tubos foram colocados num banho de gelo a aproximadamente -5°C , onde permaneceram por 30 min. As moscas do grupo controle foram mantidas em tubos com as mesmas condições, no mesmo ambiente, mas não foram colocadas no banho de gelo.

No estresse de privação alimentar, as moscas do grupo estresse foram colocadas em tubos plásticos contendo ágar 1%, enquanto as moscas do grupo controle foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho. Os animais permaneceram nestas condições por 24h.

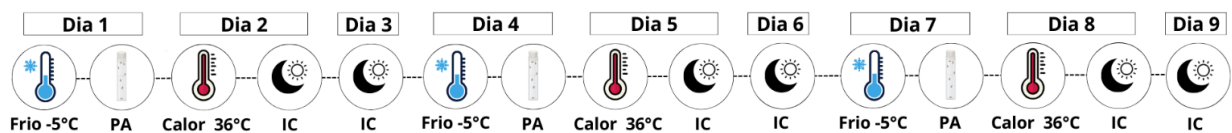
No estresse de calor, as moscas foram colocadas em tubos contendo meio de milho. Os tubos foram colocados em uma placa de acrílico e esta foi imersa em um banho quente a 36°C

(Figura 9). As moscas do grupo controle foram transferidas para tubos nas mesmas condições e mantidas em um ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Os animais permaneceram nestas condições por 4h.

No estresse de inversão de ciclo as moscas foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho e estes tubos foram mantidos em uma caixa confeccionada para este fim (Figura 11), com luzes acesas às 18h e apagadas às 6h. Os animais do grupo controle foram transferidos para tubos com as mesmas condições, mas em uma caixa sem a alteração no ciclo de luz, ou seja, luzes acesas às 6h e apagadas às 18h.

As moscas foram transferidas de um tubo para outro, sempre que possível, usando o geotropismo negativo, característica desta espécie, para evitar outra fonte de estresse. Neste experimento, cada tubo possuía, inicialmente, 5 moscas, machos ou fêmeas.

Figura 11. Protocolo de estresse crônico leve de 9 dias



Legenda: PA= privação alimentar. IC= inversão do ciclo. Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.3.4 Experimento piloto 4 - Padronização do protocolo de estresse de calor

Devido à alta taxa de mortalidade observada no experimento piloto 3 (ver seção de resultados 6.2.3), principalmente nos dias em que os animais passavam pelo estresse de calor, foi realizado um protocolo para avaliar qual a temperatura mais adequada para esse estressor. Para isso, foram selecionadas, arbitrariamente, as temperaturas de 30°C e 33°C por serem próximas, mas mais baixas do que 36°C . O protocolo foi repetido três vezes para cada, com grupos diferentes de moscas. Os tubos foram retirados do banho quente a cada hora para avaliar a taxa de mortalidade dos animais. Cada teste teve duração total de 4h.

5.4 Desenhos experimentais após pilotos do protocolo de estresse

5.4.1 Experimento 1 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 9 dias

Em razão da mortalidade observada no experimento piloto 3 (ver seção de resultados 6.2.3), o protocolo de estresse crônico leve foi ligeiramente modificado, sendo a temperatura do estresse de calor alterada para 33°C , e o tempo de exposição ao estresse de frio para 15 min a aproximadamente -5°C . O protocolo consistiu em três blocos sequenciais, com quatro

diferentes fatores de estresse em cada bloco, nunca sobrepostos, incluindo frio, calor, privação alimentar e inversão de ciclo. As moscas foram designadas aleatoriamente para cada grupo (Figura 10).

No estresse de frio, as moscas foram colocadas em tubos plásticos (7,5 cm x 1,1 cm) contendo meio de milho. Estes tubos foram então colocados no freezer a uma temperatura de aproximadamente -5°C onde permaneceram por 15 min. As moscas do grupo controle foram mantidas em tubos com as mesmas condições a temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

No estresse de privação alimentar, as moscas foram colocadas em tubos plásticos contendo 0,5 mL de solução de ágar 1%, enquanto as moscas controle foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho. Os animais permaneceram nestas condições por 24h.

No estresse de calor, as moscas foram colocadas em tubos contendo meio de milho. Os tubos foram colocados em uma placa de acrílico (Figura 8), e esta foi imersa em um banho quente a 33°C . As moscas do grupo controle foram transferidas para tubos nas mesmas condições e mantidas em um ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Os animais permaneceram nestas condições por 4h.

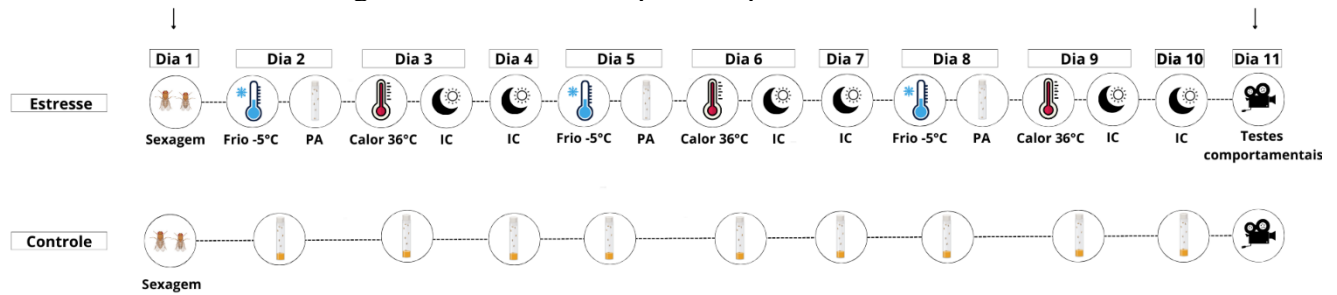
No estresse de inversão de ciclo, as moscas foram colocadas em tubos plásticos contendo meio de milho e estes tubos foram mantidos em uma caixa confeccionada para este fim (Figura 10), com luzes acesas às 18h e apagadas às 6h, e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Os animais do grupo controle foram transferidos para tubos com as mesmas condições, mas em uma caixa sem a inversão de ciclo de luz, ou seja, luzes acesas às 6h e apagadas às 18h.

As moscas foram transferidas de um tubo para outro, sempre que possível, usando o geotropismo negativo, característica desta espécie, para evitar outra fonte de estresse. Cada tubo possuía, inicialmente, 8 a 10 moscas, machos ou fêmeas.

Os testes comportamentais foram realizados com todos os animais no décimo primeiro dia do protocolo. Ao final dos experimentos, as moscas foram mantidas em um ambiente de -5°C por 1h para eutanásia (Figura 12).

A cada dia experimental foram testadas no máximo 14 animais por grupo. Para atingir o número amostral calculado para cada grupo foram realizadas quatro baterias de testes, com $n = \pm 11$ /grupo por bateria, totalizando ao menos $n = 44$ animais por grupo ao final dos experimentos.

Figura 12. Linha do tempo do experimento 1

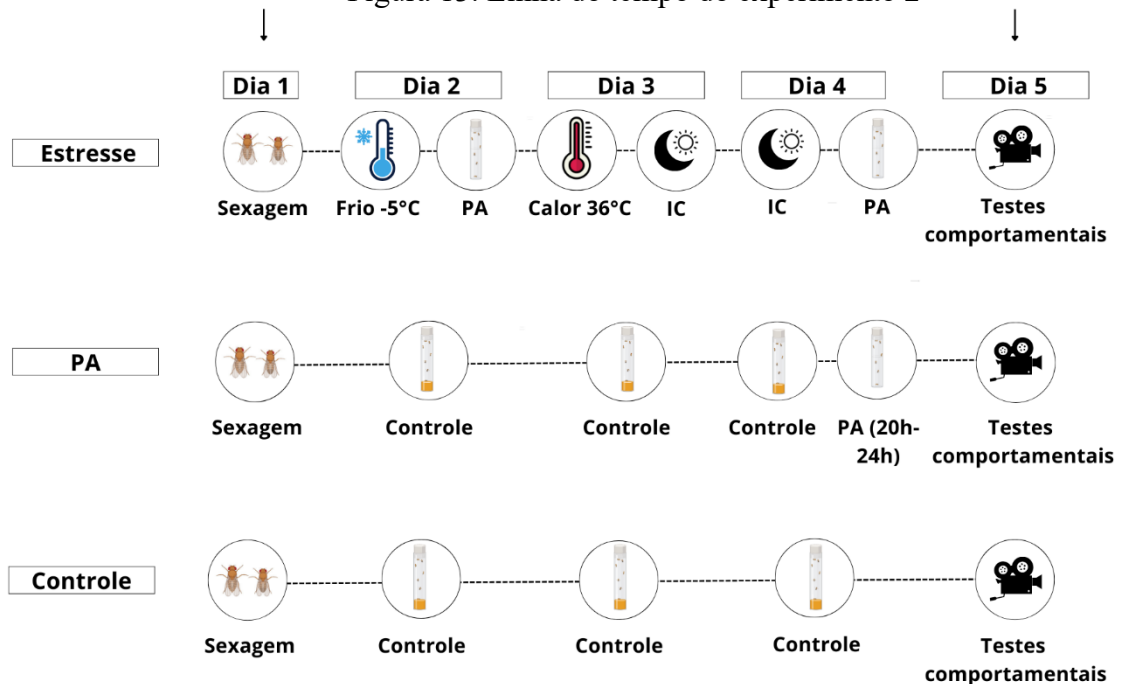


Legenda: PA= privação alimentar. IC= inversão do ciclo. As setas indicam as etapas de randomização dos grupos.
Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.4.2 Experimento 2 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias

Neste experimento as moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e, em seguida, em três condições experimentais diferentes: controle (não-estressadas e alimentadas), privadas de alimento (~20h prévias ao teste comportamental), e estressadas e privadas de alimento (~20h prévias ao teste comportamental). As moscas do grupo estresse foram submetidas ao protocolo de estresse crônico leve por 3 dias. Os testes comportamentais foram realizados com todos os animais no quinto dia do protocolo (Figura 13). Neste experimento, foram realizados o teste de preferência por sacarose de forma individual, no labirinto com raias, e em grupos, no campo aberto.

Figura 13. Linha do tempo do experimento 2

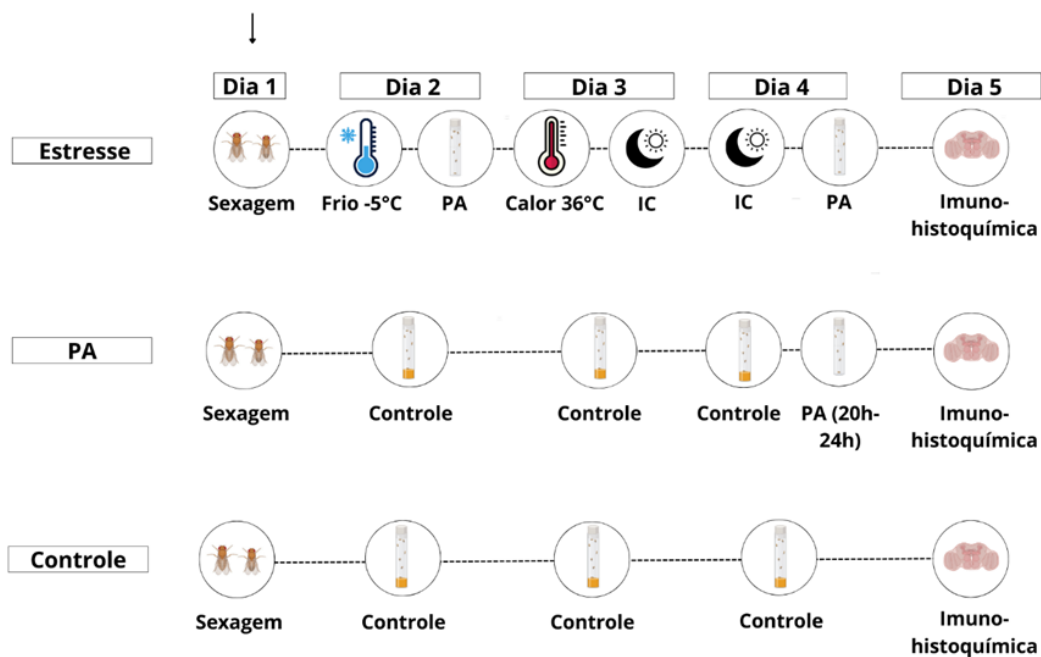


Legenda: PA= privação alimentar. IC = inversão de ciclo. As setas indicam as etapas de randomização dos grupos.
Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.4.3 Experimento 3 – Neurotransmissão serotoninérgica após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias

Neste experimento as moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e em seguida em três condições experimentais diferentes: controle (não-estressadas e alimentadas), privadas de alimento (~20h prévias ao protocolo de imuno-histoquímica), e estressadas e privadas de alimento (~20h prévias ao protocolo de imuno-histoquímica). As moscas do grupo estresse foram submetidas ao protocolo de estresse crônico leve por 3 dias. No quinto dia do protocolo, as moscas foram mantidas em um banho de gelo a -5° C por 30 min para eutanásia, e seus cérebros foram dissecados para os ensaios de imuno-histoquímica (Figura 14).

Figura 14. Linha do tempo do experimento 3



Legenda: PA= privação alimentar. IC = inversão de ciclo. Legenda: FLX = fluoxetina. A seta indica a etapa de randomização dos grupos. Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.5 Padronização do tratamento farmacológico

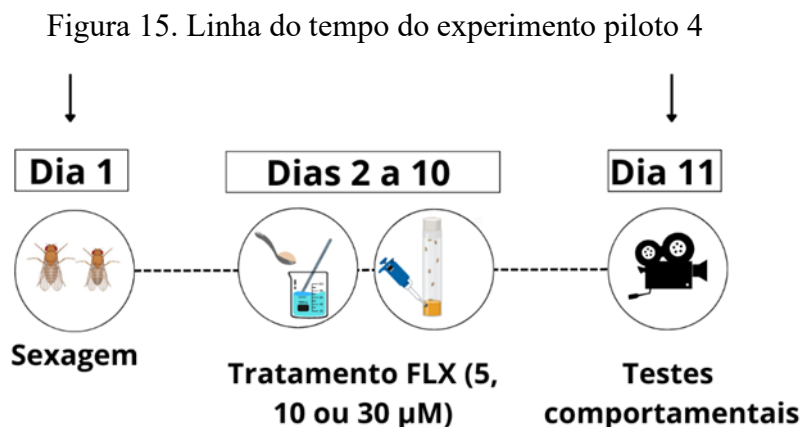
5.5.1 Experimento piloto 5 - Método de administração do fármaco

Este piloto teve por objetivo padronizar o método de tratamento com hidróclorato de fluoxetina (Sigma-Aldrich ®). Para isso foi utilizada a dose mais alta definida para o experimento 4 (30 µM). O fármaco foi dissolvido em água destilada, e todas as soluções foram coradas com corante alimentício azul para que a solução pudesse ser visível no meio de cultivo, e também no abdômen das moscas. A solução foi preparada no primeiro dia do protocolo, e mantida em refrigerador a 4°C durante o experimento.

As moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e em seguida em duas condições experimentais diferentes: controle (tratados com veículo, água destilada adicionada ao meio de milho) e tratadas (fluoxetina 30 μM). As moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e em seguida em duas condições experimentais diferentes: controle (tratados com veículo) e tratadas (fluoxetina 10 mM). Os grupos foram mantidos em tubos plásticos (7,5 cm x 1,1 cm) com 1g de meio de cultivo, e um pequeno furo na parte inferior. O tratamento teve duração de 9 dias. Foram pipetados 10 μL de fluoxetina 30 μM ou 10 μL de água destilada em cada tubo diariamente. Foram registradas a quantidade de moscas vivas em cada tubo ao final do tratamento, a fim de avaliar se essa dose era tóxica ou não aos animais.

5.5.2 Experimento 4 – Respostas comportamentais após tratamento com fluoxetina por 9 dias

As moscas foram divididas por sexo (macho ou fêmea) assim que eclodiram e transferidas para tubos plásticos contendo meio de milho. Em seguida, foram divididas de acordo com o tratamento (controle (veículo), fluoxetina 5 μM , 10 μM , ou 30 μM). O tratamento teve duração de 9 dias, e foi realizado conforme descrito no item 5.5.1. Os testes comportamentais ocorreram no décimo primeiro dia do protocolo. Ao final dos experimentos, as moscas foram mantidas em um ambiente a -5°C por 1h para eutanásia (Figura 15).



Legenda: FLX = fluoxetina. As setas indicam as etapas de randomização dos grupos. Fontes: Canva [®] e Biorender [®].

5.5.3 Experimento 5 - Neurotransmissão serotoninérgica após tratamento com fluoxetina

Após análise dos resultados do experimento 4 (ver seção de resultados 6.2.9), optou-se por modificar a concentração de fluoxetina usada. Assim, a concentração usada no experimento 5 foi de 10 mM. O fármaco foi primeiramente diluído em água destilada e, em seguida, adicionado ao meio de cultivo, e cada tubo recebeu 0,5 g do meio de cultivo.

As moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e em seguida em duas condições experimentais diferentes: controle (tratados com veículo) e tratadas (fluoxetina 10 mM). Os animais foram tratados por três dias. Ao final do tratamento, as moscas foram mantidas em um banho de gelo a -5°C por 30 min para eutanásia, e seus cérebros foram dissecados em tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*, PBS) 1% para os ensaios de imuno-histoquímica (Figura 16).

Figura 16. Linha do tempo do experimento 5

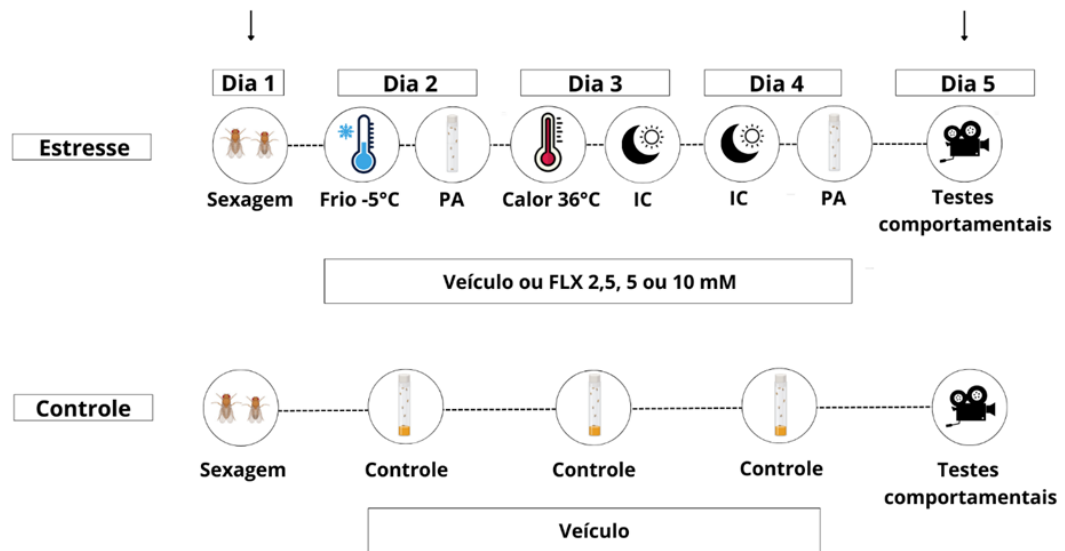


Legenda: FLX = fluoxetina. A seta indica a etapa de randomização dos grupos. Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.6 Experimento 6 - Respostas comportamentais das moscas após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias e tratamento com fluoxetina

Neste experimento, as moscas foram divididas de acordo com o sexo (macho ou fêmea), e em grupos estressados por 3 dias e tratados com fluoxetina (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) ou veículo, e em um grupo não estressado e tratado com veículo. Os testes comportamentais foram realizados com todos os animais no quinto dia do protocolo (Figura 17). Neste experimento, foi realizado apenas o teste de preferência por sacarose no labirinto com raias.

Figura 17. Linha do tempo do experimento 6



Legenda: FLX= fluoxetina. PA = privação alimentar. IC = inversão de ciclo. As setas indicam as etapas de randomização dos grupos. Fontes: Canva ® e Biorender ®.

5.7 Cálculo amostral

O tamanho da amostra mínima necessária para cada experimento comportamental foi calculado com o *software* Gpower 3.1.9.7. Os cálculos foram realizados usando o menor tamanho de efeito de interesse: Cohens'f igual a 0,25, valor de alfa igual a 0,05 e 90% de poder estatístico em uma ANOVA de duas vias. Em cada experimento os registros comportamentais foram obtidos a partir de moscas independentes, avaliadas no teste de preferência por sacarose. As limitações de recursos, principalmente relacionadas ao tempo de execução dos experimentos comportamentais, foram relevantes para a escolha do valor do tamanho de efeito e alfa usados no cálculo amostral. Os tamanhos de efeito escolhidos são intermediários, mas menores ou iguais ao limite inferior do intervalo de confiança de 95% dos tamanhos de efeito observados na literatura para cada desfecho primário.

Experimento 1: Quatro grupos foram planejados (machos controle, fêmeas controle, machos estressados e fêmeas estressadas). O tamanho amostral obtido foi de 176 moscas (n = 44 por grupo, 88 fêmeas e 88 machos), por desfecho comportamental. Para o cálculo amostral foi utilizado um tamanho de efeito igual a 0,25.

Experimento 2: Seis grupos foram planejados (machos controle, machos privados de alimento, machos estressados + privados de alimento, fêmeas controle, fêmeas privadas de alimento, fêmeas estressadas + privadas de alimento). O tamanho amostral obtido foi de 206

moscas ($n = 34$ por grupo, 103 fêmeas e 103 machos), por desfecho comportamental. Para o cálculo amostral foi utilizado um tamanho de efeito igual a 0,25.

Experimento 3: Seis grupos foram planejados (machos controle, machos privados de alimento, machos estressados + privados de alimento, fêmeas controle, fêmeas privadas de alimento, fêmeas estressadas + privadas de alimento). O tamanho amostral foi de no mínimo 6 animais por grupo, baseado em experimentos prévios do laboratório Kaun.

Experimento 4: Oito grupos foram planejados (machos controle - FLX 0 μM , machos FLX 5 μM , machos FLX 10 μM , machos FLX 30 μM , fêmeas controle- FLX 0 μM , fêmeas FLX 5 μM , fêmeas FLX 10 μM , fêmeas FLX 30 μM). O tamanho amostral obtido foi de 231 moscas. Entretanto, para balancear o número de moscas em cada grupo, um total de 240 moscas foram utilizadas ($n = 30$ por grupo, 120 fêmeas e 120 machos), por desfecho comportamental. Para o cálculo amostral foi utilizado um tamanho de efeito igual a 0,25.

Experimento 5: Quatro grupos foram planejados (machos controle, machos FLX 10 mM, fêmeas controle, fêmeas FLX 10 mM). O tamanho amostral foi de no mínimo 6 animais por grupo, baseado em experimentos prévios do laboratório Kaun.

Experimento 6: Dez grupos foram planejados (machos não estressados + FLX 0 mM, machos estressados + FLX 0 mM, machos estressados + FLX 2,5 mM, machos estressados + FLX 5 mM, machos estressados + FLX 10 mM, fêmeas não estressadas + FLX 0 mM, fêmeas estressadas + FLX 0 mM, fêmeas estressadas + FLX 2,5 mM, fêmeas estressadas + FLX 5 mM, fêmeas estressadas + FLX 10 mM). O tamanho amostral obtido foi de 231 moscas ($n = 23$ por grupo, 115 fêmeas e 115 machos), por desfecho comportamental. Para o cálculo amostral foi utilizado um tamanho de efeito igual a 0,25.

5.8 Análise dos testes comportamentais

Os dados coletados durante as filmagens foram analisados com os softwares ANY-maze (<https://www.any-maze.com/>), para análises de testes individuais (labirinto com raias), e Trex seguido de análises com código em Python para análise dos vídeos em grupo (campo aberto). Para cada animal foram obtidos os comportamentos: distância percorrida (m), velocidade (m/s), tempo total na sacarose (s), tempo total na raia (s), tempo total no ágar (s), tempo de mobilidade na sacarose (s), tempo de mobilidade na raia (s), tempo de mobilidade no ágar (s), tempo de imobilidade na sacarose (s), tempo de imobilidade na raia (s), tempo de imobilidade no ágar (s).

5.9 Cálculo do índice de preferência

O índice de preferência pela sacarose (Pindex) foi estimado da seguinte forma: 1 - o tempo de mobilidade e de imobilidade na região do ágar ou da sacarose foram somadas; 2 - a ocupação na zona sacarose (P sacarose) ou zona ágar (P ágar) foi calculada pela divisão do tempo na zona pelo tempo total (P sacarose ou ágar = Tempo total na sacarose ou ágar / (tempo na sacarose + tempo no ágar)); 3 - a diferença entre o P sacarose e o P ágar foi calculada (Pindex = P sacarose – P ágar). O Pindex varia de 1 (preferência total pela zona com sacarose, ou seja, preferência pela sacarose) a – 1 (aversão total à zona com sacarose, ou seja, aversão à sacarose).

5.10 Análise estatística

Para os testes comportamentais, a duração da locomoção e da imobilidade foram registradas para cada região dos aparatos utilizados. No labirinto com raias foram consideradas as regiões da sacarose, da raia e do ágar. No campo aberto, foram consideradas as regiões da sacarose e do ágar. A preferência por sacarose (índice de preferência) foi considerada como desfecho primário e a locomoção (distância percorrida) como desfecho secundário. A hipótese nula de que não há diferenças entre os sexos e entre as intervenções foi testada para cada experimento.

Todos os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados dos experimentos segmentados em períodos de 5 min, e que apresentaram distribuição normal aplicou-se ANOVA de duas vias (fatores sexo e tratamento/condição experimental) com medidas repetidas (fator tempo do teste) seguido de *post-hoc* de Tukey quando aplicável. Para os dados dos experimentos não segmentados e que apresentaram distribuição normal aplicou-se ANOVA de duas vias (fatores sexo e condição experimental) seguido de *post-hoc* de Tukey quando aplicável. Além disso, foram obtidos os tamanhos de efeito de cada comparação (*eta partial squared*). Os tamanhos de efeito foram classificados da seguinte forma, de acordo com Sawilowsky (2009): muito pequeno: 0,01-0,2; pequeno: 0,2-0,5; médio: 0,5-0,8; grande: 0,8-1,2; muito grande: 1,2-2; enorme: acima de 2.

Para os dados que não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste de Kruskal-wallis (fator condição experimental). Quando aplicável, o teste *post-hoc* de múltiplas comparações entre os *rankings* foi realizado.

As análises foram realizadas no *software* Statistica 13®. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes os resultados com valor de $p \leq 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

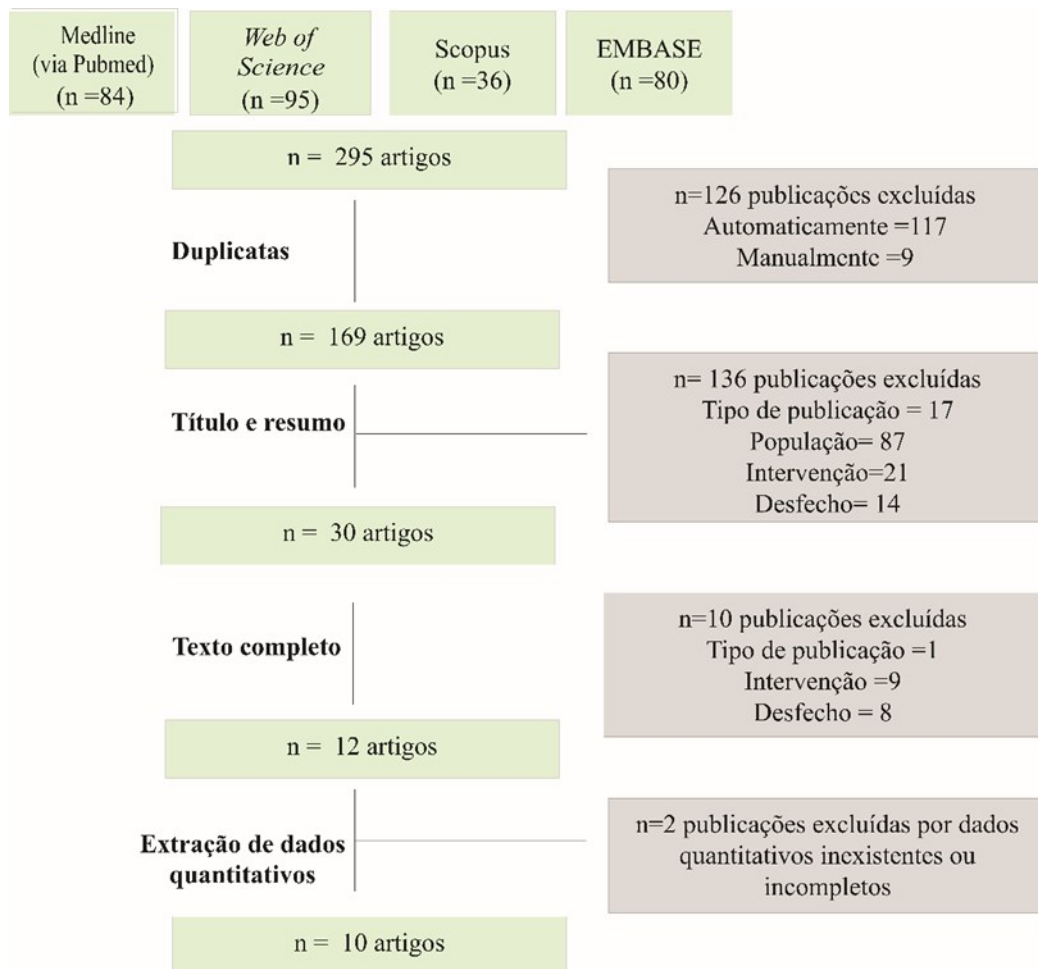
6 RESULTADOS

6.1 Dados obtidos na revisão sistemática da literatura

6.1.1 Análise qualitativa dos dados

Um fluxograma resumindo as etapas de busca, triagem e seleção dos artigos pode ser observada na Figura 1. As buscas retornaram 12 publicações, que somaram 140 estudos relevantes para extração de dados qualitativos. Estudos foram definidos como cada comparação diferente entre os grupos controle e experimental, assim, uma mesma publicação pode contar um ou mais estudos.

Figura 18. Fluxograma PRISMA



Dentre os estudos incluídos, 15 foram conduzidos em larvas e 125 em adultos. Nos estudos em larvas o sexo dos animais não foi especificado. Em relação ao sexo das moscas adultas, 51 estudos usaram machos, 38 estudos usaram fêmeas, 33 estudos usaram machos e fêmeas, e 3 estudos não especificaram o sexo dos animais. Em estudos com larvas, os fármacos usados foram desipramina (k=8), fluoxetina (k=5) e imipramina (k=2). Já em estudos com adultos foram usados fluoxetina (k=105), citalopram (k=10), desipramina (k=6), amitriptilina (k=2) e imipramina (k=2). Em estudos com larvas, o tempo de tratamento variou de 1h (k=1) a

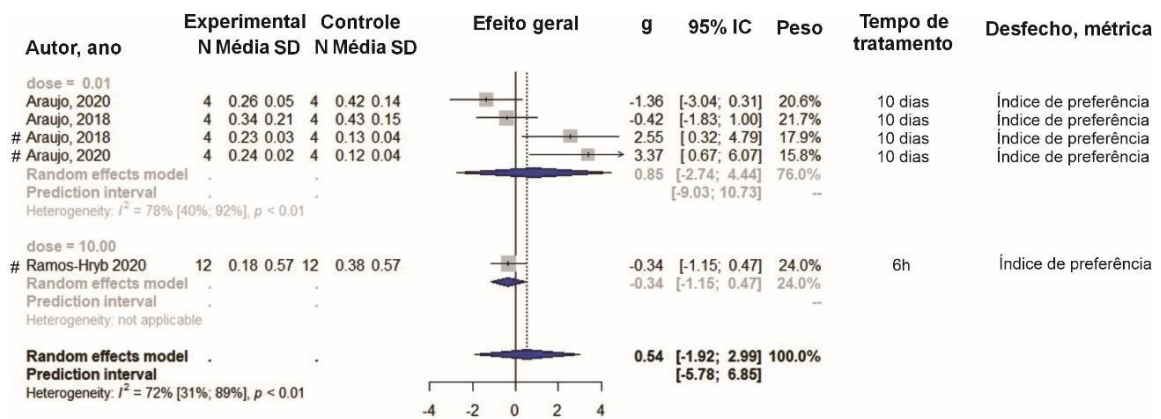
48h (k=14). Já em estudos com adultos, o tempo de tratamento foi subdividido em crônico (48h a 10 dias, k=49), intermediário (14h a 24h, k=11) ou agudo (10 min a 6h, k=11). Em 54 estudos os animais foram tratados durante o período larval e testados quando adultos. Todos os estudos usaram a via oral para a administração dos fármacos. Os desfechos comportamentais nos estudos usando larvas foram locomoção (k=13) e alimentação (k=2). Nos estudos com adultos, os desfechos foram cópula ou acasalamento (k=84), imobilidade (k=21), locomoção (k=10), preferência por sacarose (k=5), preferência por luz (k=2), agressão (k=2) e escalada (k=1).

6.1.2 Análise quantitativa dos dados

O processo de triagem identificou 10 publicações relevantes para a extração de dados quantitativos, incluindo 5 estudos em larvas e 121 em adultos. O ES de cada estudo e o CES entre eles foram calculados, entretanto, devido a heterogeneidade presente entre o desenho experimental de cada estudo, o CES não foi levado em consideração nas análises e discussão dos dados. Nesta seção são apresentados apenas os resultados quantitativos dos estudos realizados em adultos para locomoção, preferência por sacarose, e desfechos secundários (não-comportamentais), devido ao escopo dos experimentos realizados no presente estudo. Dentre os estudos de cada desfecho, estes foram subdivididos de acordo com a dose ou o fármaco administrado. Os resultados obtidos para estudos em larvas e demais desfechos comportamentais em adultos podem ser observados nos Apêndices A à D.

Em relação a preferência por sacarose, pode-se observar que este comportamento foi avaliado em cinco estudos (k = 5), provenientes de apenas três publicações diferentes (Figura 2). Em todos os estudos os animais foram tratados com fluoxetina. Dentre os estudos em que os animais foram previamente estressados, dois apresentaram tamanho de efeito positivo, ou seja, aumento da preferência por sacarose ($g = 2,55 [0,32; 4,79]$ e $g = 3,37 [0,67; 6,07]$, Araujo *et al.*, 2018;2020), enquanto um estudo apresentou tamanho de efeito negativo, ou seja, diminuição da preferência por sacarose ($g = -0,34 [-1,15;0,47]$, Ramos-Hryb *et al.*, 2020). Nos estudos em que os animais não foram previamente estressados os tamanhos de efeito observados também foram negativos ($g = 2,55 [0,32; 4,79]$ e $g = 3,37 [0,67; 6,07]$, Araujo *et al.*, 2018;2020).

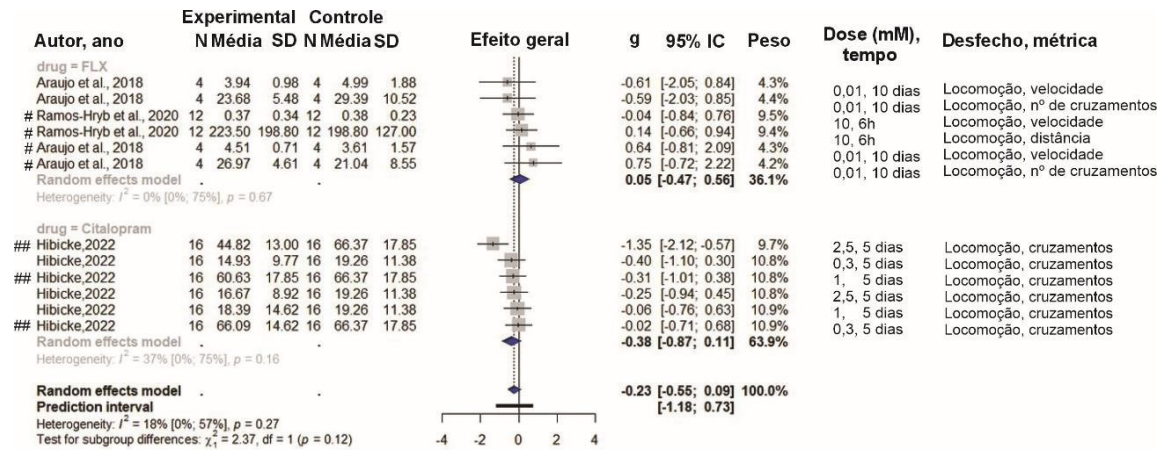
Figura 19. Gráfico em floresta dos estudos que avaliaram a preferência por sacarose em moscas adultas



Legenda: efeitos observados para cada estudo individual (quadrados cinzas), seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o CES (losango azul). Estudos localizados à esquerda da linha vertical (ausência de efeito), indicam diminuição do comportamento, e estudos localizados à direita da linha indicam aumento do comportamento. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges g. # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas. Todos os estudos administraram fluoxetina e foram feitos em moscas machos.

Em relação a locomoção, identificamos doze estudos que registraram desfechos relacionados à locomoção, e estes foram divididos em subgrupos baseados no fármaco administrado. As análises incluíram diferentes métricas para o mesmo desfecho, e.g. velocidade, distância percorrida, e número de cruzamentos, como indicado na Figura 20. Na penúltima coluna são apresentadas as informações das doses e dos tempos de tratamentos de cada estudo. Embora o tamanho efeito tenha sido positivo para o tratamento com fluoxetina ($CES = 0,05$), o baixo tamanho amostral ($k = 6$) não confere poder estatístico suficiente para concluir sobre a contribuição deste antidepressivo na locomoção dos animais. Além disso, esses dados foram extraídos de apenas duas publicações, que apresentaram diferentes esquemas de tratamento e protocolos de estresse. Assim como observado com a fluoxetina, o tamanho amostral de estudos que realizaram tratamento com citalopram também é baixo ($k = 6$) e, com isso, o efeito é inconclusivo.

Figura 20. Gráfico em floresta dos estudos que avaliaram a locomoção em moscas adultas



Legenda: efeitos observados para cada estudo individual (quadrados cinzas), seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o CES (losango azul). Estudos localizados à esquerda da linha vertical (ausência de efeito), indicam diminuição do comportamento, e estudos localizados à direita da linha indicam aumento do comportamento. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges g. # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas, ## indicam os estudos realizados em fêmeas. Dados divididos em subgrupos baseados no fármaco administrado: fluoxetina (FLX) ou citalopram.

Além dos desfechos comportamentais, os desfechos secundários também foram avaliados na revisão sistemática. Estes foram observados em apenas duas publicações incluídas nesta revisão, e somaram oito estudos. Os desfechos observados foram o peso dos animais ($k = 4$), e os níveis de serotonina (5-HT) ($k = 2$) e de dopamina (DA) ($k = 2$) no cérebro de moscas machos controle ou tratadas com fluoxetina 10 μM por 10 dias, estressadas ou não (Tabela 1). Os dados obtidos nesta revisão indicam que, independentemente das condições de estresse, o tratamento com fluoxetina aumenta tanto os níveis de 5-HT (animais estressados $g = 2,08$ [1,34; 2,91], animais não estressados $g = 3,75$ [3,00; 4,88]), quanto de DA (animais estressados $g = 5,46$ [4,18; 6,95], animais não estressados $g = 0,33$ [-0,30; 0,97]) (ARAÚJO *et al.*, 2018). Apesar de apresentarem tamanhos de efeito positivos, estas são informações inconclusivas, visto que são provenientes de apenas dois estudos para cada desfecho. Por fim, os dados obtidos também indicam um aumento do peso corporal em animais tratados com fluoxetina, independente da condição de estresse (animais estressados $g = 0,51$ [-0,11; 1,16], animais não estressados $g = 2,80$ [1,96; 3,75]) (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Tabela 1. Desfechos secundários avaliados na revisão sistemática

Autor, ano	Experimental			Controle			g	95 CI	Desfecho
	N	Média	SD	N	Média	SD			
Araujo <i>et al.</i> , 2018	20	5,93	0,21	20	5,03	0,25	3,75	[2,77;4,88]	Níveis de 5-HT
Araujo <i>et al.</i> , 2018	20	4,68	0,30	20	4,00	0,33	-1,71	[-4,41; 0,13]	Níveis de 5-HT #
Araujo <i>et al.</i> , 2018	20	15,81	0,46	20	16,01	0,7	0,33	[-0,30; 0,97]	Níveis de DA
Araujo <i>et al.</i> , 2018	20	12,93	1,07	20	8,16	0,56	2,08	[1,34; 2,91]	Níveis de DA #
Araujo <i>et al.</i> , 2018	8	0,003	0,0007	8	0,002	0,0005	2,7	[1,96; 3,75]	Peso corporal
Araujo <i>et al.</i> , 2018	8	0,003	0,0004	8	0,003	0,0005	0,51	[-0,11; 1,16]	Peso corporal #
Araujo <i>et al.</i> , 2020	3	0,006	0,0002	3	0,007	0,0005	-1,71	[-4,41; 0,13]	Peso corporal
Araujo <i>et al.</i> , 2020	3	0,005	0,0002	3	0,005	0,0004	-1,03	[-3,28; 0,70]	Peso corporal #

Legenda: # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges g. Todos os estudos realizaram tratamento com fluoxetina 10 μ M por 10 dias.

6.2 Dados obtidos nos experimentos *in vivo*

6.2.1 Experimento piloto 1 - Padronização do estresse de privação alimentar

Este protocolo teve por objetivo avaliar qual o melhor método para realizar a privação alimentar, e qual a taxa de sobrevivência após duas etapas de privação alimentar de 58h. Na primeira bateria de testes, 19 moscas foram divididas em quatro tubos com ágar 1% (n = 4-5/tubo), 20 moscas divididas em três tubos com papel filtro embebido em água (n = 5/tubo), e 17 moscas divididas em quatro tubos com solução de sacarose 5% (n = 2-5/tubo). Após 58h, dois animais de tubos contendo papel filtro embebido em água estava mortos. Os animais foram então transferidos para tubos contendo meio de milho, onde permaneceram por 58h. Em seguida, retornaram para tubos com as mesmas condições, para mais 58h de privação alimentar.

Após a segunda etapa de privação alimentar, 11 moscas acondicionadas em tubos contendo ágar 1%, e 17 moscas acondicionadas em tubos com papel filtro embebido em água estavam mortos. Dentre as moscas acondicionadas em tubos contendo solução de sacarose nenhuma morte foi contabilizada (Tabela 2). Entretanto, por considerarmos que a solução de sacarose não consiste em uma privação total de alimento, optamos por diminuir o tempo de privação alimentar nos experimentos posteriores, e privá-las de alimento em tubos contendo solução de ágar 1%, por este ser o segundo método com menor taxa de mortalidade.

Tabela 2. Taxa de mortalidade no experimento piloto 1

Grupo	1ª exposição (58h)	2ª exposição (58h)
	Nº de mortes	Nº de mortes
Ágar	0	11
Papel filtro com água	2	17
Papel filtro com sacarose	0	0

6.2.2 Experimento piloto 2 - Protocolo de estresse crônico leve de 10 dias

Neste piloto, as moscas foram submetidas a um protocolo de estresse crônico de 10 dias, com quatro fatores de estresse: privação alimentar, inversão de ciclo, calor e frio. Para os grupos estressados, foram utilizadas 170 moscas, de ambos os sexos, separadas em 17 tubos (n = 10 moscas/tubo).

Durante a realização deste piloto foi observada alta taxa de mortalidade. Do quarto ao oitavo dia de protocolo foram perdidos 16 tubos. No nono dia de protocolo havia apenas uma mosca viva.

Considerando que o protocolo continha fatores de estresse sobrepostos, e que este fator poderia estar influenciando a taxa de mortalidade, optou-se por modificar o protocolo de estresse crônico. Além disso, tendo em vista que a taxa de mortalidade era um fator importante a ser observado, nos demais experimentos foi contabilizada a quantidade de animais mortos em cada tubo, e não apenas a quantidade de tubos perdidos durante o protocolo. Além disso, observou-se que ao realizar o estresse de frio utilizando um isopor com gelo (banho frio), não era possível manter a temperatura desejada de -5°C durante todo o período de estresse. Assim, novas adaptações foram realizadas no protocolo, descritas no item 6.1.5.

6.2.3 Experimento piloto 3 - Padronização do protocolo de estresse crônico leve de 9 dias

Neste piloto foi realizado um protocolo de estresse crônico de 9 dias, com as modificações necessárias observadas no protocolo de 10 dias. Para isso, os animais foram submetidos a quatro fatores de estresse, incluindo privação alimentar, inversão de ciclo, estresse de calor e de frio, sempre de forma individual, ou seja, sem sobreposição dos fatores de estresse. Ao final deste piloto foi observada uma alta taxa de mortalidade, principalmente quando as moscas eram expostas ao estresse de calor (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de mortalidade no experimento piloto 3

Grupo	C	E
Nº inicial de moscas	136	115
Dia	Nº de mortes	Nº de mortes
1	1	1
2	3	79
3	0	0
4	0	1
5	6	7
6	12	3
7	5	7
*8	5	0
Total de mortes	27	98

Legenda: C = controle; E = estresse. *interrupção do teste devido à falta de animais vivos.

6.2.4 Experimento piloto 4 - Padronização do protocolo de estresse de calor

Devido a alta mortalidade observada nos pilotos anteriores, principalmente quando expostos ao estresse de calor, realizou-se um piloto com o intuito de modificar a temperatura deste estressor. Para isso, foram realizados dois pilotos para temperatura de 30°C, e três pilotos para a temperatura de 33°C. Os animais permaneceram 4h no banho quente, e a cada hora foram contabilizadas as mortes em cada tubo.

Na primeira exposição ao banho quente de 30°C havia 240 animais, divididos em 24 tubos (10/tubo). Neste protocolo, foi contabilizada apenas 1 morte após 4h de estresse. Na segunda exposição, o protocolo foi iniciado com 232 moscas, divididas em 24 tubos ($\pm 6-10$ /tubo), foram contabilizadas 4 mortes pelo calor. Além disso, dois tubos inteiros ($n = 20$ moscas) foram perdidos devido a problemas durante a experimentação.

Na primeira exposição ao banho quente de 33°C havia, inicialmente, 122 animais, divididos em 14 tubos ($n = 5-10$ /tubo). Foram contabilizadas ao total 10 mortes, sendo estas nas primeiras 2h de teste. Além disso, um tubo inteiro foi perdido devido a problemas na experimentação ($n = 10$). Na segunda bateria, havia, inicialmente, 170 animais, divididos em 18 tubos ($n = 8-10$ /tubo). Dentre estes, foi contabilizada apenas uma morte em 4h de protocolo. Na terceira bateria, havia, inicialmente, 143 animais, divididos em 16 tubos ($n = 7-10$ /tubo), e nenhuma morte foi observada em 4h.

Tendo em vista a baixa taxa de mortalidade observada a 33°C, e por ser a temperatura mais próxima da observada no protocolo descrito na literatura (ARAÚJO *et al.* 2018;2020), optou-se por esta temperatura para realizar o estresse de calor de 4h no protocolo de estresse crônico subsequente.

6.2.5 Experimento 1 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 9 dias

Neste experimento foi realizado um protocolo de estresse crônico leve de 9 dias, baseado no experimento piloto 3. Entretanto, foram realizadas as modificações necessárias relacionadas a temperatura dos estresses de calor e ao tempo de exposição ao estresse de frio. Ao final deste experimento foi observada uma taxa de mortalidade reduzida em relação aos pilotos anteriores (Tabela 4). Estabeleceu-se assim o protocolo de estresse crônico leve para os experimentos seguintes.

Tabela 4. Taxa de mortalidade no experimento 1

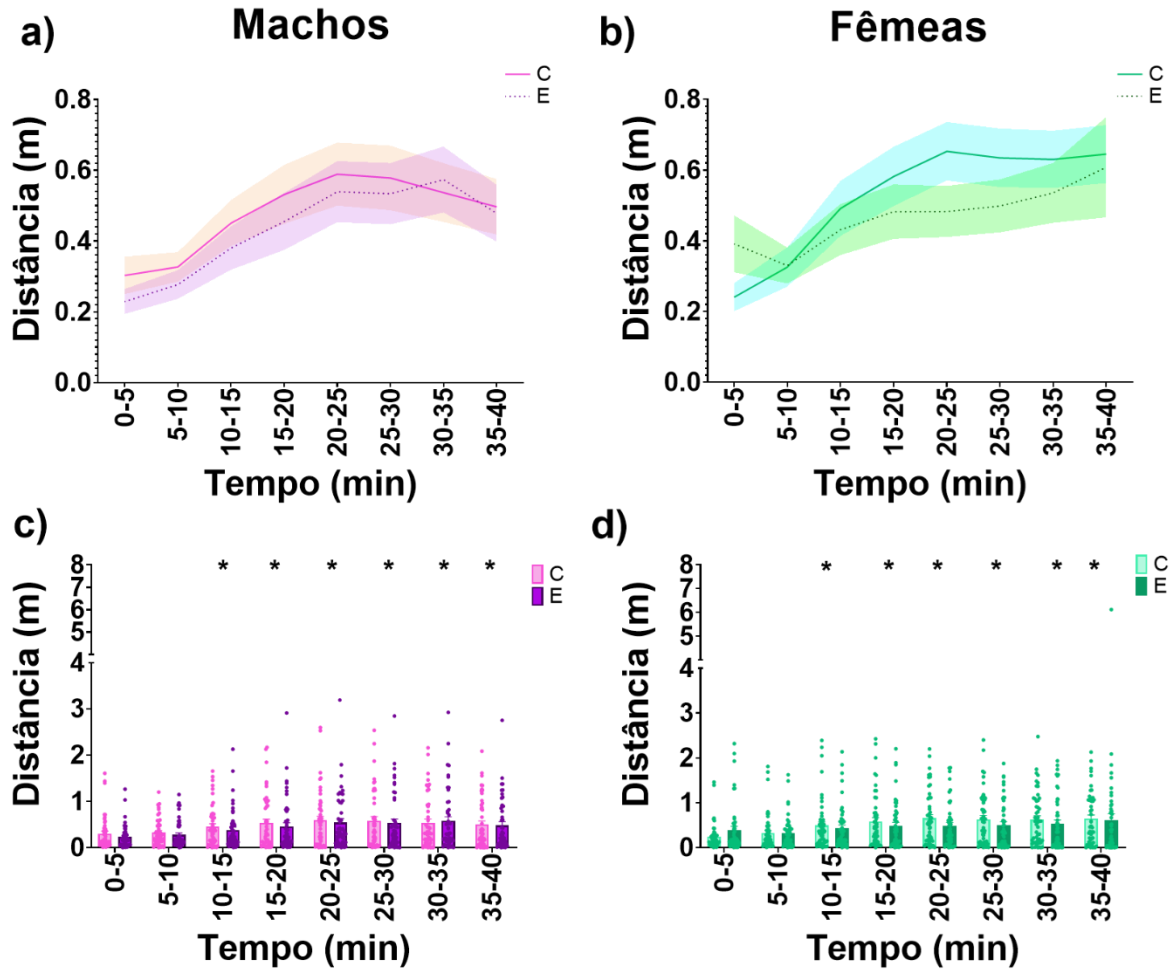
Grupo	C	E
	(M e F)	(M e F)
Nº inicial de moscas	234	269
Dia	Nº de mortes	Nº de mortes
1	2	4
2	0	16
3	9	6
4	5	9
5	5	23
6	7	1
7	0	2
8	0	11
9	4	1
*10	2	2
Total de mortes	34	71

Legenda: C = controle; E = estresse; M = machos; F= fêmeas. * Dia do teste comportamental.

Ao final do protocolo de estresse de 9 dias foi realizado o teste comportamental no labirinto com raias. O índice de preferência por sacarose e a locomoção foram analisados.

Em relação à locomoção, não houve diferença entre os grupos, tanto em relação ao sexo (ANOVA com medidas repetidas: $F(1, 192) = 0,484$, $p = 0,48$, tamanho de efeito = 0,002), quanto em relação a condição experimental (ANOVA com medidas repetidas: $F(1, 192) = 0,639$, $p = 0,424$, tamanho de efeito = 0,003). Entretanto, pode-se observar uma diferença no fator tempo do teste, ou seja, houve diferença na locomoção ao longo do teste (ANOVA com medidas repetidas: $F(7, 1344) = 21,48$, $p = 0,0001$, tamanho de efeito = 0,1). Pode-se observar aumento da locomoção entre os períodos 0-5 min quando comparado aos períodos 10-15 min a 35-40 min (Figura 21). Apesar da diferença observada, o tamanho de efeito obtido é considerado muito pequeno.

Figura 21. Efeitos do estresse crônico leve de 9 dias na locomoção



Legenda: figuras a, c = machos, figuras b, d = fêmeas. C = controle, E = estresse. Machos controle n = 48, machos estresse crônico n = 49, fêmeas controle n = 51, fêmeas estresse crônico n = 48. Média±EPM. ANOVA com medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$ comparado ao período 0-5 min.

Os dados obtidos nos testes de ANOVA com medidas repetidas, e as comparações realizadas no teste *post-hoc* para a locomoção podem ser observados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção – experimento

1

	df	F	p	η^2p
Sexo	1,192	0,4847	0,487154	0,487154
Condição experimental (controle ou estressado)	1,192	0,6396	0,424830	0,424830
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	1,192	0,0095	0,922381	0,922381
Tempo	7, 1344	21,4820	0,000000	0,000000
Interação entre os fatores "sexo" e tempo	7, 1344	0,7139	0,660286	0,660286
Interação entre os fatores "condição experimental" e "tempo"	7, 1344	0,9398	0,474448	0,474448
Interação entre os fatores "condição experimental", "sexo" e "tempo"	7, 1344	1,3423	0,226459	0,226459

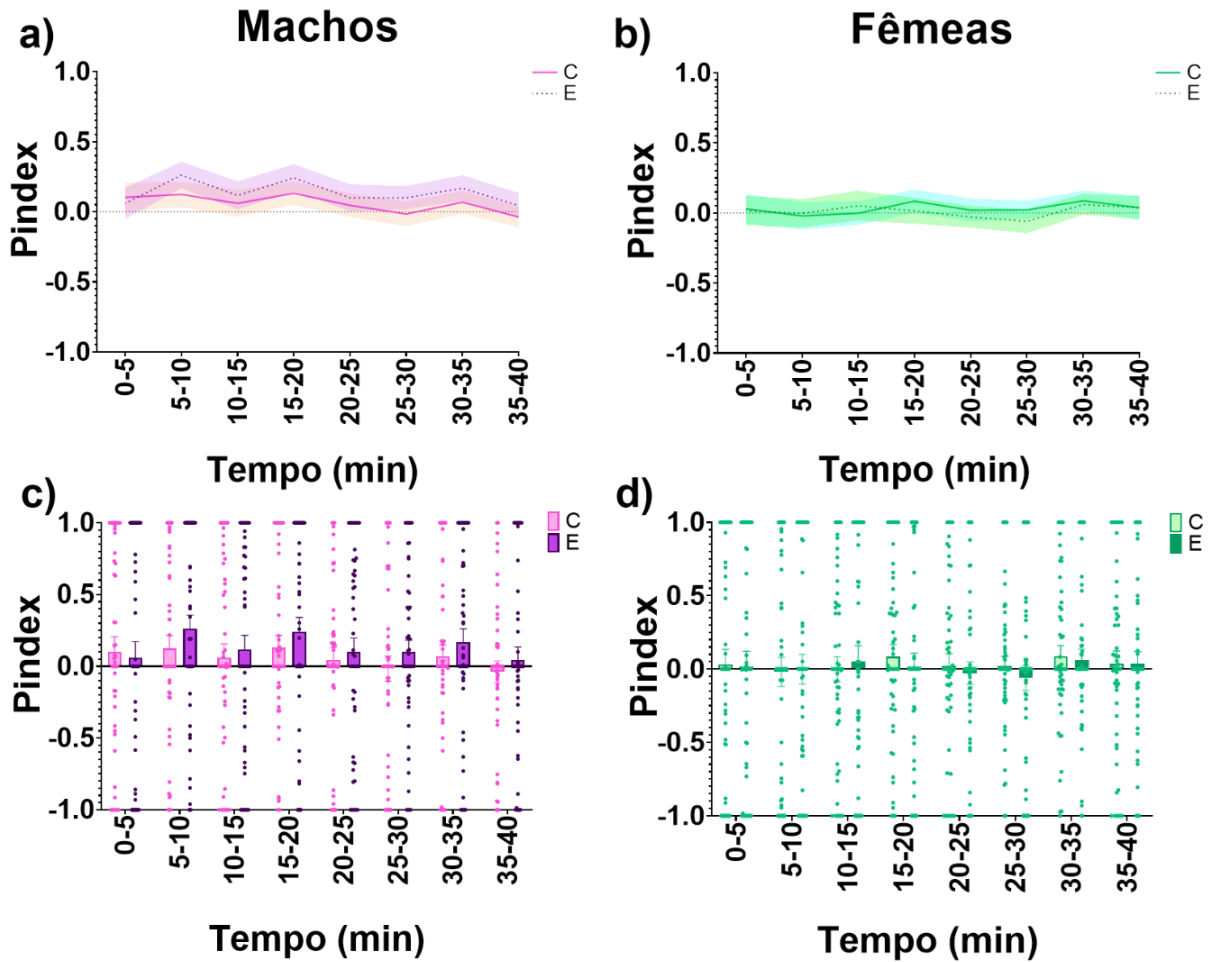
Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

Tabela 6. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a locomoção – experimento 1

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tempo	0-5 min e 10-15 min	0,000632
	0-5 min e 15-20 min	0,000032
	0-5 min e 20-25 min	0,000032
	0-5 min e 25-30 min	0,000032
	0-5 min e 30-35 min	0,000032
	0-5 min e 35-40 min	0,000032

A análise estatística demonstrou que, para a preferência por sacarose, não há efeito do sexo (ANOVA com medidas repetidas: $F(1, 192) = 1,52$, $p = 0,22$, tamanho de efeito = 0,007), da condição experimental (ANOVA com medidas repetidas: $F(1, 192) = 0,20$, $p = 0,65$, tamanho de efeito = 0,001), e do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas: $F(7, 1344) = 1,18$, $p = 0,30$, tamanho de efeito = 0,006). Ainda, pode-se observar que, diferentemente da locomoção, na preferência por sacarose há uma grande variabilidade entre os animais de um mesmo grupo (Figura 22).

Figura 22. Efeitos do estresse crônico leve de 9 dias no índice de preferência por sacarose



Legenda: figuras a, c = machos, figuras b, d = fêmeas. C = controle, E = estresse. Pindex = índice de preferência por sacarose. Machos controle n = 48, machos estresse crônico n = 49, fêmeas controle n = 51, fêmeas estresse crônico n = 48. Média±EPM. ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$.

Ainda, os dados obtidos no teste de ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose podem ser observados nas Tabela 7.

Tabela 7. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 1

	d,f	F	p	η^2p
Sexo	1,192	1,520658	0,219028	0,007858
Condição experimental (controle ou estressado)	1,192	0,200812	0,654571	0,001045
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	1,192	0,626284	0,429698	0,003251
Tempo	7, 1344	1,181995	0,309898	0,006119
Interação entre os fatores "sexo" e tempo	7, 1344	0,973814	0,448702	0,005046
Interação entre os fatores "condição experimental" e "tempo"	7, 1344	0,216146	0,981786	0,001124
Interação entre os fatores "condição experimental", "sexo" e "tempo"	7, 1344	0,312787	0,948467	0,001626

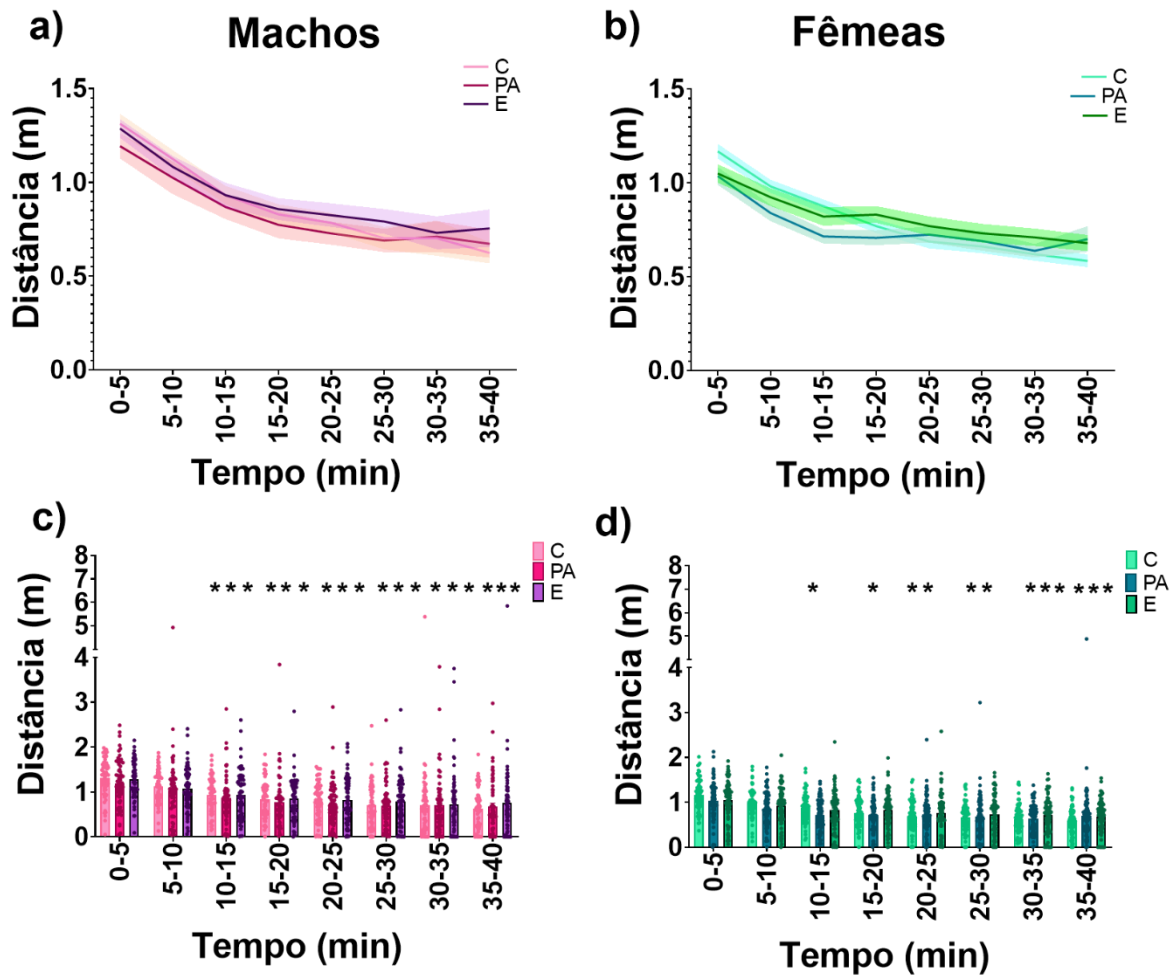
Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

6.2.6 Experimento 2 – Respostas comportamentais após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias

Neste experimento, os animais foram submetidos a um protocolo de estresse de 3 dias e, em seguida, foram realizados os testes comportamentais no labirinto com raias (individual) e no campo aberto (grupo). O índice de preferência por sacarose e a locomoção foram analisados.

Em relação a locomoção, pode-se observar efeito do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(1, 409) = 5,86$, $p = 0,01$, tamanho de efeito = 0,014), e do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 2863) = 121,12$, $p < 0,0001$, tamanho de efeito = 0,228). A análise de *post-hoc* demonstrou que, independentemente da condição experimental, há diminuição da locomoção no final do teste quando comparado aos primeiros 5 min. Apesar das diferenças observadas, os tamanhos de efeito obtidos são considerados muito pequeno e pequeno, respectivamente. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à condição experimental (ANOVA com medidas repetidas $F(2, 409) = 0,80$, $p = 0,44$, tamanho de efeito = 0,003). Por fim, pode-se observar interação entre os fatores tempo e sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 2863) = 3,35$, $p = 0,001$, tamanho de efeito = 0,081), e entre os fatores sexo, condição experimental e tempo (ANOVA com medidas repetidas $F(14, 2863) = 2,156$, $p = 0,007$, tamanho de efeito = 0,01). Os tamanhos de efeito obtidos nas interações entre os fatores são considerados muito pequenos (Figura 23).

Figura 23. Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção



Legenda: figuras a,c= machos, figuras b, d = fêmeas. C= controle, PA= privado de alimento, E = estresse crônico + privados de alimento. Machos controle n = 63, machos privados de alimento n = 64, machos estresse crônico + privados de alimento n = 66, fêmeas controle n = 73, fêmeas privadas de alimento n = 76, fêmeas estresse crônico+ privados de alimento n = 73. Média±EPM. ANOVA com medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$ comparado ao período 0-5 min. Diferenças entre machos e fêmeas foram observadas independente da condição experimental e do tempo do teste.

Os dados obtidos nos testes de ANOVA com medidas repetidas, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção – experimento

2

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,409	5,862	0,015905	0,014130
Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2, 409	0,804	0,448434	0,003914
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	2, 409	0,445	0,641427	0,002169
Tempo	7,2863	121,127	0,000000	0,228486
Interação entre os fatores "sexo" e tempo	7,2863	3,356	0,001442	0,008139
Interação entre os fatores "condição experimental" e "tempo"	14,2863	0,759	0,714777	0,003698
Interação entre os fatores "condição experimental", "sexo" e "tempo"	14,2863	2,156	0,007431	0,010431

Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

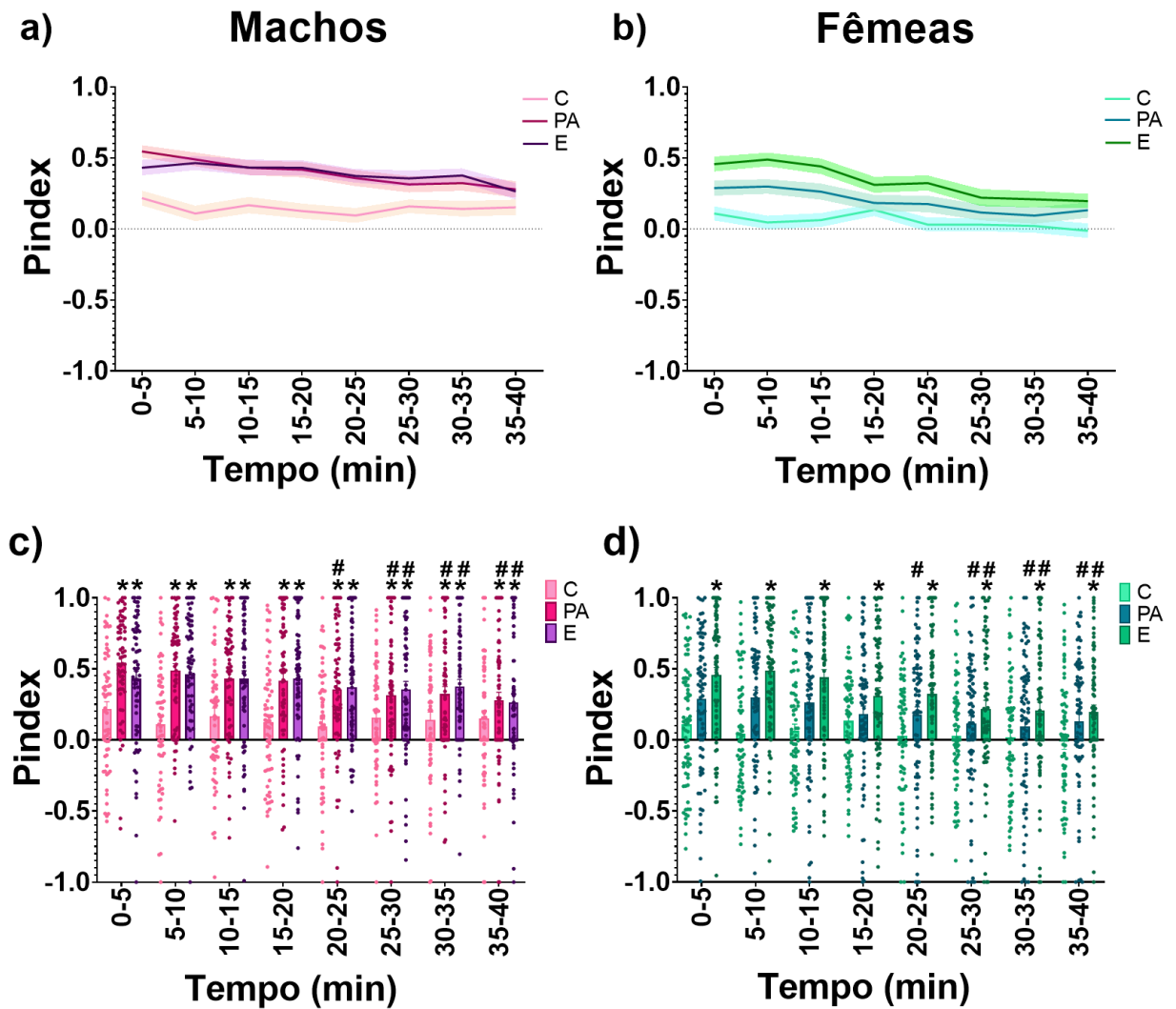
Tabela 9. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a locomoção – experimento 2

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tempo	0-5 min e 10-15 min	0,00032
	0-5 min e 15-20 min	0,00032
	0-5 min e 20-25 min	0,00032
	0-5 min e 25-30 min	0,00032
	0-5 min e 30-35 min	0,00032
	0-5 min e 35-40 min	0,00032
	Tempo e sexo	Machos
0-5 min e 10-15 min		0,000029
0-5 min e 15-20 min		0,000029
0-5 min e 20-25 min		0,000029
0-5 min e 25-30 min		0,000029
0-5 min e 30-35 min		0,000029
0-5 min e 35-40 min		0,000029
Fêmeas		
0-5 min e 10-15 min		0,000029
0-5 min e 15-20 min		0,000029
0-5 min e 20-25 min		0,000029
0-5 min e 25-30 min		0,000029
0-5 min e 30-35 min		0,000029

	0-5 min e 35-40 min	0,000029
Tempo, sexo e condição experimental	Machos estresse	
	0-5 min e 10-15 min	0,000050
	0-5 min e 15-20 min	0,000050
	0-5 min e 20-25 min	0,000050
	0-5 min e 25-30 min	0,000050
	0-5 min e 30-35 min	0,000050
	0-5 min e 35-40 min	0,000050
	Machos privados de alimento	
	0-5 min e 10-15 min	0,000050
	0-5 min e 15-20 min	0,000050
	0-5 min e 20-25 min	0,000050
	0-5 min e 25-30 min	0,000050
	0-5 min e 30-35 min	0,000050
	0-5 min e 35-40 min	0,000050
	Machos controle	
	0-5 min e 10-15 min	0,000066
	0-5 min e 15-20 min	0,000050
	0-5 min e 20-25 min	0,000050
	0-5 min e 25-30 min	0,000050
	0-5 min e 30-35 min	0,000050
	0-5 min e 35-40 min	0,000050
	Fêmeas estresse	
	0-5 min e 30-35 min	0,044347
	0-5 min e 35-40 min	0,004413
	Fêmeas privados de alimento	
		0,000051
	0-5 min e 10-15 min	0,000050
	0-5 min e 15-20 min	0,000052
	0-5 min e 20-25 min	0,000050
	0-5 min e 25-30 min	0,000050
0-5 min e 30-35 min	0,000050	
0-5 min e 35-40 min		
Fêmeas controle		
0-5 min e 20-25 min	0,000087	
0-5 min e 25-30 min	0,000052	
0-5 min e 30-35 min	0,000050	
0-5 min e 35-40 min	0,000050	

Em relação ao índice de preferência por sacarose, foi observado efeito do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F_{(1, 409)} = 11,491$, $p = 0,0007$, tamanho de efeito = 0,027) e da condição experimental (ANOVA com medidas repetidas $F_{(2, 409)} = 20,061$, $p < 0,0001$, tamanho de efeito = 0,09), com diferença entre os machos controle e estressados ou privados de alimento, e entre fêmeas controle e estressadas. Também foi observado efeito do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F_{(7, 2863)} = 20,756$, $p < 0,0001$, tamanho de efeito = 0,05), e interação entre os fatores condição experimental e tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F_{(14, 2863)} = 3,223$, $p < 0,0001$, tamanho de efeito = 0,01). Apesar das diferenças observadas, os tamanhos de efeito são considerados muito pequenos. Além disso, novamente foi observada uma grande variabilidade entre animais do mesmo grupo para este desfecho (Figura 24). Os dados obtidos nos testes de ANOVA com medidas repetidas, bem como as comparações realizadas no teste de *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 10 e 11.

Figura 24. Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose



Legenda: figuras a,c= machos, figuras b, d = fêmeas. C= controle, PA= privado de alimento, E = estresse crônico + privados de alimento. Machos controle n = 63, machos privados de alimento n = 64, machos estresse crônico + privados de alimento n = 66, fêmeas controle n = 73, fêmeas privadas de alimento n = 76, fêmeas estresse crônico + privadas de alimento n = 73. Média±EPM. ANOVA com medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$ comparado aos animais controle # = $p < 0,05$ comparado aos períodos 0-5 min do mesmo grupo.

Tabela 10. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 2

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,409	11,4908	0,000767	0,027327
Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2, 409	20,0612	0,000000	0,089335
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	2, 409	1,4816	0,228484	0,007193
Tempo	7,2863	20,7568	0,000000	0,048299
Interação entre os fatores "sexo" e tempo	7,2863	1,3400	0,227002	0,003265
Interação entre os fatores "condição experimental" e "tempo"	14,2863	3,2238	0,000043	0,015520
Interação entre os fatores "condição experimental", "sexo" e "tempo"	14,2863	1,4470	0,123107	0,007026

Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

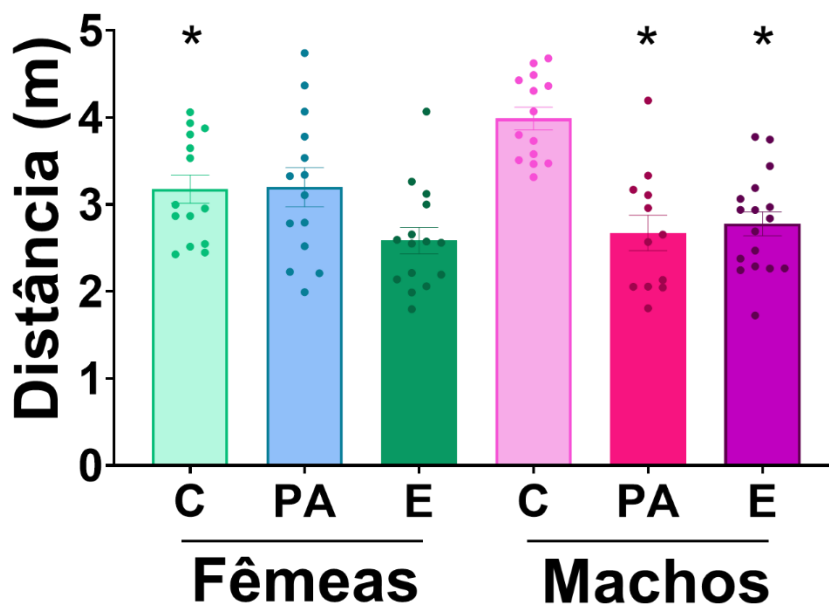
Tabela 11. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a preferência por sacarose – experimento 2

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Condição experimental	Controle e Privado de alimento Controle e Estresse crônico	0,000046 0,000022
Tempo	0-5 min e 10-15 min 0-5 min e 15-20 min 0-5 min e 20-25 min 0-5 min e 25-30 min 0-5 min e 30-35 min 0-5 min e 35-40 min	0,000632 0,000032 0,000032 0,000032 0,000032 0,000032
Tempo e condição experimental	Estresse crônico 0-5 min e 25-30 min 0-5 min e 30-35 min 0-5 min e 35-40 min	0,000697 0,001132 0,000018

	Privação alimentar	
	0-5 min e 20-25 min	0,003389
	0-5 min e 25-30 min	0,000018
	0-5 min e 30-35 min	0,000018
	0-5 min e 35-40 min	0,000018

No teste realizado no campo aberto, em grupos, pode-se observar um efeito da condição experimental na locomoção (ANOVA de 2 vias $F(2,80) = 16,512$, $p = 0,0001$, tamanho de efeito = 0,29), e uma interação entre os fatores condição experimental e sexo (ANOVA de 2 vias $F(2,80) = 6,803$, $p = 0,001$, tamanho de efeito = 0,14). Machos privados de alimento e machos estressados se locomovem por uma distância menor quando comparados aos machos controle. Além disso, as fêmeas controle se locomovem por uma distância menor que os machos controle. Entre as fêmeas, não foi observado efeito do estresse crônico leve de 3 dias (Figura 25). Os dados obtidos nos testes de ANOVA de 2 vias, bem como as comparações realizadas no teste de *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 12 e 13.

Figura 25. Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção no teste em grupo



Legenda. C = controle, PA = privados de alimento, E = estressados + privados de alimento. Machos controle $n = 14$, machos privados de alimento $n = 12$, machos estresse crônico + privados de alimento $n = 17$, fêmeas controle $n = 14$, fêmeas privadas de alimento $n = 14$, fêmeas estresse crônico + privadas de alimento $n = 15$. Média \pm EPM. ANOVA de 2 vias seguido de *post-hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$ comparado aos machos controle.

Tabela 12. Dados obtidos na ANOVA de 2 vias para a locomoção em grupos – experimento 2

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,80	0,914	0,341907	0,011297
Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2, 80	16,512	0,000001	0,292187
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	2, 80	6,803	0,001868	0,145354

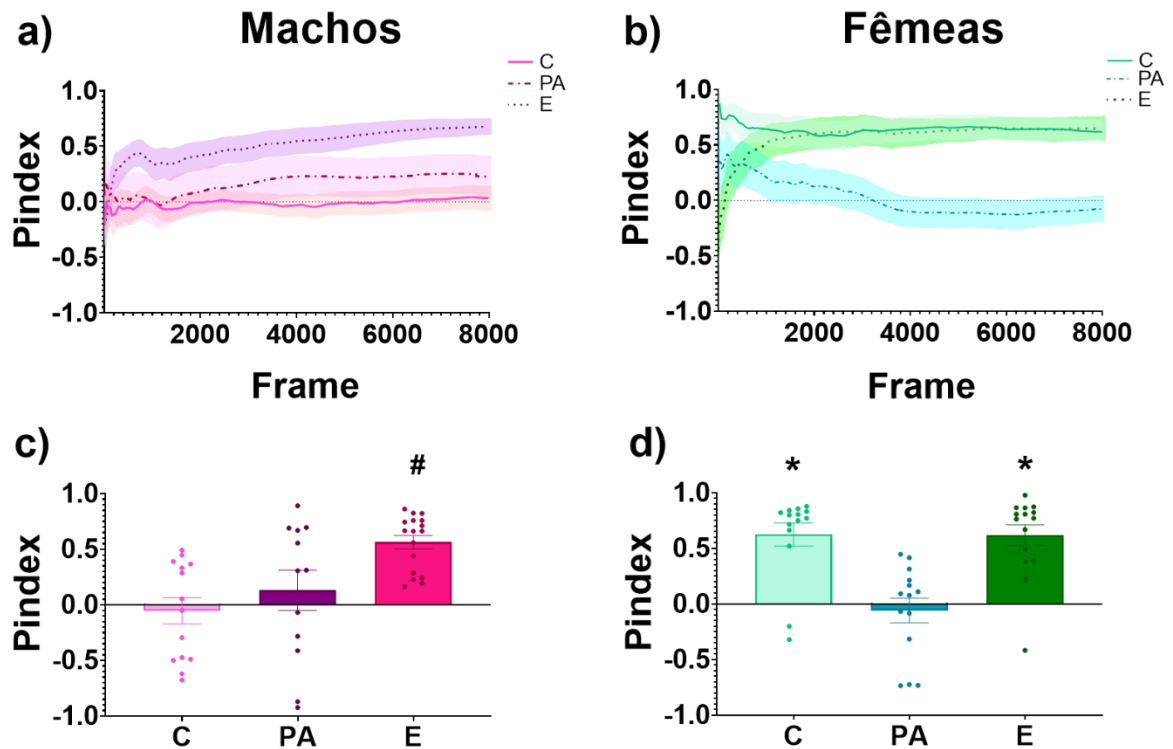
Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

Tabela 13. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a locomoção em grupos – experimento 2

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tratamento	Controle e Privado de alimento Controle e Estresse crônico	0,000046 0,000022
Sexo x Tratamento	Machos Controle e Fêmeas Controle Machos Controle e Machos Privado de alimento Machos controle e Machos Estresse crônico	0,021292 0,000145 0,000130

Em relação à preferência por sacarose, no teste em grupos, foi observado efeito do tratamento entre as fêmeas ($H(2, N = 43) = 18,07131$ $p = 0,0001$), e entre os machos ($H(2, N = 43) = 11,37860$ $p = 0,0034$). Fêmeas estressadas apresentaram o menor índice de preferência quando comparadas às fêmeas controle e às fêmeas estressadas. Entre os machos, os animais estressados apresentaram o maior índice de preferência quando comparado aos animais controle e aos privados de alimento (Figura 26). Os dados obtidos no teste de Kruskal-wallis, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 14 e 15.

Figura 26. Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose no teste em grupo



Legenda: figuras a,c = machos, figuras b, d = fêmeas. Pindex = índice de preferência por sacarose. C = controle, PA = privados de alimento, E = estressados + privados de alimento. Machos controle n = 14, machos privados de alimento n = 12, machos estresse crônico + privados de alimento n = 17, fêmeas controle n = 14, fêmeas privadas de alimento n = 14, fêmeas estresse crônico + privadas de alimento n = 15. Média±EPM. Teste de Kruskal-wallis seguido de *post-hoc* de múltiplas comparações entre os *rankings*. * = $p < 0,05$ comparado às fêmeas privadas de alimento. # $p < 0,05$ comparado aos machos controle.

Tabela 14. Dados obtidos no teste de Kruskal-wallis para a preferência por sacarose no teste em grupos – experimento 2

	d,f	H	p (alfa 0,05)
Fêmeas: Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2,43	17,29939	0,0002
Machos: Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2,43	11,37860	0,0034

Legenda: df: graus de liberdade

Tabela 15. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a preferência por sacarose no teste em grupos – experimento 2

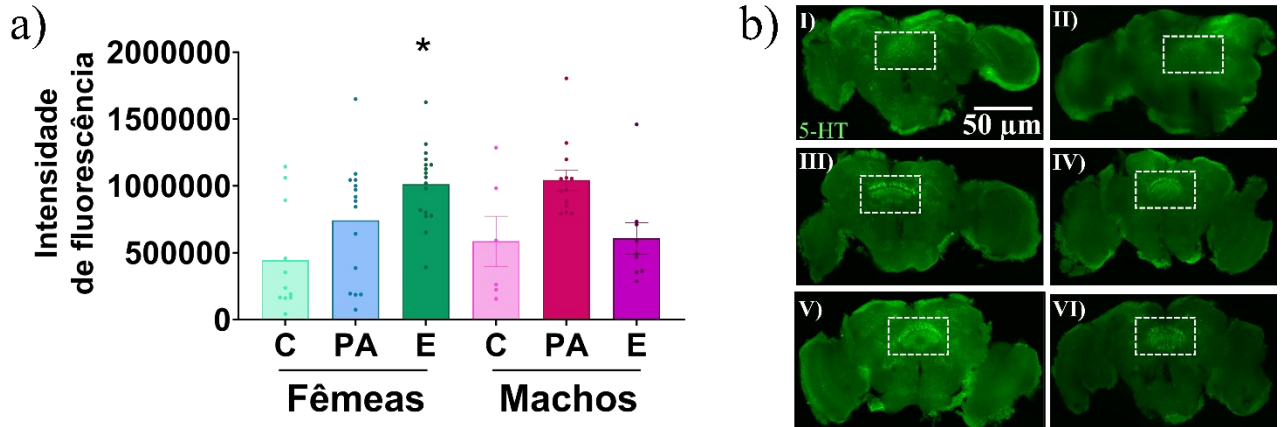
Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tratamento	Fêmeas	
	Privado de alimento e Controle	0,000860
	Privado de alimento e Estresse crônico	0,000523
	Machos	
	Controle e Estresse crônico	0,002533

6.2.7 Experimento 3 – Neurotransmissão serotoninérgica após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias

Um ensaio de imuno-histoquímica foi conduzido para avaliar as possíveis alterações ocasionadas pelo estresse crônico leve de 3 dias na quantidade de células serotonina (5-HT) positivas no “corpo em leque”, região do complexo central do cérebro das moscas (Figura 27).

Pode-se observar efeito da condição experimental (ANOVA 2 vias $F(2, 65) = 5,45$, $p = 0,006$, tamanho de efeito = 0,143775), e também da interação entre os fatores sexo e condição experimental (ANOVA 2 vias $F(2, 65) = 6,20$, $p = 0,003$, tamanho de efeito = 0,16). Fêmeas estressadas apresentam aumento de células 5-HT positivas quando comparadas aos seus controles. Em machos, os animais privados de alimento apresentam aumento de células 5-HT positivas quando comparados aos animais estressados (Figura 27). Os dados obtidos na ANOVA de 2 vias, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 16 e 17.

Figura 27. Efeitos do estresse crônico leve de 3 dias sob as células 5-HT positivas



Legenda: figura a) efeitos do estresse crônico leve de 3 dias sob as células 5-HT positivas. C = controle, PA = privados de alimento, E = estresse + privados de alimento. ANOVA de 2 vias seguido de *post-hoc* de Tukey, Dados representados em Média±EPM * = $p < 0,05$ comparado às fêmeas controle. b) Representação do cérebro de cada grupo experimental analisado por ensaio de imuno-histoquímica: I- fêmea controle (n = 11), II- macho controle (n = 6), III- fêmea privada de alimento (n = 15), IV - macho privado de alimento (n = 13), V - fêmea estresse + PA (n = 17), VI- macho estresse + PA (n = 9). O retângulo tracejado indica a região analisada (corpo em forma de leque). 5-HT = serotonina (verde fluorescente). Escala 50 µm. Fonte: De autoria própria.

Tabela 16. Dados obtidos na ANOVA de 2 vias para o experimento 3

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,65	0,0170	0,896678	0,000261
Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	2, 65	5,4573	0,006443	0,143775
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	2, 65	6,2013	0,003429	0,160235

Legenda: df: graus de liberdade

Tabela 17. Dados obtidos no teste de *post-hoc* para o experimento 3

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Condição experimental (controle, privado de alimento ou estressado)	Controle e Estresse crônico	0,002968
Interação entre os fatores "condição experimental" e "sexo"	Fêmeas Controle e Estresse crônico	0,002228

6.2.8 Experimento piloto 5 – Método de administração do fármaco

Neste experimento piloto, os animais receberam tratamento diário de 10 µL de fluoxetina na concentração de 30 µM, a fim de avaliar a sobrevivência dos animais e padronizar o método de administração do fármaco. Os dados de mortalidade dos grupos controle e tratados para ambos os sexos foram agrupados e podem ser observados na Tabela 18. Pode-se observar que a mortalidade entre os animais tratados foi mais alta após os períodos em que eram alocados em tubos contendo meio ágar (a fim de simular o período de privação alimentar aplicados no protocolo de estresse de 9 dias). Entretanto, após esse experimento concluímos que o tratamento com fluoxetina não era tóxico aos animais.

Tabela 18. Taxa de mortalidade no experimento piloto 5

Grupo	C	FLX 30 µM
Nº inicial de moscas	231	226
Dia	Nº de mortes	Nº de mortes
1	0	0
2	0	*0
3	0	2
4	0	1
5	0	*17
6	0	0
7	0	0
8	0	*17
9	1	0
Total	1	37

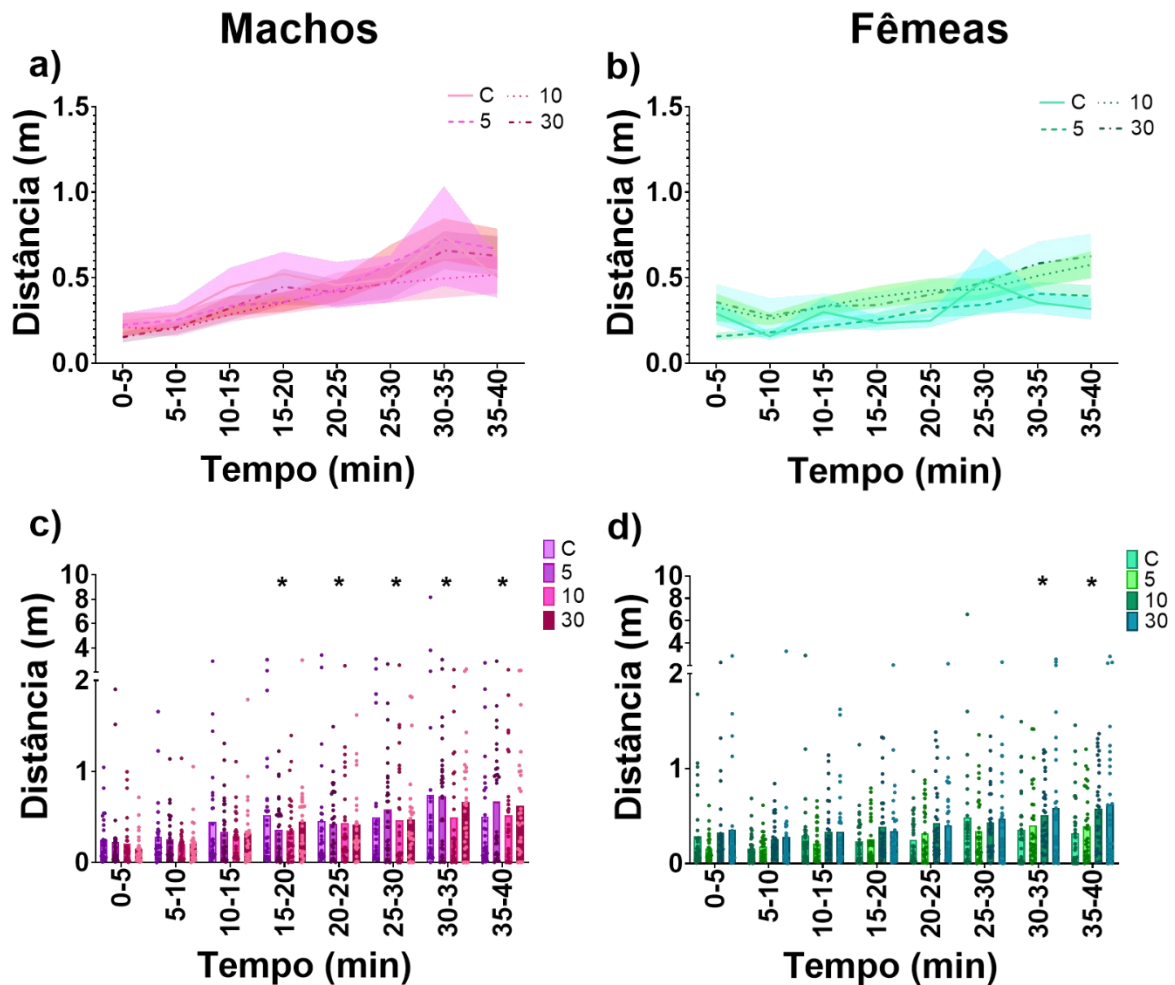
Legenda: C = controle. FLX = fluoxetina. *mantidas em meio ágar por 24h.

6.2.9 Experimento 4 – Respostas comportamentais após tratamento com fluoxetina por 9 dias

Neste experimento, machos e fêmeas foram tratados com veículo ou fluoxetina nas concentrações 5 µM, 10 µM e 30 µM durante 9 dias. Após esse período, os animais foram testados no labirinto com raias, e a preferência por sacarose e a locomoção foram avaliados. Em relação à locomoção, foi observado efeito do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 1694) = 20,485$, $p < 0,0001$, tamanho de efeito = 0,09) e uma interação dos fatores tempo e sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 1694) = 2,497$, $p = 0,015$, tamanho de efeito = 0,01). Pode-se observar que em machos, independentemente do tratamento, há aumento da locomoção entre os períodos 15 a 40 min de teste, quando comparados aos períodos 0 a 5 min. Em fêmeas, independentemente do tratamento, essa diferença entre os períodos iniciais e finais do teste é observada apenas após 25 min (Figura 28). Apesar das diferenças encontradas, os tamanhos de efeito obtidos nestas análises são considerados muito pequenos. Por fim, efeitos

do tratamento não foram observados neste desfecho (ANOVA com medidas repetidas $F(3, 242) = 2,324$, $p = 0,128$, tamanho de efeito = 0,003). Os dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 19 e 20.

Figura 28. Efeitos do tratamento com fluoxetina por 9 dias na locomoção



Legenda: figuras a,c = machos, figuras b, d = fêmeas. C = controle (tratamento com veículo), 5 = tratamento com fluoxetina 5 μM , 10 = tratamento com fluoxetina 10 μM , 30 = tratamento com fluoxetina 30 μM . Machos controle $n = 25$, machos 5 μM $n = 29$, machos 10 μM $n = 25$, machos 30 μM $n = 27$, fêmeas controle $n = 32$, fêmeas 5 μM $n = 29$, fêmeas 10 μM $n = 32$, fêmeas 30 μM $n = 28$. Média \pm EPM. ANOVA com medidas repetidas seguido de *post-hoc* Tukey. * = $p < 0,05$ comparado aos períodos 0-5 min, independente do tratamento.

Tabela 19. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção – experimento 4

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,242	2,3242	0,128684	0,009513
Tratamento (Veículo, FLX 5 μ M, FLX 10 μ M e FLX 30 μ M)	3,242	0,2359	0,871280	0,002916
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	3,242	1,4100	0,240445	0,017179
Tempo	7, 1694	20,4856	0,000000	0,095278
Interação entre os fatores "sexo" e "tempo"	7, 1694	2,4975	0,014887	0,010215
Interação entre os fatores "tratamento" e "tempo"	21, 1694	0,7487	0,784219	0,009196
Interação entre os fatores "tratamento ", "sexo" e "tempo"	21, 1694	0,5827	0,932314	0,007172

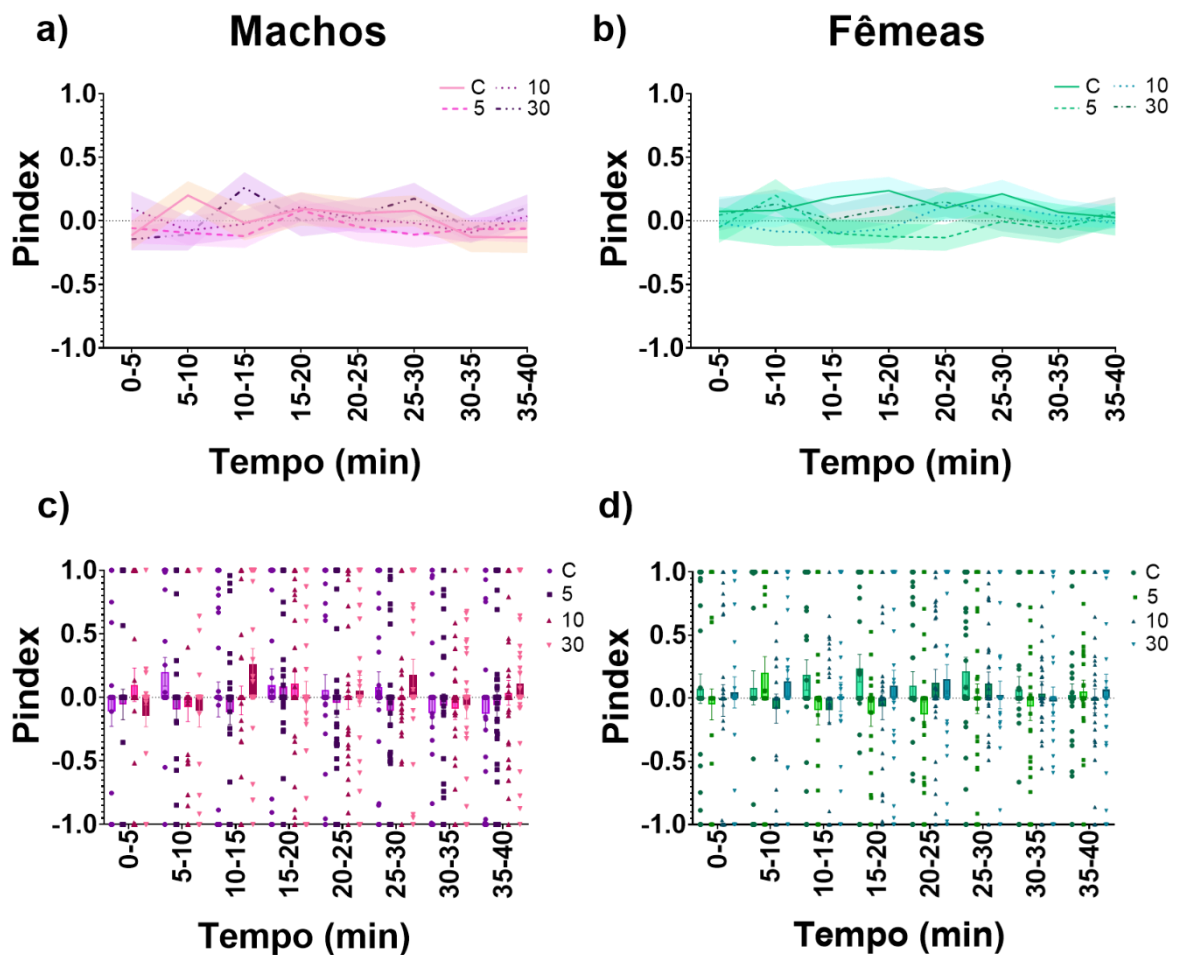
Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito). FLX = fluoxetina.

Tabela 20. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a locomoção – experimento 4

Fator ou interação (níveis)	Comparações planejadas	p (alfa 0,05)
Tempo	0-5 min e 15-20 min	0,029475
	0-5 min e 20-25 min	0,001431
	0-5 min e 25-30 min	0,000032
	0-5 min e 30-35 min	0,000032
	0-5 min e 35-40 min	0,000032
Sexo x Tempo	Fêmeas	
	0-5 min e 30-35 min	0,019066
	0-5 min e 35-40 min	0,006842
	Machos	
	0-5 min e 15-20 min	0,002946
	0-5 min e 20-25 min	0,001005
	0-5 min e 25-30 min	0,000030
0-5 min e 30-35 min	0,000029	
0-5 min e 35-40 min	0,000029	

Em relação a preferência por sacarose, não foi observado efeito do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(1, 242) = 0,620$, $p = 0,431$, tamanho de efeito = 0,002), e do tratamento (ANOVA com medidas repetidas $F(3, 242) = 0,803$, $p = 0,492$, tamanho de efeito = 0,009). Além disso, efeitos do fator tempo também não foram observados (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 1694) = 1,372$, $p = 0,212$, tamanho de efeito = 0,005) (Figura 29). Os dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas podem ser observados na tabela 21.

Figura 29. Efeitos do tratamento com fluoxetina por 9 dias no índice de preferência por sacarose



Legenda: figuras a,c = machos, figuras b, d = fêmeas. C= controle (tratamento com veículo), 5 = tratamento com fluoxetina 5 μM , 10 = tratamento com fluoxetina 10 μM , 30 = tratamento com fluoxetina 30 μM . Machos controle $n = 25$, machos 5 μM $n = 29$, machos 10 μM $n = 25$, machos 30 μM $n = 27$, fêmeas controle=32, fêmeas 5 μM $n = 29$, fêmeas 10 μM $n = 32$, fêmeas 30 μM $n = 28$. Média \pm EPM. ANOVA com medidas repetidas, $p < 0,05$.

Tabela 21. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose – experimento 4

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,242	0,620687	0,431563	0,002558
Tratamento (Veículo, FLX 5 μM, FLX 10 μM e FLX 30 μM)	3,242	0,803574	0,492939	0,009863
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	3,242	0,238395	0,869528	0,002947
Tempo	7, 1694	1,372505	0,212740	0,005640
Interação entre os fatores "sexo" e tempo	7, 1694	0,654713	0,710634	0,002698
Interação entre os fatores "condição experimental" e "tempo"	21, 1694	1,150124	0,287461	0,014057
Interação entre os fatores "condição experimental", "sexo" e "tempo"	21, 1694	1,470938	0,077352	0,017908

Legenda: FLX= fluoxetina. df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito).

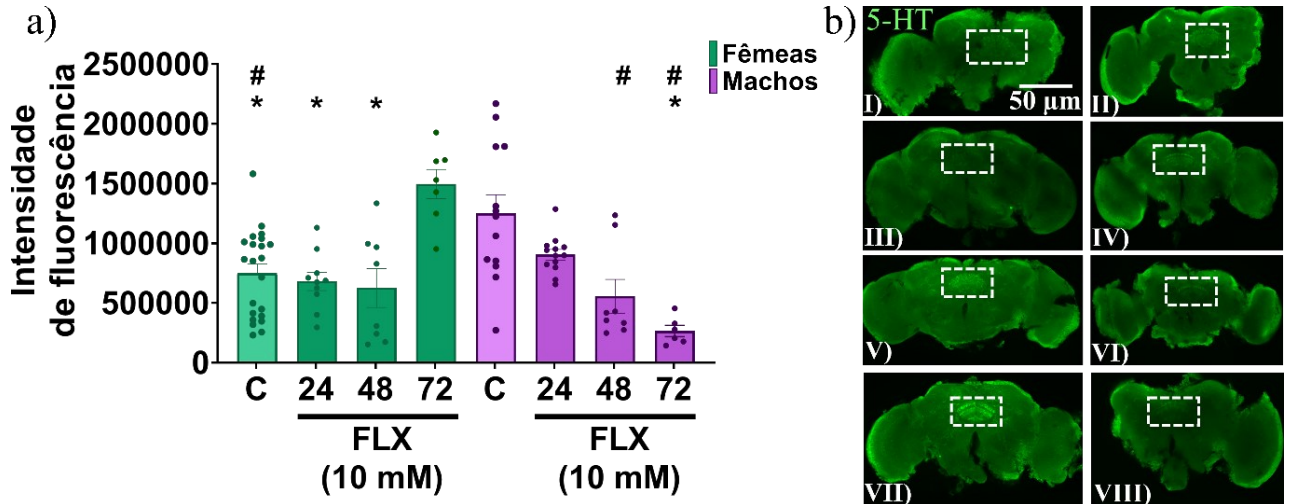
6.2.10 Experimento 5 – Neurotransmissão serotoninérgica após tratamento com fluoxetina

Este experimento teve como objetivo avaliar se o tratamento com fluoxetina alteraria a quantidade de células serotonina (5-HT) positivas no cérebro de machos e fêmeas. Para isso, os animais foram tratados com veículo ou com fluoxetina na concentração 10 mM durante 24h, 48h e 72h. Em seguida, um ensaio de imuno-histoquímica foi conduzido. Pode-se observar efeito do tratamento (ANOVA de 2 vias $F_{(3,76)} = 4,5409$, $p = 0,005$, tamanho de efeito = 0,151), e efeito da interação entre os fatores sexo e tratamento (ANOVA de 2 vias $F_{(3,76)} = 14,9590$, $p = 0,00$, tamanho de efeito = 0,371262).

Em fêmeas, pode-se observar um aumento na quantidade de células 5-HT positivas no grupo tratado com fluoxetina por 72h, quando comparados aos seus controles. Os demais períodos de tratamento não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle, mas sim em relação ao grupo tratado por 72h. Em machos, há uma diminuição de células 5-HT positivas em animais tratados com fluoxetina por 72h e 48h, quando comparados aos machos controle. Além disso, a análise estatística demonstrou que há diferenças entre os sexos em animais controle. Fêmeas controle apresentam quantidades menores de células 5-HT positivas quando comparadas aos machos. Entre os animais tratados com fluoxetina por 72h, machos apresentam uma quantidade menor de células 5-HT positivas quando comparados às fêmeas (Figura 30).

Os dados obtidos na ANOVA de 2 vias, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 22 e 23.

Figura 30. Efeitos do tratamento com fluoxetina por 24h, 48h e 72h nas células 5-HT positivas



Legenda: figura a) Efeito do tratamento com fluoxetina por 24h, 48h e 72h nas células 5-HT positivas C = controle (tratamento com veículo. FLX = fluoxetina. ANOVA de 2 vias seguido de *post-hoc* de Tukey, Dados representados em Média±EPM, * = $p < 0,05$ comparado às fêmeas FLX 72h, # = $p < 0,05$ comparado aos machos controle. Figura b) Representação do cérebro de cada grupo experimental analisado por ensaio de imuno-histoquímica: I – fêmea controle (n = 22), II – macho controle (n = 13), III – fêmea FLX 24h (n = 10), IV – macho FLX 24h (n = 13), V – fêmea FLX 48h (n = 8), VI – macho FLX 48h (n = 8), VII – fêmea FLX 72h (n = 7), VIII – macho FLX 72h (n = 6). O retângulo tracejado indica a região analisada (corpo em forma de leque). 5-HT = serotonina (verde fluorescente). Escala 50 μm. Fonte: De autoria própria.

Tabela 22. Dados obtidos na ANOVA de 2 vias para o experimento 5

	d,f	F	p (alfa 0,05)	η^2p
Sexo	1,76	2,7547	0,101091	0,034978
Tratamento (Veículo ou FLX 24h, FLX 48h, FLX 72h)	3,76	4,5409	0,005557	0,151999
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	3,76	14,9590	0,000000	0,371262

Legenda: df: graus de liberdade. FLX = fluoxetina.

Tabela 23. Dados obtidos no teste *post-hoc* para o experimento 5

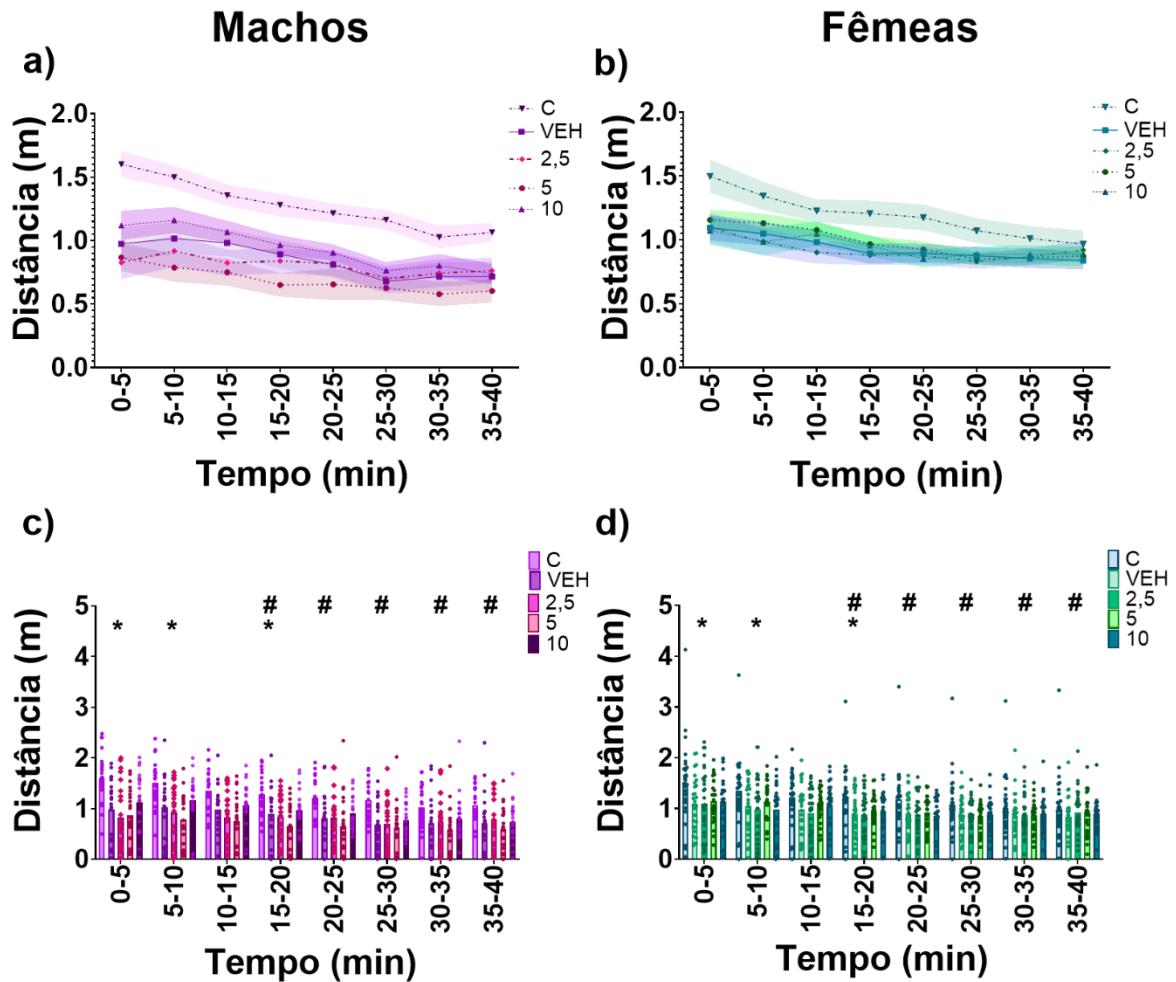
Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tratamento (Veículo, FLX 24h, FLX 48h, FLX 72h)	Controle e FLX 48h	0,019445
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	Machos	
	Controle e FLX 72h	0,001047
	Controle e FLX 48h	0,000291
	Fêmeas	
	FLX 72h e Controle	0,001137
	FLX 72h e FLX 24h	0,002235
	FLX 72h e FLX 48h	0,004613
	Machos e fêmeas controle	0,007288
	Machos e fêmeas 72h	0,000146

Legenda: FLX = fluoxetina.

6.2.11 Experimento 6 – Respostas comportamentais das moscas após protocolo de estresse crônico leve de 3 dias e tratamento com fluoxetina

Neste experimento, os animais foram divididos em grupos estressados por 3 dias e tratados com fluoxetina (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) ou veículo, e em um grupo não estressado e tratado com veículo. Após o protocolo, a locomoção e preferência por sacarose foram analisadas. Entre os animais estressados e tratados com fluoxetina ou veículo, pode-se observar um efeito do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(1,196) = 6,535$, $p = 0,01$, tamanho de efeito = 0,03), e do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F(7,1372) = 19,056$, $p = 0,000$, tamanho de efeito = 0,09). Apesar da diferença encontrada, os tamanhos de efeito obtidos são considerados muito pequenos. Efeitos do tratamento não foram observados (ANOVA com medidas repetidas $F(3,196) = 0,893$, $p = 0,44$, tamanho de efeito = 0,01). Entre os animais estressados e tratados com veículo e os animais não estressados e tratados com veículo pode-se observar efeito da condição experimental (ANOVA com medidas repetidas $F(1,102) = 16,246$, $p = 0,000$, tamanho de efeito = 0,13), do tempo (ANOVA com medidas repetidas $F(7,714) = 27,54$, $p > 0,000$, tamanho de efeito = 0,21), além de uma interação entre estes fatores (ANOVA com medidas repetidas $F(7,714) = 2,51$, $p > 0,01$, tamanho de efeito = 0,02) (Figura 31). Os dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas em animais estressados, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 24 e 25.

Figura 31. Efeitos do tratamento com fluoxetina e do estresse crônico leve de 3 dias na locomoção



Legenda: figuras a,c = machos, figuras b,d = fêmeas. C = controle (não estressados e tratados com veículo), VEH = estressados e tratados com veículo, 2,5= estressados e tratados com fluoxetina (FLX) 2,5 mM, 5 = estressados e tratados com FLX 5 mM, 10 = estressados e tratados com FLX 10 mM. Machos controle n = 23, machos estressados n = 22, machos FLX 2,5 mM n= 23, machos FLX 5 mM n = 22, machos FLX 10 mM n = 22, fêmeas controle n = 27, fêmeas estressadas n = 29, fêmeas FLX 2,5 mM n = 32, fêmeas FLX 5 mM n = 32, fêmeas FLX 10 mM n = 26. ANOVA com medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$ comparado aos animais controle no mesmo período. # $p < 0,05$ comparado aos períodos 0-5 min, independente do grupo. Diferenças entre machos e fêmeas foram observadas em animais estressados independentemente do tratamento.

Tabela 24. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a locomoção em animais estressados – experimento 6

	d,f	F	p	η^2p
Sexo	1,196	6,535	0,011332	0,032268
Tratamento (veículo, FLX 2,5 mM, FLX 5 mM, FLX 10 mM)	3,196	0,893	0,445682	0,013486
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	3,196	1,464	0,225623	0,021918
Tempo	7, 1372	19,056	0,000000	0,088609
Interação entre os fatores "sexo" e "tempo"	7, 1372	0,920	0,490146	0,004670
Interação entre os fatores "tratamento" e "tempo"	21,1372	0,552	0,949170	0,008380
Interação entre os fatores "tratamento", "sexo" e "tempo"	21,1372	0,617	0,908975	0,009359

Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito); FLX = fluoxetina.

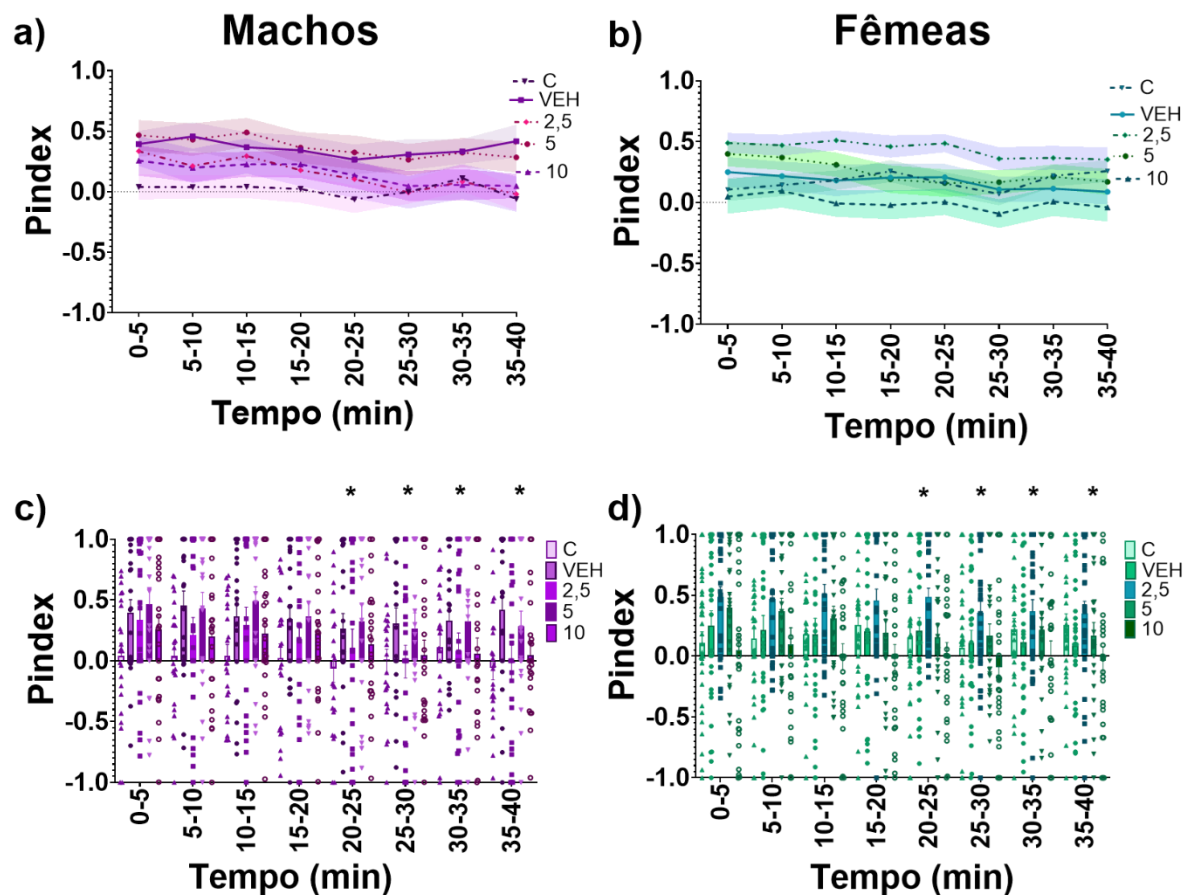
Tabela 25. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a locomoção em animais estressados – experimento 6

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tempo	0-5 min e 15-20 min	0,000102
	0-5 min e 20-25 min	0,000032
	0-5 min e 25-30 min	0,000032
	0-5 min e 30-35 min	0,000032
	0-5 min e 35-40 min	0,000032

Em relação à preferência por sacarose, pode-se observar efeito do tempo entre os animais estressados e tratados com fluoxetina ou veículo (ANOVA com medidas repetidas $F(7, 1372) = 9,33$, $p = 0,00$, tamanho de efeito = 0,04). Apesar da diferença, o tamanho de efeito observado é considerado muito pequeno. Não foram observados efeitos do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(1, 196) = 0,368$, $p = 0,54$, tamanho de efeito = 0,001) e do tratamento (ANOVA com medidas repetidas $F(3, 196) = 2,325$, $p = 0,07$, tamanho de efeito = 0,03). Entre os animais estressados e tratados com veículo, e os animais não estressado e tratados com veículo não foram observados efeitos do sexo (ANOVA com medidas repetidas $F(1, 102) = 0,02$, $p > 0,86$,

tamanho de efeito = 0,00), da condição experimental (ANOVA com medidas repetidas $F(1,102) = 3,33$, $p > 0,07$, tamanho de efeito = 0,03), e do tempo do teste (ANOVA com medidas repetidas $F(1,102) = 1,29$, $p > 0,25$, tamanho de efeito = 0,01) (Figura 32). Os dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas em animais estressados, bem como as comparações realizadas no teste *post-hoc* podem ser observados nas tabelas 26 e 27.

Figura 32. Efeitos do tratamento com fluoxetina e do estresse crônico leve de 3 dias no índice de preferência por sacarose



Legenda: figuras a,c = machos, figuras b,d = fêmeas. C = controle, VEH = estressados e tratados com veículo, 2,5 = estressados e tratados com fluoxetina (FLX) 2,5 mM, 5 = estressados e tratados com FLX 5 mM, 10 = estressados e tratados com FLX 10 mM. Machos controle n = 23, machos estressados n = 22, machos FLX 2,5 mM n = 23, machos FLX 5 mM n = 22, machos FLX 10 mM n = 22, fêmeas controle n = 27, fêmeas estressadas n = 29, fêmeas FLX 2,5 mM n = 32, fêmeas FLX 5 mM n = 32, fêmeas FLX 10 mM n = 26. ANOVA com medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ comparado aos períodos 0-5 min para os grupos de animais estressados, independente do tratamento.

Tabela 26. Dados obtidos na ANOVA com medidas repetidas para a preferência por sacarose em animais estressados – experimento 6

	d,f	F	p	η^2p
Sexo	1,196	0,36779	0,544914	0,001873
Tratamento (Veículo, FLX 2,5 mM, FLX 5 mM, FLX 10 mM)	3,196	2,32563	0,076059	0,034373
Interação entre os fatores "tratamento" e "sexo"	3,196	2,61028	0,052685	0,038418
Tempo	7, 1372	9,33928	0,000000	0,045482
Interação entre os fatores "sexo" e "tempo"	7, 1372	0,51511	0,823703	0,002621
Interação entre os fatores "tratamento" e "tempo"	21,1372	0,56596	0,941865	0,008588
Interação entre os fatores "tratamento", "sexo" e "tempo"	21,1372	0,64572	0,886689	0,009787

Legenda: df: graus de liberdade; η^2p = eta quadrado parcial (tamanho de efeito); FLX = fluoxetina.

Tabela 27. Dados obtidos no teste *post-hoc* para a preferência por sacarose em animais estressados – experimento 6

Fator ou interação (níveis)	Comparações	p (alfa 0,05)
Tempo	0-5 min e 20-25 min	0,010404
	0-5 min e 25-30 min	0,000032
	0-5 min e 30-35 min	0,000315
	0-5 min e 35-40 min	0,000037

7 DISCUSSÃO

7.1 Uso de *D. melanogaster* para o estudo de fármacos antidepressivos: revisão sistemática da literatura

A etapa teórica do presente trabalho examinou como *D. melanogaster* é usada em estudos que avaliam as respostas comportamentais e não-comportamentais desses animais ao tratamento com fármacos antidepressivos. Para isso, uma revisão sistemática da literatura foi conduzida.

A revisão sistemática identificou apenas cinco estudos descrevendo o teste de preferência por sacarose no estudo de fármacos antidepressivos em *D. melanogaster*. Este foi um resultado inesperado tendo em vista que, em experimentos com roedores, o teste de preferência por

sacarose é amplamente usado para avaliar os comportamentos de anedonia induzidos por estresse, e o potencial efeito de fármacos antidepressivos em reverter estes comportamentos (LIU *et al.*, 2018). Dentre os estudos avaliados na revisão, todos usaram fluoxetina, em diferentes concentrações. O tempo de tratamento variou de 6h, nos estudos de Ramos- Hryb *et al.* (2020), a 10 dias nos estudos de Araujo *et al.* (2018; 2020). Dentre os cinco estudos incluídos nesta revisão, três submetem os animais a protocolos de estresse, crônico ou agudo, e todos os animais foram submetidos a um período de privação alimentar de ao menos 90 min antes do início dos testes comportamentais (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020, RAMOS-HRYB *et al.*, 2020). Além das diferentes concentrações e tempos de tratamento, os testes de preferência também foram realizados de maneiras distintas. Nos estudos de Araujo *et al.* (2018; 2020) o teste foi realizado em grupos de 30 moscas machos, e a preferência foi calculada com base no consumo médio de sacarose pelo grupo de moscas após 6h. Já no estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020), o sexo das moscas não foi distinguido, e a preferência por sacarose foi avaliada de forma individual em um teste de um min. Apesar de os resultados da meta-análise indicarem um efeito positivo para a preferência por sacarose em animais previamente estressados, estas informações são consideradas inconclusivas, visto que são dados provenientes de apenas dois estudos.

Os testes de locomoção, como o teste de campo aberto, são usados tanto em estudos com roedores (KRAEUTER *et al.*, 2019) quanto em *D. melanogaster* (SOIBAM *et al.*, 2012). Esse teste é útil na avaliação dos mecanismos envolvidos nas respostas motoras, bem como, nas respostas comportamentais destes animais frente a diferentes tratamentos. Nesta revisão, identificamos doze estudos que registraram desfechos relacionados à locomoção. O tamanho de efeito obtido para o tratamento com fluoxetina foi positivo, entretanto o baixo tamanho amostral não confere poder estatístico suficiente para concluir sobre a influência deste antidepressivo na locomoção dos animais. Além disso, esses dados foram extraídos de apenas duas publicações, que apresentaram diferentes esquemas de tratamento e protocolos de estresse. O tamanho amostral de estudos que realizaram tratamento com citalopram também foi baixo e, com isso, o efeito obtido é considerado inconclusivo. Isso indica que estudos ainda são necessários para se obter conclusões mais assertivas sobre o efeito dos fármacos antidepressivos nos comportamentos de locomoção em *D. melanogaster*. Nos estudos de Araujo *et al.* (2018), machos de *D. melanogaster* foram tratados com fluoxetina 10 μ M durante 10 dias, e a locomoção foi avaliada em um teste de campo-aberto durante um min. Os autores não observaram diferença no número de cruzamentos ou na velocidade entre os animais controles e tratados.

No estudo de Hibicke; Nichols (2022), moscas machos e fêmeas foram tratadas com três concentrações diferentes de citalopram (0,3 mM, 1 mM e 2,5 mM) durante cinco dias, e avaliadas em um aparato de monitoramento de atividade durante este período. Os autores observaram que, administrando uma concentração de 2,5 mM, há uma diminuição da atividade locomotora em fêmeas, mas não em machos. Esta diferença não foi observada com as concentrações de 0,3 mM e 1 mM em ambos os sexos. Vale ressaltar que, apesar de os animais estarem no mesmo ambiente recebendo o tratamento durante os cinco dias, os autores não apresentaram os dados da locomoção segmentados para cada dia desse período, apresentando apenas a média de cruzamentos/hora/dia. Logo, o efeito do tratamento com citalopram sobre o comportamento de locomoção em um período menor que o de cinco dias é desconhecido.

Além dos comportamentos, nesta revisão também foram avaliados desfechos secundários. Análises não comportamentais foram observadas em apenas duas publicações incluídas nesta revisão, somando oito estudos. Os desfechos observados foram o peso dos animais, e os níveis de 5-HT e de DA no cérebro de moscas machos tratadas com fluoxetina 10 μ M por 10 dias ou não tratadas, e estressadas cronicamente ou não. Os dados obtidos na revisão indicaram que o tratamento com fluoxetina aumenta os níveis de 5-HT e DA, independentemente das condições de estresse (ARAÚJO *et al.*, 2018). Apesar de os estudos apresentarem tamanhos de efeito positivos, estas são informações inconclusivas, visto que são provenientes de apenas dois estudos para cada desfecho. Os dados obtidos também indicam um aumento no peso corporal dos animais tratados com fluoxetina no estudo de Araujo *et al.* (2018) em moscas não-estressadas. Entretanto, o mesmo não foi observado nos estudos de Araujo *et al.* (2020), apesar de apresentarem protocolos semelhantes de tratamento e avaliação do desfecho. Novamente, estas são informações inconclusivas, visto que são provenientes de apenas quatro estudos.

De modo geral, os dados obtidos nesta revisão demonstram que ainda há uma lacuna de conhecimento nesta área, e que mais estudos são necessários para elucidar como moscas respondem ao tratamento com fármacos antidepressivos. Ainda, as análises mostram que há uma falta de padronização nos estudos presentes na literatura, indicando a necessidade de padronizar a forma que esses animais são tratados, e como são realizados os testes comportamentais.

7.2 Respostas de *D. melanogaster* ao estresse crônico leve e ao tratamento com fluoxetina

A etapa experimental deste trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de estresse crônico leve e de tratamento com fármaco antidepressivo em *D. melanogaster*, e avaliar

as repostas comportamentais de machos e fêmeas expostos a estas condições. Os principais resultados foram esquematizados e podem ser observados ao final desta seção (Figura 33).

O protocolo de estresse crônico leve foi baseado no descrito por Araujo *et al.* (2018). Os autores descreverem um protocolo de estresse crônico de 10 dias incluindo, entre outros fatores, a privação alimentar. Para isso, os animais foram mantidos em recipientes contendo apenas papel filtro embebido em solução de sacarose 5%. Entretanto, por não considerarmos esta uma forma de privá-los totalmente de alimento, optamos por, primeiramente, realizar um piloto a fim de avaliar qual o melhor método de privação alimentar. Para isso, utilizamos três métodos diferentes: solução de ágar 1% (WANG *et al.*, 2014), papel embebido em água (NECKAMEYER; NIETO, 2015; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020), e papel embebido em solução de sacarose (ARAUJO *et al.*, 2018). Apesar de o método com solução de sacarose ter apresentado a menor taxa de mortalidade, consideramos que este não seria um método de privação total de alimento e, assim, o método de solução de ágar 1% foi usado nos experimentos seguintes. A privação alimentar como única fonte de estresse é amplamente estudada, e já foi usada em diversos trabalhos (WANG *et al.*, 2014; NECKAMEYER; NIETO, 2015; YANG, *et al.*, 2015; EDMUNDS; WIGBY; PERRY, 2021; ECKERT *et al.*, 2023). Nestes estudos observou-se que, quando privados de alimento, há aumento da agressividade em machos (EDMUNDS; WIGBY; PERRY, 2021), aumento da locomoção (YANG, *et al.*, 2015), bem como aumento da procura por alimento (EDMUNDS; WIGBY; PERRY, 2021).

Em relação ao estresse de calor, iniciamos utilizando a temperatura de 36°C, conforme usado no protocolo de Araujo *et al.* (2018). Entretanto, observamos que havia alta taxa de mortalidade após exposição das moscas a esta condição. Assim, um experimento piloto em que os animais foram expostos a três diferentes temperaturas, próximas a 36°C, foi realizado. Como resultado observamos que a temperatura de 33°C seria a mais adequada para o nosso protocolo de estresse. Na literatura, o estresse de calor em *D. melanogaster* é amplamente realizado, e diferentes desfechos são analisados (KLEPSATEL *et al.*, 2016; KLEPSATEL; WILDRIDGE; GÁLIKOVÁ, 2019). Quando expostas apenas a temperaturas elevadas, superior a 29°C as reservas de lipídios diminuem nestes animais (KLEPSATEL *et al.*, 2016; KLEPSATEL; WILDRIDGE; GÁLIKOVÁ, 2019).

O piloto 3 teve como objetivo reproduzir o protocolo de estresse crônico de 10 dias descrito por Araujo *et al.* (2018), com animais de ambos os sexos. Entretanto, observou-se que os animais não sobreviviam até o décimo dia do protocolo. A alta taxa de mortalidade pode estar relacionada à sobreposição de estressores em determinados dias, ou seja, os animais

passavam por um longo período de privação alimentar e, concomitantemente, eram expostos ao estresse de calor. Ainda, em nosso protocolo os animais não eram expostos a privação alimentar com solução de sacarose, mas sim com solução de ágar. Sabe-se que, quando moscas são expostas a altas temperaturas, há diminuição das reservas energéticas (KLEPSATEL *et al.*, 2016; KLEPSATEL; WILDRIDGE; GÁLIKOVÁ, 2019). Essa diminuição das reservas energéticas pelo estresse de calor, somada a privação alimentar por 58h, pode ter levado à alta taxa de mortalidade observada neste piloto. Apesar do protocolo já ter sido realizado em dois trabalhos descritos na literatura (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020), os autores não descrevem se houve alta taxa de mortalidade. Assim, criamos um protocolo de estresse, ainda utilizando os mesmos fatores de estresse, mas sem sobreposição do estressores e com menor tempo de privação alimentar.

Apesar de diferentes fatores de estresse como a privação alimentar, o calor, e frio serem amplamente estudadas em *D. melanogaster*, a união de diferentes fatores de estresse é pouco presente na literatura, tendo sido observada em apenas três estudos (ARAUJO *et al.*, 2018;2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020), demonstrando assim a importância do presente estudo. Quando as moscas foram submetidas a um protocolo de estresse crônico leve de 9 dias, sem a sobreposição de estressores, e com alterações nos protocolos de frio e calor, observou-se uma diminuição na taxa de mortalidade. Assim, foi possível a realização dos testes comportamentais. Em relação à locomoção, não foi observada diferença entre os grupos, tanto em relação a condição experimental, quanto em relação ao sexo. Entretanto, pode-se observar aumento da locomoção após 10 min de teste no labirinto com raias em machos e fêmeas, independentemente da condição experimental (estressados ou controle). O aumento da locomoção após 10 min pode estar relacionado ao fato de que, antes do teste, os animais foram anestesiados no frio. Assim, apesar de o registro dos comportamentos ter iniciado após os animais apresentarem os primeiros sinais de recuperação da anestesia, a baixa locomoção nos primeiros períodos do teste pode ter sido afetada pela anestesia. O estudo de MACMILLAN *et al.* (2017) mostra que, quando comparado a outros métodos de anestesia, como o CO₂ e isoflurano, moscas fêmeas anestesiadas no frio apresentam locomoção menor do que os demais grupos, mesmo 1h após o fim da anestesia.

Efeitos do estresse sob a locomoção não foram observados nos estudos que realizaram protocolo de estresse crônico de 10 dias (ARAUJO *et al.*, 2018;2020). Entretanto, no estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020), em que os animais foram expostos a um estresse variável por 24h, os autores observaram aumento da locomoção nos animais stressados, considerada uma hiperatividade em resposta ao estresse. Sugere-se assim que a hiperatividade pode estar

relacionada ao tipo de estresse aplicado, e ao tempo em que os animais são expostos a estas condições.

Na preferência por sacarose, não foi observada diminuição da preferência em animais estressados, como era esperado de acordo com estudos da literatura (ARAÚJO *et al.*, 2018; 2020; RAMOS-HRYB *et al.*, 2020). Este resultado sugere que o estresse crônico leve de 9 dias não influencia de forma significativa o comportamento alimentar destes animais. Entretanto, fatores como a ausência de um período de privação alimentar prévios ao teste, como realizado em outros estudos, pode ter afetado a observação de efeito do estresse na preferência por sacarose. Nos estudos de Araujo *et al.* (2018; 2020) os animais foram privados de alimento por 6h antes do teste de preferência por sacarose. No estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020), o protocolo de estresse teve duração de 24h e um dos fatores de estresse era a privação alimentar por 6h. Assim, os animais não estavam alimentados horas antes do teste. Além disso, a concentração da solução de 5% sacarose usada nesse experimento pode ter sido insuficiente para atrair os animais a procurarem o alimento. Apesar de ter sido a mesma concentração usada no estudo de Araujo *et al.* (2018; 2020), em nosso estudo não foi suficiente para observamos algum efeito, possivelmente pelo tempo de teste usado em nosso estudo, quando comparado ao da literatura. No estudo citado, o teste de preferência por sacarose teve duração de 6h, o que pode ter contribuído para os resultados encontrados (ARAÚJO *et al.*, 2018; 2020). No estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020), o teste de preferência por sacarose teve duração de apenas 1 min, entretanto, a concentração de sacarose usada foi de 2M. Desta forma, a concentração de sacarose foi modificada nos experimentos subsequentes, e um período de privação alimentar prévio ao teste comportamental foi inserido no protocolo.

No experimento seguinte, os animais foram expostos a um protocolo de estresse crônico leve de 3 dias, com os mesmos estressores usados no protocolo anterior. Neste experimento, a concentração da solução de sacarose nos testes foi modificada para 2M. Ainda, os animais foram privados de alimento por 20h antes do teste, e foram inseridos no labirinto com raias com um aspirador entomológico, ao invés da anestesia no frio. Em relação à locomoção, foram observadas diferenças entre machos e fêmeas, independentemente da condição experimental, sendo que machos apresentam maior locomoção que as fêmeas. Além disso, pode-se observar efeitos do tempo do teste na locomoção, ou seja, em todos os grupos uma diminuição da locomoção ao longo do teste, principalmente após os primeiros 10 min, ao contrário do observado no experimento 1. Possivelmente, por não sofrerem os efeitos da anestesia no frio, eles usam os primeiros períodos de teste para explorar o novo ambiente. Estudos mostram que, quando expostos a novos ambientes as moscas tendem a explorá-lo no início e apresentarem

um platô ao longo do teste (CONNOLLY, 1967; SOIBAM *et al.*, 2012). Ainda, mesmo estando sob privação alimentar, não foi observada alteração na locomoção dos animais estressados e dos privados de alimento quando comparados aos animais controle. Estudos demonstram que a privação alimentar promove a locomoção, tanto em roedores (DIETRICH *et al.*, 2015), quanto em *D. melanogaster* (ISABEL *et al.*, 2005; LEE; PARK, 2004; YANG *et al.*, 2015). Ainda, a hiperatividade também já foi descrita no trabalho de Ramos-Hryb *et al.* (2020) em animais submetidos a estresse variável. É possível que estes animais se locomovam tanto quanto os animais controle por, além de um comportamento inato de explorar novos ambientes, também estejam em busca de outras fontes de alimento. Entretanto, no estudo de Araujo *et al.* (2018;2020), quando submetidos a estresse variável crônico, incluindo a privação alimentar, essa alteração na locomoção não foi observada.

Em relação ao índice de preferência por sacarose, foram observados resultados interessantes neste experimento. Tanto machos privados de alimento quanto machos estressados apresentaram aumento da preferência por sacarose em relação aos machos controle (alimentados), nos primeiros 15 min de teste. Ainda, esses mesmos grupos apresentaram diminuição da preferência por sacarose após 20 min, quando comparado ao início do teste. Isso não é observado nos demais grupos do mesmo sexo. Entre as fêmeas, apenas as do grupo estressado apresentaram índice de preferência por sacarose maior quando comparadas às fêmeas controle. Apesar de fêmeas privadas de alimento também apresentarem índice de preferência maior que as controles, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Ainda, apesar das fêmeas estressadas apresentarem maior índice ao longo do teste, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes comparadas às privadas de alimento. Ainda, diferenças sexuais também foram observadas, independentemente da condição experimental e do período do teste.

Ao contrário do observado em outros estudos com *D. melanogaster*, em que machos apresentam uma diminuição da preferência por sacarose quando comparados aos animais privados de alimento (RAMOS-HRYB *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2018; 2020), nossos resultados indicam uma possível compensação ao estresse de três dias, tanto em machos quanto em fêmeas. O aumento no índice de preferência por sacarose pode refletir uma busca por fontes rápidas de energia, para compensar o gasto energético sofrido durante o protocolo de estresse. Os dados também indicam que, o estresse crônico leve somado à privação alimentar afeta mais as fêmeas do que os machos. Apesar dos dados não apresentarem significância estatística, fêmeas estressadas apresentam índice de preferência maior que as privadas de alimento, o que não é observado em machos, em que animais estressados e animais privados de alimento

apresentam índices similares de preferência por sacarose. Estudos sugerem que, em *D. melanogaster*, a corazonina, um neuropeptídeo parálogo ao hormônio liberador de gonadotrofina em mamíferos (TIAN *et al.*, 2016), é liberada durante estresse nutricional, e age no “corpo gordo”, conhecido como o fígado desses animais, aumentando a busca e a ingestão de alimento (ZANDAWALA *et al.*, 2021; KUBRAK *et al.*, 2016). Ainda, o estudo de Hermanns *et al.* (2022) mostra que, moscas tratadas com sacarose 5% após exposição a estresse crônico de vibração, aumentam o comportamento de escalada, sugerindo que a sacarose pode agir como uma forma de reverter os prejuízos causados pelo estresse. Por fim, a grande variabilidade entre os animais de um mesmo grupo, pode indicar uma resposta individualizada ao estresse. Estudos mostram que, mesmo quando criados em ambientes com as mesmas condições, moscas podem apresentar comportamentos heterogêneos (KAIN *et al.*, 2012; BUCHANAN; KAIN; DE BIVORT, 2015; MUELLER *et al.*, 2022).

Quando submetidos ao mesmo protocolo de estresse, mas testados em grupos, pode-se observar que machos privados de alimento e machos estressados se locomovem por uma distância menor do que os animais controle, o que não foi observado em fêmeas. Essa diferença pode estar relacionada ao fato que, quando em grupos, moscas *D. melanogaster* se comportam de forma diferente de quando sozinhas (ROOKE *et al.*, 2020).

Em relação ao índice de preferência por sacarose, machos testados em grupos apresentam o mesmo padrão de comportamento de quando testados individualmente. Entre as fêmeas, quando testadas em grupos, as privadas de alimento diminuem a preferência ao longo do teste, diferentemente de quando testadas individualmente. Em contrapartida, as fêmeas controle apresentam aumento do índice de preferência, semelhante às fêmeas estressadas. Uma possível explicação para o aumento da preferência por sacarose em fêmeas controle é a busca por um local propício para ovoposição. O estudo de Schwartz *et al.* (2012) mostra que, quando expostas a um meio com sacarose comparado a um meio de ágar, as moscas preferem o meio de sacarose para ovopositar. Sabe-se que em moscas estressadas a ovoposição é suprimida (MEISELMAN; KINGAN; ADAMS 2018). Assim, é provável que o aumento da preferência por sacarose em fêmeas estressadas não esteja relacionado a ovoposição, como nas fêmeas controle, mas sim ao aumento da busca por alimento induzida pelo aumento de corazonina (ZANDAWALA *et al.*, 2021; KUBRAK *et al.*, 2016), o que deve ainda ser confirmado experimentalmente.

Para avaliar qual o papel do sistema serotoninérgico sobre as respostas de moscas submetidas ao estresse crônico leve de 3 dias, um ensaio de imuno-histoquímica foi realizado utilizando cérebros inteiros de machos e fêmeas dos grupos controle, privados de alimento e

estressados. Foi avaliada a região do corpo em forma de leque, região do complexo central do cérebro de moscas. O complexo central do cérebro de *D. melanogaster* apresenta papéis importantes em comportamentos como o aprendizado, a locomoção e a orientação visual. Essa região é dividida em quatro estruturas principais e interconectadas: o corpo elipsoide, o corpo em forma de leque, os nódulos e a ponte protocerebral (KAHSAI *et al.*, 2012; KAHSAI; WINTHER, 2011). O corpo em forma de leque é a maior região do complexo central no cérebro destes animais. Estudos demonstram que neurônios presentes nesta região estão envolvidos na formação de memória visual (LI *et al.*, 2009), controle do sono (DONLEA *et al.*, 2014), e controle de comportamentos sociais (CAO *et al.*, 2022). A presença de serotonina nesta região já havia sido descrita anteriormente (VALLÉS; WHITE, 1988; KAHSAI; WINTHER, 2011), e foi também observada no presente estudo.

Os resultados indicam que, apesar de não apresentar significância estatística, há um aumento de células serotonina positivas em machos privados de alimento, quando comparados aos animais controle e aos animais estressados, entretanto essa diferença não é estatisticamente significativa. Sabe-se que em machos estressados por 10 dias há diminuição de serotonina quando comparados aos animais privados de alimento (ARAUJO *et al.*, 2018), semelhante ao observado em nosso estudo. Entretanto não é possível confirmar se há também uma diminuição na quantidade de serotonina liberada. Para isso, um ensaio de cromatografia líquida seria necessário. Em fêmeas, as moscas estressadas apresentaram aumento de células serotonina positivas quando comparadas aos grupos controle e privados de alimento. Em outro estudo, que também realizou ensaio de imuno-histoquímica, os autores observaram diminuição da sinalização de serotonina no *mushroom body*, outra região do cérebro de moscas, não analisada no presente estudo (RIES *et al.*, 2017). Sabe-se que a serotonina está envolvida na locomoção, alimentação, cópula, entre outros comportamentos (NICHOLS *et al.*, 2002). Assim, quando esses dados são comparados ao resultado do comportamento no teste de preferência por sacarose vemos que, fêmeas estressadas apresentam aumento de células serotonina positivas, ao passo que também mostram um aumento na busca pela sacarose. Essas respostas podem estar relacionadas a um mecanismo de compensação provocado pelo estresse, e as condições de estresse parecem afetar mais as fêmeas do que os machos. Por fim, uma limitação do nosso estudo é que o ensaio de imuno-histoquímica marca células serotonina positivas, entretanto, com este ensaio não é possível saber se este neurotransmissor está de fato sendo liberado, ou o estresse está apenas afetando sua síntese.

Moscas machos e fêmeas foram tratadas com fluoxetina nas concentrações 5 μ M, 10 μ M e 30 μ M durante 9 dias, e posteriormente os comportamentos de locomoção e preferência por

sacarose foram avaliados. Em relação a locomoção, pode-se observar efeito do tempo e uma interação entre os fatores tempo e sexo, machos e fêmeas, independente do tratamento, locomovem-se por uma distância maior após 15 ou 25 min de teste, respectivamente. Uma possível explicação para essa diferença é o fato que os animais são anestesiados no frio antes do teste. Apesar dos vídeos iniciarem após os animais apresentarem os primeiros sinais de recuperação da anestesia, o fato deles se locomoverem menos no início do teste pode estar relacionado ainda aos efeitos da anestesia, e ainda, pode indicar que as fêmeas foram mais afetadas pela anestesia do que os machos. No estudo de Araujo *et al.* (2018), em animais tratados por 10 dias com fluoxetina na concentração de 10 μ M, sem prévia exposição ao estresse, também não foi observado efeito do tratamento sobre a locomoção. No estudo de Hibicke; Nichols (2022), fêmeas tratadas com citalopram 2,5 mM por 5 dias, sem serem previamente estressadas, apresentaram diminuição da locomoção. Ainda, no estudo de Rasti *et al.* (2020), em que os animais foram tratados com fluoxetina na concentração de 20 mM por 24h, os animais apresentaram diminuição da latência para imobilidade no teste do nado forçado, em ambos os sexos. Assim, pode-se observar que quando tratadas com concentrações mais altas do fármaco, as moscas apresentam alterações na atividade locomotora, mesmo se não forem expostas a um estresse prévio. Em relação à preferência por sacarose, não foram observados efeitos tanto do tempo, do sexo e do tratamento. Ainda, no estudo de Araujo *et al.* (2018) também não foram observados efeitos no índice de preferência por sacarose em machos tratados com fluoxetina 10 μ M, sem prévia exposição ao estresse.

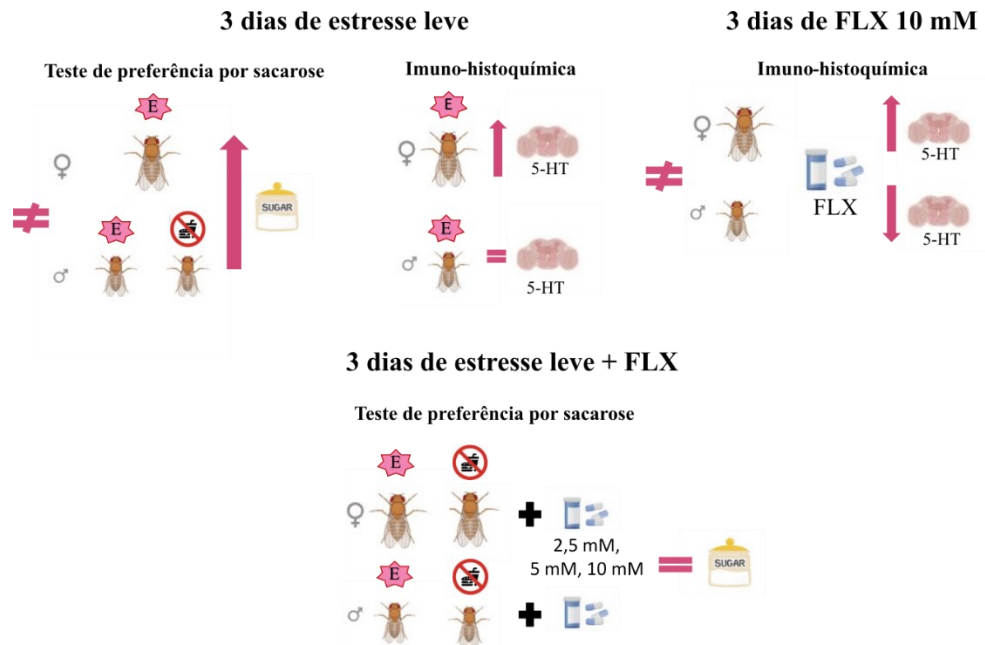
Para avaliar qual o efeito do tratamento com fluoxetina no sistema serotoninérgico, um ensaio de imuno-histoquímica foi realizado. Os animais foram tratados com fluoxetina 10 mM por 24h, 48h ou 72h e, em seguida, seus cérebros foram dissecados e usados no ensaio. Pode-se observar que, em fêmeas há um aumento de células serotonina positivas em animais tratados por 72h, e o oposto foi observado nos machos. Pode-se dizer que o fármaco provoca efeito nestes animais, estimulando a produção de células produtoras deste neurotransmissor em fêmeas, e inibindo essa produção em machos. Entretanto, com este experimento não é possível afirmar que há aumento ou diminuição da liberação de serotonina no cérebro destes animais. A diferença entre machos e fêmeas tratados com fluoxetina por 72h indica que pode haver um dimorfismo sexual na resposta à fármacos antidepressivos em *D. melanogaster*, e que o efeito da fluoxetina é tempo dependente. No estudo de Araujo *et al.* (2018), não foram observadas diferenças nos níveis de serotonina entre moscas machos tratadas com fluoxetina 10 μ M quando comparadas aos animais não tratados. Em ratos, diferentes respostas comportamentais ao tratamento com fluoxetina já foram descritas, entretanto, estas respostas não estão associadas à

função dos transportadores de serotonina (DOMINGUES *et al.*, 2020). Ainda, a influência do tratamento com fluoxetina em roedores tem respostas variadas, podendo aumentar a síntese (STENFORS; ROSS, 2002) ou diminuí-la (CARLSSON; LINDQVIST, 1978; STENFORS; YU; ROSS, 2001). Assim, para avaliar se o tratamento com fluoxetina também influencia a liberação ou recaptação nestes animais, de forma sexualmente dimórfica, outros estudos poderiam ser conduzidos, avaliando por exemplo a função do transportador de serotonina.

A fim de avaliar se o tratamento com fluoxetina seria capaz de reverter os efeitos do estresse em machos e fêmeas, animais expostos ao protocolo de estresse crônico leve de 3 dias foram tratados com fluoxetina nas concentrações 2,5 mM, 5 mM e 10 mM, concomitante ao protocolo de estresse. Em seguida, foram submetidos ao teste no labirinto com raias. Em relação à locomoção, pode-se observar efeito do sexo, independentemente do tratamento. Além disso, também foi observado efeito do tempo do teste entre animais estressados e tratados com fluoxetina ou veículo. Observou-se diferença entre os períodos finais do teste quando comparados aos primeiros 10 min. Esses resultados corroboram com os observados no estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020), em que os animais estressados e tratados com fluoxetina 10 mM apresentam diminuição da locomoção no período final do teste, quando comparado ao inicial. Entretanto, assim como no presente estudo, diferenças entre animais tratados e não tratados com fluoxetina também não foram observadas. No estudo de Araujo *et al.* (2018) também não foi observado efeito do tratamento sobre a locomoção. Ries *et al.* (2017) observaram aumento do comportamento de escalada em animais submetidos a estresse de vibração por 3 dias e tratados com fluoxetina 10 mM. Assim, sugere-se que, o aumento da atividade locomotora é dependente do tipo de estresse ao qual os animais são expostos, e também ao teste usado para avaliar a atividade locomotora. Ou seja, quando testados em campo aberto ou no labirinto com raias, o aumento da atividade locomotora não foi observado, diferentemente de quando analisados em um teste vertical de escalada.

Em relação a preferência por sacarose, não foram observados efeitos do tratamento ou do sexo. Efeitos do tempo foram observados, com diferenças entre os períodos iniciais aos finais do teste. Nos estudos de Araujo *et al.* (2018; 2020), machos expostos a estresse crônico de 10 dias diminuem a preferência por sacarose, e esta alteração também não é revertida pelo tratamento com fluoxetina na concentração de 10 μ M. Ainda, no estudo de Ramos-Hryb *et al.* (2020) também não foi observado efeito do tratamento com fluoxetina 10 mM na preferência por sacarose.

Figura 33. Desenho esquemático representando os principais resultados obtidos



Legenda: FLX= fluoxetina, Sugar= sacarose, 5-HT = serotonina. Símbolos com “E” representam os grupos estressados + privados de alimento. Símbolos de “proibido alimento” representam os grupos privados de alimento. Símbolos de igualdade representam ausência de diferença em relação aos grupos controle. Setas representam aumento ou diminuição em relação aos grupos controle. Símbolos de diferença representam diferença entre os sexos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de já existirem estudos na literatura que avaliam o comportamento de *D. melanogaster* expostas a protocolos de estresse crônico variável, este é o primeiro estudo que propõem esta análise também em fêmeas. Outros estudos já avaliaram as respostas comportamentais de fêmeas de *D. melanogaster*, mas expostas a um único fator de estresse. Ainda, este também é o primeiro estudo que avalia as respostas de fêmeas submetidas ao estresse crônico e ao tratamento com fluoxetina.

Este é o primeiro estudo que propõem avaliar a quantidade de células serotonina positivas no cérebro de moscas machos e fêmeas, estressadas ou não, bem como de moscas tratadas com fluoxetina. Apesar de pioneiro, com nossos experimentos não foi possível confirmar se há ou não mais liberação de serotonina no cérebro de fêmeas estressadas, e de fêmeas tratada com fluoxetina por 72h. Para isso, outros estudos deveriam ser realizados, avaliando por exemplo a quantidade de serotonina no cérebro destes animais por ensaio de cromatografia líquida. Ainda, para avaliar se o sistema serotoninérgico tem papel crucial nas respostas comportamentais de animais expostos ao estresse ou ao tratamento com fluoxetina, ou a ambos, seria necessário a utilização de moscas mutantes com aumento ou depleção da síntese de serotonina.

Por fim, outros testes comportamentais poderiam ser realizados, a fim de avaliar se o estresse crônico leve e o tratamento com fármaco fluoxetina alteram o comportamento destes animais em outros contextos, como por exemplo, no teste de escalada ou nos comportamentos de cópula.

9 CONCLUSÕES

a) Para responder ao primeiro objetivo, uma revisão sistemática da literatura foi conduzida. Com os dados obtidos nesta revisão pode-se observar que os estudos nesta área ainda são bastante escassos. Dentre os estudos existentes, a maior parte utilizou moscas adultas e machos como animal experimental. A fluoxetina foi o fármaco mais utilizado nos estudos, e a única via oral foi a única via de tratamento encontrada nos estudos. Foi observado uma discrepância entre os estudos em relação ao tempo de tratamento e concentração usada. Os comportamentos estudados mais prevalentes foram a locomoção, a preferência por sacarose, a cópula, e a imobilidade. Além disso, apenas oito estudos avaliaram desfechos não comportamentais.

b) Para responder ao segundo objetivo, moscas machos e fêmeas foram expostas ao estresse crônico leve de 9 e 3 dias. Quando expostas ao estresse crônico leve de 9 dias, não há dimorfismo sexual tanto em relação à locomoção, quanto à preferência por sacarose. Efeitos do período do teste sobre a locomoção, com aumento da distância percorrida, foram observados independentemente do grupo experimental. Quando submetidas ao estresse crônico leve de 3 dias não se observam efeitos do estresse sobre a locomoção. Pode-se observar efeitos do sexo, independentemente da condição experimental. Além disso, efeitos do período do teste foram observados em todos os grupos, com diminuição da locomoção ao longo do teste. Em relação a preferência por sacarose, pode-se observar que machos estressados e machos privados de alimento apresentam preferência maior que machos controle (alimentados) na maior parte do teste. Em fêmeas, esse aumento foi observado apenas nos animais estressados. Ainda, efeitos do sexo também foram observados. Quando expostas ao estresse crônico leve de 3 dias e testadas em grupos, machos privados de alimento e machos estressados apresentam diminuição da locomoção quando comparados aos animais controle. Entre as fêmeas, não há diferença entre os grupos. Observou-se ainda apenas que fêmeas controle se locomovem por uma distância menor que machos controle. Em relação à preferência por sacarose, pode-se observar que machos estressados apresentam aumento da preferência por sacarose em relação aos animais controle e privados de alimento. Em fêmeas, há aumento da preferência em animais estressados e controle, em relação às fêmeas privadas de alimento.

- c) Para responder ao terceiro objetivo, moscas machos e fêmeas foram tratadas com fluoxetina nas concentrações 5 μ M, 10 μ M e 30 μ M durante 9 dias. Na locomoção, não foram observados efeitos do tratamento, apenas efeitos do tempo do teste, e interação entre os fatores tempo e sexo, com aumento da distância percorrida no final do teste quando comparado ao início. Na preferência por sacarose não foram observados efeitos do sexo, do tratamento ou do tempo do teste.
- d) Para responder ao quarto objetivo, machos e fêmeas foram expostos ao estresse crônico leve de 3 dias, e seus cérebros usados em ensaio de imuno-histoquímica. Observou-se respostas diferentes em machos e fêmeas, com aumento de células serotonina positivas em fêmeas estressadas, mas não em machos.
- e) Para responder ao quinto objetivo, machos e fêmeas foram tratadas com fluoxetina 10 mM por 24h, 48h e 72h. Observou-se respostas distintas entre machos e fêmeas. Há aumento de células serotonina positivas em fêmeas tratadas com fluoxetina 10 mM por 72h, e o oposto foi observado em machos.
- f) Para responder ao sexto objetivo, machos e fêmeas foram expostos ao estresse crônico leve de 3 dias e, concomitantemente, ao tratamento com fluoxetina nas concentrações 2,5 mM, 5 mM e 10 mM. Em relação a locomoção, observou-se efeito do sexo em animais estressados e tratados com fluoxetina ou veículo. Ainda, efeitos do tempo do teste também foram observados, com diminuição da locomoção nos períodos finais do teste quando comparados aos iniciais, independentemente do tratamento. Ainda, diferenças entre os animais estressados e não estressados, independente do sexo, também foram observadas. Em relação a preferência por sacarose, observou-se apenas efeito do tempo entre os animais estressados tratados com fluoxetina ou veículo.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, S.M.; POETINI, M.R.; BORTOLOTTI, V.C.; COUTO, S.F.; PINHEIRO, F.C.; MEICHTRY, L.B.; DE ALMEIDA, F.P.; SANTOS MUSACHIO, E.A.; DE PAULA, M.T.; PRIGOL, M. 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.
- ARAUJO, S.M.; BORTOLOTTI, V.C.; POETINI, M.R.; DAHLEH, M.M.M.; COUTO, S.D.F.; PINHEIRO, F.C.; MEICHTRY, L.B.; MUSACHIO, E.A.S.; RAMBORGER, B.P.; ROEHRS, R.; GUERRA, G.P.; PRIGOL, M. γ -Oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster*. **Stress**, v. 24, n. 3, p. 282-293, 2021.
- ARYAL, B.; LEE, Y. Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. **BMB reports**, n.52, n.4, p.250, 2019.
- BORGGREFE, T.; OSWALD, F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, p. 1631-1646, 2009.
- BROWN, G.E.; MITCHELL, A.L.; PEERCY, A.M.; ROBERTSON, C.L. Learned helplessness in *Drosophila melanogaster*? **Psychological reports**, v. 78, n. 3, p. 962-962. 1996.
- BROWN, S.D.M. Advances in mouse genetics for the study of human disease. **Human Molecular Genetics**, v. 30, n. R2, p. R274-R284, 2021.
- BULTERIJS, S.; BRAECKMAN, B.P. Phenotypic Screening in *C. elegans* as a Tool for the Discovery of New Geroprotective Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, p. 164, 2020.
- BUCHANAN, S.M.; KAIN, J. S.; DE BIVORT, B. L. Neuronal control of locomotor handedness in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 21, p. 6700-6705, 2015.
- BUTTON, KS; IOANNIDIS, J. P; MOKRYSZ, C; NOSEK, BA; FLINT, J; ROBINSON, ES; MUNAFÒ, MR. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 365- 76, 2013.
- CAO, H; TANG, J; LIU, Q; HUANG, J; XU, R. Autism-like behaviors regulated by the serotonin receptor 5-HT2B in the dorsal fan-shaped body neurons of *Drosophila melanogaster*. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 1, p. 203, 2022.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effects of antidepressant agents on the synthesis of brain monoamines. **Journal of Neural Transmission**, v. 43, p. 73-91, 1978.
- COHEN, J. A power primer. **Psychol Bull**, v. 112, n. 1, p. 155-9, 1992.
- CONNOLLY, K. Locomotor activity in *Drosophila* III. A distinction between activity and reactivity. **Animal behaviour**, v. 15, n. 1, p. 149-152, 1967.

COREY, J.L.; QUICK, M.W.; DAVIDSON, N.; LESTER, H.A.; GUASTELLA, J. A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: cloning, expression, and electrophysiological characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n.3, p. 1188–1192, 1994.

CURRAN, K. P.; CHALASANI, S. H. Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us? **Invertebrate Neuroscience**, v. 12, p. 81-92, 2012.

DEMCHYSHYN, L.L.; PRISTUPA, Z.B.; SUGAMORI, K.S.; BARKER, E.L.; BLAKELY, R.D.; WOLFGANG, W.J.; FORTE, M.A.; NIZNIK, H.B. Cloning, expression, and localization of a chloride facilitated cocaine-sensitive serotonin transporter from *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91 n.11, p. 5158–5162, 1994.

DERSIMONIAN, R.; LAIRD, N. Meta-analysis in clinical trials. **Controlled clinical trials**, v. 7, n. 3, p. 177-188, 1986.

DE VRIES, R.B; HOOIJMANS, C.R.; LANGENDAM, M.W.; VAN LUIJK, J.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; WEVER, K.E. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. **Evidence-based Preclinical Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2015.

DEWHURST, S. A., CROKER, S. G., IKEDA, K., & MCCAMAN, R. E. Metabolism of biogenic amines in drosophila nervous tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 975-981, 1972.

DIETRICH, M. O.; ZIMMER, M. R.; BOBER, J.; HORVATH, T. L. Hypothalamic Agrp neurons drive stereotypic behaviors beyond feeding. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1222-1232, 2015.

DOMINGUES, K.; LIMA, F.B.; LINDER, A.E; MELLEU, F.F.; POLI, A.; SPEZIA, I.; SUMAN, P.R.; THEINDL, L.C.; LINO DE OLIVEIRA, C. Sexually dimorphic responses of rats to fluoxetine in the forced swimming test are unrelated to the function of the serotonin transporter in the brain. **Synapse**, v. 74, n. 1, p. e22130, 2020.

DONLEA, J.M.; PIMENTEL., D; MIESENBÖCK, G. Neuronal machinery of sleep homeostasis in *Drosophila*. **Neuron**, v. 81, n.4, p. 860-872, 2014.

DOS SANTOS, J.F.; BRITO, I.R.R.; DE MELO, I.; NASSIB, B.B.; DE ARAUJO, L.A.; CASTRO, O. "Psychoactive drugs and the underlying mechanisms that affect the normal development of *Drosophila melanogaster*: A Systematic Review and meta-analysis". **PROSPERO** 2020 **CRD42020146823** Disponível em: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020146823. Acesso em: 01 nov. 2023.

DUNHAM, K.E.; VENTON, B.J. SSRI antidepressants differentially modulate serotonin reuptake and release in *Drosophila*. **Journal of Neurochemistry**. v. 162, n. 5, p. 404-416, 2022.

ECHELARD, Y.; EPSTEIN, D.J.; ST-JACQUES, B.; SHEN, L.; MOHLER, J.; MCMAHON, J.A.; MCMAHON, A.P. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1417-1430, 1993.

ECKERT, F.B. Criação e padronização de métodos para análises etológicas de *Drosophila melanogaster* [trabalho de conclusão de curso]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Ciências Biológicas, 2017.

ECKERT, F.B.; TRICHES, F.F.; COSTA, J.E.; LINO DE OLIVEIRA, C. Antidepressant treatment and behavior responses in *Drosophila melanogaster*: a systematic review and metanalysis. **PROSPERO 2020 CRD42020225423** Disponível em: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020225423. Acesso em: 01 nov. 2023

ECKERT, F.B.; VALDATI, D.B.; MARINO-NETO, J.; DE TONI, D.; DE OLIVEIRA, C.L. Lane-maze for behavioral tests in flies. ***Drosophila Information Service***. v.103, p.77-80, 2020.

ECKERT, F. B.; DE BRITTOS VALDATI, D.; NETO, J. M., DE TONI, D. C.; DE OLIVEIRA, C. L. One-capillary lane-maze test in flies: exploratory studies. ***Biological Models Research and Technology***, v. 3, n. 1, 2023.

EDMUNDS, D.; WIGBY, S.; PERRY, J. C. ‘Hangry’ *Drosophila*: food deprivation increases male aggression. ***Animal Behaviour***, v. 177, p. 183-190, 2021.

ERICSSON, A.C.; CRIM, M. J.; FRANKLIN, C. L. A brief history of animal modeling. ***Missouri medicine***, v. 110, n. 3, p. 201, 2013.

ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. ***Nature***, v. 169, n. 4306, p. 800-801, 1952.

FERGUSON, J. M. SSRI antidepressant medications: adverse effects and tolerability. ***Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry***, v. 3, n.1, p. 22, 2001.

GONZALEZ, C. *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. ***Nature Reviews Cancer***, v.13, p. 172–183 2013.

HAMILTON, T.J.; KWAN, G. T.; GALLUP, J.; TRESGUERRES, M. Acute fluoxetine exposure alters crab anxiety-like behaviour, but not aggressiveness. ***Scientific reports***, v. 6, p. 19850, 2016.

HAO, Y.; GE, H.; SUN, M.; GAO, Y. Selecting an appropriate animal model of depression. ***International journal of molecular sciences***, v. 20, n. 19, p. 4827, 2019.

HERMANN, T.; GRAF-BOXHORN, S.; POECK, B.; STRAUSS, R. Octopamine mediates sugar relief from a chronic-stress-induced depression-like state in *Drosophila*. ***Current Biology***, v. 32, n. 18, p. 4048-4056, 2022.

HIBICKE, M.; NICHOLS, C.D. Validation of the forced swim test in *Drosophila*, and its use to demonstrate psilocybin has long-lasting antidepressant-like effects in flies. ***Scientific Reports***, v. 12, n. 1, p. 10019, 2022.

HUET, O.; DE HAAN, J.B. The ethical dimension in published animal research in critical care: the dark side of our moon. ***Critical Care***, v. 18, n. 2, p. 120-121, 2014.

ISABEL, G.; MARTIN, J. R.; CHIDAMI, S., VEENSTRA, J. A.; ROSAY, P. AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R531-R538, 2005.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 2, p. 407- 440, 2009.

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

JIA, J; HE, L; YANG, J; SHUAI, Y; YANG, J; WU, Y; LIU, X; CHEN, T; WANG, G; WANG, X; SONG, X; DING, Z; ZHU, Y; ZHA, L; CHEN, P; QIN, H. A pair of dopamine neurons mediate chronic stress signals to induce learning deficit in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.118, n. 42, p. e2023674118, 2021.

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

KAHSAI, L.; CARLSSON, M.A.; WINTHER, Å.M.; NÄSSEL, D.R. Distribution of metabotropic receptors of serotonin, dopamine, GABA, glutamate, and short neuropeptide F in the central complex of *Drosophila*. **Neuroscience**, v. 208, p.11- 26, 2012.

KAHSAI, L; WINTHER, ÅM. Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 2, p. 290-315, 2011.

KAIN, J. S.; STOKES, C.; DE BIVORT, B. L. Phototactic personality in fruit flies and its suppression by serotonin and white. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 48, p. 19834-19839, 2012.

KLEPSATEL, P.; GÁLIKOVÁ, M.; XU, Y; KÜHNLEIN, R. P. Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 33667, 2016.

KLEPSATEL, P.; WILDRIDGE, D.; GÁLIKOVÁ, M. Temperature induces changes in *Drosophila* energy stores. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5239, 2019.

KRAEUTER, A-K; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. **Pre-clinical models: techniques and protocols**, p. 99-103, 2019.

KUBRAK, O. I.; LUSHCHAK, O. V.; ZANDAWALA, M.; NÄSSEL, D. R. Systemic corazonin signalling modulates stress responses and metabolism in *Drosophila*. **Open Biology**, v. 6, n. 11, p. 160152, 2016.

LAIRD, N. M.; WARE, J. H. Random-effects models for longitudinal data. **Biometrics**, v. 38, n. 4, p. 963-74, 1982.

LAPMANEE, S.; CHAROENPHANDHU, J.; CHAROENPHANDHU, N. Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety-and depression-like behaviors. **Behavioural brain research**, v. 250, p. 316-325, 2013.

LASKO, P.; LÜTHY, K. Investigating rare and ultrarare epilepsy syndromes with *Drosophila* models. **Faculty Reviews**, v. 10, 2021.

LEE, G.; PARK, J. H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 167, n. 1, p. 311-323, 2004.

LEONELLI, S.; ANKENY, R.A. What makes a model organism? **Endeavour**, v. 37, n. 4, p. 209-212, 2013.

LI, W; PAN, Y; WANG, Z; GONG, H; GONG, Z; LIU, L. Morphological characterization of single fan-shaped body neurons in *Drosophila melanogaster*. **Cell and tissue research**, v. 336, n. 3, p. 509-519, 2009.

LIU, Q., LI, B.; ZHU, H. Y.; WANG, Y. Q.; YU, J.; WU, G. C. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n.11, p. 796-805, 2009.

LIU, M.Y.; YIN, C.Y.; ZHU, L.J.; ZHU, X.H.; XU, C.; LUO, C.X.; CHEN, H.; ZHU, D.Y.; ZHOU, Q.G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature protocols**, v.13, n. 7, p. 1686-1698, 2018.

MACMILLAN, H. A.; NØRGÅRD, M.; MACLEAN, H. J.; OVERGAARD, J.; WILLIAMS, C. J. A critical test of *Drosophila* anaesthetics: Isoflurane and sevoflurane are benign alternatives to cold and CO₂. **Journal of Insect Physiology**, v. 101, p. 97-106, 2017.

MAHAR I.; BAMBICO F.R.; MECHAWAR N.; NOBREGA J.N. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 38, n. 173, p. 92, 2014.

MAJEED, Z. R.; ABDELJABER, E.; SOVELAND, R.; CORNWELL, K.; BANKEMPER, A., KOCH, F.; COOPER, R. L. Modulatory action by the serotonergic system: behavior and neurophysiology in *Drosophila melanogaster*. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 1-23, 2016.

MARASINE, N. R.; SANKHI, S.; LAMICHHANE, R.; MARASINI, N. R.; DANGI, N. B. Use of antidepressants among patients diagnosed with depression: a scoping review. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

MARTIN, C.A; KRANTZ, D. E. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. **Neurochemistry international**, v. 73, p. 71-88, 2014.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochemical pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162-171, 2014.

MEISELMAN, M. R.; KINGAN, T. G.; ADAMS, M. E. Stress-induced reproductive arrest in *Drosophila* occurs through ETH deficiency-mediated suppression of oogenesis and ovulation. **BMC biology**, v. 16, p. 1-15, 2018.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F.; MOSES L.; GWALTNEY-BRANT S.M. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, n. 3, p. 187-99, 2008.
MORGAN, T.H; STURTEVANT, A.H.; MULLER, H.J.; BRIDGES, C.B. The mechanism of Mendelian heredity. **Henry Holt and Company**,1923.

MORGAN, T.H. Localization of the hereditary material in the germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.1, n. 7, p. 420-429, 1915.

MORGAN, T.H. The Theory of the Gene. **The American Naturalist**, v. 51, n. 609, p. 513–544, 1917.

MOULIN, T.C.; FERRO, F.; HOYER, A.; CHEUNG, P.; WILLIAMS, M.J.; SCHIÖTH, H.B. The *Drosophila melanogaster* levodopa-induced depression model exhibits negative geotaxis deficits and differential gene expression in males and females. **Frontiers in Neuroscience**, v.15, p. 653470, 2021.

MUELLER, J. M.; ZHANG, N.; CARLSON, J. M.; SIMPSON, J. H. Variation and variability in *Drosophila* grooming behavior. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 15, 769372, 2022.

MUSSELMAN, L.P.; KÜHNLEIN, R.P. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. Suppl_1, p. jeb163881, 2018.

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

NICHOLS, C. D.; RONESI, J.; PRATT, W.; SANDERS-BUSH, E. Hallucinogens and *Drosophila*: linking serotonin receptor activation to behavior. **Neuroscience**, v. 115, n. 3, p. 979-984, 2002.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v. 287, n. 5785, p. 795-801, 1980.

O'KANE, C.J. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. **Current Topics in Behavioral Neuroscience**. n.7, p. 37–60, 2011.

PANNU A.; GOYAL R.K. Serotonin and Depression: Scrutiny of New Targets for Future Anti-Depressant Drug Development. **Current Drug Targets**, v. 24, n. 10, p. 816-837, 2023.

PEREZ-CABALLERO, L; TORRES-SANCHEZ, S; ROMERO-LÓPEZ- ALBERCA, C; GONZÁLEZ-SAIZ, F; MICO, J.A; BERROCOSO, E. Monoaminergic system and depression. **Cell and tissue research**, v. 377, p. 107-113, 2019.

PETRUCCELLI, E.; FEYDER, M.; LEDRU, N.; JAQUES, Y.; ANDERSON, E.; KAUN, KR. Alcohol Activates Scabrous-Notch to Influence Associated Memories. **Neuron**.v.100, n. 5, p.1209-1223.e4, 2018.

POULSON, D.F. Chromosomal deficiencies and the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.23, n.3, p.133-137, 1937.

RACAGNI, G; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **International clinical psychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 117-131, 2010.

RAMOS-HRYB, A.B; BAHOR, Z.; MCCANN, S.; SENA, E.; MACLEOD, MR; DE LINO DE OLIVEIRA, C. Protocol for a systematic review and meta-analysis of data from preclinical studies employing forced swimming test: an update **BMJ Open Science**, v.3, p. e000043,2019.

RAMOS-HRYB, A.B.; RAMIREZ, M.F.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; PAGANI, M.R. Stress-mediated hyperactivity and anhedonia resistant to diazepam and fluoxetine in *Drosophila*. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 96-106, Epud 2020.

RASTI, A.R.; COOMBE, V.E.; MUZIK, J.R.; KLIETHERMES, C.L. Pharmacological characterization of the forced swim test in *Drosophila melanogaster*. **Invertebrate Neuroscience**, 20, 1-8, 2020.

RAPPORT, M. M. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemical**, v. 176, p. 1243-1251, 1948.

RIES, A. S.; HERMANN, T.; POECK, B.; STRAUSS, R. Serotonin modulates a depression-like state in *Drosophila* responsive to lithium treatment. **Nature communications**, v. 8, p.15738, 2017.

ROOKE, R.; RASOOL, A.; SCHNEIDER, J.; LEVINE, J. D. *Drosophila melanogaster* behaviour changes in different social environments based on group size and density. **Communications biology**, v. 3, n.1, p. 304, 2020.

RUSSELL, W. M. S. The development of the three Rs concept. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, n. 3, p. 298-304, 1995.

SAWILOWSKY, S. S. New effect size rules of thumb. **Journal of Modern Applied Statistical Methods**, v. 8, n. 2, p. 26, 2009.

SCAPLEN K.M.; MEI, N.J.; BOUNDS, H.A.; SONG, S.L.; AZANCHI, R.; KAUN, K.R. Automated real-time quantification of group locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. **Scientific reports**, v. 14, n 9, p. 4427, 2019.

SCHWARTZ, N. U.; ZHONG, L.; BELLEMER, A.; TRACEY, W. D. Egg laying decisions in *Drosophila* are consistent with foraging costs of larval progeny. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37910, 2012.

STENFORS, C.; YU, H.; ROSS, S. B. Pharmacological characterisation of the decrease in 5-HT synthesis in the mouse brain evoked by the selective serotonin re-uptake inhibitor citalopram. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 363, p. 222-232, 2001.

STENFORS, C.; ROSS, S. B. Evidence for involvement of 5-hydroxytryptamine1B autoreceptors in the enhancement of serotonin turnover in the mouse brain following repeated treatment with fluoxetine. **Life sciences**, v. 71, n. 24, p. 2867-2880, 2002.

SHERMAN, A. D.; SACQUITNE, J. L.; PETTY, F. Specificity of the learned helplessness model of depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, n. 3, p. 449-454, 1982.

SOIBAM, B; MANN, M; LIU, L; TRAN, J; LOBAINA, M; KANG, YY; GUNARATNE, GH; PLETCHER, S; ROMAN, G. Open-field arena boundary is a primary object of exploration for *Drosophila*. **Brain and behavior**, v.2, n. 2, p. 97-108, 2012.

TIAN, S.; ZANDAWALA, M.; BEETS, I.; BAYTEMUR, E.; SLADE, S. E.; SCRIVENS, J. H.; ELPHICK, M. R. Urbilaterian origin of paralogous GnRH and corazonin neuropeptide signalling pathways. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 28788, 2016.

TIERNEY, A. J. Invertebrate serotonin receptors: a molecular perspective on classification and pharmacology. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 19, p. jeb184838, 2018.

THE 3R. Disponível em: The 3Rs | NC3Rs. Acesso em 01 nov 2023.

TSUDA, L.; LIM, Y-M. Alzheimer's disease model system using *Drosophila*. **Drosophila Models for Human Diseases**, p. 25-40, 2018.

TWAROG, B. M.; PAGE, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 175, n. 1, p. 157-161, 1953.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H.J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease models & mechanisms**, v.9, n. 3, p. 235-244, 2016.

VALLÉS, AM; WHITE, K. Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. **Journal of Comparative Neurology**, v. 268, n. 3, p. 414-428, 1988.

VOLLMAYR, B.; GASS, Pr. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. **Cell and tissue research**, v. 354, p. 171-178, 2013.

WAN X.; WANG W.; LIU J.; TONG T. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. **BMC Medical Research Methodology**, v.14, p.1-13, 2014.

WANG, S. P.; GUO, W. Y.; MUHAMMAD, S. A.; CHEN, R. R.; MU, L. L.; LI, G. Q. Mating experience and food deprivation modulate odor preference and dispersal in *Drosophila melanogaster* males. **Journal of insect science**, v.14, n.1, p. 131, 2014.

WELSH, J. H., AND M. MOORHEAD. The quantitamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. **Journal of Neurochemistry**, v.6, p. 146-169, 1960.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1-16. 1984.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacology & therapeutics**, v. 45, n. 3, p. 425-455, 1990.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of stress**, v. 6, p. 78-93, 2017.

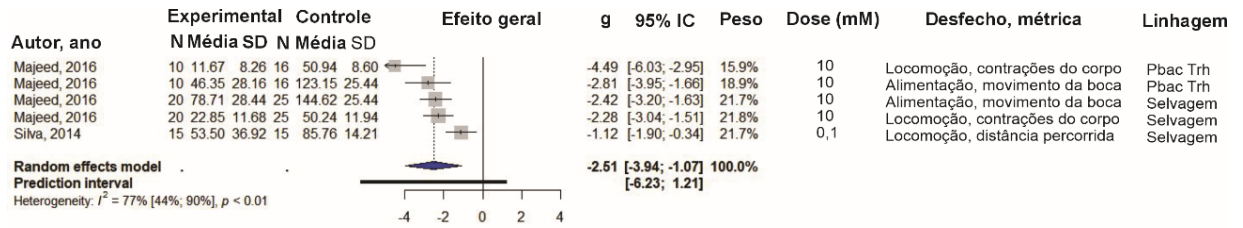
YANG, Z.; BERTOLUCCI, F.; WOLF, R.; HEISENBERG, M. Flies cope with uncontrollable stress by learned helplessness. **Current biology**, v. 23, n. 9, p.799-803, 2013.

YANG, Z.; YU, Y.; ZHANG, V.; TIAN, Y.; QI, W.; WANG, L. Octopamine mediates starvation-induced hyperactivity in adult *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 5219-5224, 2015.

YOUNES, S.; AL-SULAITI, A.; NASSER, E.A.A.; NAJJAR, H.; KAMAREDDINE, L. *Drosophila* as a model organism in host–pathogen interaction studies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.10, n. 214, 2020.

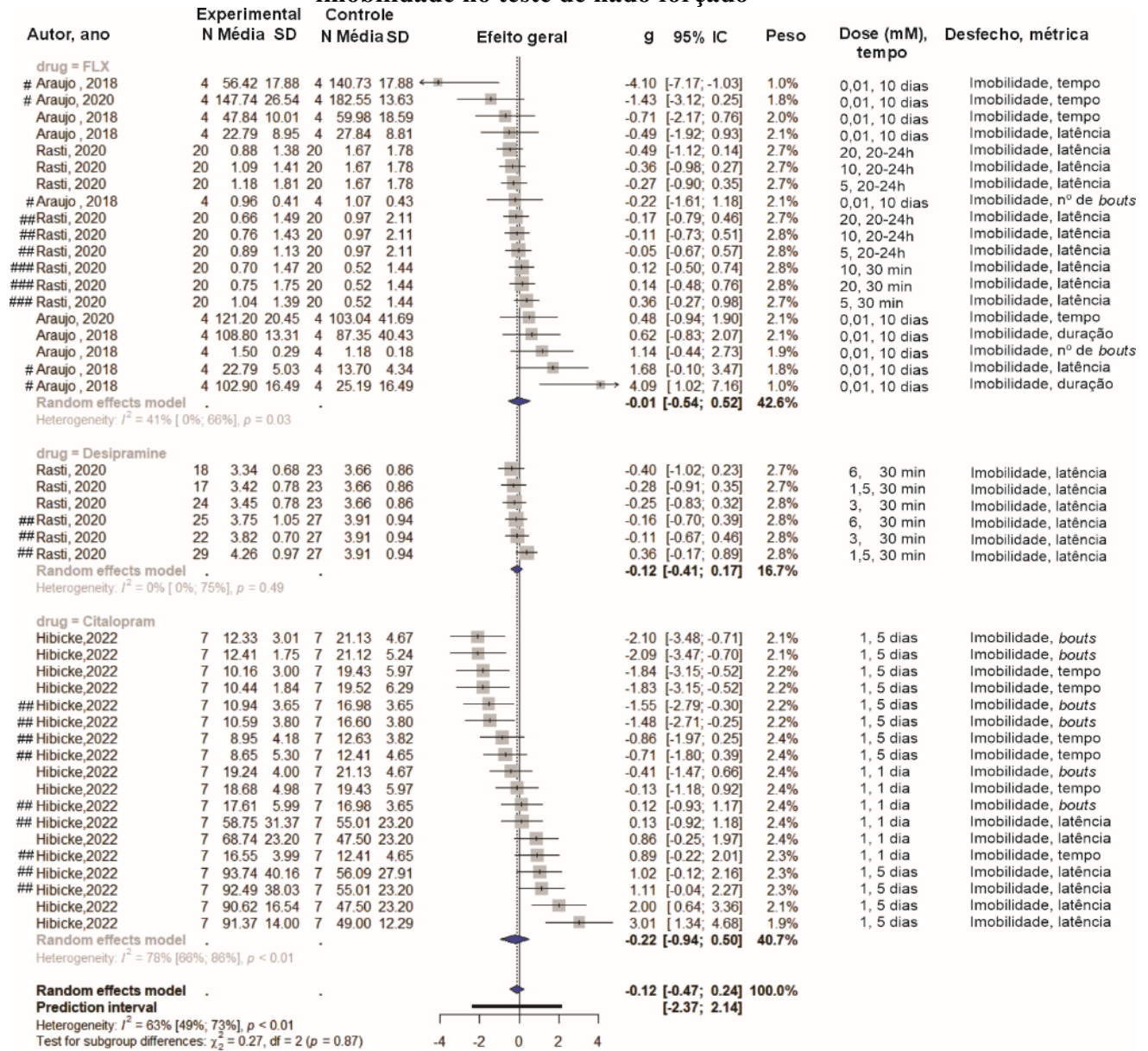
ZANDAWALA, M.; NGUYEN, T.; BALANYÀ SEGURA, M.; JOHARD, H. A.; AMCOFF, M.; WEGENER, C.; PALUZZI, J.P.; NÄSSEL, D. R. A neuroendocrine pathway modulating osmotic stress in *Drosophila*. **PLoS genetics**, v. 17, n. 3, p. e1009425, 2021.

APÊNDICE A - Gráfico em floresta dos estudos realizados em larvas



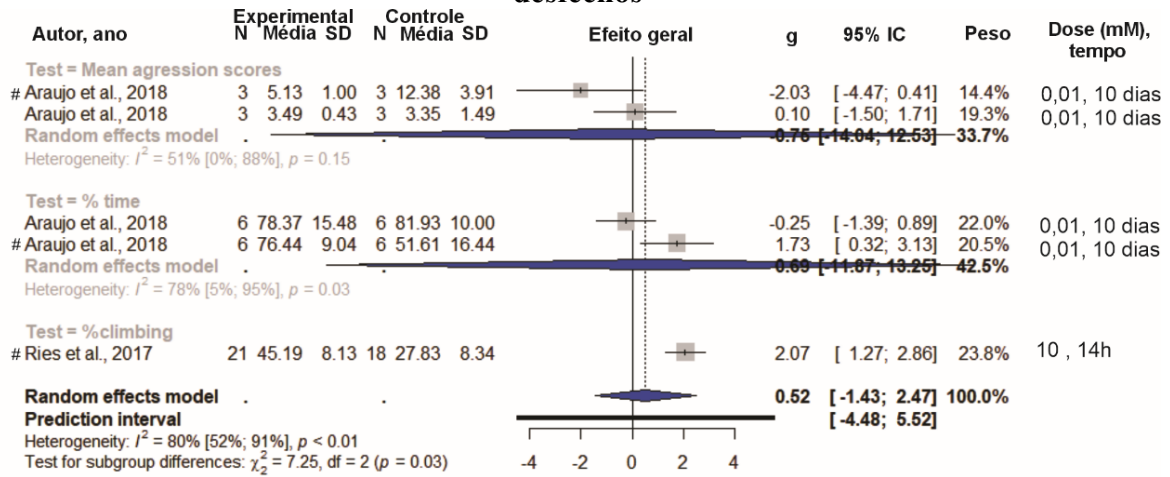
Legenda: efeitos observados para cada estudo individual (quadrados cinzas), seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o CES (losango azul). Estudos localizados à esquerda da linha vertical (ausência de efeito), indicam diminuição do comportamento, e estudos localizados à direita da linha indicam aumento do comportamento. Pbac Trh= moscas mutantes com diminuição na síntese de serotonina. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges.

APÊNDICE B - Gráfico em floresta dos estudos realizados em adultos para o desfecho imobilidade no teste de nado forçado



Legenda: efeitos observados para cada estudo individual (quadrados cinzas), seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o CES (losango azul). Estudos localizados à esquerda da linha vertical (ausência de efeito), indicam diminuição do comportamento, e estudos localizados à direita da linha indicam aumento do comportamento. FLX= fluoxetina, # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas, ## indicam estudos realizados em fêmeas, ### indicam estudos realizados sem distinção do sexo. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges g.

APÊNDICE C - Gráfico em floresta dos estudos realizados em adultos para outros desfechos



Legenda: efeitos observados para cada estudo individual (quadrados cinzas), seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o CES (losango azul). Estudos localizados à esquerda da linha vertical (ausência de efeito), indicam diminuição do comportamento, e estudos localizados à direita da linha indicam aumento do comportamento. Todos os estudos realizaram tratamento com fluoxetina. # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas. *mean aggression score* = número de embates em teste de agressividade; *% time* = tempo de permanência no lado claro em teste de claro-escuro; *% climbing* = teste de escalada. SD = desvio padrão da média, N = tamanho amostral e g = Hedges g.

APÊNDICE D - Tabela de dados extraídos dos estudos que avaliaram o desfecho cópula/acasalamento

Autor, ano	g	95% IC	Métrica
Nazari, 2006	0,2736	[-0,6080; 1,1553]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,8666	[-0,0597; 1,7930]	Latência de corte
Nazari, 2006	18264	[0,7460; 2,9068]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,6194	[-0,2829; 1,5218]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,66	[-0,2458; 1,5657]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,4171	[-0,4712; 1,3054]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,2954	[-1,1778; 0,5871]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,4216	[-1,3101; 0,4670]	Latência de corte
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,8652	[-0,0610; 1,7913]	Latência de corte
Nazari, 2006	11022	[0,1464; 2,0580]	Latência de corte
Nazari, 2006	17422	[0,6785; 2,8058]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,3218	[-0,5617; 1,2054]	Latência de corte
Nazari, 2006	16168	[0,5772; 2,6565]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,6639	[-0,2422; 1,5700]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,1634	[-1,0417; 0,7150]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,1634	[-1,0417; 0,7150]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,1634	[-0,7150; 1,0417]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,4781	[-0,4138; 1,3701]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2686	[-0,6129; 1,1500]	Latência de cópula

Nazari, 2006	0,3533	[-0,5317; 1,2383]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,1277	[-1,0053; 0,7500]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,368	[-1,2537; 0,5177]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,1709	[-1,0495; 0,7076]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2229	[-0,6570; 1,1028]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,0646	[-0,9414; 0,8122]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2354	[-0,6449; 1,1157]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,7596	[-0,1554; 1,6747]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0808	[-0,7962; 0,9578]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,1381	[-0,7397; 1,0159]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,3008	[-1,1835; 0,5819]	Latência de cópula
Nazari, 2006	13354	[0,3447; 2,3262]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,9668	[-1,9049; -0,0287]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,3039	[-0,5789; 1,1867]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,1109	[-0,9882; 0,7665]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,5062	[-1,4000; 0,3876]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,4547	[-0,4358; 1,3452]	Duração de cópula
Nazari, 2006	12415	[0,2655; 2,2175]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,6856	[-0,2224; 1,5936]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,4949	[-1,3880; 0,3981]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,3298	[-1,2137; 0,5541]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-10177	[-1,9622; -0,0731]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,2482	[-1,1289; 0,6325]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,1116	[-0,7658; 0,9889]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,0643	[-0,9411; 0,8125]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-14440	[-2,4527; -0,4352]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,06	[-0,8168; 0,9367]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,7719	[-0,1443; 1,6882]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,3782	[-0,5080; 1,2644]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,2009	[-1,0802; 0,6783]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,1545	[-0,7236; 1,0327]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,3091	[-1,1921; 0,5739]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,1625	[-0,7158; 1,0409]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,5367	[-1,4326; 0,3593]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,7932	[-0,1252; 1,7117]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,6646	[-0,2415; 1,5708]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,5335	[-1,4293; 0,3622]	Latência de corte
Nazari, 2006	11294	[0,1698; 2,0890]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,3365	[-0,5477; 1,2207]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,2954	[-1,1778; 0,5871]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,2954	[-1,1778; 0,5871]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,4216	[-1,3101; 0,4670]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,07	[-0,8069; 0,9468]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,1569	[-0,7213; 1,0351]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,6855	[-0,2225; 1,5935]	Latência de corte

Nazari, 2006	0,1073	[-0,7700; 0,9846]	Latência de corte
Nazari, 2006	27913	[1,4874; 4,0952]	Latência de corte
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,1705	[-1,0490; 0,7080]	Latência de corte
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,1634	[-1,0417; 0,7150]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,4602	[-0,4306; 1,3511]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,0189	[-0,8954; 0,8577]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,3224	[-1,2060; 0,5611]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,2475	[-1,1282; 0,6332]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2581	[-0,6229; 1,1392]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2503	[-0,6305; 1,1311]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0193	[-0,8572; 0,8958]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,2502	[-1,1310; 0,6306]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,0362	[-0,9129; 0,8404]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,3441	[-0,5405; 1,2287]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0083	[-0,8683; 0,8848]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,0319	[-0,9085; 0,8447]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-24363	[-3,6521; -1,2205]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,1362	[-0,7416; 1,0140]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,7138	[-1,6244; 0,1969]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,5569	[-0,3406; 1,4543]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0795	[-0,7974; 0,9565]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,1963	[-0,6828; 1,0755]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,8075	[-0,1124; 1,7275]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,8423	[-0,0813; 1,7660]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,2259	[-1,1059; 0,6541]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,2048	[-0,6745; 1,0842]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,8624	[-1,7882; 0,0635]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,7336	[-1,6461; 0,1789]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,8564	[-1,7816; 0,0688]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,5142	[-0,3802; 1,4086]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,6027	[-0,2983; 1,5037]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,2632	[-0,6180; 1,1445]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,49	[-0,4027; 1,3828]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,1773	[-0,7014; 1,0560]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,6917	[-0,2169; 1,6003]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,5943	[-0,3060; 1,4946]	Duração de cópula
Nazari, 2006	14615	[0,4497; 2,4733]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,467	[-0,4243; 1,3582]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,5784	[-1,4775; 0,3206]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,6671	[-0,2393; 1,5735]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,8469	[-0,0772; 1,7711]	Latência de corte
Nazari, 2006	14871	[0,4708; 2,5033]	Latência de corte
Nazari, 2006	10380	[0,0908; 1,9852]	Latência de corte

Nazari, 2006	0,4775	[-0,4144; 1,3695]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,7534	[-0,1610; 1,6678]	Latência de corte
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,2676	[-1,1490; 0,6138]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,7385	[-1,6514; 0,1745]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,5484	[-0,3484; 1,4452]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,7139	[-0,1968; 1,6245]	Latência de corte
Nazari, 2006	10727	[0,1209; 2,0244]	Latência de corte
Nazari, 2006	0	[-0,8765; 0,8765]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,7346	[-0,1780; 1,6471]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,1469	[-1,0249; 0,7311]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,0844	[-0,9614; 0,7927]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,0934	[-0,9705; 0,7838]	Latência de corte
Nazari, 2006	-0,3513	[-1,2362; 0,5336]	Latência de corte
Nazari, 2006	0,9296	[-0,0040; 1,8632]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,1224	[-0,7551; 1,0000]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,6005	[-0,3003; 1,5013]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,1499	[-0,7281; 1,0280]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0555	[-0,8213; 0,9322]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0963	[-0,7809; 0,9734]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,1405	[-1,0183; 0,7374]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,1592	[-1,0375; 0,7190]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0165	[-0,8601; 0,8930]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,4002	[-0,4872; 1,2876]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,6958	[-0,2131; 1,6048]	Latência de cópula
Nazari, 2006	13831	[0,3846; 2,3817]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,0121	[-0,8644; 0,8887]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,6555	[-1,5609; 0,2499]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,4794	[-1,3715; 0,4126]	Latência de cópula
Nazari, 2006	0,2267	[-0,6533; 1,1067]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,3247	[-1,2083; 0,5590]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,2805	[-1,1624; 0,6014]	Latência de cópula
Nazari, 2006	-0,0356	[-0,9122; 0,8410]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,1211	[-0,9987; 0,7564]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,4235	[-0,4652; 1,3121]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,3935	[-0,4935; 1,2806]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,3955	[-1,2826; 0,4917]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,7757	[-1,6924; 0,1409]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,4198	[-1,3083; 0,4687]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,3286	[-1,2124; 0,5553]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,1558	[-1,0340; 0,7224]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,5383	[-1,4344; 0,3578]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,4143	[-1,3024; 0,4739]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,5527	[-1,4498; 0,3445]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,0488	[-0,9255; 0,8279]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,4146	[-0,4736; 1,3027]	Duração de cópula

Nazari, 2006	0,1756	[-0,7030; 1,0543]	Duração de cópula
Nazari, 2006	-0,1926	[-1,0716; 0,6865]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,6004	[-0,3004; 1,5012]	Duração de cópula
Nazari, 2006	0,7106	[-0,1997; 1,6209]	Duração de cópula
Nazari, 2011	0,9241	[-0,4202; 2,2685]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	21256	[0,4027; 3,8486]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	22466	[0,4757; 4,0176]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	11011	[-0,2848; 2,4871]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,964	[-0,3892; 2,3171]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,6063	[-0,6794; 1,8920]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,2957	[-0,9550; 1,5465]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	-0,0869	[-1,3275; 1,1536]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	0,8143	[-0,5073; 2,1359]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	15084	[0,0058; 3,0109]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	14976	[-0,0015; 2,9968]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	14864	[-0,0092; 2,9820]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	-0,5969	[-1,8813; 0,6874]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	-0,6998	[-2,0005; 0,6009]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	-0,1373	[-1,3793; 1,1047]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0,2572	[-0,9908; 1,5052]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	12434	[-0,1802; 2,6670]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	11153	[-0,2743; 2,5048]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	0,4577	[-0,8084; 1,7238]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	13017	[-0,1383; 2,7418]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	16073	[0,0726; 3,1421]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	0,2681	[-0,9807; 1,5168]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	0,0565	[-1,1835; 1,2965]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	0,5088	[-0,7634; 1,7811]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	19348	[0,2846; 3,5850]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	15316	[0,0216; 3,0417]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	13996	[-0,0692; 2,8684]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	-0,2051	[-1,4501; 1,0398]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,4029	[-0,8573; 1,6630]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	14508	[-0,0337; 2,9353]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	-0,084	[-1,3245; 1,1565]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	-0,019	[-1,2586; 1,2207]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	16121	[0,0758; 3,1484]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	0,9285	[-0,4168; 2,2738]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	0,9697	[-0,3848; 2,3241]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	23605	[0,5432; 4,1778]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	-0,8658	[-2,1978; 0,4662]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	-0,0673	[-1,3075; 1,1729]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0,1391	[-1,1030; 1,3811]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0,5857	[-0,6970; 1,8684]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	18462	[0,2285; 3,4639]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	19400	[0,2879; 3,5921]	<i>Circling</i>

Nazari, 2011	0,4689	[-0,7985; 1,7363]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	16175	[0,0794; 3,1557]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	14354	[-0,0444; 2,9151]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	-0,2605	[-1,5088; 0,9877]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	0,2613	[-0,9870; 1,5096]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	16943	[0,1302; 3,2585]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	11399	[-0,2560; 2,5358]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	15082	[0,0057; 3,0107]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	17407	[0,1605; 3,3209]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	-0,6359	[-1,9262; 0,6543]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,3755	[-0,8820; 1,6330]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	12644	[-0,1651; 2,6938]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	-0,164	[-1,4070; 1,0790]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	0,6472	[-0,6449; 1,9392]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	23195	[0,5190; 4,1200]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	0,2126	[-1,0328; 1,4580]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	12824	[-0,1521; 2,7169]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	21588	[0,4228; 3,8948]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	-0,7257	[-2,0309; 0,5795]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	-0,1925	[-1,4368; 1,0518]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0,7179	[-0,5859; 2,0217]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	-0,3668	[-1,6235; 0,8898]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	13252	[-0,1216; 2,7720]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	23590	[0,5423; 4,1757]	<i>Circling</i>
Nazari, 2011	0	[-1,2396; 1,2396]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	13084	[-0,1335; 2,7503]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	15233	[0,0160; 3,0307]	<i>Extruding</i>
Nazari, 2011	-12437	[-2,6673; 0,1800]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	0,5204	[-0,7533; 1,7941]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	22964	[0,5053; 4,0875]	<i>Decamping</i>
Nazari, 2011	-0,2126	[-1,4579; 1,0328]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	0,2647	[-0,9838; 1,5132]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	0,4494	[-0,8157; 1,7146]	<i>Orientation</i>
Nazari, 2011	12452	[-0,1789; 2,6692]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	14542	[-0,0314; 2,9397]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	0,8736	[-0,4600; 2,2072]	<i>Tapping</i>
Nazari, 2011	-0,3273	[-1,5805; 0,9259]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	-0,5274	[-1,8021; 0,7472]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	0,2592	[-0,9889; 1,5074]	<i>Wing Vibration</i>
Nazari, 2011	-0,1736	[-1,4171; 1,0698]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	0,3849	[-0,8735; 1,6433]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	0,7341	[-0,5726; 2,0408]	<i>Scissoring</i>
Nazari, 2011	-0,6055	[-1,8911; 0,6801]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0	[-1,2396; 1,2396]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0	[-1,2396; 1,2396]	<i>Licking</i>
Nazari, 2011	0,3431	[-0,9115; 1,5976]	<i>Circling</i>

Araujo, 2018	-1,2368	[-3,11;0,26]	Duração de cópula
Araujo, 2018	1,903982	[0,29;4,09]	Duração de cópula#
Araujo, 2018	-1,29477	[-3,19;0,21]	Duração do acasalamento
Araujo, 2018	0,542861	[-0,91;2,16]	Duração do acasalamento#
Araujo, 2018	0,884697	[-0,58;2,62]	Latência de cópula
Araujo, 2018	-2,77137	[-5,46; -0,92]	Latência de cópula#

Legenda: todos os estudos realizaram tratamento com fluoxetina. # indicam os estudos em que as moscas foram previamente estressadas. Orientation, tapping, wing vibration, scissoring, licking, circling, extruding e decampig = comportamentos específicos relacionados à cópula. g = Hedges g.