

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Getulio Nicola Bressan

**INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO MONOAMINÉRGICA SOBRE
COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS TÉRMICOS DE
*Drosophila melanogaster***

**Santa Maria, RS
2018**

Getulio Nicola Bressan

**INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO MONOAMINÉRGICA SOBRE
COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS TÉRMICOS DE
*Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roselei Fachinetto

Santa Maria, RS
2018

Bressan, Getulio
Influência da Modulação Monoaminérgica Sobre
Comportamentos Nociceptivos Térmicos de *Drosophila*
melanogaster / Getulio Bressan.- 2018.
46 p.; 30 cm

Orientadora: Roselei Fachinetto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

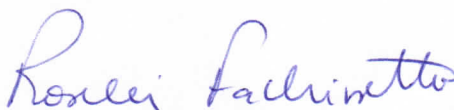
1. *Drosophila melanogaster* 2. Nocicepção 3.
Comportamento 4. Monoaminas 5. Manipulação Farmacológica
I. Fachinetto, Roselei II. Título.

Getulio Nicola Bressan

**INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO MONOAMINÉRGICA SOBRE
COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS TÉRMICOS DE
*Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 17 de agosto de 2018:



Roselei Fachinetto, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)



Robson Luiz Puntel, Dr. (UNIPAMPA) - Parecer

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que os ventos do destino em constante movimento conduzam-me ao destino traçado. Também agradeço ao Espiritismo por iluminar minha vida e mostrar a evolução espiritual.

Agradeço aos meus pais, Paulina Lourdes Nicola Bressan e Aldo Bressan, pelo amor incondicional, e por confiar e apoiar nesta caminhada. Agradeço aos meus irmãos Estevão Nicola Bressan e Glauber Nicola Bressan pelo amor de irmão, pela amizade e pelo apoio, devo a eles a proteção. Ao meu sobrinho Murilo Pereira Bressan que ilumina nossa família. Agradeço também a Angel Finato Bressan pelo incentivo e apoio.

Agradeço a minha orientadora, professora e fonte de inspiração, Prof.^a Roselei Fachinetto por ter acolhido-me em seu laboratório e ter confiado a mim o trabalho científico. Obrigado por toda troca de conhecimento e ensinamento.

Agradeço aos padrinhos de batismo e crisma, por ajudar e apoiar-me nesta caminhada. Obrigado Artemides Bressan, Lorena Nicola, Claiton Amaral. Em especial, agradeço a Leonice Bressan Amaral que me incentivou, confiou e amou.

Agradeço aos amigos do Laboratório Neurotox, por ter me aceitado como colega de laboratório, pela rotina do trabalho e pela troca de conhecimento. Obrigado Alcindo B., Ana Paula C., Bárbara K., Carol P., Catiúscia F., Elizete R., Janaína S., Jeane R., Camila P., Talita R., Janaína e Thamile. Em especial, a Juliane Reckziegel que ajudou-me na produção deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de incentivo à pesquisa (CNPq, FAPERGS e a CAPES) pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros.

Agradeço a UFSM, meu segundo lar, e a PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realizar este curso.

Por fim, agradeço as *Drosophila melanogaster* por permitir que este trabalho fosse realizado, são seres vivos de uma linda natureza.

Agradeço a todos que de alguma forma participam deste processo de construção da vida acadêmica.

Obrigado!

“ **Art. 205.** A educação, direito de todos e dever do Estado e da família, será promovida e incentivada com a colaboração da sociedade, visando ao pleno desenvolvimento da pessoa, seu preparo para o exercício da cidadania e sua qualificação para o trabalho.”

Constituição Federal de 1988

RESUMO

INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO MONOAMINÉRGICA SOBRE COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS TÉRMICOS DE *Drosophila melanogaster*

AUTOR: Getulio Nicola Bressan
ORIENTADORA: Roselei Fachinetto

A *Drosophila melanogaster* é um organismo-modelo usado para estudar mecanismos moleculares e funções dos genes e proteínas envolvidas na nocicepção. A dor nociceptiva tem a função de detectar estímulos nocivos aos tecidos e, assim, protegê-los de potenciais danos. Os mecanismos moleculares que atuam na detecção e condução do sinal nociceptivo envolvem canais iônicos, como os receptores de potencial transitório (TRP), e os neurotransmissores. Nas *D. melanogaster* o TRPA1 é um receptor ativado pelo calor e participa na indução de comportamentos nociceptivos térmicos como a esquiva ao calor nocivo. As monoaminas estão envolvidas em processos fisiológicos e comportamentais, como a dopamina que auxilia no controle da atividade locomotora e sensibilidade térmica. No entanto, pouco se sabe sobre a participação da serotonina em respostas comportamentais ao calor. Dessa forma, nós investigamos se as monoaminas participam na comunicação neuronal da via nociceptiva para o processamento e resposta aos estímulos nociceptivos térmicos. Neste estudo, investigou-se o envolvimento da depleção de monoaminas e, seletivamente, da dopamina e serotonina, através da manipulação farmacológica, sobre os comportamentos de nocicepção térmica de *D. melanogaster*. Para isso, as moscas foram tratadas com reserpina (10 µM, 30 µM, 100 µM e 300 µM), 3-Iodo-L-Tirosina (5 mg/mL e 10 mg/mL) e p-cloro-fenilalanina (5 mg/mL e 10 mg/mL), em seguida, foram submetidas aos testes comportamentais. A reserpina reduziu o perfil de tolerância térmica, ou seja, a resistência ao calor da *D. melanogaster*, bem como o comportamento da esquiva ao calor nocivo. Apesar de possuir um déficit locomotor induzido pela reserpina, haviam moscas que foram capazes de executar o comportamento de esquiva. Além da reserpina, o PCPA diminui a esquiva ao calor nocivo e a resistência ao calor à 41° C sem apresentar dano locomotor, sugerindo que a perda da habilidade de esquiva ao calor nocivo esteja relacionada com a diminuição da resistência ao calor em *D. melanogaster* por estes fármacos. Os dados do presente estudo sugerem que as monoaminas, particularmente a serotonina, estão associadas ao prejuízo na esquiva ao calor nocivo o qual pode estar relacionado à redução da resistência ao calor em *D. melanogaster*.

Palavras-chaves: Nocicepção. Monoaminas. Esquiva do Calor Nocivo. Tolerância Térmica. Reserpina. 3-Iodo-L-tirosina. p-Cloro-fenilalanina.

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE MONOAMINERGIC MODULATION ON THERMAL NOCICEPTIVE BEHAVIORS OF *Drosophila melanogaster*

AUTHOR: Getulio Nicola Bressan

ADVISOR: Roselei Fachinetto

Drosophila melanogaster is a model organism that has been used to research molecular mechanisms and the role of the genes and proteins involved in nociception, which have a function in detecting noxious stimuli and protecting the tissues from potential damage. Molecular mechanisms that act in detecting and conducting the nociceptive signal, involving ion channels such as Transient Receptor Potential (TRP) and neurotransmitters. In *D. melanogaster*, TRPA1 is a receptor activated by heat, participating in the induction of thermal nociceptive behavior as avoidance of noxious heat. Monoamines have been involved in physiological and behavioral processes, for example dopamine that supports the control of locomotor activity and temperature sensitivity. However, little is known about the participation of serotonin in behavioral responses to heat. Therefore, we investigated whether monoamines participate in the neuronal communication of the nociceptive pathway for the processing and response to thermal nociceptive stimuli. In this study, we researched the effects of the depletion of monoamines and, selectively, of dopamine and serotonin, through pharmacological manipulation, on thermal nociceptive behaviors in *D. melanogaster*. Flies were treated with reserpine (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M and 300 μ M), 3-Iodo-L-Tyrosine (5 mg and 10 mg) and p-chloro-phenylalanine (5 mg and 10 mg), then subjected to behavioral tests. Reserpine reduces the thermal tolerance profile and, thus, the heat resistance of *D. melanogaster*, as well as the avoidance of noxious heat. Whereas treated flies have a deficit in locomotion induced by reserpine, they are able to execute the avoidance behavior. Also, PCPA decreases avoidance of noxious heat and heat resistance at 41° C without impairing locomotion, suggesting that the impaired avoidance of noxious heat is related to the reduction of heat resistance in *D. melanogaster* by these drugs. These data suggest that monoamines, particularly serotonin, are associated with the impaired avoidance of noxious heat, which could be related to the reduction of heat resistance in *D. melanogaster*.

Keywords: Nociception. Monoamines. Avoidance of Noxious Heat. Thermal Tolerance. Reserpine. 3-Iodo-L-tyrosine. p-Chloro-phenylalanine.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Representação gráfica do comportamento de tolerância térmica da <i>D. melanogaster</i>	16
Figura 2 – Representação gráfica do comportamento de esquiva ao calor nocivo.....	16
Figura 3 – Transmissão sináptica dopaminérgica em <i>D. melanogaster</i>	18
Figura 4 – Transmissão sináptica serotoninérgica em <i>D. melanogaster</i>	19

Manuscrito:

Figure 1 – Effect of reserpine treatment at 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M and 300 μ M and vehicle (ethanol 1%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the <i>D. melanogaster</i>	37
Figure 2 – Effect of reserpine treatment at 30 μ M, 100 μ M and 300 μ M and its withdrawal on exploratory locomotion of the flies subjecting at different temperatures.....	358
Figure 3 – Effect of 3-I-T treatment at 5 mg/mL and 10 mg/mL and vehicle (sucrose 5%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the <i>D. melanogaster</i>	359
Figure 4 – Effect of PCPA treatment at 5 mg/mL and 10 mg/mL and vehicle (sucrose 5%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the <i>D. melanogaster</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

3-I-T	3-Iodo-L-Tirosina
5-HT	Serotonina
COMT	Catecol-O-metil transferase
DA	Dopamina
DSERT	Transportador de serotonina
DTRHn	Triptofano hidroxilase de <i>Drosophila</i> , do inglês <i>Drosophila</i> tryptophan hydroxylase
DTPHu	Triptofano-fenilalanina hidroxilase de <i>Drosophila</i> , do inglês <i>Drosophila</i> tryptophan-phenylalanine hydroxylase
MAO	Monoamina oxidase
PCPA	p-Cloro-fenilalanina
rDA	Receptor de dopamina
SNC	Sistema nervoso central
TRP	Receptor de potencial transitório, do inglês Transient Receptor Potential
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas, do inglês Vesicular Monoamine Transporter

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	11
2 INTRODUÇÃO	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 <i>D. melanogaster</i> como um organismo-modelo	13
3.2 Dor e nocicepção	14
3.3 Modelos de nocicepção em <i>D. melanogaster</i>	15
3.4 Sistema monoaminérgico	17
4 OBJETIVO (s):	20
4.1 Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5 RESULTADOS	21
3.1 Manuscrito	22
6 CONCLUSÃO	41
6.1 Conclusões Específicas	41
6.2 Conclusão Final	42
7 PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS	44

1 APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nessa dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito a ser submetido para publicação na revista *The Journal of Experimental Biology*, o qual se encontra no item **RESULTADOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas do manuscrito, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÕES** encontrado no final desta dissertação, apresenta comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

A dor ou a nocicepção é um estímulo sensorial que alerta o organismo para evitar um possível dano aos tecidos e órgãos, quando este estiver em uma situação de perigo ou em um ambiente hostil (WOOLF, 2010). Este sistema integra células nervosas no sistema nervoso periférico, chamadas de nociceptores, os quais detectam estímulos nociceptivos como o calor e conduzem-os ao sistema nervoso central (SNC) para serem processados e, assim, gerar uma resposta de retirada do ambiente nocivo. A nocicepção diferencia-se da dor, o qual é um processo subjetivo, por não envolver um fator emocional (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Dessa forma, esta definição imputa a nocicepção a insetos, já que estes não possuem um sistema nervoso tão complexo quanto os mamíferos.

A *D. melanogaster* é usada como um organismo-modelo para pesquisar os mecanismos moleculares, assim como as funções de proteínas e genes, envolvidos na detecção, transdução e condução do estímulo nociceptivo (GALLION et al., 2011; LEUNG et al., 2013; MILINKENICIUTE et al., 2012). Estudos já identificaram e caracterizaram, em *D. melanogaster*, receptores e canais iônicos como o receptor de potencial transitório (TRP, do inglês Transient Receptor Potential), que detectam o estímulo nociceptivo e aumentam a permeabilidade da membrana celular no nociceptor para íons catiônicos, a fim de estimulá-lo e, portanto, conduzir o sinal (BARBAGALLO; GARRITY, 2015). Além dos receptores, os neurotransmissores também estão envolvidos na condução do sinal nociceptivo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Em mamíferos, por exemplo, a serotonina e a noradrenalina estão envolvidas na modulação da dor à nível central no sistema nervoso (OSSIPOV et al., 2010).

Assim como nos mamíferos, os neurotransmissores participam na modulação de comportamentos na *D. melanogaster*. As monoaminas, como a dopamina (DA) e a serotonina (5-HT), estão envolvidas em diversos comportamentos como a atividade locomotora, sono e vigília, aprendizagem e memória (JOHNSON et al., 2011; PENDLETON et al., 2002; RIEMENSPERGER et al., 2011). Além disso, a dopamina também participa na modulação do comportamento de preferência térmica e na sensibilidade térmica em *D. melanogaster* (UENO et al., 2012; BANG et al., 2011).

Uma ferramenta para estudar a modulação dos comportamentos pelos neurotransmissores é a manipulação farmacológica, a qual pode ser usada para depletar farmacologicamente a síntese ou o armazenamento dos neurotransmissores (MANEV et al., 2003). Alguns estudos já usaram fármacos para manipular o sistema monoaminérgico na

mosca, como a reserpina, 3-iodo-L-tirosina (3-I-T) e para-cloro-fenilalanina (PCPA) (DASARI et al., 2007; GREER et al., 2005; WANG et al., 2011).

Considerando que os mecanismos relacionados à nocicepção em *D. melanogaster* ainda são poucos claros, é interessante estudar se a depleção das monoaminas, induzida farmacologicamente pela reserpina, 3-I-T e PCPA, está envolvida nos mecanismos moleculares que modulam comportamentos nociceptivos térmicos em *D. melanogaster*. Por conseguinte, a elucidação do envolvimento destes neurotransmissores poderia futuramente auxiliar na descoberta de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor ao usar como organismo-modelo a *D. melanogaster*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *D. melanogaster* como um organismo-modelo

A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca da fruta, é um inseto da ordem díptera utilizada como organismo-modelo em várias áreas da pesquisa experimental (BELLEN et al., 2010). Além de suas vantagens de uso, como fácil cultivo e ciclo de vida curto (aproximadamente 12 dias entre o depósito do ovo pela fêmea, o desenvolvimento da larva, a formação da pupa e a eclosão da mosca adulta), ela principalmente contribui para estudos preliminares a testes em roedores (NICHOLS, 2006). Desta forma, garante os princípios éticos preconizados na pesquisa científica ao diminuir o número de roedores utilizados em experimentos.

Ao relacionar o genoma da *D. melanogaster* com o de humanos, estima-se que mais de 60% dos genes humanos têm ortólogos funcionais nas *D. melanogaster*, e também que 75% dos genes das doenças humanas têm homólogos conservados na *D. melanogaster* (NICHOLS, 2006), o que torna-a um organismo-modelo de grande potencial para o estudo de mecanismos relacionados às doenças humanas como a doença de Parkinson, Alzheimer, câncer, entre outras (PANDEY; NICHOLS, 2011; UGUR et al., 2016).

Dados da literatura demonstram o uso da *D. melanogaster* em pesquisas de genes e proteínas que desempenham funções e que estão envolvidos nos mecanismos moleculares relacionados à transdução e transmissão da nocicepção em moscas (GALLIO et al., 2011; LEUNG et al., 2013; MILINKEVICIUTE et al., 2012.).

3.2 Dor e nocicepção

A dor pode ser classificada, basicamente, em três tipos: dor nociceptiva (nocicepção), inflamatória e neuropática (ou disfuncional). A dor inflamatória e neuropática são geradas por processos inflamatórios ou más adaptações de uma doença ou agressão ao nociceptor, respectivamente (WOOLF, 2010). Estes tipos de dor consistem em um desafio para o tratamento clínico, visto que doenças como câncer em fase terminal, fibromialgia e síndrome do intestino irritável são de difíceis tratamentos (COSTIGAN et al., 2009).

A dor nociceptiva ou nocicepção é um mecanismo sensorial fisiológico que serve como mecanismo de defesa frente a um agente nocivo como, por exemplo, o calor, o frio ou um objeto perfuro-cortante (WOOLF, 2010). Esses agentes nocivos são capazes de produzir estímulos nociceptivos, os quais são detectados por neurônios sensoriais especializados e que são chamados de nociceptores (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A nocicepção funciona como um sistema de alerta e, portanto, é essencial para a sobrevivência dos organismos, já que previne e evita um possível dano real ou potencial aos tecidos e órgãos. A nocicepção difere da dor pelo fato desta última ser uma experiência subjetiva e acrescida de um fator emocional (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

Em mamíferos, essas formas de dor envolvem mecanismos moleculares para a transdução do sinal nocivo pelos nociceptores, geração do potencial de ação, transmissão do sinal pelos neurônios aferentes até as regiões especializadas no processamento do sinal na medula espinhal ou no SNC e geração de uma resposta comportamental de fuga ou reflexo de retirada (JULIUS; BASBAUM, 2001). A abertura dos canais de cálcio, as ações dos neurotransmissores e mediadores químicos pró-inflamatórios são exemplos de mecanismos moleculares envolvidos neste processo (SCHOLZ; WOOLF, 2002; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

A transmissão da nocicepção envolve receptores sensoriais de potencial transitório (proveniente do inglês *Transient Receptor Potential*, TRP), os quais são ativados por estímulos nociceptivos (ZHENG, 2013). Algumas famílias de TRPs são proteínas de canais de cátions ou cálcio, que foram identificadas pela primeira vez em *D. melanogaster*, e são expressos na membrana celular dos nociceptores (MONTELL, 2011). Quando os TRPs são ativados, eles permitem a passagem de íons sódio e/ou cálcio para dentro do neurônio nociceptivo e inicia-se o processo de condução do estímulo nociceptivo. O estudo da função do canal TRP pode levar a avanços na terapia para o tratamento da dor (JULIUS, 2013).

Os TRPs foram conservados entre as espécies ao longo da evolução (KANG et al., 2010; KIM et al., 2010). Numa comparação entre os TRPs dos mamíferos e da *D. melanogaster*, as várias funções atribuídas a estes canais parecem ser muito semelhantes. A família TRP Vanilóide (TRPV) nos humanos e a família TRP Anquirina (TRPA) na *D. melanogaster* funcionam como termosensores (HAMADA et al., 2008; NEELY et al., 2011). *Painless* e o TRPA1 são alguns dos TRPs identificados como termosensores e seus envolvimento nos processos e mecanismos moleculares da nocicepção são estudados na *D. melanogaster*, no entanto, o gene *painless* não foi conservado nos vertebrados (TRACEY et al., 2003; XU et al., 2006).

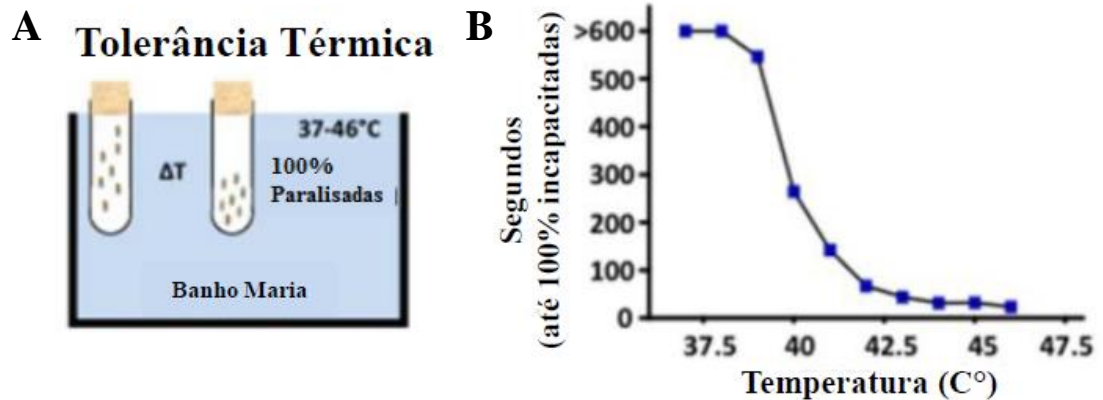
3.3 Modelos de nocicepção em *D. melanogaster*

A *D. melanogaster* está sendo usada como um organismo-modelo para pesquisas relacionadas à nocicepção. Estudos usam diversos modelos para investigar a função de proteínas envolvidas nos processos de transdução do estímulo nociceptivo químico, mecânico e térmico (LEUNG et al.; 2013; MILINKEVICIUTE et al., 2012.). Vários modelos comportamentais são empregados para pesquisar a nocicepção química, térmica e mecânica em *D. melanogaster*. Os pesquisadores utilizam instrumentos como filamentos de Von Frey para investigar estímulos mecânicos (KIM et al., 2012), agentes aversivos químicos para investigar estímulos químicos (KANG et al., 2010; KIM et al., 2010) e equipamentos como sondas, chapa quente e compartimentos providos de um gradiente de temperatura para pesquisar estímulos térmicos, como o calor e o frio (GALLIO et al., 2011; TRACEY, 2013; XU et al., 2006).

Dois modelos de comportamentos térmicos para empregar na investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na via neuronal, a qual é ativada pelo calor, são a tolerância térmica (Figura 1.) e a esquiva ao calor nocivo (Figura 2) (NEELY et al.; 2011). A tolerância térmica reflete um perfil de resposta à temperatura, ao representar o limiar de tempo no qual as moscas tornam-se incapazes de moverem-se por um tubo de vidro submerso em um banho eletrostático a uma temperatura específica (NEELY et al.; 2011).

A esquiva ao calor nocivo é um comportamento desenvolvido a fim de ser facilmente reproduzido, pois comportamentos que envolvem sonda e chapa quente são mais robustos e de reprodutibilidade lenta. Em uma descrição breve, o comportamento consiste em colocar 20 moscas em uma placa de Petri, a qual será colocada sobre um banho eletrostático à 46° C. Sobre a água à 46°C, a base da placa de Petri torna-se uma zona de perigo à mosca, pois essa

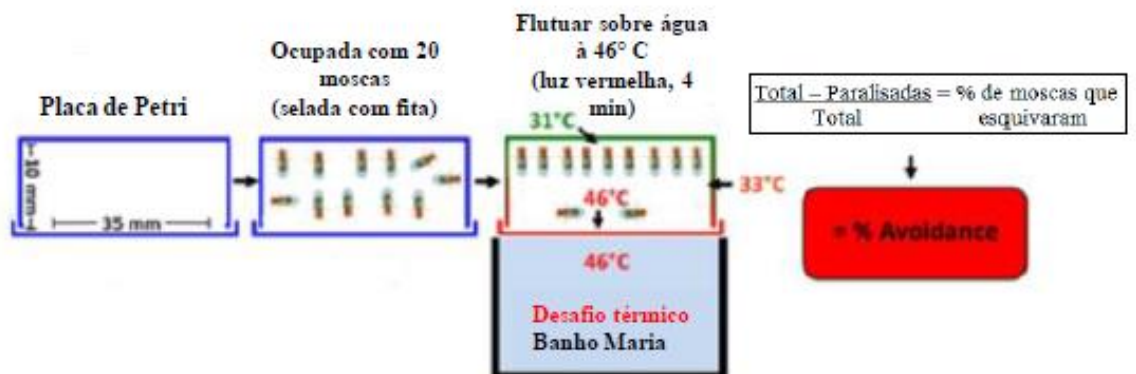
Figura 1. Representação gráfica do comportamento de tolerância térmica da *D. melanogaster* (A). Curva do limiar de tolerância térmica (B). (Adaptado de NEELY, 2011).



Fonte: (NELLY, 2011).

temperatura é altamente nociva como pode ser visualizado no perfil de resposta ao calor (teste da tolerância térmica). As laterais e no topo da placa de Petri torna-se uma zona tolerável (31 e 33° C, repectivamente) às moscas, que podem esquivar-se e fugir do calor nocivo. Moscas que perdem a capacidade de discriminar a zona nociva, acabam por explorar-lá e permanecem imobilizada sobre ela (NEELY et al., 2011).

Figura 2. Representação gráfica do comportamento de esquiva ao calor nocivo. (Adaptado de NEELY, 2011).



Fonte: (NELLY, 2011).

3.4 Sistema monoaminérgico

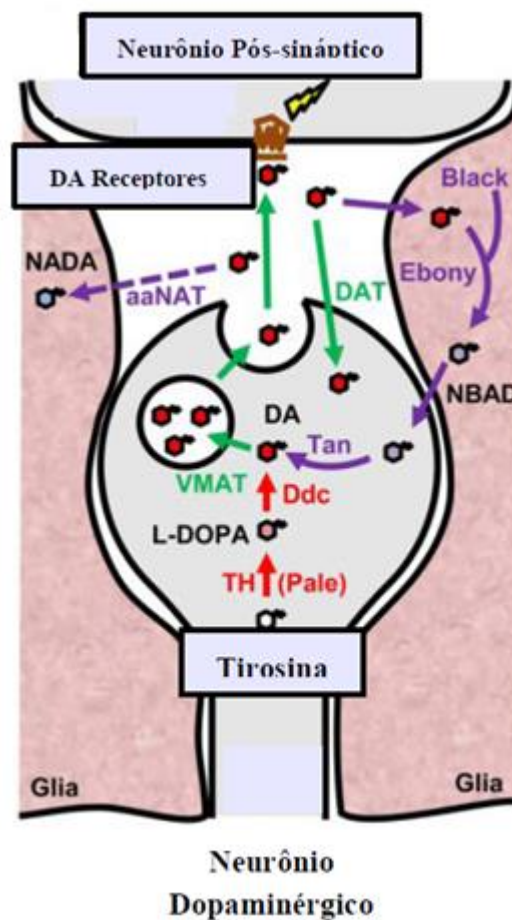
Assim como em humanos, os processamentos de informações relacionados com os sentidos sensoriais, nociceção e outros comportamentos complexos são conduzidos para o SNC e controlados por neurotransmissores na *D. melanogaster*. Apesar do SNC destes organismos serem estruturalmente diferentes, eles compartilham propriedades químicas, genéticas e celulares (UGUR et al., 2016). A dopamina e serotonina são classificadas como monoaminas e juntamente com o ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato e acetilcolina são exemplos de neurotransmissores em comum entre estes organismos. No entanto, a octopamina na *D. melanogaster* é um neurotransmissor que apresenta funções semelhantes às da noradrenalina nos humanos (MONASTIRIOTI, 1999; NICHOLS, 2006).

A DA é um neurotransmissor catecolaminérgico, que participa na modulação de comportamentos nos mamíferos e na *D. melanogaster*. Na *D. melanogaster* a dopamina possui funções bem definidas na regulação de vários comportamentos como, por exemplo, a coordenação e atividade locomotora, aprendizagem e memória, cortejo, estado de alerta/sono e agressão (PENDLETON et al., 2002; RIEMENSPERGER et al., 2011). Além destes comportamentos, a sinalização da dopamina contribui para a percepção de alterações na temperatura ambiental, na preferência térmica corporal e na sensibilidade térmica da *D. melanogaster* (UENO et al., 2012; BANG et al., 2011). Em mamíferos, estudos demonstraram a participação das monoaminas na modulação a nível central da dor, como a serotonina e noradrenalina, as quais possuem características anti-nociceptivas em vias eferentes inibitórias específicas (OSSIPOV et al., 2010).

Estudos com a *D. melanogaster* podem elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, pois a mosca possui igualmente genes da síntese, transporte, liberação, metabolismo e a transdução de sinais (receptores e cascatas de sinalização). A síntese de DA inicia-se pela conversão do aminoácido tirosina em L-Dopa pela ação da enzima Tirosina Hidroxilase. O segundo passo é a conversão da L-Dopa em dopamina, pela enzima Dopa Descarboxilase. Após a DA ser sintetizada no citoplasma, ela é transportada para dentro das vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas (DVMAT). Após a DA ser liberada na fenda sináptica, ela liga-se nos seus receptores localizados na célula pós-sináptica. O efeito gerado pela dopamina vai depender em qual receptor pós-sináptico de dopamina (rDA) se ligar, como, por exemplo, o rDA1 ou rDA2. Após a sinalização, a DA deve ser retirada da fenda sináptica para manter os níveis adequados de sinalização no cérebro. Um dos mecanismos

para retirar a DA é enviá-la de volta ao neurônio pré-sináptico através do transportador de DA (DAT). Outra forma é metabolizar a dopamina em compostos inativos através de enzimas como a Monoamina oxidase (MAO) e a Catecol-O-metil transferase (COMT) em mamíferos, ou pela Dopamina N-acetiltransferase na *D. melanogaster* (Figura 3.) (MARTIN; KRANTZ, 2014; YAMAMOTO; SETO, 2014).

Figura 3. Transmissão sináptica dopaminérgica em *D. melanogaster*. (Adaptado de YAMAMOTO; SETO, 2014). (aaNAT =N-acetiltransferase; DA = dopamina; DAT = transportador de dopamina; Ddc = dopa descaboxilase; TH = tirosina hidroxilase; VMAT = transportador vesicular de monoaminas;).

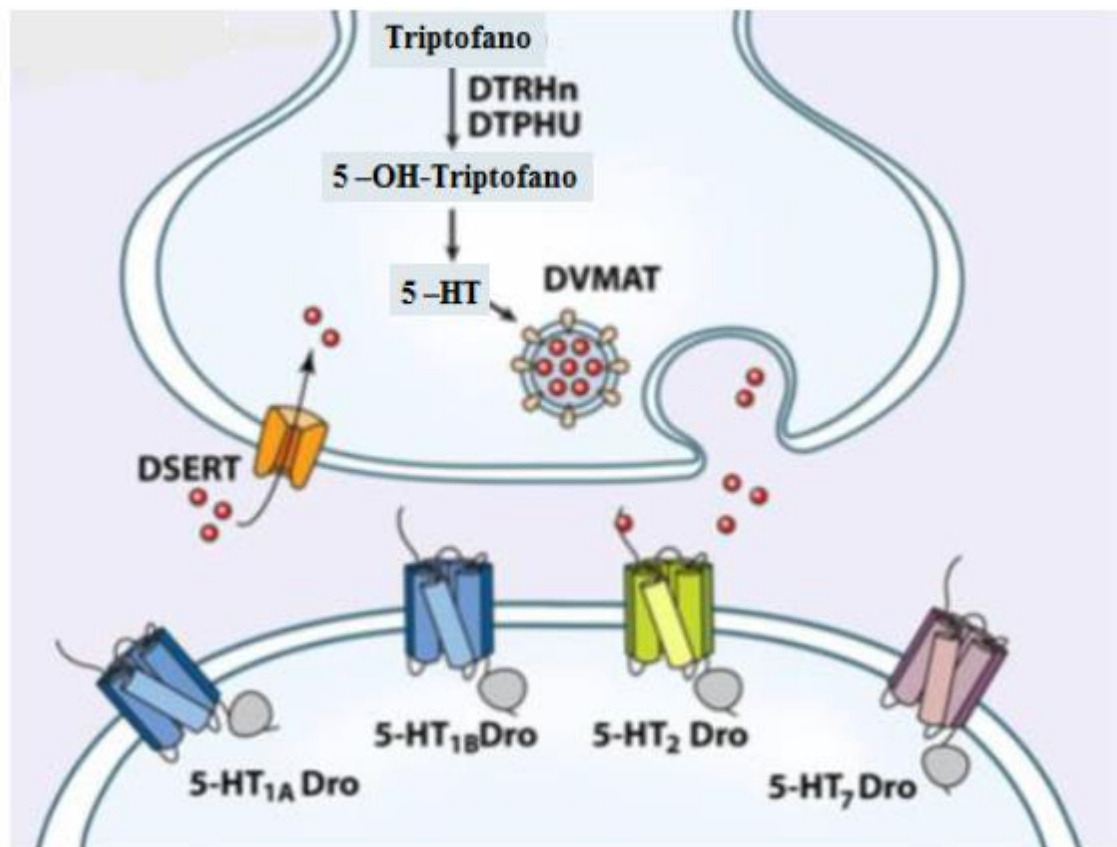


Fonte: (YAMAMOTO; SETO, 2014)

A transmissão sináptica serotonérgica nas moscas assemelha-se com a dos mamíferos. A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, o qual é transportado para o neurônio por um transportador de aminoácido. A enzima que hidroxilisa o triptofano em L-5-hidroxitriptofano é denominada triptofano hidroxilase. Como nos mamíferos, a *D. melanogaster* também possui duas isoformas desta enzima, a triptofano hidroxilase de

Drosophila (DTRHn, hidroxila o triptofano) e triptofano-fenilalanina hidroxilase de *Drosophila* (DTPHu, hidroxila o triptofano e a fenilalanina). A L-5-hidroxitriptofano é descaboxilada pela enzima denominada L-aminoácido aromático descarboxilase, formando a 5-HT (5-hidroxitri-triptamina). A serotonina recém sintetizada é armazenada nas vesículas sinápticas pelo mesmo DVMAT, a mesma transportadora vesicular de dopamina. Ao ser estimulada, o neurônio serotoninérgico libera a serotonina na fenda sináptica a qual pode ligar-se em 4 tipos de receptores: 5-HT_{1A}Dro, 5-HT_{1B}Dro, 5-HT₂Dro e 5-HT₇Dro. Após agir nos receptores homólogos aos dos mamíferos estrutural, farmacologica e fisiologicamente, a serotonina pode ser removida da fenda sináptica pelo transportador de serotonina (DSERT), o qual também é homólogo (CURRAN; CHALASANI, 2012) (Figura 4).

Figura 4. Transmissão sináptica serotoninérgica em *D. melanogaster*. (Adaptado de CURRAN; CHALASANI, 2012). (DTRHn e DTPHU = isoformas da triptofano hidroxilase de *Drosophila*; 5-HT = serotonina, 5-OH-Tryptophan = L-5-hidroxitriptofano; DVMAT = transportador vesicular de monoaminas de *Drosophila*; DSERT = transportador de serotonina de *Drosophila*.)



Fonte: (CURRAN; CHALASANI, 2012)

O tratamento farmacológico consiste numa estratégia experimental que permite investigar os comportamentos regulados pelos neurotransmissores e os mecanismos moleculares envolvidos nos processos comportamentais. Desse modo, a manipulação farmacológica pode ser usada para alterar os níveis de neurotransmissores através da diminuição de sua síntese ou interferir na resposta celular através do antagonismo de seus receptores (MANEV et al., 2003). Exemplos de fármacos usados para manipular o sistema monoaminérgico nas moscas são a reserpina, a 3-I-T e a PCPA.

A reserpina é um fármaco usado para diminuir a liberação e sinalização das monoaminas endógenas, pois bloqueia o VMAT (SCHULDINER et al., 1993). Portanto, impede que as monoaminas sejam armazenadas nas vesículas sinápticas. A 3-I-T e a PCPA são drogas usadas para diminuir a síntese de DA (inibe a enzima tirosina hidroxilase) e de 5-HT (inibe a enzima triptofano hidroxilase), respectivamente (KENNETH; ANDALBERT, 1966; NESS et al., 1996). Estas drogas produzem efeitos na *D. melanogaster* como nos mamíferos e são usadas para inibir a sinalização de monoaminas *in vivo* (DASARI et al., 2007; GREER et al., 2005; WANG et al., 2011).

4 OBJETIVO (s):

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica do sistema monoaminérgico sobre comportamentos de nocicepção térmica em *D. melanogaster*.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da reserpina sobre comportamentos de nocicepção térmica em *D. melanogaster*;
- Investigar a influência do calor na atividade locomotora *D. melanogaster* tratadas com reserpina;
- Investigar o efeito da 3-I-T e da PCPA sobre comportamentos de nocicepção térmica em *D. melanogaster*.

5 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O **manuscrito** está disposto na forma em que será submetido para publicação na revista **The Journal of Experimental Biology**.

5.1 Manuscrito

RESERPINA E PCPA REDUZEM A RESISTÊNCIA AO CALOR E A ESQUIVA AO CALOR NOCIVO EM *Drosophila melanogaster*

Manuscrito

RESERPINE AND PCPA REDUCE HEAT RESISTANCE AND AVOIDANCE OF NOXIOUS HEAT IN *Drosophila melanogaster*

Getulio Nicola Bressan ; Juliane Reckziegel; Roselei Fachinetto.

RESERPINE AND PCPA REDUCE HEAT RESISTANCE AND AVOIDANCE OF NOXIOUS HEAT IN *Drosophila melanogaster*

Getulio Nicola Bressan^a; Juliane Reckziegel^c; Roselei Fachinetto^{a, b, *}

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^b*Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^c*Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

Corresponding author:

Dr^a. Roselei Fachinetto

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: x21-55-3220 8096

Fax: x21-55-3220 8241

e-mail: roseleirf@gmail.com

Abstract

Drosophila melanogaster is a model organism to study molecular mechanisms and the role of the genes and proteins involved in thermal nociception. In *D. melanogaster*, monoamines, as dopamine, have been involved on temperature preference behavior. Therefore, we investigated whether the monoamines, particularly dopamine and serotonin, participate in the response to thermal nociceptive stimuli in the *D. melanogaster* through of pharmacological manipulation. Flies were treated with reserpine (inhibitor of vesicular monoamines transporter), 3-Iodo-*L*-tyrosine (3-I-T, inhibitor of tyrosine hydroxylase) and p-Chloro-phenylalanine (PCPA, inhibitor of tryptophan hydroxylase) (5 mg/mL and 10 mg/mL); then, they were subjected to thermal nociceptive behaviors. The reserpine reduces the thermal tolerance profile of the *D. melanogaster*, as well as the avoidance of noxious heat. Although treated flies have a deficit locomotor induced by reserpine, there are flies can execute the avoidance behavior. Also, PCPA, but not 3-I-T, decreased the avoidance of noxious heat and heat resistance at 41° C without impairing locomotion. These data suggest that monoamines, particularly serotonin, are associated to the impaired avoidance of the noxious heat which could be related to the reduction of the heat resistance in the *D. melanogaster*.

Keyword: Thermal tolerance. Monoamines. Serotonin. Dopamine. Nociceptive behavior.

Introduction

Pain or nociception is a sensorial signal that alerts the organism to prevent it from a potential damage to the tissues, when in a dangerous situation or hostile environmental (Woolf, 2010). This system integrates nervous cell in peripheral nervous system designated as nociceptors, which detects nociceptive stimuli, like heat, conducting to central nervous system to be processed and, thus, generate a response of withdrawal from noxious environmental (Dubin and Patapoutian, 2010). In mammals, the integration of nociceptive pathways also depends of the participation of neurotransmitters (Scholz and Woolf, 2002).

D. melanogaster have been used as a model organism to investigate the molecular mechanisms as well as the function of proteins and genes involved in detection, transduction and conduction of the nociceptive stimuli (Gallio et al., 2011; Leung et al., 2013; Milinkeviciute et al., 2012). In *D. melanogaster*, studies have identified and characterized receptors and ion channels like TRPs which are involved in detecting the stimuli and increase the membrane permeability of the nociceptor to cationic ions (Kang et al., 2010; Kang et al., 2012; Kim et al., 2012; Tracey et al., 2003). Besides of the receptors, the neurotransmitters also are involved in the conduction of nociceptive signal. In mammals, for example, the serotonin and noradrenaline participate in the modulation of the pain at central level and other behavioral responses (Ossipov et al., 2010; Viguier et al., 2013). As well as in mammals, the neurotransmitters participate in the modulation of the behaviors in *D. melanogaster* (Monastirioti, 1999; Nichols, 2006). Particularly, dopamine and serotonin are monoamines involved in several behaviors like locomotor activity (Pendleton et al., 2002), sleep and arousal (Riemensperger et al., 2011) and learning and memory (Johnson et al., 2011). Moreover, dopamine modulates the temperature preference behavior and temperature sensitivity in *D. melanogaster* (Bang et al., 2011; Ueno et al., 2012). However, in *D. melanogaster* it is not known if serotonin is involved in behavioral responses to heat. The elucidation of the involvement of these neurotransmitters could help in the discovery of new therapeutic strategies for the treatment of pain by using *D. melanogaster* as organism model.

Considering the mechanism related to nociception in *D. melanogaster* remains unclear, it is interesting to study whether the depletion of the monoamines are involved in the modulation of thermal nociceptive behavior. Here, we treat flies with reserpine (inhibitor of vesicular monoamines transporter), 3-I-T (inhibitor of tyrosine hydroxylase) and PCPA (inhibitor of tryptophan hydroxylase) to deplete monoamines and subjected them in thermal tolerance and avoidance of noxious heat behavior.

Materials and methods

Drosophila melanogaster

Wild-type *D. melanogaster* (Canton-S) were maintained in an incubator with controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (60%) on a 12h light/dark cycle. Flies were reproduced in glasses containing cornmeal food [sucrose (8.9%), salt (0.66%), wheat germ (8.9%), dry milk (1.33%), medium and large corn flour (44.54% and 35.63% respectively)]. For all behavioral experiments it was used adult flies with 1-4-days-old after emergences which were anesthetized on ice for distributing to treatment groups.

Drug Treatment

D. melanogaster were treated using agar medium treatment (1% agar, 2% sucrose, 1% dry milk, 1% yeast and 0.08% Nipagim®) for 72-hours with reserpine at the concentrations of 0, 10, 30, 100 and 300 μM and sucrose medium treatment (5% sucrose and 1% yeast) for 48-hours with either 3-I-T or PCPA at 5 mg/mL and 10 mg/mL, respectively. These drugs (all from Sigma-Aldrich®) either deplete biogenic monoamines (reserpine) or inhibit the synthesis of dopamine (3-I-T) and serotonin (PCPA). The vehicle (control group) for reserpine was 1% of ethanol and for both 3-I-T e PCPA was water. For behavioral assay 72 h after withdrawn of reserpine treatment, agar medium was made without reserpine.

Behavioral experiments

Thermal Tolerance

The thermal tolerance of *D. melanogaster* was performed according to Neely et al., 2011 . Briefly, ten flies were placed in the test tubes covered with sponge, and all tubes were submerged in a water bath at temperature ranging ($38^\circ\text{C} - 46^\circ\text{C}$ with $+1^\circ\text{C}$). The time at which all *D. melanogaster* are immobilized at the bottom of the tube was quantified to each temperature. The maximum time to all *D. melanogaster* paralyze was 10 min. In the temperatures at which *D. melanogaster* did not paralyze until 10 minutes, considered > 600 seconds time for paralyzing flies.

Negative geotaxis

Climbing behavior was carried out according to Sudati et al., 2013. Briefly, ten *D. melanogaster* were placed in a transparent plastic tube (95 mm X 27 mm) with a marked line on 6 cm of bottom to top. In a vertical position on support and under a lamp, all tubes (each group) were tapped gently on table for the flies drop to the bottom and recordings were performed to quantify the number of flies that they crossed the line until six seconds.

Open-Field Test

Spontaneous locomotor activity was performed according to Figueira et al., 2017. One treated *D. melanogaster* was placed in a Petry dish (95 mm in diameter and 2 mm in height) which was put on a white paper and under a camera. After 10 minutes for recovering of the anesthesia with ice, recordings of the flies walking freely throughout apparatus during 5 min were made for quantification (ANY-MAZE). Number of crossings was counted as a result of locomotor activity. In the same way, the apparatus was set on a support in a water bath at 38°C and 43°C to performing this behavioral experiment under higher temperature.

Avoidance of Noxious Heat

The avoidance of noxious heat was performed according to Neely et al., 2011. Briefly, twenty treated *D. melanogaster* were placed into a Petri dish (35 mm X 10 mm) sealed with a scotch tape and rested for 30 min in the dark. The glass chambers were floated on a water bath at 46°C and, therefore, the bottom of the dish heated to 46°C over 15 seconds making a noxious zone and the top and inner top of the dish a sub-noxious zone (31°C and 33°C, respectively) for avoiding to noxious heat. After four minutes, the chamber was retired of the water bath and immobilized flies on the bottom were recorded. The percentage of avoidance was calculated as described by Nelly et al 2011, following the equation: $(\text{total flies} - \text{immobilized flies}) / (\text{total flies})$. Assays were performed in the dark and we used a red lamp for seeing it.

Statistical analysis

All results of the behavioral tests were analyzed by ANOVA followed by post-test Tukey test when appropriated. All values were expressed as mean \pm SEM. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*).

Results

Reserpine decreased thermal tolerance

Reserpine is an inhibitor of vesicular monoamine transporter (VMAT) by depleting the storages of biogenic amines such as dopamine, octopamine and serotonin in *D. melanogaster* (Greer et al., 2005; Schuldiner et al., 1993). We used reserpine for depleting the storages of the monoamines to evaluate its effect on temperature-response profiles. Reserpine, at a concentration of 300 μ M, decreased the threshold of thermal tolerance of the *D. melanogaster* (Fig. 1 A-B), and at 41° C appeared to be the temperature at which the flies became more rapidly immobilized (Fig. 1 C). During the test of thermal tolerance to determining the temperature-responses profiles, we observed that at 40°C anyone of *D. melanogaster* of the control and 10 μ M reserpine group was immobilized until 600 seconds. However, at concentrations of reserpine higher than 30 μ M it was recorded a number of flies immobilized at the bottom of test tube. Reserpine at concentrations of 100 and 300 μ M caused a significant immobilization of *D. melanogaster* in relation of control (Fig. 1 D). These results suggest that reserpine decrease the heat resistance of the *D. melanogaster*.

Reserpine affects the avoidance of noxious heat and locomotor activity of climbing

As reserpine decreased heat resistance of the *D. melanogaster* and the evidence support a play role of dopamine in temperature sensitivity (Bang et al., 2011; Ueno et al., 2012), we decided to study whether reserpine alters the behavior of avoidance of the noxious heat. Reserpine at concentrations higher than 100 μ M decreased the capacity of flies to avoid of noxious heat (Fig. 1 E). However, as this behavioral experiment requires locomotor ability, we performed the negative geotaxis assay. Reserpine at concentration higher than 30 μ M decreased the locomotor activity of climbing (Fig. 1 F). Considering the results of negative

geotaxis, we can not affirm that the decreased avoidance is affected by reserpine since the locomotion of the flies may be impaired by this drug.

Reserpine decrease exploratory locomotion and its withdrawal causes locomotor hyperactivity

Monoamines, such as dopamine, modulate locomotion in *D. melanogaster*. Therefore its depletion leads to a decrease in locomotor activity (Pendleton et al., 2002; Pendleton et al., 2005). To investigate if even with impaired locomotion the flies can avoid of heat noxious, we decided to investigate the exploratory locomotor behavior at temperature higher than environmental temperature. Thus, this behavioral experiment was performed at environmental temperature (25°C), 38° C and 43 °C. After 72h of treatment, reserpine decreased the locomotion in all treated groups at 25°C, and higher temperatures increased locomotion in the control group, but this did not occur in the treated groups (Fig 2-A). Also, we decided to investigate the effect of reserpine 24h and 48h after its withdrawal. After 24h of withdrawal, reserpine at 30 µM increased significantly the crossings in higher temperatures (Fig. 2-B). After 48 h of the withdrawal, reserpine at 100 µM increased the number of crossing at 25°C in relation to control (Fig. 2-C.), and at higher temperatures, there was an increase in the number of crossings in the group treated with 300 µM.

PCPA, but not 3-I-T, decreased the heat resistance at 40°C and the avoidance of noxious heat

As reserpine reduces the storage of all monoamines, we decided to investigate the effect of 3-I-T (inhibitor of tyrosine hydroxylase) and PCPA (inhibitor of tryptophan hydroxylase) for depleting the synthesis of dopamine and serotonin, respectively, and the flies were subject to the thermal nociceptive behaviors (Dasari et al., 2007; Wang et al., 2011). Both drugs did not alter the temperature-response profile (Fig. 3 A-C and 4 A-C). 3-I-T treatment did not alter any nociceptive behavior (Fig 3). On the other hand, flies treated with PCPA at 10 mg/mL become incapacitated at 40°C (Fig. 4. D). Furthermore, another effect of PCPA at 5 mg/mL was on decreasing of the avoidance of noxious heat and this occurs without impairing locomotion (Fig. 4 E and F).

Discussion

Biogenic amines modulate a number of complex behaviors in *D. melanogaster*, such as sleep and arousal, locomotor activity, fertility, learning and memory (Blenau and Baumann, 2001; Chen et al., 2013; Yellman et al., 1997). Here, we investigated if monoaminergic modulation by pharmacological agents alters thermal nociceptive behaviors in the *D. melanogaster*. Our results demonstrate that reserpine reduces the thermal tolerance profile of the *D. melanogaster*, as well as the avoidance of noxious heat. Furthermore, PCPA, but not 3-I-T, decreased the avoidance of noxious heat and heat resistance at 41° C.

Firstly, we used reserpine for blocking the package of monoamines in synaptic vesicle of the monoaminergic neurons for investigating the effect of drug on temperature-response profile (thermal tolerance) in flies. Reserpine reduced the thermal tolerance profile in *D. melanogaster*, i.e., reserpine-treated flies were immobilized more suddenly than flies which have a normal profile. We observed that the major difference, comparing the times among reserpine-treated and non-treated flies, was sight at the temperature of 41° C. During the test, we verified that reserpine-treated flies at 40° C became immobilized since at this temperature the normal profile of the flies is to continue moving even in a time higher than 10 min. Considering that reserpine appears to decrease the resistance of the heat it is suggested that monoamines could be involved in heat resistance of the *D. melanogaster*.

Studies have demonstrated the involvement of the Transient Receptor Potential (TRPs) in nociceptive behaviors of *D. melanogaster* (Guo et al., 2014; Hamada et al., 2008; Kang et al., 2010; Kim et al., 2012; Ni et al., 2013; Tracey et al., 2003). In flies, TPRA1 is a receptor activated for heat and, therefore, regulates thermal nociceptive behaviors in flies been required, for example, for the behavior of avoiding of the heat (Neely et al., 2011). Some studies have demonstrated that the monoamines, like dopamine, modulates the temperature sensitivity, temperature-preference behavior and serotonin modulate thermal-related behavior of memory (Bang et al., 2011; Sitaraman et al., 2008; Ueno et al., 2012). For studding the involvement of the monoamines in the thermal nociceptive behavior, we investigate whether reserpine which depletes the package of monoamines also affects the avoidance of noxious heat. Our results demonstrated reserpine reduces the avoidance of noxious heat. It is known this nociceptive-response behavior requires an intact locomotor coordination for avoiding the heat, but this drug caused a locomotor deficit in flies at the same concentrations that decrease the avoidance of noxious heat. However, we noticed that even flies treated with 30 µM of reserpine showed an impaired locomotion and did not lose the capability of escaping from the

noxious heat. Even almost flies treated with concentrations higher than 100 μM appeared impaired locomotion, more than 50% of flies can avoid of noxious heat. Therefore, we suggest that the decreased avoidance is not by influenced only for impaired locomotion, but also by decreasing the resistance of heat.

To test whether, even with an impaired locomotion, flies can move more in a hostile environment and, thus, it can avoid of heat, we decided to perform an exploratory locomotor behavior at three temperatures: at environmental temperature (25° C), 38° C and 43° C. Beside performing in different temperatures, we also test the effect of withdrawal reserpine at 24 and 48 hours after treatment. Treatment with reserpine during 72 h, control flies presented an increased exploratory locomotion at higher temperature and, this did not occur significantly in reserpine-treated flies, but it is possible to observe a tendency to increasing the number of crossings. We also noticed that after reserpine withdrawal, besides recovering the locomotion, flies increased activity locomotor when they were at environmental temperature (100 μM group at 48h) and higher temperatures (30 μM group at 24h and 300 μM group at 48h). These results suggest that although flies have an impaired locomotion, they can move away from a hostile environmental. Thus, we suggests that the increased locomotion following reserpine withdrawal may be related to sensitization of monoamine-related receptors, and this behavior appears in flies that were treated whit low concentrations of reserpine at 24h and high concentrations in 48h.

As monoamines seem to be involved in heat resistance and avoiding of heat, we decided to investigate which of them could participate in these nociceptive-response behaviors. We used the 3-I-T and PCPA to deplete the synthesis of the dopamine and serotonin, respectively. Although not altering the temperature-response profile, PCPA reduces the heat resistance at 40° C of the *D. melanogaster* and this was not affected by 3-I-T. Moreover, PCPA, but not 3-I-T, also decreased the avoidance of noxious heat and both drugs did not alter the locomotor coordination. As the depleting of the synthesis of the dopamine does not alter any of temperature-response behaviors, we suggest that the serotonin may be involved in the modulation of these behaviors.

In conclusion, these data demonstrate that both reserpine and PCPA reduce the heat resistance and the avoidance of noxious heat in *D. melanogaster*, which are required behaviors for flies when they are thermal noxious environment. Moreover, the avoiding do not seen only spoiled by impaired locomotion, but also by decreasing of heat resistance. Then, the present data suggest a possible involvement of the monoamines, particularly the serotonin, on these thermal nociceptive behaviors of the *D. melanogaster*.

Acknowledgments

This study was supported by CAPES/PROEX (88887.285978/2018-00), CNPq and FAPERGS. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS) (PqG - 2080-2551/13-5-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal - 475210/2013-1).

References

- Bang, S., Hyun, S., Hong, S.-T., Kang, J., Jeong, K., Park, J.-J., Choe, J. and Chung, J.** (2011). Dopamine Signalling in Mushroom Bodies Regulates Temperature-Preference Behaviour in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **7**, e1001346.
- Blenau, W. and Baumann, A.** (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **48**, 13–38.
- Chen, A., Ng, F., Lebestky, T., Grygoruk, A., Djapri, C., Lawal, H. O., Zaveri, H. A., Mehanzel, F., Najibi, R., Seidman, G., et al.** (2013). Dispensable, redundant, complementary, and cooperative roles of dopamine, octopamine, and serotonin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **193**, 159–176.
- Dasari, S., Viele, K., Turner, A. C. and Cooper, R. L.** (2007). Influence of PCPA and MDMA (ecstasy) on physiology, development and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 424–438.
- Dubin, A. E. and Patapoutian, A.** (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* **120**, 3760–72.
- Figueira, F. H., de Quadros Oliveira, N., de Aguiar, L. M., Escarrone, A. L., Primel, E. G., Barros, D. M. and da Rosa, C. E.** (2017). Exposure to atrazine alters behaviour and disrupts the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **202**, 94–102.
- Gallio, M., Ofstad, T. A., Macpherson, L. J., Wang, J. W. and Zuker, C. S.** (2011). The coding of temperature in the *Drosophila* brain. *Cell* **144**, 614–624.
- Greer, C. L., Grygoruk, A., Patton, D. E., Ley, B., Romero-Calderon, R., Chang, H. Y., Houshyar, R., Bainton, R. J., DiAntonio, A. and Krantz, D. E.** (2005). A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine.

- J. Neurobiol.* **64**, 239–258.
- Guo, Y., Wang, Y., Wang, Q. and Wang, Z.** (2014). The role of PPK26 in *Drosophila* larval mechanical nociception. *Cell Rep.* **9**, 1183–90.
- Hamada, F. N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S. R., Ghezzi, A., Jegla, T. J. and Garrity, P. A.** (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* **454**, 217–220.
- Johnson, O., Becnel, J. and Nichols, C. D.** (2011). Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience* **192**, 372–381.
- Kang, K., Pulver, S. R., Panzano, V. C., Chang, E. C., Griffith, L. C., Theobald, D. L. and Garrity, P. A.** (2010). Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature* **464**, 597–600.
- Kang, K., Panzano, V. C., Chang, E. C., Ni, L., Dainis, A. M., Jenkins, A. M., Regna, K., Muskavitch, M. A. T. and Garrity, P. A.** (2012). Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*. *Nature* **481**, 76–80.
- Kim, S. E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B. and Patapoutian, A.** (2012). The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception. *Nature* **483**, 209–212.
- Leung, C., Wilson, Y., Khuong, T. M. and Neely, G. G.** (2013). Fruit flies as a powerful model to drive or validate pain genomics efforts. *Pharmacogenomics* **14**, 1879–1887.
- Milinkeviciute, G., Gentile, C. and Neely, G. G.** (2012). *Drosophila* as a tool for studying the conserved genetics of pain. *Clin. Genet.* **82**, 359–366.
- Monastirioti, M.** (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.* **45**, 106–121.
- Neely, G. G., Keene, A. C., Duchek, P., Chang, E. C., Wang, Q.-P., Aksoy, Y. A., Rosenzweig, M., Costigan, M., Woolf, C. J., Garrity, P. A., et al.** (2011). TrpA1 Regulates Thermal Nociception in *Drosophila*. *PLoS One* **6**, e24343.
- Ni, L., Bronk, P., Chang, E. C., Lowell, A. M., Flam, J. O., Panzano, V. C., Theobald, D. L., Griffith, L. C. and Garrity, P. A.** (2013). A gustatory receptor paralogue controls rapid warmth avoidance in *Drosophila*. *Nature* **500**, 580–584.
- Nichols, C. D.** (2006). *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* **112**, 677–700.
- Ossipov, M. H., Dussor, G. O. and Porreca, F.** (2010). Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.* **120**, 3779–3787.

- Pendleton, R. G., Rasheed, A., Sardina, T., Tully, T. and Hillman, R.** (2002). Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: A study in functional genomics. *Behav. Genet.* **32**, 89–94.
- Pendleton, R. G., Rasheed, A., Paluru, P., Joyner, J., Jerome, N., Meyers, R. D. and Hillman, R.** (2005). A developmental role for catecholamines in *Drosophila* behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81**, 849–853.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al.** (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 834–839.
- Scholz, J. and Woolf, C. J.** (2002). Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* **5 Suppl**, 1062–7.
- Schuldiner, S., Liu, Y. and Edwards, R. H.** (1993). Reserpine binding to a vesicular amine transporter expressed in Chinese hamster ovary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **268**, 29–34.
- Sitaraman, D., Zars, M., Laferriere, H., Chen, Y.-C., Sable-Smith, A., Kitamoto, T., Rottinghaus, G. E. and Zars, T.** (2008). Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5579–84.
- Sudati, J. H., Vieira, F. A., Pavin, S. S., Dias, G. R. M., Seeger, R. L., Golombieski, R., Athayde, M. L., Soares, F. A., Rocha, J. B. T. and Barbosa, N. V.** (2013). Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* **37**, 118–126.
- Tracey, W. D., Wilson, R. I., Laurent, G. and Benzer, S.** (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* **113**, 261–273.
- Ueno, T., Tomita, J., Kume, S. and Kume, K.** (2012). Dopamine modulates metabolic rate and temperature sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **7**, 1–11.
- Viguiet, F., Michot, B., Hamon, M. and Bourgoin, S.** (2013). Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms -Implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. *Eur. J. Pharmacol.* **716**, 8–16.
- Wang, Z., Ferdousy, F., Lawal, H., Huang, Z., Daigle, J. G., Izevbaye, I., Doherty, O., Thomas, J., Stathakis, D. G. and O'Donnell, J. M.** (2011). Catecholamines up integrates dopamine synthesis and synaptic trafficking. *J. Neurochem.* **119**, 1294–1305.
- Woolf, C. J.** (2010). What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.* **120**, 3742–4.
- Yellman, C., Tao, H., He, B. and Hirsh, J.** (1997). Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4131–4136.

Figure Legends

Fig. 1: Effect of reserpine treatment at 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M and 300 μ M and vehicle (ethanol 1%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the *D. melanogaster*. (A) Temperature-responses profiles of the flies treated with reserpine, the time of all flies immobilized ($n = 6$). (B) Area under curve of temperature-responses profiles ($n = 6$). (C) Time (s) that all flies were immobilized at 41°C ($n = 6$). (D) Percentage of flies continuing activated at 40 °C until 600 s ($n = 5$). (E) Percentage of flies avoiding of noxious heat ($n = 5$) and (F) number of flies that climbing 6 cm at 6 seconds ($n = 5$). Results expressed in \pm SEM and statistical analyses with ANOVA followed by Tukey (* $p < 0.05$).

Fig. 2: Effect of reserpine treatment at 30 μ M, 100 μ M and 300 μ M and its withdrawal on exploratory locomotion of the flies subjecting at different temperatures. (A) 72 hours of treatment, (B) 24 and (C) 48 hours of the withdrawal of reserpine at environmental temperature (25° C) ($n = 12-20$), 38° C ($n = 8-9$) and 43° C ($n = 9-12$). Results expressed in \pm SEM and statistical analyses with ANOVA followed by Tukey (* $p < 0.05$).

Fig. 3: Effect of 3-I-T treatment at 5 mg/mL and 10 mg/mL and vehicle (sucrose 5%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the *D. melanogaster*. (A) Temperature-responses profiles of the 3-I-T-treated flies, the time of all flies immobilized ($n = 5$). (B) Area under curve of temperature-responses profiles ($n = 5$). (C) Time (s) that all flies were immobilized at 41°C ($n = 5$). (D) Percentage of flies continuing activated at 40 °C until 600 s ($n = 5$). (E) Percentage of flies avoiding of noxious heat ($n = 5$) and (F) number of flies that climbing 6 cm at 6 seconds ($n = 5$). Results expressed in \pm SEM and statistical analyses with ANOVA followed by Tukey (* $p < 0.05$).

Fig. 4: Effect of PCPA treatment at 5 mg/mL and 10 mg/mL and vehicle (sucrose 5%, control group) on thermal nociceptive behaviors and climbing locomotion of the *D. melanogaster*. (A) Temperature-responses profiles of the PCPA-treated flies, the time of all flies immobilized ($n = 5$). (B) Area under curve of temperature-responses profiles ($n = 5$). (C) Time (s) that all flies were immobilized at 41°C ($n = 5$). (D) Percentage of flies continuing activated at 40 °C until 600 s ($n = 5$). (E) Percentage of flies avoiding of noxious heat ($n = 5$)

and (F) number of flies that climbing 6 cm at 6 seconds ($n = 5$). Results expressed in \pm SEM and statistical analyses with ANOVA followed by Tukey (* $p < 0.05$).

Figures

Figure 1:

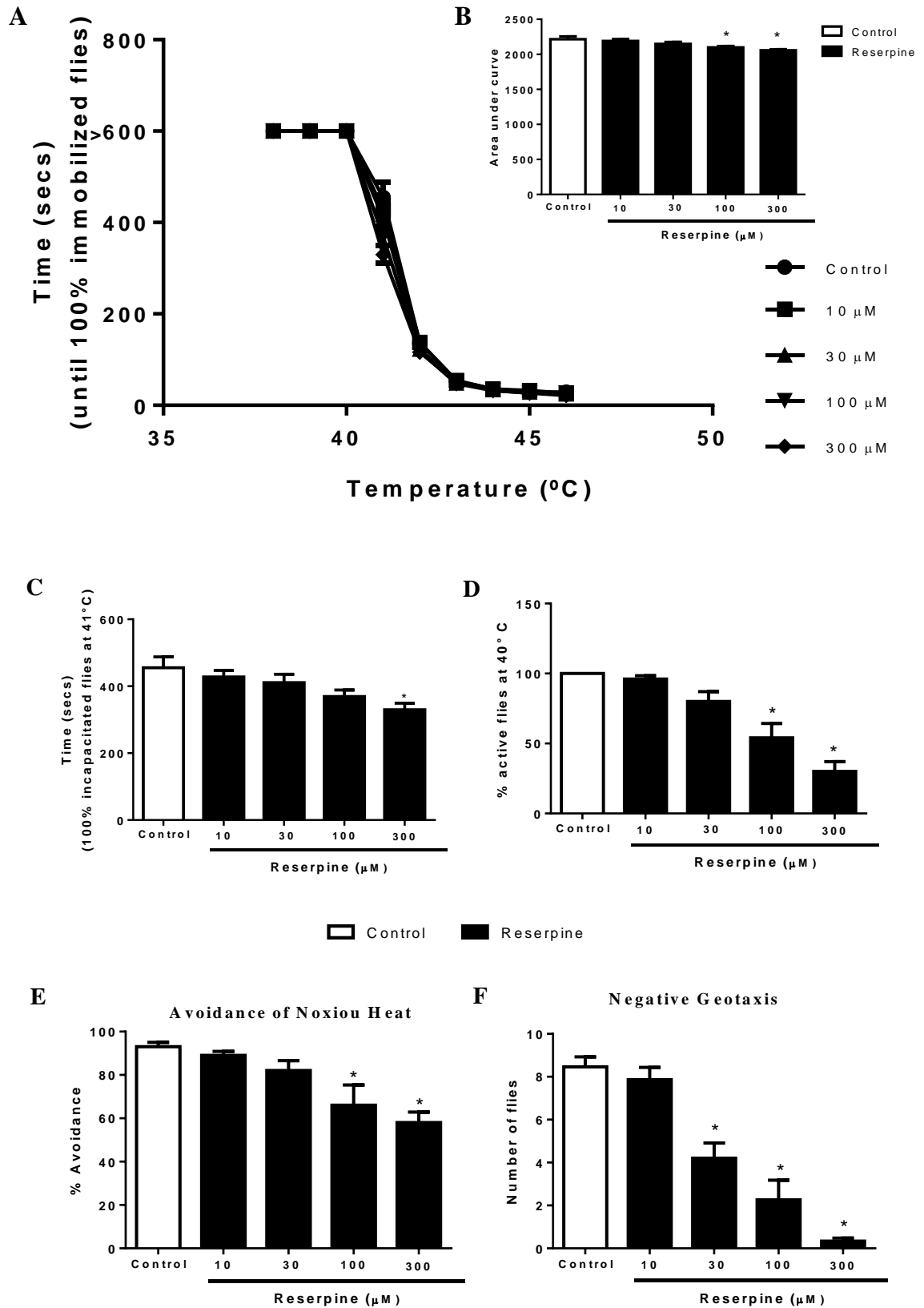


Figure 2:

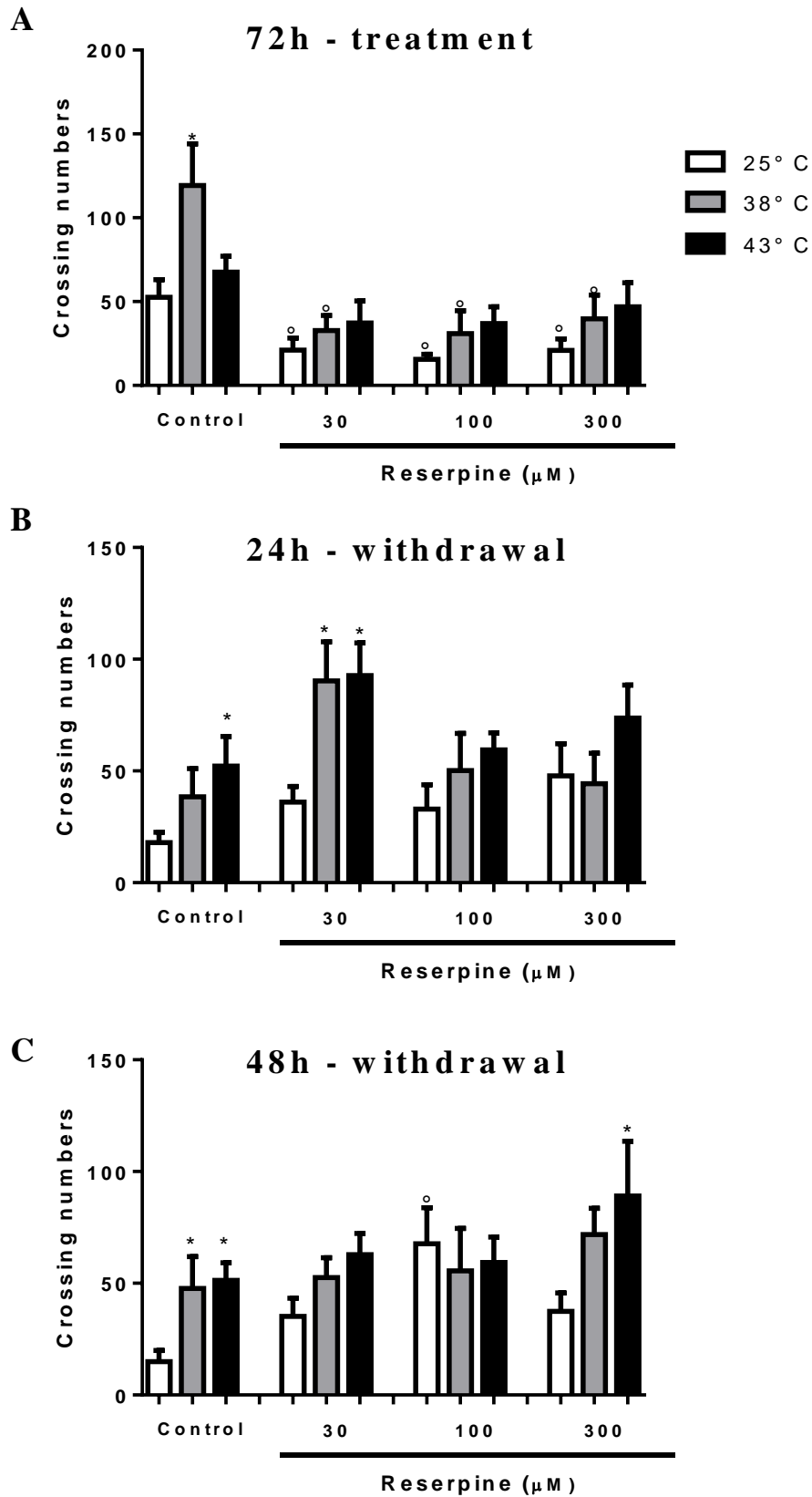


Figure 3:

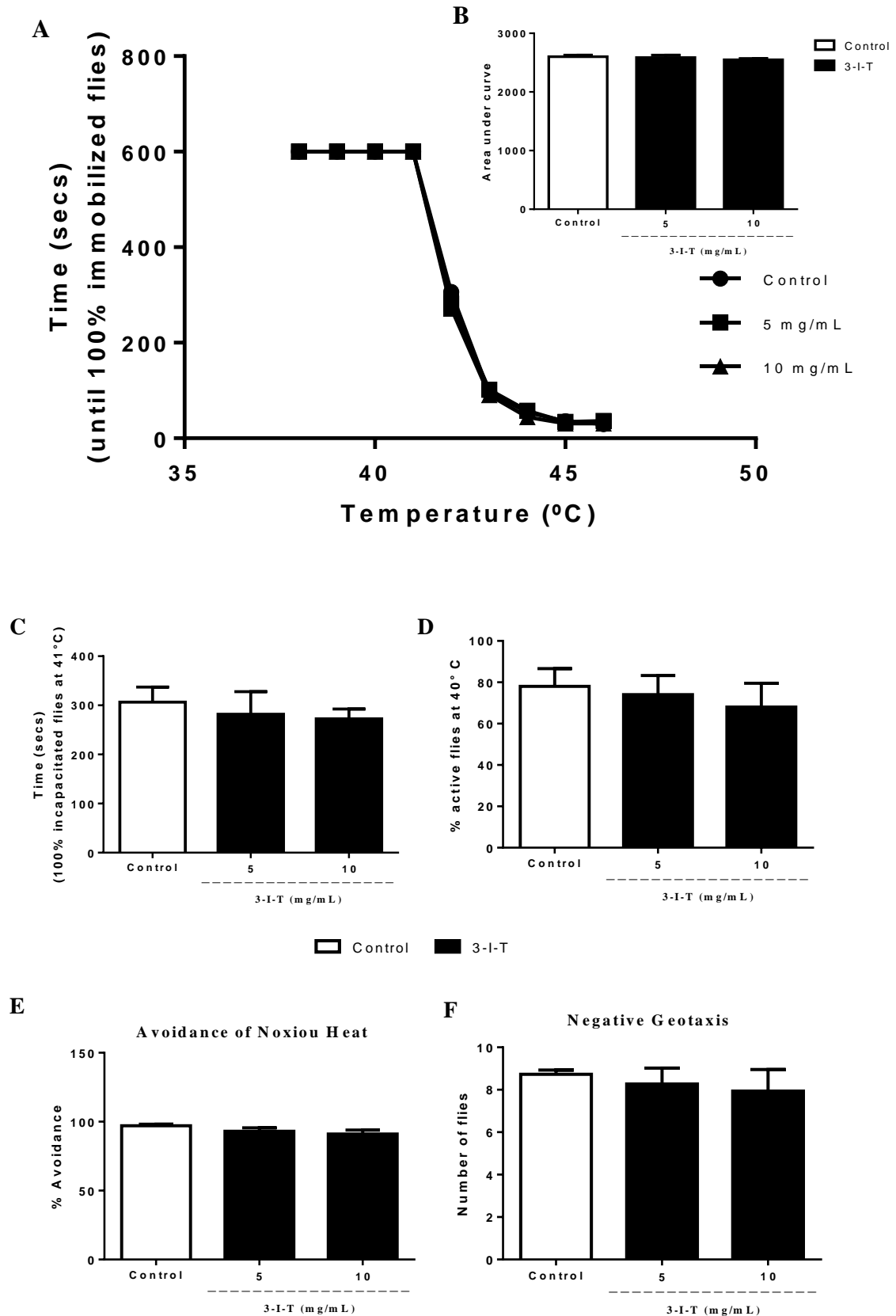
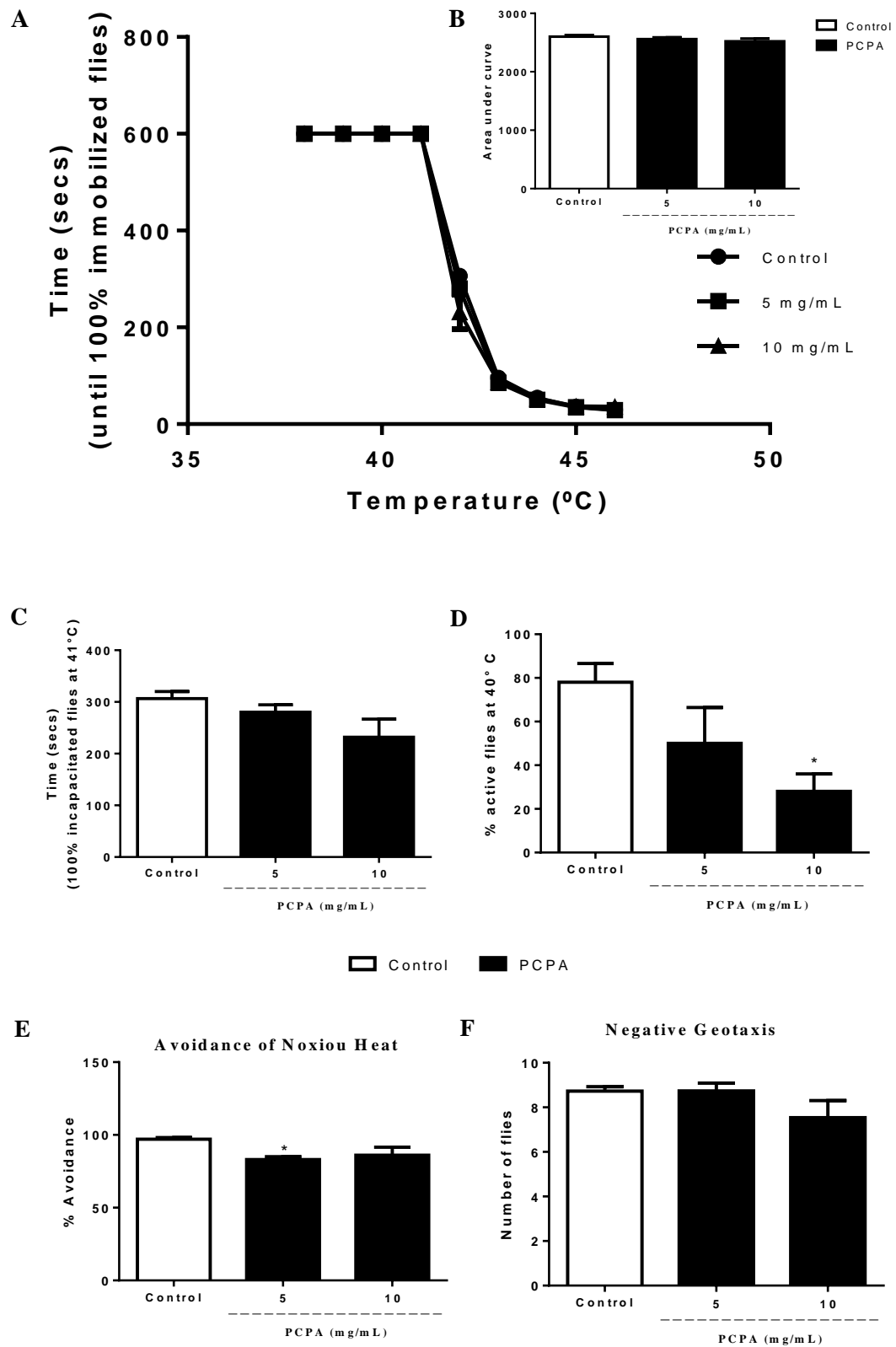


Figura 4:



6 CONCLUSÃO

6.1 Conclusões Específicas

Através desse estudo, pode-se concluir que:

- O bloqueio farmacológico do dVMAT nas concentrações de 100 e 300 μM pela reserpina reduziu o limiar de tolerância térmica e a esquiva ao calor nocivo. Portanto, a reserpina diminuiu a resistência ao calor da *D. melanogaster* e esta alteração pode estar relacionada na redução da capacidade de esquivar-se do calor.
- O prejuízo locomotor causado pela reserpina pode ser um dos fatores envolvidos na redução da esquiva ao calor nocivo. Entretanto, não parece ser o fator determinante que afeta o comportamento de esquiva, visto que moscas tratadas com 30 μM de reserpina apresentam dano locomotor e não perdem a capacidade de esquivar-se do calor nocivo; e quase todas as moscas que foram tratadas com concentrações maiores que 100 μM apresentaram prejuízo locomotor, mas mais de 50% conseguiram esquivar-se. Além disso, a retirada do tratamento com reserpina aumentou a locomoção da mosca, sugerindo uma possível sensibilização dos receptores monoaminérgicos.
- A possível diminuição da síntese de 5-HT pelo PCPA, diminuiu a resistência da *D. melanogaster* à 40 °C e isso não ocorreu na possível diminuição da síntese de DA pela 3-I-T. O PCPA, mas não a 3-I-T, também reduziu o comportamento de esquiva ao calor nocivo sem alterar a atividade locomotora das moscas, sugerindo o envolvimento da 5-HT na modulação destes comportamentos de nocicepção térmica.

6.2 Conclusão Final

Em conclusão, este estudo demonstrou que ambos os fármacos, reserpina e PCPA, reduziram a resistência ao calor e o comportamento de esquiva ao calor nocivo em *D. melanogaster*, os quais são comportamentos necessários às moscas quando estas estão em um ambiente térmico nocivo. Além do mais, o comportamento de se esquivar do calor não parece ser afetado somente por uma perda da atividade locomotora, mas também pela redução da resistência ao calor causada pelos fármacos. Então, com base nos resultados presentes neste trabalho, as monoaminas, particularmente a serotonina, parecem estar envolvidas nestes comportamentos nociceptivos térmicos em *D. melanogaster*.

7 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, temos como perspectivas:

- Quantificar os níveis das monoaminas, particularmente a serotonina e a dopamina, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Analisar parâmetros dopaminérgicos e serotoninérgico como a expressão e os níveis de enzimas e receptores envolvidos na transmissão sinápticas destas vias.
- Investigar um possível efeito das reserpina e PCPA na expressão de proteínas envolvidas na resistência ao calor como as heat-shock protein 70 (HSP70).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANG, S. et al. Dopamine signalling in mushroom bodies regulates temperature-preference behaviour in *Drosophila*. **Plos Genetics**, v. 7, n. 3, 2011.
- BARBAGALLO, B.; GARRITY, P. Temperature sensation in *Drosophila*. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 34. 8-13, 2015.
- BLENAU, W.; BAUMANN, A. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v. 48, 13-38, 2001.
- BELLEN, H. J.; TONG, .C; TSUDA, H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nature Review Neuroscience**, 11, 514-522, 2010.
- COSTIGAN, M.; SCHOZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, 1-32, 2009.
- CURRAN, K. P.; CHALASANI, S. H. Serotonin circuits and anxiety: What can invertebrates teach us?. **Invertebrate Neuroscience**, v.12, 81-92, 2012.
- DASARI, S. et. al. Influence of PCPA and MDMA (ecstasy) on physiology, development and behavior in *Drosophila melanogaster*. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, 424-438, 2007.
- DUBIN, A. E; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, 3760-3770, 2010.
- GALLIO, M. et al. The coding of temperature in the *Drosophila* brain. **Cell**, v. 144, 614-624, 2011.
- GREER, C.L. et al. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. **Journal of Neurobiology**, v. 64, 239-258 2005.
- HAMADA, F. N. et al. An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. **Nature**, v. 454, n. 10, 217-222, 2008.
- JOHNSON, O. et al. Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in *Drosophila melanogaster*. **Neuroscience**, v. 192, 372–381, 2011.
- JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, 355-384, 2013.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, 203-210, 2001.

- KANG, K. et al. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**, v. 464, n. 25, 597-601 2010.
- KENNETH, B. K.; ANDALBERT, W. p-chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 154, 499-516 1966;
- KIM, S. E. et al. The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception. **Nature**, v. 483, 209-213, 2012.
- KIM, S. H. et al. *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, 8440-8445, 2010.
- LEUNG, C. et al. Fruit flies as a powerful model to drive or validate pain genomics efforts. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 15, 1879-1887, 2013.
- MANEV, H.; DIMITRIJEVIC, N.; DZITOYEVA, S. Techniques: fruit flies as models for neuropharmacological research. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, 41-43, 2003.
- MARTIN, C. A; KRANTZ, D. E. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. **Neurochemistry International**, 73, 71-88, 2014.
- MILINKEVICIUTE, G.; GENTILE, C.; NEELY, G. G. *Drosophila* as a tool for studying the conserved genetics of pain. **Clinical Genetics**, v. 82, 359-366, 2012.
- MONASTIRIOTI, M. Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Microscopy Research and Technique**, v. 45, 106-121, 1999
- MONTELL, C. *Drosophila* TRP channels. **European Journal of Physiology**, v. 451, 19-28, 2005.
- NEELY, G. G. et al. TrpA1 regulates thermal nociception in *Drosophila*. **Plos One**, v. 6, ed. 8, 2011.
- NESS, D. K. et al. Effects of 3-Iodo-L-tyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, on eye pigmentation and biogenic amines in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 30, 153-161, 1996.
- NICHOLS, C. D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug Discovery. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, ed. 3, 677-700, 2006.
- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, 3779-3787, 2010.
- PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, 411-436, 2011.

PENDLETON et al., Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: a study in functional genomics. **Behavior Genetics**, v.32, 89-94, 2002.

RIEMENSPERGER, T. et al. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 2, 834-839, 2011.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, 1062-1067, 2002.

SCHULDINER, S. et al. Reserpine binding to a vesicular amine transporter expressed in Chinese hamster ovary fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, 29-34, 1993.

TRACEY, W. D. Jr. et al. *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. **Cell**, v. 113, 261-273, 2003.

UENO, T. et al. Dopamine modulates metabolic rate and temperature sensitivity in *Drosophila melanogaster*. **Plos One**, v. 7, n. 2, 2012.

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

WANG, Z. et al. Catecholamines up integrates dopamine synthesis and synaptic trafficking. **Journal of Neurochemistry**, v. 119, 1294-1305, 2011.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, 3742-3744, 2010.

XU, S. Y. et al. Thermal nociception in adult *Drosophila*: behavioral characterization and the role of the *painless* gene. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, 602-613, 2006.

YAMAMOTO, S.; SETO, E. S. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. **Experimental Animals**, v. 63, n. 2, 107-119, 2014.

ZHENG, J. Molecular mechanism of TRP channels. **Comprehensive Physiology**, v. 3, 221-242, 2013.