



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Efeitos da suplementação com geleia real sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos expostos a estresse crônico

UBERLÂNDIA
2019

Anna Laura de Jesus Gomes

“Efeitos da suplementação com geleia real sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do grau de Licenciatura no Curso de Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Érika Renata Barbosa Neiro

UBERLÂNDIA-MG

“Efeitos da suplementação com geleia real sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para obtenção do grau de Licenciatura, no curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia (MG), pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 25 de março de 2019.

Nota:_____

Prof^a. Dr. Érika Renata Barbosa Neuro, UFU/MG

Prof^a. Dr. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, UFU/MG

Prof^a. Dr. Simone Ramos Deconte, UFU/MG

É com muito respeito que dedico este trabalho a todos os animais de laboratório eutanasiados em minha pesquisa científica. Em especial aos camundongos. Desta maneira, dedico à espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/C.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu grande amor, por ter me dado além de saúde, força e fé para superar as dificuldades, pessoas que por meio Dele me ajudaram e me confortaram nos momentos felizes e difíceis;

Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, a minha mãe, Maria Clementina de Jesus, pelo incentivo nas horas de desânimo, pelo abraçado aconchegante que tudo cura e pelo excelente e verdadeiro exemplo de professora a ser seguido. Ao meu pai Valtemir Gomes Pereira pelo carinho, proteção e suporte, além do incrível exemplo de simplicidade, humildade e determinação;

À minha irmã Aline, pelas conversas, companheirismo e modelo. Ao meu irmão Gabriel, por todos os momentos, principalmente os de piadas e distração;

Às minhas tias e tios pelo esforço em sempre querer ajudar e pelos momentos maravilhosos em família compartilhados;

Ao meu namorado Marcos Vinícius, pessoa com quem amo compartilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva de verdade, obrigada pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer leveza na correria de cada semestre;

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar o curso, e desfrutar de todos os seus bens e recurso, tanto fisicamente quanto academicamente, com os professores que partilharam seus ensinamentos;

Às minhas amigas de faculdade: Karina Malaquias “irmã acadêmica”, Luanna Xênia, Camilla Marra, Camila Siqueira, Elusca, Marcela, Mariana Veloso “amorzinha” e Anna Beatriz, pelas risadas, trabalhos juntos, companheirismo e amizade, pois sem vocês tudo teria sido muito mais “pesado”;

Às minhas colegas de laboratório, Amanda, Rhanna, Tais, Vitória, Marcela, Daiany e principalmente pela minha dupla infalível Mariana por todo suporte ao longo da pesquisa;

À todos os professores do meu curso, que por meio das aulas e conversas compartilharam não somente conhecimento e pesquisa, mas também contribuíram para minha formação pessoal. Em especial à minha orientadora Érika Renata Barbosa Neiro, pelo apoio, orientação, paciência e oportunidade. A Prof^ª Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini pelo carinho de mãe e motivação;

À Técnica Simone Ramos Deconte, um agradecimento mais que especial, pois sem sua dedicação e paciência não teria sido possível dar continuidade neste trabalho;

À banca examinadora pelo tempo, leitura e colaboração para este trabalho. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO:

Atualmente a população mundial sofre com vários transtornos psiquiátricos, como os transtornos de ansiedade, transtornos de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) e de conduta, transtornos depressivos, obsessivo-compulsivos, estresse pós-traumático, transtorno bipolar, dentre muitos outros. Embora existam diversos tratamentos farmacológicos eficazes, como o uso de drogas com efeito ansiolítico. Buscam-se cada vez mais substâncias naturais que possam ser utilizadas nos tratamentos, com menor risco de efeitos colaterais ao indivíduo. Dentre essas substâncias naturais destacam-se aquelas com potencial antioxidante e anti-inflamatório com efeitos sobre o sistema nervoso central, como o resveratrol, a geleia real (GR), os ômega 3, 6 e 9 dentre outras. Neste sentido, o presente projeto teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com geleia real sobre o ganho de peso e sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos submetidos a estresse crônico por contenção. A GR é um produto natural que possui composição complexa, dispondo de uma grande variedade de componentes, especificamente o ácido graxo 10-hidroxi-2-decenóico (HDEA) que apresenta inúmeras atividades biológicas. É produzida e secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de jovens abelhas operárias (*Apis mellifera*), sendo o principal alimento da abelha rainha durante toda sua vida, além de contribuir no desenvolvimento das larvas em estágio inicial. Este produto possui várias atividades biológicas, dentre elas a de interesse para este estudo é a propriedade antioxidante. Para tanto, inicialmente os camundongos Balb C foram submetidos ao protocolo de estresse por restrição de movimento, sendo posteriormente testados em aparatos específicos: labirinto em cruz elevado e campo aberto, para averiguação da expressão de comportamentos do tipo ansiosos. O parâmetro fisiológico alteração de peso corpóreo foi avaliado durante todo processo experimental. Os resultados obtidos nos testes comportamentais mostraram que os quatro grupos experimentais apresentaram comportamentos do tipo ansioso, não diferindo significativamente um do outro. Tanto no C.A quanto no LCE foram analisados 6 parâmetros, nos quais em todos os quatro grupos experimentais apresentaram valores de média muito próximos um dos outros. Mostrando que todos apresentaram sinais de estresse e comportamentos do tipo ansiosos nos dois testes comportamentais. A geleia real na dose de 200 mg/kg não foi capaz de diminuir tal comportamento e também não foi capaz de reverter tal comportamento no grupo estressado cronicamente.

Palavras chaves: Geleia Real, Estresse Crônico, Comportamento do tipo Ansioso.

ABSTRACT

Currently the world population suffers from various psychiatric disorders, such as disorders attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and conduct, depressive disorders, obsessive-compulsive, post-traumatic stress disorder, bipolar disorder, among many others. Although there are several effective pharmacological treatments such as the use of drugs with anxiolytic effect, in the case of anxiety disorder the drugs used are: buspirone, diazepam and clonazepam, among many other medicines. Seek ever more natural substances that can be used in treatments, with less risk of side effects to the individual. One of these natural substances include those with antioxidant and anti-inflammatory with potential effects on the central nervous system, as resveratrol, Royal Jelly (RJ), the omegas 3, 6 and 9 among other. In this sense, this project aims to investigate the effects of treatment with Royal Jelly on physiological changes and about the weight gain behaviors in adult mice subjected to chronic stress situations due to containment. The RJ is a natural product that has a complex composition, with a wide variety of components, specifically the fatty acid 10-hydroxy-2-decenóico (HDEA) that features numerous biological activities. Is produced and secreted by the hypo pharyngeal glands and mandible of young worker bees (*Apis mellifera*). Being the main food of the Queen Bee throughout your life, besides contributing in the development of early-stage larvae. This product has several biological activities, among them of interest to this study is the antioxidant property. To do this, initially the Balb C mice will be subjected to stress protocols for restriction of movement, later being tested on specific devices: high cross maze and open field, for investigation of the behaviors of type expression anxious. The results obtained in behavioral tests showed that the four experimental groups showed anxious type behaviors not significantly different from each other. In both O.F and E.P.M six parameters were analyzed, in which all four experimental groups average values very close to one of the other. Showing all signs of stress and anxious type behaviors in two behavioral tests. Royal Jelly at a dose of 200 mg/kg was not able to reduce such behaviour and it wasn't able to revert such behavior in the group chronically stressed.

Keywords: Royal Jelly, Chronic Stress, Anxious Type Behavior.

SUMÁRIO:

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivo Específico	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Grupos Experimentais	19
3.3 Etapas dos Experimentos	20
3.4 Realização dos Experimentos	20
3.4.1 <i>Fornecimento da Geleia Real e Água Deionizada</i>	20
3.4.2 <i>Método de Administração das Substâncias</i>	21
4 MÉTODO DE INDUÇÃO DO ESTRESSE	21
5 MEDIDA DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	21
6 EUTANÁSIA	22
7 TESTES COMPORTAMENTAIS	22
7.1 Campo Aberto (CA)	22
7.2 Labirinto em Cruz Elevado	23
8 PROGRAMAS UTILIZADOS	25
8.1 Open Field	25
8.2 Teste Estatístico	25
9 RESULTADOS	26
9.1 Campo Aberto	26
9.2 Labirinto em Cruz Elevado	27
9.3 Peso Animais	29
10 DISCUSSÃO	30
11 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
Anexo	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico

ARFIS- Área de Ciências Fisiológicas

BA- Braços Abertos

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-derived Neurotrophic Factor)

BDZ – Benzodiazepínicos

CA – Campo Aberto

CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEUA- Comissão de Ética na Utilização de Animais

DEFIS- Departamento de Fisiologia

CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

DSM – Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EPM- Erro Padrão da Média

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GC – Hormônios Glicocorticóides

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Geleia Real

HDEA – Ácido Graxo 10-Hidroxi-Trans-2-Ácido-Decenóico

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

OMS – Organização Mundial de Saúde

SART – Alteração Específica no Ritmo de Temperatura

SNC – Sistema Nervoso Central

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade

TOC – Transtorno Obsessivo Compulsivo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01- Esquema de Resposta contra o Estresse.....	15
Figura 02 e 03 – Estante Ventilada e Mini caixa isoladora.....	19
Figura 04- Geleia Real.....	21
Figura 05 – Ilustração do Teste Campo Aberto.....	22
Figura 06 e 07 – Ilustração do Teste Labirinto em Cruz Elevado.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Tabela de Índices Comportamentais.....	25
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01- Tempo de Permanência no Centro.....	25
Gráfico 02- Porcentagem da locomoção Central.....	25
Gráfico 03- Locomoção Central.....	25
Gráfico 04- Locomoção Total.....	25
Gráfico 05- <i>Rearing</i> - Campo Aberto.....	25
Gráfico 06- Locomoção Periferica.....	25
Gráfico 07- Tempo nos Braços Abertos.....	28
Gráfico 08- Número de Entradas nos Braços Abertos.....	28
Gráfico 09- Tempo nos Braços Fechados.....	28
Gráfico 10- <i>Rearing</i> - Labirinto em Cruz Elevado.....	28
Gráfico 11- <i>Headdipping</i>	28
Gráfico 12- Linha do tempo do Controle dos pesos dos animais.....	29

1. Introdução

Atualmente populações do mundo inteiro sofrem com transtornos mentais, que incapacitam os indivíduos e têm impacto social e econômico na vida dos afetados. Durante séculos, tais transtornos atingiram os indivíduos de diferentes civilizações, sendo que as pessoas que não possuíam comportamentos considerados adequados perante a sociedade eram tidas como loucas, profetas (que recebiam sinais dos deuses), mágicos e até mesmo possuídos por demônios (este último com influência da igreja). Desta forma, os doentes eram abandonados, excluídos da sociedade e chegavam a serem presos, para que ficassem assim isolados do mundo e da sociedade (SPADINI; SOUZA, 2006).

Apenas com o passar das décadas é que os transtornos psiquiátricos e os próprios doentes foram sendo compreendidos, e com os avanços na área da saúde levantou-se a importância do diagnóstico preciso e do tratamento adequado para cada caso. Só com a criação do Manual de Diagnóstico e Estatístico das Perturbações Mentais, ou Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*”(DSM), que hoje se encontra na quinta edição e da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – CID, no qual já está na décima primeira edição, é que tais transtornos mentais foram mais corretamente elucidados (SPADINI; SOUZA, 2006).

A DSM-V e a CID-10 orientam e definem vários transtornos mentais. E segundo a DSM-V define-se como transtornos mentais:

Um transtorno mental é uma síndrome caracterizada por perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento de um indivíduo que reflete uma disfunção nos processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental. Transtornos mentais estão frequentemente associados a sofrimento ou incapacidade significativos que afetam atividades sociais, profissionais ou outras atividades importantes. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (Estados Unidos). **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5.ed. Washington: Artmed, 2013. 947 p.)

Inúmeras doenças neuropsiquiátricas atingem a população mundial em alguma fase da vida, seja ela na infância, adolescência, vida adulta ou na terceira idade. Dentre tais doenças temos distúrbios bipolares, transtornos depressivos e ansiosos, demências, esquizofrenia, fobias, dentre muitos outros. Segundo relato da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2017 cerca de 322 milhões de pessoas no mundo sofriam com a depressão, 264 milhões com ansiedade, 21 milhões com esquizofrenia e 60 milhões com transtornos

bipolares. No mesmo ano, no Brasil, o número de pessoas atingidas pela depressão foi de 11,5 milhões, o equivalente a 5,8% da população e 18,6 milhões sofriam com a ansiedade, 9,3% da população (Organização Mundial da Saúde- OMS, 2017).

Entre os principais transtornos que atingem a população, o transtorno de ansiedade é um dos mais comuns e apresenta relação direta com o estresse crônico. Segundo a DSM-V, os transtornos de ansiedade acometem pessoas que apresentam o medo e ansiedade de forma excessiva e compartilhada; sendo o medo uma resposta emocional frente à determinada ameaça e a ansiedade uma antecipação da ameaça futura. Ambos estados se sobrepõem, mas também se separam, dependendo da situação enfrentada pelo indivíduo. Somente se realiza a classificação e o diagnóstico dos transtornos de ansiedade quando os sintomas apresentados não provêm do uso de substâncias, remédios, efeitos biológicos ou drogas (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-V).

Ainda segundo a DSM-V, existem vários transtornos de ansiedade, dentre eles o transtorno de ansiedade generalizada, o transtorno de ansiedade social, o transtorno de pânico, a agorafobia, o transtorno obsessivo compulsivo (TOC), o transtorno de conduta e muitos outros. Entre os indivíduos atingidos os mais acometidos são do gênero feminino (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-V).

De modo simplificado, a ansiedade é um sentimento vago, desagradável, que está associado a uma condição de apreensão ou tensão, na qual o medo não é obrigatoriamente o responsável, mas pode ser causada pela perspectiva / possibilidade de algo ocorrer em um futuro próximo (CASTILLO et al., 2000). É uma característica humana, não sendo possível reproduzir de forma idêntica em modelo animal. Porém, com o auxílio do modelo animal é possível analisar os “comportamentos do tipo ansiosos” que se assemelham ao apresentado pelo ser humano (ANDREATINI et. al, 2001).

Tanto a ansiedade como o estresse possuem efeitos duradouros e estão diretamente relacionados com o fato de que seus ajustes fisiológicos ultrapassam a área do Sistema Nervoso Autônomo, chegando assim a outros sistemas como o sistema endócrino e imunológico (LENT, 2005).

Segundo Lent (2005), os termos ansiedade e estresse são muitas vezes empregados como sinônimos, e suas manifestações são consideradas reações normais até o ponto que começam a provocar sofrimento no indivíduo. Daí em diante pode ocorrer ansiedade patológica generalizada e outros distúrbios emocionais.

O estresse provém do meio ao qual o indivíduo pertence e das diversas situações estressantes que o mesmo presencia dia após dia. Entre os fatores externos considerados

estressantes para o indivíduo está à urbanização, a migração, o *status* social, os abusos físicos e psicológicos, os traumas, o abandono, as tragédias e o *bullying*. Situações de estresse crônico podem predispor ao surgimento de distúrbios mentais como depressão e ansiedade (JOCA et al., 2003), funcionando como um “gatilho”, capaz de causar uma desordem comportamental, contribuindo para o surgimento não só da ansiedade e depressão, mas de outras doenças neuropsiquiátricas (HATA et al., 2000).

O estresse é proveniente também da interação entre as características da pessoa e as demandas do meio, ou seja, as discrepâncias entre o meio externo e interno e a percepção do indivíduo quanto à sua capacidade de resposta. A resposta ao agente estressor engloba: aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos que visam propiciar uma melhor percepção da situação.

Ainda sobre o estresse, seu termo denota o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e, ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação caracterizado, entre outras alterações, pelo aumento da secreção de adrenalina produzindo diversas manifestações sistêmicas, como distúrbio fisiológico e psicológico. O termo designa ainda, a resposta geral e inespecífica do organismo a um estressor ou a uma situação estressante (MARGIS et al., 2003).

Um episódio de estresse sofrido por uma pessoa é capaz de causar diversas alterações neurofisiológicas, dentre elas a diminuição/supressão da neurogênese, que ocorre em determinadas áreas como, por exemplo, no Hipocampo e Hipotálamo. Isto faz com que haja prejuízo na formação e desenvolvimento das células do Sistema Nervoso (JOCA, 2003).

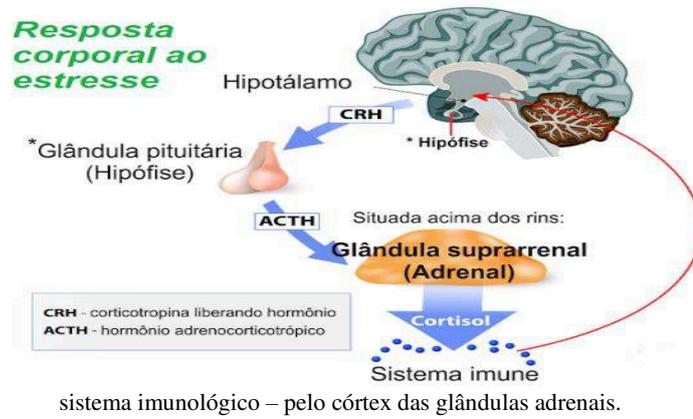
Para que o organismo consiga gerar uma resposta eficaz contra o estresse físico e mental, deve ocorrer a ativação de um sistema neuroendócrino conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que está associado diretamente com a síntese e liberação de hormônios, influenciando na disponibilidade energética para o organismo, na resposta imunológica e também em relação aos comportamentos. A hiperatividade desse eixo pode contribuir para fisiopatologia de transtornos psiquiátricos (JURUENA et. al, 2004).

O HHA desempenha papel fundamental na resposta à estímulos internos e externos, através da liberação de hormônios glicocorticóides (GC) provindos das glândulas adrenais, que exercerão papel importante nas respostas ao estresse crônico. Quando o eixo HHA é ativado, elevam-se imediatamente os níveis de glicocorticóides no plasma sanguíneo.

A exposição ao estressor vai provocar a ativação dos neurônios presentes no núcleo paraventricular do Hipotálamo, que sintetizarão o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que agirá em diversas áreas cerebrais como amígdala e hipocampo relacionadas a

emoções e comportamentos sociais (ZUARDI, 2010), além de promover a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise anterior que influenciará na liberação do cortisol e corticosterona pelas glândulas adrenais. Níveis elevados de cortisol atuarão em diversos tecidos. Dentre eles estruturas do telencéfalo e diencéfalo, influenciando em mecanismos de memória e aprendizagem (MARGIS et. al, 2003).

Figura 01: Esquema simples da ativação do eixo HHA em resposta ao estresse: O hipotálamo libera CRH, que estimula a liberação de ACTH pela adenohipófise. O ACTH induz a liberação de cortisol – principal hormônio regulador do



Fonte: <http://nolimiardafisiologia.wixsite.com/blog/single-post/2016/03/08/Keep-Calm-and-n%C3%A3o-libere-cortisol> (2018).

Esta exposição crônica ao estresse pode levar a diversas modificações no organismo, como alterações na neurogênese no Giro Dentado do Hipocampo região com função importante na memória de trabalho e informações espaciais (JOCA et al., 2003). A exposição crônica ao estresse pode levar a déficits cognitivos, vulnerabilidade em regiões encefálicas, alteração na defesa neuronal, além de causar a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos devido principalmente à abundância de radicais livres que estão sendo liberados, causando danos oxidativos (BARREIROS, 2006). Para proteger o organismo contra o estresse oxidativo e suas consequências deletérias, existem diversos sistemas formados por enzimas como, por exemplo, a Glutathiona Peroxidase (GPx) que reduz os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e das espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas que costumam alterar proteínas e lipídios nas células(OLIVEIRA, 2010).

Deste modo, antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (BARREIROS et al., 2006).

Quando os níveis de estresse estão excessivamente elevados, há risco de danos/lesão aos tecidos, degradação dos lipídeos das membranas, ataque a proteínas e enzimas dos tecidos, levando desta forma ao desenvolvimento de diversas patologias (BARREIROS et al., 2006). Além de promover modificações no comportamento, bem como no comportamento de roedores.

Para combater aos efeitos provindos do estresse crônico, tal como os transtornos mentais, dos tipos ansiosos e depressivos, existem diferentes classes de fármacos (especificamente os psicofármacos). Muitos transtornos necessitam da utilização de medicamentos específicos, por exemplo, esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão grave e ataque de pânico.

A ansiedade é um dos sintomas presentes em quase todos os transtornos psiquiátricos, sendo no transtorno de ansiedade o de principal manifestação. As drogas utilizadas no tratamento de ansiedade são nomeadas de ansiolíticos. Entre os ansiolíticos mais usados a partir da década de 60 estão os benzodiazepínicos-BDZ (grande grupo de drogas), sendo alguns de seus representantes o clordiazepóxido (Librium®) e o diazepam (Valium®), ambos possuindo efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes, hipnóticos e sedativos. Entre os fármacos indicados para os casos de transtorno de pânico estão o alprazolam, o clonazepam e o diazepam; nos transtornos de ansiedade generalizada o diazepam, o clonazepam e o bromazepam; no tratamento de insônia o midazolam, o nitrazepam, o flurazepam e o flunitrazepam; em convulsões o clorazepato. Atualmente muitos antidepressivos com menos efeito colaterais, como a imipramina, a venlafaxina e a paroxetina vem substituindo algumas dessas drogas nos tratamentos da ansiedade (CORDIOLI, 2014).

Os ansiolíticos apesar de comprovada eficiência clínica apresentam como efeitos colaterais: sedação, fadiga, perda de memória, sonolência, falta de coordenação motora, diminuição no reflexo e atenção, podendo também levar à síndrome de descontinuação, na qual o paciente apresenta quadro de dependência ao remédio(CORDIOLI, 2014). A Buspirona, pertencente ao grupo das azapironas, que vem sendo utilizada no tratamento de ansiedade generalizada, quando se há contra indicações do uso de BDZ, no geral não causam sedação e dependência como efeitos colaterais, mas podem levar o paciente a sentir tontura, cefaléia, náusea, fadiga, sudorese e inquietude (CORDIOLI, 2014).

As análises dos efeitos colaterais dos fármacos utilizados para tratar transtornos mentais apontam para a necessidade de busca por outras formas alternativas de tratamentos com os produtos naturais, trazendo nenhum ou pouco efeito colateral a saúde do paciente (VORKAPIC; RANGÉ, 2011).

Devido aos riscos/danos que o excesso de radicais livres causa ao organismo, hoje em dia, existem vários estudos e interesses no uso de substâncias com efeitos antioxidantes no sistema nervoso. Os radicais livres podem ser formados de modo natural através da via aeróbica do nosso metabolismo ou por perturbações biológicas.

Na natureza existem diferentes compostos que, por meio de suas propriedades antioxidantes, possuem efeito comprovado contra o estresse oxidativo, protegendo o corpo contra as consequências do estresse crônico. Neste contexto destaca-se a geleia real (GR), produto formado através da secreção das glândulas hipofaríngeas e mandibulares localizadas na região da cabeça das abelhas operárias da espécie *Apis mellifera*. A produção da GR está relacionada com o desenvolvimento/nutrição da abelha rainha e de sua prole. Possui coloração amarelada e é constituída por um complexo de elementos: lipídeos, carboidratos, proteínas, vitaminas (A, E, D, C e B), minerais (ferro, fósforo, magnésio, potássio e cálcio), água, aminoácidos (sendo 10-hidroxi-trans-2-ácido-decenóico o principal), enzimas e muitos outros componentes (PAVEL; BARNUTIU 2011; NAGAI, 2001).

Os antioxidantes presentes na geleia real (GR) atuam no combate aos radicais livres liberados pelo estresse crônico. Possuem também ação neurotrófica, que promove o aumento da diferenciação das células presentes no cérebro.

Por sua complexidade de componentes a GR possui diversos potenciais farmacêuticos como atividade antioxidante, ação neurotrófica, ação hipotensiva e reguladora no sangue, ação antitumoral, ação anti-inflamatória, efeito antibiótico, atividade imunomodulatória e antialérgica, efeito sobre o sistema reprodutor, efeito antienvhecimento e efeito de proliferação celular. Estudos apontam que a GR estimula o crescimento de neuritos (HATTORI et al., 2006; ITO et al., 2012) e facilita a expressão de RNAm de Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial (GDNF), induzindo a produção de uma neurotrofina essencial para regulação da plasticidade, função, manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso (HASHIMOTO et al., 2005). Possui também ação neurotrópica, contribuindo assim no melhoramento da memória, aumento de diferenciação em todas as células cerebrais, bem como contribuindo na redução da ansiedade (PAVEL, 2011).

Dentre todos os elementos que constituem a GR, o que apresenta maior atividade biológica é o ácido graxo 10-hidroxi-trans-2-ácido-decenóico (HDEA), com atividade antitumoral, antioxidante, antibiótica e estímulo da produção de colágeno. O HDEA mostrou possuir efeito similar ao BDNF, sendo capaz de favorecer o crescimento de neurônios (HATTORI et al., 2007).

No intuito de analisar compostos com potencial antiestresse, fez-se necessário a indução do estresse crônico em modelo animal. Existem vários modelos de estresse induzido na literatura, tal como por restrição de movimento, alteração específica no ritmo de temperatura (SART), estresse pelo frio e pela presença do predador.

Devido às suas importantes propriedades antioxidante a suplementação com GR poderá ser como uma alternativa para combater as espécies reativas de oxigênio, prevenindo assim o estresse oxidativo no sistema nervoso central. Como mostrado anteriormente, ela possui em sua composição o ácido graxo 10-hidroxi-trans-2-ácido-decenóico (HDEA), candidato a ser uma alternativa natural futura, atuando nos tecidos cerebrais, induzindo, por exemplo, o crescimento de neuritos, o aumento da neurogênese e a produção de fatores neurotróficos. Além de agir contra os radicais livres que prejudicam várias funções do organismo (HATTORI et al., 2007-2009).

Nesse sentido, o presente trabalho visou induzir comportamento do tipo ansioso em camundongos, por meio de contenção e verificar se o GR exerce modelo protetor contra o estresse, impedindo o estabelecimento de comportamentos do tipo ansiosos.

2.OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos do estresse crônico nos comportamentos associados à ansiedade em modelo animal, assim como possível papel da suplementação com Geleia Real na prevenção de tais comportamentos.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Analisar os efeitos gerados pelo estresse crônico, por contenção, nos comportamentos do tipo ansiosos em camundongos machos;
- ✓ Estudar possíveis efeitos da suplementação com Geleia Real na atenuação dos comportamentos do tipo ansiosos causados pelo estresse crônico;
- ✓ Verificar alterações no peso dos animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos machos recém desmamados, pertencentes à linhagem Balb C, espécie *Mus musculus*. O fornecimento foi feito pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) número 042/17. Os animais foram mantidos no Locatário de Animais da ARFIS/ICBIM até atingirem a idade adulta (por volta do sexagésimo dia após o nascimento - P60) quando iniciaram-se os experimentos descritos na sequência do texto.

Foram estabelecidas as seguintes condições ambientais: ciclo de luz controlado (claro/escuro 12hs/12hs), alimentação e ingestão hídrica *ad libitum*, e permanência em caixas (mini-isoladora) de 17 cm de largura x 27 cm de comprimento x 12,5 cm de altura nos padrões ambientais estabelecidos acima, com fluxo de ar puro, ventiladas por exaustão, permitindo assim uma proteção aos animais contra agentes contaminantes. Como representa nas imagens a seguir:

Figura 02 e 03 - Ilustração do modelo de estante e caixas mini isoladoras utilizadas para manter os camundongos em isolamento e proteção ao ar ambiente.



Fonte: <https://www.alescobrasil.com.br/racks> (2018).

3.2 Classificações dos Grupos Experimentais:

Os animais (P60) foram divididos da seguinte forma:

Grupo Geleia Real + Estresse (GR/E): Camundongos que foram submetidos ao estresse e suplementados com a geleia real;

Grupo H₂O + Estresse (H₂O/E): Camundongos submetidos ao estresse e suplementados com água deionizada;

Grupo Geleia Real/ Sem Estresse (GR/SE): Camundongos não submetidos ao estresse e suplementados com a geleia real;

Grupo H₂O/ Sem Estresse (H₂O/SE): Camundongos não submetidos ao estresse e suplementados com água deionizada.

3.3 Etapas dos Experimentos:

O experimento foi dividido em cinco partes, veja o esquema abaixo:

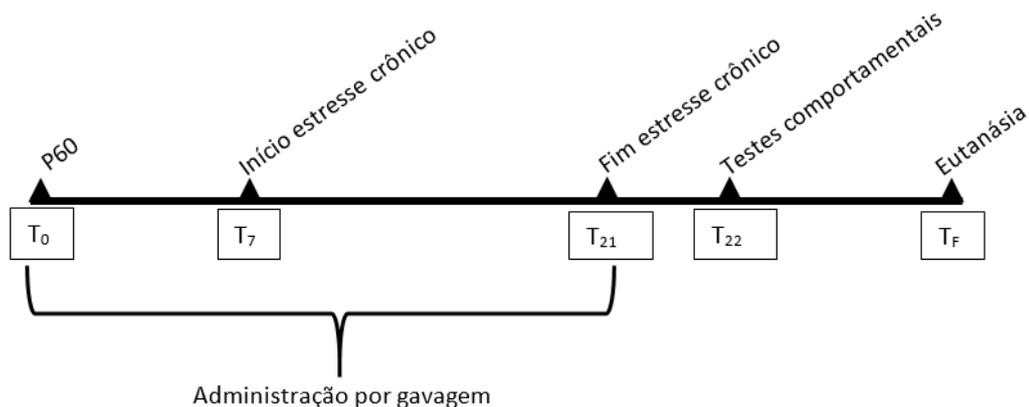
(Parte 01): A solicitação dos animais;

(Parte 02): Ao atingirem a idade adulta (P60), iniciou-se as administrações de GR por meio da gavagem (T 01 até T 21 dias);

(Parte 03): Após 7 dias recebendo Gr ou Água por gavagem iniciou o protocolo de estresse crônico, com a continuação da administração de geleia ou água por meio da gavagem;

(Parte 04): Posteriormente as semanas da indução do estresse e da gavagem começaram os testes comportamentais (T- 22)

(Parte 05): No final dos testes foi realizada a eutanásia dos animais.



3.4 Realizações dos procedimentos:

3.4.1 Fornecimento da Geleia Real e da Água Deionizada:

A Geleia Real foi fornecida pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola do Instituto de Genética e Bioquímica- INGEB/UFU, sendo mantida e armazenada no freezer do laboratório

de fisiologia DEFIS/ICBIM, a -20°C de temperatura. A geleia real, pertence à marca Apiários Girassol, foi utilizada na dose de 200mg/kg de peso animal, e diluída em 200 μl de água deionizada.

Figura 04- Abelha operária e a Geleia Real, em sua colmeia.



Fonte: <http://8ou80foto.com/2017/09/25/geleia-real-poderoso-produto-natural/> (2019).

3.4.2 Método de Administração de Geleia Real ou Água Deionizada:

A GR ou Água foram administradas por gavagem uma vez ao dia, 45 minutos antes da primeira sessão de estresse. Iniciando uma semana antes dos procedimentos de indução de estresse e perdurando durante as próximas duas semanas (totalizando 21 dias de administração de GR ou Água Deionizada). A gavagem ocorria por uma cânula guia (de 4 cm) com a ponta arredondada e flexível introduzida na boca do animal e gentilmente empurrada para o esôfago.

4. Método de Indução de Estresse por Restrição de Movimento:

Durante 14 dias os animais passaram pelo estresse por restrição de movimento durante o período da manhã das 8h às 10h (120 minutos). Este procedimento de imobilização consistiu-se em conter o animal em um tubo cilíndrico de acrílico, (6-7 cm de diâmetro com 12 cm de largura) com respiradouro. Os camundongos puderam avançar somente para frente e para trás dentro do tubo, mas não conseguiram virar a cabeça ou movimentar a cauda, experimentando assim uma situação de restrição de movimento.

5. Medidas dos Parâmetros Fisiológicos:

Os animais tiveram seus pesos mensurados dia sim dia não, desde o início dos experimentos, até o dia da eutanásia.

6. Método de Indução da Morte dos Animais:

Os machos foram eutanasiados dias após o final dos testes comportamentais por meio de aprofundamento de anestesia com uma mistura de cetamina (10%) e xilazina (2%), seguido de deslocamento cervical. As carcaças ficaram acondicionadas no freezer a uma temperatura de -20°C até o momento de descarte definitivo.

7. Testes Comportamentais:

Após a indução do estresse e eventuais tratamentos com geleia real ou água, os animais passaram pelos seguintes testes comportamentais: Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, direcionados para análise de comportamentos do tipo ansiosos.

7.1 Campo Aberto (CA):

O CA consiste em avaliar a quantidade de atividade motora do animal e os parâmetros comportamentais que indiquem um estado “ansioso” em modelo animal. Para esta avaliação foi utilizado um aparato feito de acrílico, com formato circular e contendo uma base de 30 cm de diâmetro. Esta base é circundada por uma parede de 30 cm de altura. O assoalho do aparato é dividido em quadrantes periféricos que são adjacentes a quadrantes centrais (RAMOS, 2008).

Figura 05- Campo Aberto, aparato redondo de acrílico. Um dos métodos padrão utilizado para avaliação de comportamentos do tipo ansiosos em camundongo.



Fonte: <https://www.bonther.com.br/produtos/189/open-field-campo-aberto> (2018).

No início do teste os animais foram posicionados no centro do aparato e os comportamentos expressos foram gravados por 5 minutos em vídeo para análise posterior dos seguintes parâmetros comportamentais: a permanência na área central do aparato, medida em segundos; o número de quadrantes percorridos no total; o número de quadrantes percorridos na parte periférica, o número de quadrantes percorridos na área central, e a porcentagem da locomoção central. E os seguintes parâmetros complementares: quantidade de *rearing* (movimento em que o animal fica sobre as duas patas traseiras e se levanta para explorar mais o ambiente).

Entre cada animal testado foi realizada a limpeza do aparato com álcool 15%, deixando-o secar antes do início do próximo animal.

Segundo a literatura, a maioria dos roedores prefere a periferia do aparato à área central, onde ficaria mais exposto frente a um possível ataque predatório (RAMOS et al 1997-2008). Quanto mais quadrantes ele percorre na periferia e quanto menos tempo ele passa dentro da área central (área desprotegida) do aparato, mais ansioso o animal é considerado. Além destes fatores existem outros que são complementares e que ajudam na análise do teste.

7.2 Labirinto em Cruz Elevado:

Este é uns dos principais modelos usados para mensurar a ansiedade, surgiu por volta dos anos 50. E inicialmente estava relacionado com experimentos associados à exploração e medo, foi desenvolvido por Montgomery, como modelo inicial, o labirinto em Y elevado. Handley e Mithani (1984) posteriormente foram os responsáveis por iniciarem trabalhos com o labirinto elevado em forma de cruz, caracterizando hoje o labirinto em cruz elevado. É um teste muito utilizado hoje em dia para se estudar sobre a ansiedade e os comportamentos do tipo ansiosos apresentados pelos roedores (MORATO, 2006). Dentro deste teste é analisado um comportamento chamado avaliação de risco, no qual o ambiente novo iria ocasionar um aumento no impulso exploratório e um aumento no medo, originando assim um conflito interno nos roedores, entre explorar o ambiente e proteger-se contra as áreas abertas e elevadas.

Atualmente o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é o teste mais utilizado para seleção de drogas ansiolíticas, permitindo investigar aspectos comportamentos, fisiológicos e farmacológicos dos animais (RAMOS, 2008).

Os animais colocados no labirinto em cruz elevado apresentam comportamento de avaliação de risco (“risk assessment”), como já mencionado anteriormente que pode estar

relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD et al., 2001; LACERDA, 2006).

O teste compreende em utilizar um aparato feito de acrílico, plástico ou madeira com as seguintes medidas: braço aberto (34 x 6,5 cm) e braço fechado (34 x 6,5 x 15 cm). Neste caso foi utilizado um aparato feito de polipropileno, em formato de cruz elevada com 50 cm de altura em relação ao substrato da sala em que o teste será realizado. O aparato dispõe de dois braços abertos e dois braços fechados que estão posicionados de forma oposta entre si. Os braços abertos não contêm bordas nas extremidades. Neste teste o animal pode explorar livremente os braços do labirinto durante cinco minutos. Os parâmetros comportamentais expressos pelos animais foram filmados para posterior análise. (PINTO et al., 2012). Antes de um novo animal ser testado, o aparato foi limpo com álcool 15%.

Figura 06 e 07: Labirinto em Cruz Elevado, aparato com uma plataforma em cruz acima do solo, com um par de braços abertos e um par de braços oposto fechados. Método padrão utilizado para avaliação de comportamentos do tipo ansiosos em camundongo.



Fonte: <http://analisedocomportamentouel.blogspot.com/2016/01/> (2018).

Os parâmetros comportamentais avaliados no LCE incluem: tempo de permanência na plataforma central, tempo gasto nos braços fechados e abertos, porcentagem de tempo gasto nos braços fechados e abertos em relação ao tempo total do teste, número de entradas nos braços abertos e fechados. Os parâmetros complementares foram: *headdipping* (número de inclinações com a cabeça em relação ao braço aberto- mergulho), ocorrência de urina e fezes durante o teste, *freezing* (congelamento) do animal, *grooming* (comportamento de autolimpeza), número total de espreita, o número total de *rearing* (apoio do animal sobre as patas traseiras), *stretched attend postures* (esticada- postura na qual o animal se estica de forma cautelosa adiante, sem que saia do lugar, permanecendo imóveis as patas traseiras, voltando posteriormente para a mesma posição) e por fim o número de quedas a partir do braço aberto (PINTO, 2012).

Tabela I – Distribuição teórica dos índices comportamentais observados no Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto, fatores ansiedade e locomoção.

MODELO	Ansiedade	Locomoção
Labirinto em Cruz Elevado		
Número de entradas nos braços abertos	X	
% de entradas nos braços abertos	X	
% de tempo nos braços abertos	X	
Espreitas	X	
Head dippings	X	
Número de entradas nos braços fechados		X
Campo Aberto		
Ambulação Total		X
Ambulação Periferica		X
Ambulação Centro (número)	X	

Fonte: LACERDA, 2006 “Ansiedade em Modelos Animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial”

8. Programas Utilizados:

8.1 Open Field

O Programa OpenFLD foi utilizado em especial para análises dos testes comportamentais referentes ao Campo Aberto. Este programa conta com inúmeras opções que facilitam principalmente a contagem dos 300 segundos e o reconhecimento do animal no centro do aparato.

8.2 Teste Estatístico:

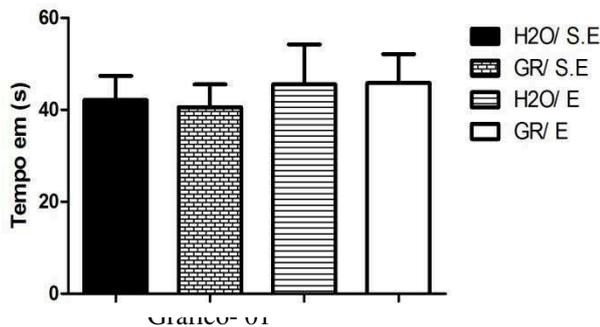
O teste estatístico realizado para análises e entendimento dos resultados obtidos através dos experimentos (Campo Aberto e Labirinto Em Cruz Elevado) foi feito através do programa online Prisma (GraphPad Prism7). Dentro deste programa Prism, utilizou-se o ONE WAY ANOVA e o TWO WAY ANOVA seguido do pós teste Newman-Keuls para comparações. O nível de significância atribuído foi de ($p \leq 0,05$). Para realização destes gráficos se trabalhou através das médias, do desvio padrão e dos erros padrão das médias $EPM \pm$

9. Resultados dos Testes Comportamentais:

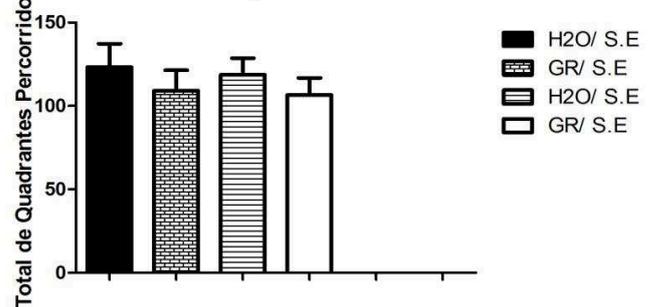
9.1 Teste Campo Aberto

Buscou-se analisar as relações do tipo ansiosas pelos animais dos grupos experimentais.

Campo Aberto - Tempo de Permanência no Centro



Locomoção Total



% da Locomoção Central

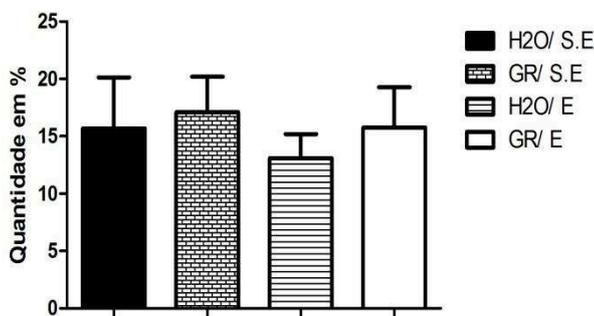


Gráfico- 02

Rearing do Campo Aberto

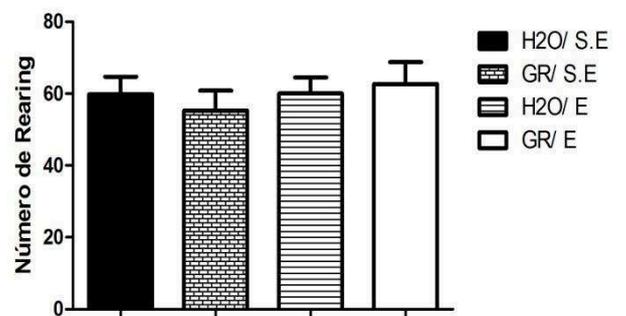


Gráfico- 05

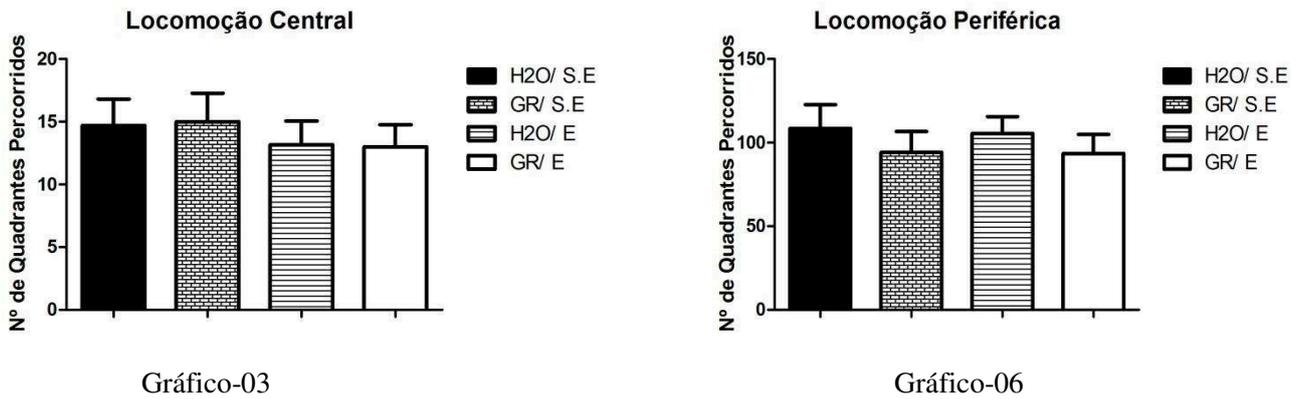


Gráfico 01- Tempo de permanência na área central dos quatro grupos; Gráfico 02- Porcentagem da locomoção central; Gráfico 03- Locomoção Central; Gráfico 04- Locomoção Total; Gráfico 05- *Rearing*; Gráfico 06- Locomoção Periférica. Nenhum dos gráficos apresentou diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos na forma de média \pm EPM.

Quanto ao tempo de permanência na área central, os grupos controle: H2O/S.E ($42,12 \pm 5,3$) e H2O/E ($45,51 \pm 8,7$) e os grupos suplementados com GR/S.E ($40,58 \pm 4,9$) e GR/E ($45,80 \pm 6,4$), não mostraram diferença significativa, sendo que, os quatro grupos permaneceram pouco tempo (40 segundos) na área central (gráfico 01). Em relação à locomoção central e periférica, temos que em relação ao parâmetro de quadrantes percorridos no centro (gráfico 03), os quatro grupos se apresentam de forma semelhante: H2O/S.E ($14,8 \pm 2,08$), GR/S.E ($15 \pm 2,28$), H2O/E ($13,16 \pm 1,89$) GR/E ($13,0 \pm 1,75$), todos percorrendo poucos quadrantes centrais e mostrando uma quantidade menor de quadrantes percorridos. Em quanto à locomoção periférica (gráfico 06), todos os quatro grupos permaneceram boa parte do tempo nos quadrantes periféricos, inclusive o grupo controle, não havendo diferença significativa entre eles: H2O/S.E ($108,58 \pm 14,09$), GR/S.E ($94,17 \pm 12,49$) H2O/E ($105,5 \pm 10,09$) e GR/E ($93,5 \pm 11,39$).

Quando comparamos a locomoção total de quadrantes percorridos, os grupos suplementados GR/S.E ($109,2 \pm 12,24$) e GR/E ($106,5 \pm 10,35$) e os grupos controle, H2O/S.E ($123,2 \pm 14,02$) e H2O/E ($118,7 \pm 10,08$), mostram valores semelhantes, não apresentando diferença significativa entre eles (gráfico 04). Do mesmo modo, quanto à porcentagem de locomoção central, observou-se que tanto os grupos controle H2O/S.E ($15,6 \pm 4,44$), H2O/E ($13,0 \pm 2,11$) quanto os suplementados GR/S.E ($17,0 \pm 3,10$) e GR/E ($15,78 \pm 3,49$) mantiveram um padrão semelhante entre si, possuindo pouca porcentagem na área central do aparato (gráfico 02). Por fim o último parâmetro analisado neste teste foi o comportamento de *rearing*, que assim como todos os outros não apresentou diferença significativa entre os quatro grupos: H2O/S.E ($59,8 \pm 4,8$), GR/S.E ($55,4 \pm 5,5$), H2O/E ($60,0 \pm 4,47$), GR/E ($62,6 \pm 6,07$)(gráfico 05).

9.2 Teste Labirinto em Cruz Elevado- LCE

Neste teste também se buscou analisar as reações do tipo ansiosas expressas pelos animais experimentais.

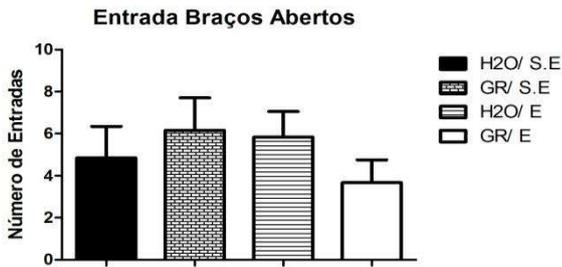


Gráfico-07

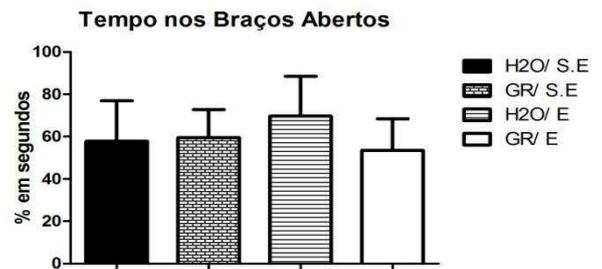


Gráfico-08

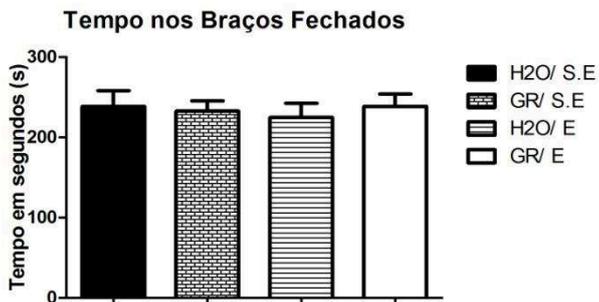


Gráfico-09

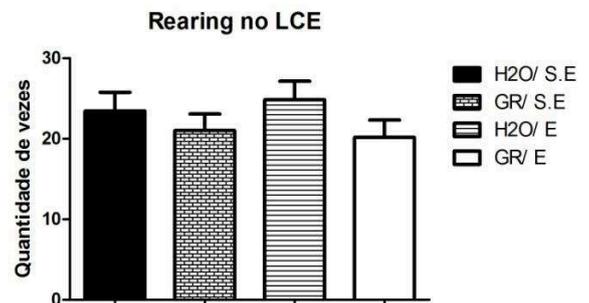


Gráfico-10



Gráfico-11

Gráfico 07- Número de entrada nos Braços Abertos dos grupos experimentais; Gráfico 08- Tempo(s) nos Braços Abertos em porcentagem; Gráfico 09- Tempo (s) nos Braços Fechados; Gráfico 10- *Rearing* e Gráfico 11- *Headdipings*. Nenhum dos parâmetros/gráficos apresentou diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos na forma de média \pm EPM.

Com relação ao primeiro parâmetro analisado para este teste, tempo de permanência nos braços abertos, percebemos que não houve diferença significativa entre os grupos ($57,76 \pm 19,16$), H2O/E ($69,72 \pm 18,81$) e os grupos tratados GR/S.E ($59,55 \pm 13,23$), GR/E ($53,55 \pm 14,51$) em relação à na quantidade de tempo nos braços abertos (gráfico 08). Inclusive o grupo controle permanecendo pouco tempo nos B.A. Também em relação ao número de entradas nos braços abertos, houve baixa quantidade de entradas não havendo diferenças significativas entre os grupos: H2O/S.E ($4,86 \pm 1,08$), H2O/E ($5,84 \pm 1,22$), GR/S.E ($6,17 \pm 1,53$) e GR/E ($3,67 \pm 1,08$) (gráfico 07).

Em relação ao tempo gasto nos braços fechados (gráfico 09), medido em segundos, os grupos continuaram a manter padrão de semelhança entre eles, não mostrando diferença significativa. H2O/S.E ($238,3 \pm 19,7$), GR/S.E ($232,5 \pm 12,7$), H2O/E ($224,5 \pm 17,9$) e GR/E ($238,5 \pm 15,2$). Novamente observamos os que até mesmo o próprio grupo controle ficou muito tempo nos braços fechados, de forma geral todos ficam quase que 100% do tempo nos braços fechados.

Em relação ao parâmetro complementare no *rearing* o grupo suplementados com GR tenderam a exibir menos esse comportamento, GR/S.E ($21 \pm 2,06$) e GR/E ($20,17 \pm 2,15$) em relação aos grupos controles H2O/S.E ($23,42 \pm 2,32$) e H2O/E ($24,84 \pm 2,30$), mas a diferença não foi significativa entre os quatros grupos (gráfico 10). Quanto ao outro, parâmetro completar *headdipping*, não se observou diferença significativa entre os grupos não estressados H2O/S.E ($16,4 \pm 6,27$) e GR/S.E ($16,5 \pm 4,50$), que apresentaram valores próximos. Embora o grupo H2O/E ($21,5 \pm 7,0$) tenha apresentado quantidades maiores deste comportamento que o grupo suplementado, GR/E ($12,3 \pm 4,07$), não houve diferença entre eles (gráfico 11).

9.3 Resultados do Controle de Peso dos Animais

O controle de peso foi um parâmetro fisiológico verificado ao longo de todo o experimento. Como pode ser visto no gráfico 12 a média dos pesos dos animais do grupo controle que não foram expostos ao estresse crônico H2O/S.E ($25,7 \pm 0,26$) foi menor em comparação à média de peso observado no grupo que recebeu suplementação de GR, GR/S.E ($27,2 \pm 0,23$). Já o grupo controle que foi exposto ao estresse crônico H2O/E obteve média maior ($27,17 \pm 0,5$) em relação ao grupo suplementado com GR ($27,15 \pm 0,3$). Mostrando assim de forma geral, que não houve diferença significativa entre os quatros grupos.

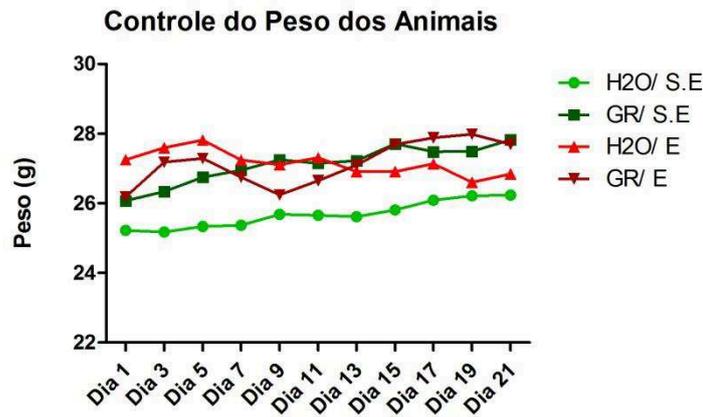


Gráfico -12 Peso em média dos quatro grupos de animais no decorrer de todo o experimento. Iniciado no dia (T1) e se prorrogando ao final (T21). Mesmo com a tendência de alguns grupos se apresentarem com pesos menores em relação a outros. As análises não foram significativas para $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos na forma de média \pm EPM.

10. Discussão

Inúmeros estudos mostraram os diversos benefícios da geleia real para o organismo, promovendo efeitos positivos no SNC, como por exemplo, facilitando a neurogênese e a diferenciação de células troncos (HATTORI et al, 2007), proporcionando efeito neuroprotetor em ratos que possuíram danos cerebrais causados pelo corante sintético tartrazina, (MOHAMED; GALAL; ELEWA 2015, GONÇALVES, 2018), além de redução de sintomas relacionados à ansiedade e depressão em animais cujo estresse foi induzido (ITO et al 2012; SILVA, 2017) e (TEXEIRA et al 2017).

PYRZANOWSKA e colaboradores (2014), mostraram em experimentos com ratos machos envelhecidos naturalmente, que o consumo prolongado de GR foi capaz de favorecer a neurotransmissão, trazendo uma melhora significativa na memória em idades avançadas.

Sabe-se que o encéfalo é um órgão vulnerável, quando comparado aos demais órgãos do nosso corpo, sofrendo bem mais com o estresse oxidativo, uma vez que necessita de quantidades maiores de oxigênio para realizar suas funções e possui uma carência de antioxidantes para se proteger (SERRANO et al, 2004; GUIMARÃES et al, 2008; TEXEIRA, 2017).

O encéfalo é o principal órgão relacionado ao estresse, ele é responsável por acionar as respostas contra o estressor, ele mobiliza inúmeros mecanismos adaptativos contra os estressores (inúmeras situações), tanto físicos quanto sociais, assim armazenando uma memória a estes estímulos sofridos no decorrer da vida. Também sendo o responsável por

regular as respostas fisiológicas comportamentais, protetoras ou até mesmo danosas do indivíduo (MCEWEN et al, 2015; PITTA, 2017).

Sabe-se que o principal hormônio esteróide presente no ser humano é o cortisol e nos roedores encontramos um hormônio análogo a este, que é a corticosterona (KANDEL et. al 2014). Esse hormônio é liberado pela glândula adrenal do eixo hipotálamo-hipófise adrenal quando há uma situação estressante que o induz. A Geleia Real foi capaz de reduzir tais níveis de corticosterona, e ao mesmo tempo gerou uma melhora no sistema antioxidante em ratos que sofreram com o estresse crônico induzido (TEXEIRA et al 2017). Foi mostrado que os produtos produzidos pelas abelhas de modo geral possuem grande quantidade de antioxidante que são capazes de combater os efeitos causados pelo estresse oxidativo na patogênese de muitas doenças, temos como exemplo, a própolis, o mel e a geleia real (KOCOT et al, 2018). Isto se deve a presença de compostos fenólicos e flavonóides nestes produtos.

Ainda em relação ao efeito antioxidante da GR, foi mostrado em estudo com roedores que receberam Cádmio, um metal pesado e tóxico, que o tratamento com GR uma melhora significativa nos resultados, afinal as duas doses ministradas de GR (100 e 250mg/kg) foram capazes de suprimir o efeito causado por este metal tóxico, além de ter ajudado na recuperação do sistema antioxidante glutatona reduzida, pois seu dano oxidativo havia levado a diminuição dos níveis deste sistema antioxidante (ÇAVUŞOĞLU, 2009). Essa propriedade antioxidante esta bem relacionada com a presença de uma substância conhecida como ácido graxo 10-hidroxi-2-decenóico- HDEA, composto identificado somente na composição da geleia real, não sendo encontrado em nenhum outro produto (SILICI et al 2009-2011, KOCOT et al, 2018).

Pesquisadores da UFU em experimento semelhante a este, analisaram as propriedades antioxidante da GR. Após induzirem estresse crônico, por restrição de movimentos e pelo frio, suplementaram os animais com GR por 14 dias. Foi demonstrado que o estresse foi capaz de gerar um aumento nos níveis de corticosterona, glicemia e peroxidação cerebral, e a GR foi capaz de atuar contra estes efeitos gerados, diminuindo então os níveis de corticosterona e peroxidação, e mantendo os de glicemia nos roedores (TEXEIRA et al 2017).

O consumo de GR de forma prolongada foi capaz de diminuir os neurotransmissores GABA (Ácido Gama Aminobutírico), que possuem papel essencial no combate contra o estresse e a tensão nervosa (PYRZANOWSKA et al, 2014-2018). O HDEA presente na geleia real foi capaz de reduzir os sintomas de ansiedade e depressão em roedores que passaram pelo modelo de estresse induzido nado forçado, e que posteriormente receberam a administração de geleia real (ITO el al, 2012).

Em experimento realizado por JAMNIK e colaboradores (2007), no qual avaliou-se a ação antioxidante da GR em uma levedura, *Sccharomyces cerevisiae*, a GR mostrou-se capaz de baixar a oxidação intracelular, eliminando assim as espécies de oxigênio reativas, além de afetar também a expressão proteica desta. Neste experimento eles usaram 2',7'-diclorofluoresceína, um corante orgânico, para induzir a oxidação intracelular.

Em nosso presente trabalho também se buscou avaliar tais efeitos positivos da GR, em especial sua propriedade antioxidante, bem como sua capacidade de ajudar na redução dos níveis de comportamentos do tipo ansiosos em roedores que foram expostos ao estresse crônico por restrição de movimento. E para tal análise, utilizou-se os testes comportamentais: LCE e CA, muito utilizado na avaliação de tal comportamento.

O Labirinto em Cruz Elevado é um sistema de avaliação comportamental muito importante, sendo uma grande ferramenta na pesquisa em área experimental, especialmente para o estudo de doenças neuropsiquiátricas, sendo também utilizado com muita frequência nos estudos com fármacos. Hoje em dia está entre os principais testes relacionados aos estudos de transtornos de ansiedade, bem como os comportamentos associados à ansiedade (PINTO et al, 2012).

Neste teste temos a análise do conflito de aproximação-esquiva do animal, conhecido como *approach-avoid conflict*. Esse evento é observado diante de ambientes desconhecidos, já que os roedores possuem naturalmente uma tendência de esquiva em relação a regiões abertas, que são potencialmente perigosas ou conflituosas (LISTER, 1987; FRUSSA et al, 2010). Além deste comportamento, no LCE também é possível estudar e observar a avaliação de risco (*risk assesment*) por meio da quantidade obtida nos seguintes parâmetros: número de *headdippings* e o número de entradas nos braços fechados. Quando se obtêm números altos em ambos, indica que o animal está apresentando um comportamento padrão de cautela e precaução referente ao ambiente no qual está inserido (PINTO et al, 2012).

Em nossos resultados obtidos no LCE, foi demonstrado que os quatro grupos experimentais apresentaram médias semelhantes entre si, com relação a quantidade de vezes que se realizou o parâmetro *headdipping* e o nº de entradas nos braços fechados. Podendo nos indicar que todos os grupos experimentais apresentaram tal comportamento de cautela.

Montgomery, 1955, mostrou em experimento com o labirinto em Y, que os animais expressaram uma permanência maior nos braços fechados, que nos braços abertos, mostrando uma exploração menor aos braços abertos. Esta preferência se deu pela exposição dos animais a lugar não familiar, mostrando uma situação de conflito interno de esquiva de exploração-curiosidade gerada pelo medo. Tal comportamento tem sido considerado análogo à ansiedade,

sendo que neste transtorno o estímulo da novidade, é a principal fonte de motivação aversiva (GRAY, 1982).

Outro estudo que comprova tal preferência foi realizado por Pellow e colaboradores em 1985, no qual os ratos submetidos ao LCE obtiveram menos tempo e menor frequência nos braços abertos quando comparados aos braços fechados. Mostrou-se neste estudo que quando se existe uma exposição forçada dos animais aos braços abertos, promove-se um aumento nos níveis de corticosterona e assim um aumento nos comportamentos relativos à ansiedade, como o *freezing* e defecação (PELLOW et. al 1985).

Em nossos resultados, quando observamos o tempo de permanência do animal nos braços fechados e o tempo de permanência nos braços abertos, vemos que os animais dos quatro grupos experimentais tendem a passar mais tempo dentro dos braços fechados, com uma média geral de aproximadamente 215 segundos, ou seja, uma grande parte do tempo total do teste é passada nos braços fechados do aparato. O interessante é que mesmo o grupo controle H2O/S.E que deveria possuir um tempo maior nos braços abertos, tende a passar a mesma quantidade de tempo nos braços fechados e nos braços abertos que os grupos que foram estressados, mostrando que já de início o grupo controle também apresentava-se estressado.

Teste de Campo Aberto (TCA) desenvolvido por HALL (1934) no qual a quantidade de atividade motora do animal é usada como indicadora de seu estado emocional, já que a baixa atividade locomotora pode ser um dos parâmetros indicativos de ansiedade. Pode-se também utilizar tal atividade locomotora do animal no centro como uma medida mais seletiva de ansiedade. Esse modelo, assim como o anterior tem sido amplamente utilizado para demonstrar efeito de drogas ansiolíticas em modelos animais (MONLEON, et al.,1995).

Sabe-se que os roedores já serem mais ativos naturalmente (VALLE,1970; WEHRMEISTER, 2010). Portanto, em relação ao presente estudo, os dados obtidos na locomoção periférica do campo aberto constatou que há uma grande preferência entre os quatro grupos experimentais em preferir a área periférica do aparato, sendo que se ocorrer um aumento desta locomoção na área central do aparato assim como um maior tempo gasto nesta área, são indicadores decrescentes da ansiedade, pois o animal se encontra em uma área aberta e desprotegida (PRUT; BELZUNG, 2003).

Ramos e colaboradores mostraram em um experimento no qual submeteram os animais ao teste CA, que os animais tendem a preferir a periferia que a área central do aparato, apresentando assim, que estes animais possuíam comportamentos do tipo ansiosos, provavelmente devido a própria presença deles a exposição a um ambiente novo.

Em nosso trabalho foi demonstrada tal preferência pela periferia, onde os animais dos quatro grupos experimentais permaneceram de forma geral e semelhante, por cerca de mais de 200 segundos na área periférica, permanecendo assim na locomoção central com média geral entre os quatro grupos de 15 segundos, pouco tempo de permanência. Foi demonstrado que assim como no LCE, os quatro grupos experimentais possuíram tal semelhança no CA, exibindo aqui que inclusive, o grupo controle H₂O/S.E que não passou pelo estresse induzido por restrição, durante o experimento apresentou-se com comportamentos estressados, comprovando mais uma vez que tal grupo sofreu outro tipo de estresse ao longo dos experimentos, pois este mesmo deveria apresentar uma quantidade menor que os grupos experimentais que passaram pelo estresse induzido por restrição.

Jeong e colaboradores (2013), nos apresenta um fator relacionado ao estresse, que é a perda de peso, um indicador de estresse nos modelos animais submetidos ao estresse crônicos. De forma semelhante Kong e colaboradores (2013), mostraram que ratos que passaram por algum tipo de estresse possuíam peso menor em relação ao grupo controle, o que não foi mostrado significativamente em nossos experimentos, mas que apresentou tal tendência, pois os grupos dos animais que sofreram estresses e foram suplementados com GR, finalizaram o experimento com pesos menores em comparação ao grupo controle que recebeu H₂O no lugar da geleia real.

Apesar de todos estes experimentos já realizados demonstrarem efeito positivo da geleia real e contribuirem com seus resultados obtidos, comprovando que a GR mostrou ser um produto de origem natural capaz e eficaz nas suas inúmeras ações. Em nosso presente experimento foi observado o contrário, que a suplementação com geleia real 200mg/kg de peso animal não foi capaz de reverter os efeitos proporcionados pelo estresse crônico induzido por restrição nos camundongos. Discutindo melhor os fatos obtidos, podemos atribuir esta não eficiência à alguns fatores apresentados e descritos abaixo.

O primeiro fator que pode ter contribuído para ineficácia do tratamento é a dosagem da geleia real, que neste experimento foi de 200mg/kg de peso animal, não sendo uma dosagem significativa para proporcionar tal mudanças nos comportamentos do tipo ansiosos.

Outro fator que é capaz de interferir nos resultados, é o próprio modelo de estresse utilizado, dentro deste, podemos destacar que o animal que recebe um estressor externo durante um tempo prolongado, a medida que o tempo passa, chega um momento que se alcança um máximo de estresse, ou seja, não importa mais o quão este estressor o estresse que não haverá mais mudanças nos níveis de estresse, neste experimento não importa o tempo e quantidade de vezes que o animal é submetido ao modelo de estresse, pois este funciona como

um estressor e já não vai mudar o nível de estresse obtido pelos animais. Podendo nos levar a acreditar que o modelo de estresse por restrição de movimentos utilizado não foi eficaz em sua finalidade, que era de causar o estresse crônico nos animais.

Terceiro fator é referente aos próprios animais, pois foi observado que até mesmo os animais do grupo controle H₂O/S.E apresentaram tais comportamentos do tipo ansiosos, mesmo não tendo este passado pelo estresse por restrição de movimento, o que indica que os animais já estavam estressados antes dos testes se iniciarem, ou seja, outro fator estressante, como por exemplo a ambiência pode ter estressado estes animais. JOHNSON-DELANEY, 1996 nos apresenta algumas características que podem ter contribuído para tal estresse. Ele nos afirma que os camundongos por possuírem tamanho pequeno, é muito susceptível as mudanças de condições ambientais a sua volta, como por exemplo, a variação pequena na temperatura (2 a 3°C), que pode levar a uma mudança em sua fisiologia e assim no comportamento. Desta forma, inúmeros fatores: temperatura; luz; ventilação; ruído; qualidade; manejo, dentre outros interferem e influenciaram no estresse dos animais, devendo ser monitorados o máximo possível (SALGADO et al 2007). Deve-se lembrar que a própria manipulação/manejo do animal pelo experimentador ao realizar o procedimento de gavagem, e pelos técnicos nas trocas de maravalha das caixas, pode ter sido capaz de gerar estresse aos animais, principalmente nos grupos não submetidos ao estresse.

Não descartando ainda, um quarto fator, referente as análises estatísticas, pois se talvez excluíssemos os valores extremos obtidos nos testes, ou seja, valores que se destoam muito da média obtida pela maioria dos animais, talvez assim o gráfico mudaria sua conformação de barras.

Sendo assim, dada a importância dos estudos que envolvam distúrbios neuropsiquiátricos e seus possíveis tratamentos, especialmente tratamentos com produtos naturais, estudos adicionais a esse são necessários para elucidarmos mais os efeitos dessa estratégia de terapia.

11. Conclusão

É possível concluir com os resultados desse estudo que o tratamento de camundongos submetidos ao estresse crônico por 14 dias e posteriormente suplementados com 200mg/kg de peso de Geleia Real durante 21 dias, apesar de demonstrado ao contrário na literatura, não foi

eficaz. Ou seja, a geleia real não foi competente na reversão dos comportamentos do tipo ansiosos apresentados pelos camungondos.

Para que se assemelhe aos demais trabalhos já apresentados na literatura é necessário refaze-lo com algumas mudanças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (Estados Unidos). **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5.ed. Washington: Artmed, 2013. 947 p. Disponível em:
<<https://blogs.sapo.pt/cloud/file/b37dfc58aad8cd477904b9bb2ba8a75b/obaudoeeducador/2015/DSM%20V.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2018;
- ANDREATINI. R et al. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, Paraná, v. 23, n. 4, p.233-242, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbp/v23n4/7172.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2017;
- BARREIROS.A L. B. S.; DAVID.J M; DAVID.J P..Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.113-123, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO);
- BARNUTIU et al. Chemical Composition Antimicrobial Activity of Royal Jelly: Animal Science and Biotechnologies. **Scientific Papers**, Romania, p.67-72, 2011;
- BLANCHARD. C.D; GRIEBEL.G.; BLANCHARD. R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 205- 218;
- CASTILLO.A R G L. Transtornos de ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, p.20-23, 2000;
- CORDIOLI.A.V. **Psicofármacos nos Transtornos Mentais**. 2014. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/242460752_PSICOFARMACOS_NOS_TRANSTORNOS_MENTAIS>. Acesso em: 03 mar. 2018;
- FRUSSA.F.R;PATTI.C.L;FUKUSHIRO.D.F;RIBEIRO.L.T.C;KAMEDA.S.R;CARVALHO. R.C. The plus-maze discriminative avoidance task: na ethical rodent model for concomitante evaluation of learning,memory,anxiety,motor activity na their interations. In:Andersen ML, Tufik S, organizers. *Animal models as tools in ethical biomedical research*. 1st ed.2010.p.363-381;
- GONÇALVES.A.H.C. et al. Efeitos da apitoxina e da geleia real sobre o sistema nervoso central. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.25-29, 1 out. 2018. Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas. <http://dx.doi.org/10.18378/rebes.v8i4.6322>;
- GRAY, J. A. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal sustem*. New York: Oxford University Press, 1982;
- GUIMARÃES.L.M.A.D; TEIXEIRA.R..R; ESPÍNDOLA.,F.S. **Avaliação Bioquímica e Comportamental de Camundongos Suplementados Oralmente com Geléia Real**. 2008. 10 f. TCC (Graduação) - Curso de --, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/54353756-Avaliacao-bioquimica-e-comportamental-de-camundongos-suplementados-oralmente-com-geleia-real.html>>. Acesso em: 10 fev. 2019;

HALL,C.S.Emotinal behavior in the rat:I.Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.*J.Comp.Psychol.* 18,385-403, 1934;

HATA.T; NISHIKAW.H; ITOH.E; FUNAKAMI, Yoshinori ,Anxiety like behavior in elevated plus maze test in repeatedly cold stressed mice. **Pharmacol**, Japan, p.189-196, 28 nov. 2000;

HASHIMOTO.M et al. Oral Administration of Royal Jelly Facilitates mRNA Expression of Glial Cell Line- Derived Neurotrophic Fator and Neurotrophic Fator and Neurofilament H in the Hippocampus of the Adult Mouse Brain. **Biosci.biotechnol.biochem**, Japan, v. 4, n. 69, p.800-805, 19 jan. 2005;

HATTORI. N et al. Royal Jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomedical Research**, Japan, p.266-2007, 01 ago. 2007;

HATTORI.N et al. Identification of AMP N1- Oxide in Royal Jelly as a Component Neurotrophic toward Cultured Rat Pheochromocytoma PC12 Cells. **Biosci.biotechnol.biochem**, Japan, v. 4, n. 70, p.897-906, 10 dez. 2006;

HATTORI.N et al. Royal Jelly Facilitates Restoration of the Cognitive Ability in Trimethyltin-Intoxicated Mice. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2011, p.1-6, 2011. Hindawi Limited.
<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep029>;

ITO.S et al. Antidepressant-Like Activity of 10-Hydroxy-Trans-2-Decenoic Acid, a Unique Unsaturated Fatty Acid of Royal Jelly, in Stress-Inducible Depression-Like Mouse Model. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2012, p.1-6, 2012. Hindawi Limited;

JAMNIK.P; DUSAN.G; RASPOR.P. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. **Elsevier Science**, -, v. 42, p.594-600, 2007;

JEONG JY, LEE D.H, KANG S.S.. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol. Metab.* 28, 288-296,2013;

JOCA.S R. L et al. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev Bras Psiquiatr**, Ribeirão Preto, p.46-51, 2003;

JURUENA M.F et al.O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev Bras Psiquiatr**, Londres, v. 3, n. 26, p.189-201, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbp/v26n3/a09v26n3>>. Acesso em: 26 jun. 2017;

JOHNSON-DELANEY C. *Small rodents: rats*. Florida: Exotic Companion Medicine Handbook, 1996. p 200;

KANDEL,E. et al. **Princípios de Neurociências**. 5 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014;

KOCOT.J et al. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2018, p.1-29, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/7074209>;

LACERDA, G L M L. **ANSIEDADE EM MODELOS ANIMAIS: EFEITO DE DROGAS NAS DIMENSÕES EXTRAÍDAS DA ANÁLISE FATORIAL**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006;

LENT, Roberto. **CEM BILHÕES DE NEURÔNIOS: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p 664-665;

LISTER.R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmac (Berl)*. 1987;92(2):180-5;

MARGIS.R; SILVEIRA.R.O; COSNER.A.F. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **R. Psiquiatr**, Rio Grande do Sul, p.65-74, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rprs/v25s1/a08v25s1>>. Acesso em: 01 nov. 2017;

McEWEN,B.S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nat Neurosci**, v.18.10,2015;

MOHAMED, A. A.; GALAL, A. A.; ELEWA, Y. H. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. **Acta Histochemica**, [s.l.], v. 117, n. 7, p.649- 658, set. 2015;

MORATO.S. O papel da visão na Aversão aos Espaços Abertos no Labirinto em Cruz Elevado. **Psicologia Usp**, São Paulo, v. 17, n. 1, p.159-174, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pusp/v17n4/v17n4a09.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2018;

MONLEON, S.; D'AQUILA, P.; PARRA, A.; SIMON, V. M.; BRAIN, P. F.; WILLNER, P. **Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine**. *Psychopharmacology (Berl)*.1995 Feb;117(4):453-7;

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 48:254-260, 1955;

NAGAIT; SAKAIM; INOUE.R, et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Elsevier Science: Food Chemistry**, Japan, n. 75, p.237-240, 28 mar. 2001;

OLIVEIRA, M. C; SCHOFFEN.J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010;

OPAS BRASIL. “Aumenta o Número de Pessoas com Depressão no Mundo”, Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5354:aumenta-o-numero-de-pessoas-com-depressao-no-mundo&Itemid=839>. Acesso em 25 de Novembro de 2017;

PAVEL et al. Biological Activities of Royal Jelly. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, Romania, p.108-118, 2011;

PRUT. L; BELZUNG.C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 463, n. 1-3, p.3-33, fev. 2003. Elsevier BV;

PINTO.W.B.V.R; LAPCHIK.V.B.V; ARIZA.C.B; KO.G. M; PORCIONATTO.M. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **RESBCAL**, São Paulo, v. 1, p.102-120, mar. 2012;

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. & BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14, 149-167, 1985;

PITTA, F. D. **Título: Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas relacionadas em camundongos.** 2017. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Psicobiologia, Programa de Pós Graduação em Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017;

PYRZANOWSKA, J. et al. Long-term administration of Greek Royal Jelly improves spatial memory and influences the concentration of brain neurotransmitters in naturally aged Wistar male rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 155, n. 1, p.343-351, ago. 2014;

PYRZANOWSKA, J. et al. Long-term administration of Greek Royal Jelly decreases GABA concentration in the striatum and hypothalamus of naturally aged Wistar male rats. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 675, p.17-22, maio 2018;

RAMOS.A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.493-498, out. 2008. Elsevier BV;

RAMOS, A.; BERTON, O., PIERRE, M.; CHAUOFF, F. A multiple-test study of anxiety related behaviors in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research*; 85: 57-69, 1997;

SALGADO,H.R.N; CHORILLI,M; MICHELIN, D.C.. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p.11-23, 2007;

SERRANO, F; Klann, E. “Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus”, *Ageing Research Reviews*, Vol.3, pp.431–443.2004 ;

SILICI S; EKMEKCIOGLU.O; ERASLAN G;DEMIRTAS A. Efeito antioxidante de geleia real em danos de testículos induzidos por cisplatina. **PubMed** 2009; 74 (3): 545-551. doi: 10.1016 / j.urology.2009.05.024;

SILICI S., Ekmekcioglu O; Kanbur M; Deniz K. O efeito protetor da geleia real contra o estresse oxidativo renal induzido por cisplatina em ratos. **PubMed** 2011; 29(1): 127–132. doi: 10.1007 / s00345-010-0543-5;

SILVA, Tiago Guardia de Souza e. **Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento prolongado com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de**

Alzheimer. 2017. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Psicologia, Instituto de Psicologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2017;

SPADINI L.S; SOUZA.M.C.B. A doença mental sob o olhar de pacientes e familiares. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, São Paulo, v. 40, n. 1, p.123-127, 2006;

TEIXEIRA, R. R. et al. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 655, p.179-185, ago. 2017;

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *Am J Psychol*, v.83, n.1, p.103-111. 1970;

VORKAPIC.C.F; RANGÉ. B. Os Benefícios do Yoga nos Transtornos de Ansiedade. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, Rio de Janeiro, p.50-54, 2011;

WEHRMEISTER.T.D. **Validação Farmacológica de um Novo Modelo Comportamental Integrado de Ansiedade/Emocionalidade em Ratos.** 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/93898/277602.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 fev. 2019;

ZUARDI.A.W. **Fisiologia do Estresse e sua Influência na Saúde.** Disponível em: <http://www.academia.edu/8514738/FISIOLOGIA_DO_ESTRESSE_E_SUA_INFLU%C3%8ANCIA_NA_SA%C3%9ADE>. Acesso em: 03 mar. 2018;

ÇAVUŞOĞLU, Kültiğın; YAPAR, Kürşad; YALÇIN, Emine. Royal Jelly (Honey Bee) Is a Potential Antioxidant Against Cadmium-Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Albino Mice. **Journal Of Medicinal Food**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.1286-1292, dez. 2009. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2008.0203>.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423; e-
mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 155/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 042/17

Projeto Pesquisa: “Efeitos da suplementação com geleia real sobre comportamentos e parâmetros fisiológicos em camundongos adultos expostos a estresse crônico”.

Pesquisador Responsável: Foued Salmen Espindola

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 19 de setembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17