

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MARIANA SOZZA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GELEIA REAL SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS À ESTRESSE CRÔNICO.

Uberlândia - MG
2019

MARIANA SOZZA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GELEIA REAL SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS À ESTRESSE CRÔNICO.

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, sob orientação da
**Profa.Dra. Vanessa Beatriz Monteiro
Galassi Spini**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

Docente do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Prof. Erika Renata Barbosa Neiro

Docente do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Prof. Alexandre Antônio Vieira

Docente do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia, 25 de junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ida e Paulo, por tudo que me proporcionaram até aqui, pelo apoio e confiança.

À minha irmã, Paula, que foi meu exemplo e ponto de apoio durante toda minha vida.

Ao meu namorado e melhor amigo, Luiz Gustavo, que ficou do meu lado durante toda a graduação, nos momentos bons e ruins, sem ele o caminho não teria sido tão iluminado.

Aos companheiros de laboratório que não hesitaram em me ajudar sempre que necessário.

À minha parceira de projeto, Anna Laura, por toda ajuda e companheirismo.

À minha amiga de faculdade, de vida, parceira de trabalho, Victória, sem ela o trajeto até aqui teria sido difícil.

Aos amigos da faculdade, por todo o apoio durante os anos de graduação.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram durante minha graduação e minha vida pessoal.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a.Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, por todo ensinamento, paciência e oportunidades oferecidos durante os anos de trabalho.

À minha professora, Dr^a. Erika Renata Barbosa Neiro, que me apresentou a disciplina de fisiologia humana. Me auxiliando sempre com muito carinho para meu crescimento profissional.

RESUMO:

O estresse é uma reação do organismo que prejudica a homeostase e pode causar alterações fisiológicas, motoras e comportamentais. Durante o estresse ocorre ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e do Sistema Nervoso Autônomo. Embora as adaptações metabólicas que ocorrem em resposta ao estresse sejam essenciais à sobrevivência do organismo, em condições de estresse crônico estas podem ser deletérias à partir, por exemplo, da geração de radicais livres. As células cerebrais são consideradas as mais vulneráveis ao estresse oxidativo, que leva ao desenvolvimento ou agravamento de diversas patologias, incluindo depressão e doenças neurodegenerativas. Uma vez que tratamentos de depressão e outros distúrbios psiquiátricos com fármacos convencionais podem apresentar efeitos colaterais que são prejudiciais ao paciente, é importante a busca por tratamentos alternativos naturais. Por conta disso, esse estudo sugere um tratamento para depressão feito à base de geleia real, uma vez que esta apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas ação antioxidante, importante contra danos ao sistema neural. Para isto foram utilizados 39 camundongos machos adultos Balb/c divididos em 4 grupos. Destes grupos, 2 foram suplementados via gavagem com Geleia Real e 2 grupos com água, 1 vez ao dia durante 21 dias. Dois grupos (GR/E e H2O/E) foram induzidos ao estresse crônico por restrição de movimento diariamente por 2 horas, enquanto os outros grupos não foram expostos ao estresse (H2O/SE e GR/SE). Ao fim do tratamento todos os animais foram submetidos ao teste de Nado Forçado. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa entre os grupos, inferindo que a Geleia Real foi capaz de reverter os danos causados pelo estresse crônico.

“Palavras-chave”: geleia real; estresse por imobilização; teste de nado forçado; depressão.

ABSTRACT:

Stress is a reaction of the body that impairs homeostasis and can cause physiological, motor and behavioral changes. During stress occurs activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the autonomic nervous system. Although metabolic adaptations that occur in response to stress are essential to the organism's survival, under chronic stress conditions they can be deleterious from, for example, the generation of free radicals. Brain cells are considered the most vulnerable to oxidative stress, which leads to the development or worsening of various pathologies, including depression and neurodegenerative diseases. Since treatments for depression and other psychiatric disorders with conventional drugs may have side effects that are detrimental to the patient, it is important to seek natural alternative treatments. Because of this, this study suggests a treatment for depression based on royal jelly, since it has several biological activities, among them antioxidant action, important against damage to the neural system. For this we used 39 adult male Balb / c mice divided into 4 groups. Of these groups, 2 were supplemented by gavage with Royal Jelly and 2 groups with water, once a day for 21 days. Two groups (GR / E and H2O / E) were induced to chronic stress by movement restriction daily for 2 hours, while the other groups were not exposed to stress (H2O / SE and GR / SE). At the end of treatment all animals were submitted to Forced Swimming test. The results showed that there was a significant difference between the groups, inferring that Royal Jelly was able to reverse the damage caused by chronic stress.

"Key words": Royal jelly; immobilization stress; forced swimming test; depression.

LISTA DE ABREVIATURAS

HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
TEPT – Transtorno de Estresse Pós Traumático
ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico
CRH – Hormônio liberador de Corticotropina
SNC – Sistema Nervoso Central
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-derived Neurotrophic Factor)
TEC – Terapia Eletro Convulsiva
5-HT – Serotonina
NE – Norepinefrina
DA – Dopamina
ACh – Acetilcolina
MAO – Monoamina-Oxidase
GR – Geleia Real
HDEA – Ácido 10-Hidroxi-Trans-2-Decenoico
CEUA- Comissão de Ética na Utilização de Animais
CONCEA – Princípio Ético na Experimentação Animal
INGEB – Instituto de Genética e Bioquímica
DEFIS – Departamento de Fisiologia
ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas
NF – Nado Forçado
REBIR – Rede de Biotérios de Roedores

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos gerais	11
2.3 Objetivos específicos	12
3. METODOLOGIA	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Delineamento experimental	13
3.3. Etapas do experimento	13
3.4. Fornecimento da geleia real.....	14
3.5. Metodologia de administração do Geleia Real/ou água	14
3.6. Metodologia de indução do estresse crônico	15
3.7. Eutanásia dos animais	15
4. TESTE COMPORTAMENTAL	16
4.1. Teste de Nado Forçado	16
4.2. Análises estatísticas	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1. Nado Forçado	17
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
8. ANEXO COMITÊ DE ÉTICA	25

1. INTRODUÇÃO

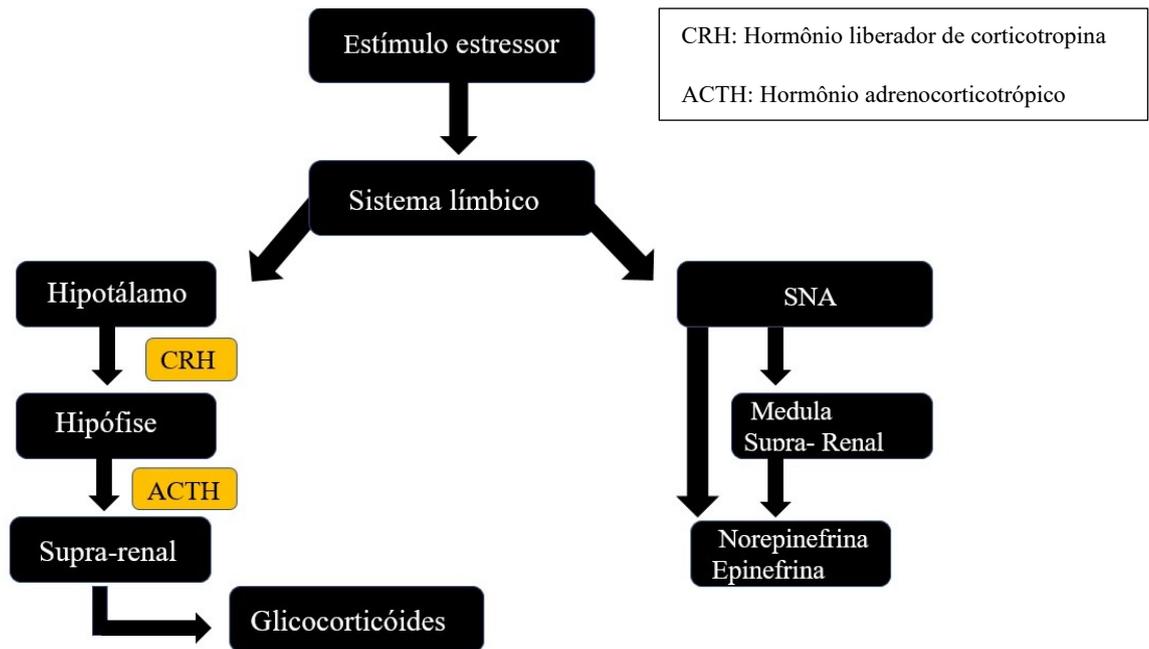
O termo estresse refere-se ao estado gerado pela percepção de estímulos mediante uma situação estressora que provoca excitação emocional, desencadeando um desequilíbrio no corpo. Pode ser classificado em agudo e crônico. O estresse agudo pode ser caracterizado pelo estado em que um organismo se apresenta após as alterações geradas pelo estresse por um período de tempo curto, mas com intensidade exagerada. O estresse crônico é quando o organismo não consegue controlar as alterações, causadas por algum desconforto, levando um longo período para se restabelecer (ANDRADE, 2002).

Um organismo estressado recebe estímulos que ativam o eixo neuroendócrino Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), aumentando a secreção de hormônios glicocorticoides e catecolaminas, como a epinefrina, que são fundamentais para gerar uma resposta ao estressor e propiciar uma melhor percepção da situação e de suas demandas, possibilitando uma busca de soluções e preparando o organismo para agir da maneira mais rápida e vigorosa (MARGIS *et al.*, 2003).

Entretanto, a persistência e a intensidade exagerada do estresse, bem como a sobreposição dos níveis fisiológicos, cognitivos e comportamentais, podem sobrecarregar tal eixo, deixando-o hiper-reativo e levando o indivíduo a um quadro psicopatológico de depressão, ansiedade e transtorno de estresse pós traumático (TEPT) (MARGIS *et al.*, 2003).

Situações de estresse são amplamente determinantes nas funções do hipocampo, uma região do encéfalo responsável por processos de aprendizagem, memória e outros aspectos do funcionamento do organismo. Hormônios peptídicos como ACTH agem no hipocampo durante o estresse, prejudicando suas funções a longo prazo (KWON *et al.*, 2006 apud TEIXEIRA *et al.*, 2008). Estudos revelam que animais submetidos a estresse crônico, podem apresentar desordens cognitivas e diminuição da memória (KNOW *et al.*, 2006 apud TEIXEIRA *et al.*, 2008)

Fig.1 – Funcionamento do eixo HPA durante situações de estresse



Fonte: Esquema autoral do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA).

À partir do estímulo estressor, ocorrerá ativação do eixo HHA e a dos neurônios presentes no núcleo paraventricular do Hipotálamo, o qual recebe e integra as informações neurais e humorais e estimula a atividade simpática e a secreção de dois neuro hormônios, sendo estes, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e a vasopressina. O CRH cai na circulação porta hipotálamo-hipofisária (hipófise anterior) e estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (MARCONDES *et al.*, 2002). Este, ao atuar na glândula adrenal promove maior secreção de glicocorticoides, cujo principal é o cortisol no homem. O cortisol, por sua vez, exerce diversas funções metabólicas importantes, como ação anti-inflamatória, modulação do sistema imunológico, regulação do metabolismo de carboidratos e de funções hemodinâmicas, sendo essenciais à vida, sobretudo em situações de estresse (ALHEIRA *et al.*, 2005; FUKUHARA *et al.*, 1996; HERMAN & CULLINAN, 1997; JEZOVA *et al.*, 1999; KVETNANSKÝ, *et al.*, 1995; PACÁK *et al.*, 1995).

A corticosterona é o principal glicocorticoide secretado pela glândula adrenal de roedores após estímulos estressores. Apesar de ser um hormônio importante para conferir resistência ao estresse e inflamação, em excesso eleva a vulnerabilidade das diferentes regiões do encéfalo às alterações metabólicas, modificando a capacidade de defesa neuronal (JEZOVA *et al.*).

As neurotrofinas são fatores de crescimento envolvidas em diversas funções do sistema nervoso, incluindo a regulação do crescimento axonal, modulação da atividade sináptica, além de modular a homeostase do Sistema nervoso central (SNC). O fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina mais abundante encontrada no encéfalo, agindo como antidepressivo. Trabalhos recentes sobre o efeito terapêutico de neurotrofinas em pacientes com depressão demonstram que elas podem ser uma alternativa aos fármacos antidepressivos clássicos (NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995).

Estudos revelam que a expressão do BDNF no hipocampo e em outras regiões do sistema límbico é diminuída em casos de estresse crônico, contribuindo para atrofia celular neuronal na região hipocampal, que em casos extremos leva à morte celular (SMITH *et al.*, 1995 apud NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995).

Tratamentos para depressão já eram utilizados antes mesmo da disponibilidade de fármacos antidepressivos, entre eles a Terapia Eletroconvulsiva (TEC), que consiste na aplicação de uma corrente elétrica que dura entre 0,1-1 segundo. Dessa forma, o paciente entra em um estado convulsivo que dura aproximadamente 1 minuto, em intervalos de 10-15 minutos e necessita-se entre 5-20 exposições à corrente elétrica. Com essa técnica, há uma liberação de neurotransmissores como serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE) (ROMEIRO *et al.*, 2002).

O encéfalo através de sinapses nervosas e da liberação de neurotransmissores, como NE, 5-HT, dopamina(DA) e acetilcolina(ACh) controla a atividade psicomotora, apetite, sono e o humor. A enzima monoamino-oxidase (MAO), encontrada na membrana das mitocôndrias do tecido hepático e nervoso, é responsável por degradar tais neurotransmissores (ROMEIRO *et al.*,2002). Assim sendo, dentre os tratamentos farmacológicos para depressão, existem os que atuam inibindo a enzima MAO. Para isso, utiliza-se compostos como fenelzina e tranilcipromina. Apesar de ser um tratamento funcional, seu uso poderia ser perigoso por causar efeitos colaterais, além de ser letal em caso de supersogaem (ROMEIRO *et al.*,2002).

Diversos compostos naturais são utilizados como alternativa aos fármacos convencionais. Um exemplo é o resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno), um polifenol encontrado principalmente na casca da uva roxa. Este princípio ativo apresenta vários benefícios à saúde, sendo a mais importante sua capacidade antioxidante. Esse composto tem sido associado à prevenção de diversas doenças e tem sido pesquisado por seu potencial efeito antidepressivo, uma vez que mostrou aumentar, em estudos com animais, o nível de BDNF no hipocampo e no córtex frontal (LIU *et al.*, 2014).

Uma nova proposta de tratamento alternativo seria à base de geleia real (GR), um produto secretado pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das abelhas operárias nutridoras (NAGAI *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a GR apresenta uma grande variedade de atividades biológicas em diferentes tipos celulares, como efeitos vasodilatadores

e hipotensores (TOKUNAGA *et al.*, 2004), efeito anti-hipercolesterolêmico (NAKAJIN *et al.*, 1982), atividade anti-inflamatória (KOHNO *et al.*, 2004), e atividade antialérgica (KATAOKA *et al.*, 2001), além de regular o sistema imunológico.

Sabe-se também que a GR possui um componente excepcional com alta ação farmacológica, o ácido 10-hidroxi-trans-2decenoico (HDEA). O HDEA possui ação antitumoral e atividade antibiótica e é um auxiliador na produção de colágeno (FURAKAWA *et al.*, 2012). Além disso, uma de suas características de maior importância é a alta ação antioxidante, que contribui para evitar doenças relacionadas ao sistema nervoso, câncer e diabetes (AMES *et al.*, 1993). Estudos comprovaram que o HDEA afeta células progenitoras neurais. Em estudos realizados com cultura de células do sistema nervoso central, o HDEA se mostrou com efeito similar ao BDNF (HATTORI *et al.*, 2007). Além disso, Hashimoto e cols. (2005) provaram que camundongos suplementados oralmente com GR 1% apresentaram aumento na produção de derivados das células de glia, responsáveis pelo bom desempenho das células nervosas e funções cerebrais como aprendizagem e memória (HASHIMOTO *et al.*, 2005 apud TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Tendo em vista que a depressão afeta mais de 300 milhões de pessoas pelo mundo e vem tornando-se um grande problema de saúde pública, podendo causar no indivíduo grande sofrimento, disfunções no trabalho e nas relações interpessoais, e considerando que já é a segunda principal causa de morte entre jovens, faz-se necessário a busca por novos tratamentos a fim de prevenir e diminuir os índices de depressão no mundo. Deste modo, como a geleia real mostrou resultados terapêuticos benéficos sobre o sistema nervoso, sua utilização na reversão de transtornos comportamentais ligados à depressão torna-se um importante alvo de investigações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do estresse crônico nos comportamentos do tipo depressivos em modelo animal, bem como um possível papel da suplementação com geleia real na prevenção de tais comportamentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos de estresse por restrição de movimento sobre comportamentos do tipo depressivos em camundongos, por meio do teste de nado forçado.
- Investigar um possível efeito neuroprotetor da geleleia real na atenuação de comportamentos do tipo depressivos em camundongos expostos ao estresse crônico por restrição de movimento.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais:

O experimento foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA) para uso de animais, pelo protocolo de nº 042/17, de acordo com os princípios éticos na Experimentação Animal (CONCEA).

Para o experimento foram disponibilizados pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia 39 camundongos machos da linhagem Balb/ C, com idade de 60 dias. Foram mantidas as condições padrões de luz (12h :12h, claro: escuro) e alimentação (*ad libitum*), com bebedouros com água potável e filtrada.

Figura 2 e 3 – Ilustração do modelo de estante e caixa mini isoladoras utilizadas para manter os camundongos em isolamento e proteção ao ar e meio ambiente.



: https://insightltda.com.br/?product_cat=bioterio



Fonte: <https://alescobrasil.com.br/racks>

3.2. Delineamento experimental:

Quadro 1 – Organização dos grupos de animais

H20/SE: Animais não submetidos à estresse e suplementados com água.
GR/SE: Animais não submetidos à estresse e suplementados com Geleia Real.
H20/E: Animais submetidos à estresse e suplementados com água.
GR/E: Animais submetidos à estresse e suplementados com Geleia Real.

3.3. Etapas do experimento

O experimento foi dividido em cinco etapas, como mostrado no esquema abaixo:

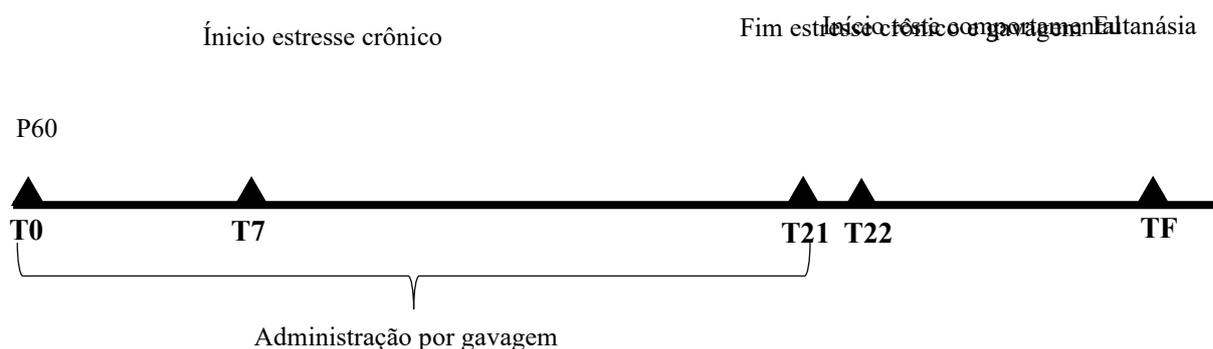
(Etapa 01): Solicitação dos animais;

(Etapa 02): Ao atingirem a idade adulta (P60), iniciou-se a administração de GR por meio da gavagem (T01 até T21 dias);

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

(Etapa 04): Posteriormente às semanas da indução do estresse e da gavagem começou o teste comportamental (T22);

(Etapa 05): Ao final do teste foi realizada a eutanásia dos animais (TF)



Os animais foram monitorados diariamente quanto ao seu estado geral de saúde, analisando-se o padrão de atividade normal para roedores (como “grooming” e “licking”, referentes aos cuidados do animal com o próprio pelo), bem como perda de peso e consumo de alimentos.

3.4. Fornecimento da geleia real

A Geleia Real foi 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.

Fig.4 – Abelha operária e geleia real em sua colmeia.



<https://queconceito.com.br/geleia-real>

Fig.5 – Geleia real comercializada.



<https://munddi.com/alimentos-e-bebidas/apicolas/geleia-real?marca=polenectar>

3.5. Metodologia de administração da geleia real e/ou água deionizada

A suplementação com geleia real (200mg/Kg) ou água deionizada foi realizada no período da manhã (07h15m A.M) por 21 dias consecutivos nos grupos GR/E, GR/SE e H20/E, H20/SE respectivamente, 45 minutos antes da sessão de estresse, utilizando-se uma cânula de gavagem de 4cm. As sessões ocorreram desde T0 e perduraram por 21 dias.

Fig. 6 – Animal recebendo gavagem



Fonte – <https://www.bonther.com.br/produtos/2/agulha-de-gavage-camundongo>

Fig. 7 – Cânula de gavagem



Fonte – <https://www.bonther.com.br/produtos/2/agulha-de-gavage-camundongo>

3.6. Metodologia de indução de estresse crônico

O protocolo seguido para indução de estresse crônico foi o de restrição de movimento e ocorreu em um aparato de acrílico cilíndrico individual fechado, apenas com pequenos furos para circulação de ar e para passar a cauda do animal, com duração de duas horas diárias no período da manhã (8-10 A.M) durante 14 dias. Os camundongos puderam avançar somente para frente e para trás dentro do tubo, mas não conseguiram virar a cabeça, experimentando assim uma situação de restrição de movimento.

Fig.8 – Animais no aparato de estresse



Fonte – Imagem capturada durante a experimentação

Fig.9 – Aparato de estresse para imobilização



Fonte – <https://insightltda.com.br/?product=eb-286p-contensor-para-camundongo-de-0-50-gramas>

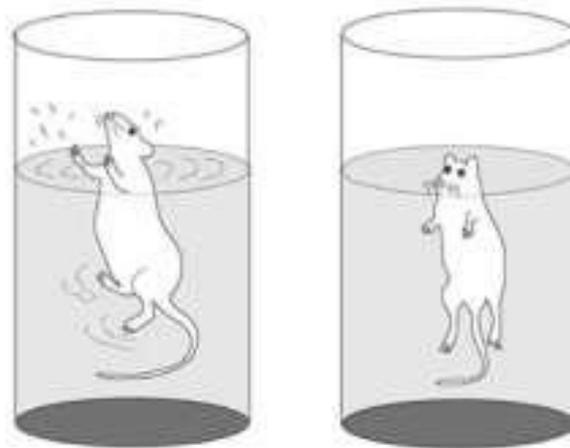
3.7. Eutanásia dos animais

Ao final dos testes comportamentais os animais foram sacrificados (TF) a fim de prevenir qualquer dano ou sofrimento desnecessário, por meio de anestesia com cetamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg, seguido de deslocamento cervical. As carcaças foram acondicionadas a -20°C até o momento de descarte definitivo.

4. TESTE COMPORTAMENTAL

4.1. Teste de nado forçado: É frequentemente usado como modelo para demonstrar comportamentos semelhantes à depressão em roedores. Compreende duas fases: pré-teste e teste. Em ambas as fases os animais foram colocados em um recipiente cilíndrico de paredes não translúcidas, com 33 cm de diâmetro, preenchido com uma coluna de água de 39 cm, sendo esta limpa e com temperatura entre 25°C e 27 °C. Na fase de pré-teste o animal foi colocado no recipiente e mantido em nado por 15 minutos. Após 24 horas, realizou-se a fase de teste, em que o animal foi colocado novamente no recipiente com água e seus comportamentos foram filmados por 5 minutos. Posteriormente, analisou-se o vídeo para observação dos seguintes comportamentos: imobilidade e nado. Após cada exposição os animais foram secos com uma toalha de tecido, e devolvidos para suas caixas de criação.

Figura 10 – Teste de Nado Forçado (NF)



4.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos à partir do exame dos vídeos gravados durante os testes comportamentais foram analisados utilizando-se Two-Way ANOVA, programa: GraphPad Prism 8, sendo os dados expressos como média e EPM e com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nado forçado (NF)

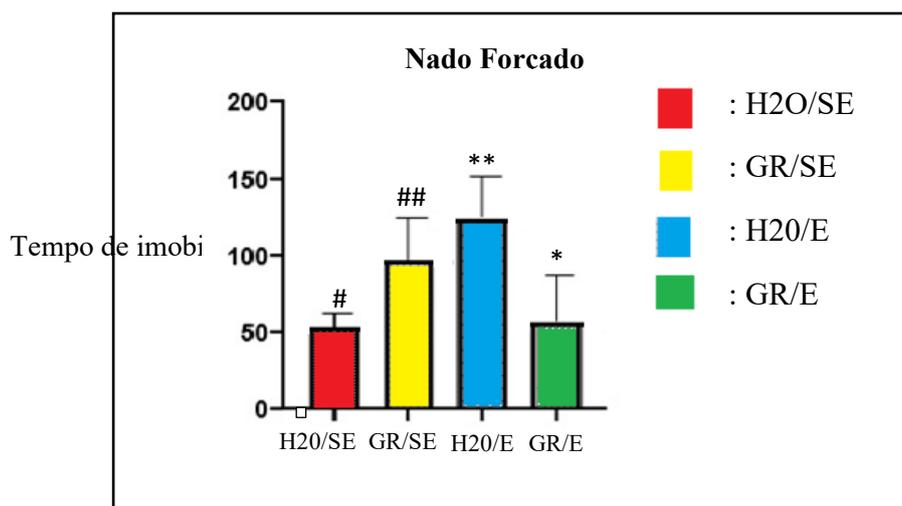
A avaliação dos parâmetros etológicos do NF por ANOVA de duas vias revelou um aumento do tempo de imobilidade nos animais do grupo H20/E ($124,7 \pm 9,10$, $p < 0,05$) em relação ao controle H20/SE ($53 \pm 2,56$, $p < 0,05$), sendo este um parâmetro indicativo de comportamento do tipo depressivo.

Quanto ao tempo de imobilidade entre os grupos que foram submetidos ao estresse, observou-se redução do tempo de imobilidade no grupo GR/E ($56,75 \pm 10,92$, $p < 0,05$) em relação ao grupo H20/E ($124,7 \pm 9,10$, $p < 0,05$), tendo sido a diferença significativa.

Ao compararmos os grupos que não foram submetidos ao estresse, observou-se diferença significativa no tempo de imobilidade dos animais no grupo GR/SE ($96,66 \pm 9,29$, $p < 0,05$), em relação ao controle H20/SE ($53 \pm 2,56$, $p < 0,05$).

A análise estatística demonstrou que o grupo GR/SE ($96,66 \pm 9,29$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo GR/E ($56,75 \pm 10,92$, $p < 0,05$), apresentou maior tempo em imobilidade, tendo sido a diferença significativa.

Figura 11: Tempo de imobilidade (média \pm EPM) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Todos os resultados significativos foram considerados com o valor de $p < 0,05$.



*Diferença significativa no comportamento estudado no grupo GR/E quando comparado ao grupo H20/E

** Diferença significativa no comportamento estudado no grupo H20/E quando comparado ao grupo H20/SE

#Diferença significativa no comportamento estudado no grupo H20/E quando comparado ao grupo GR/SE

##Diferença significativa no comportamento estudado no grupo GR/SE quando comparado ao grupo GR/E

No presente trabalho buscou-se induzir comportamentos do tipo depressivos em camundongos, por meio de estresse crônico por restrição de movimento, bem como avaliar um possível efeito protetor da Geleia real (GR) sobre tais comportamentos. Dentre os componentes da GR, tem-se o ácido 10-hidroxi-trans-2decenoico (HDEA), que possui alta ação antioxidante e contribui para evitar doenças relacionadas ao sistema nervoso, câncer e diabetes (AMES et. al., 1993). Estudos demonstram que o HDEA agiria de forma similar ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma neurotrofina que age como antidepressivo natural (NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995).

Para tal estudo, camundongos machos adultos foram submetidos a um modelo comportamental que é normalmente utilizado para avaliar comportamentos do tipo depressivos. Por meio de análise do ANOVA foram avaliadas as correlações entre os grupos estudados em cada comportamento.

No intuito de se observar indícios de comportamentos do tipo depressivos nesses animais, utilizou-se o teste de Nado Forçado, descrito por Porsolt *et al.* em 1997 (GOMES, 2003; POSSAMAI, 2013). Neste teste, o tempo de imobilidade pode ser usado como um indício de comportamento do tipo depressivo, uma vez que animais saudáveis tendem a nadar mais, na tentativa de fugir daquele ambiente, ao passo que o animal com comportamento do tipo depressivo “desiste” de lutar por sua sobrevivência e fugir do aparato, tornando-se mais imóvel.

No presente estudo, nossos resultados demonstraram que no Teste do Nado Forçado o grupo que sofreu estresse crônico e não foi tratado com Geleia real (H20/E) comparado ao grupo que sofreu estresse crônico e foi tratado com Geleia real (GR/E) apresentou maiores índices de comportamento do tipo depressivo, uma vez que exibiram maior tempo de imobilidade. Podemos inferir, assim, que neste modelo de teste comportamental, a geleia real na dose utilizada, foi eficaz em reverter os danos causados pelo estresse crônico.

Estudos comprovam que em uma situação de estresse há uma ativação do eixo HPA no organismo, que terá como resultado final a secreção de hormônios glicocorticóides, como o

cortisol no caso do homem ou a corticosterona em roedores. Tais hormônios, dentre outras funções, agem no hipocampo ajudando a controlar o estresse (MARCONDES *et al.*, 2002).

Esses hormônios são fundamentais para gerar uma resposta ao agente estressor. Entretanto, a persistência e a intensidade exagerada do estresse, podem sobrecarregar tal eixo, deixando-o hiper-reativo e levando o indivíduo à um quadro psicopatológico de depressão, ansiedade e transtorno de estresse pós traumático (TEPT) (MARGIS *et al.*, 2003).

Dentre os componentes da Geleia Real, o HDEA apresenta um alto poder antioxidante, que pode agir como um neuroprotetor para doenças relacionadas ao sistema nervoso (AMES *et al.*, 1993), além de contribuir em funções cerebrais como aprendizagem e memória (HASHIMOTO *et al.*, 2005 apud TEIXEIRA *et al.*, 2008). Além disso, estudos comprovam que o HDEA se mostrou com efeito similar ao BDNF, agindo como um antidepressivo natural (HATTORI *et al.*, 2007).

Dessa forma, pressupõe-se que os animais do grupo GR/E apresentaram menor tempo de imobilidade quando comparados ao grupo H2O/E, devido, possivelmente, às propriedades antioxidantes da Geleia Real, cujos compostos como HDEA podem ter exercido efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo gerado pelo período de contenção dos animais.

Por outro lado, os animais do grupo GR/SE tiveram maior tempo de imobilidade quando comparados ao grupo GR/E. Tal resultado não corrobora com os artigos supracitados, todavia, podemos pensar que talvez o efeito da Geleia Real seja mais evidente quando existe de fato danos oxidativos, como os gerados pelo estresse de contenção, ao passo que quando administrado apenas GR, sem que o animal tenha algum problema de saúde como aqueles ocasionados pelo estresse, os componentes desta não teriam sobre o que atuar, nos levando a pensar que a GR seria um tratamento para doenças já instaladas e não um preventivo.

Estudos em pacientes saudáveis que ingeriram GR por dias consecutivos mostram que estes desenvolveram algum problema de saúde após fazer o uso da GR, como por exemplo Enterocolite hemorrágica (YONEI, 1997), asma e anafilaxia (THIEN, 1996), reforçando a necessidade de mais estudos sobre o uso da GR quando não há uma doença instalada.

O maior tempo em imobilidade do grupo GR/SE comparado ao seu grupo controle (H2O/SE) que foi apresentado pelos animais não submetidos a estresse por restrição, também pode estar relacionado ao modo de ambientação do animal no biotério ou a forma que este foi manipulado durante seus cuidados diários, levando a uma mudança em sua fisiologia e em seu comportamento (ANDRADE, 2006). Além disso, a forma como foi administrada a gavagem diariamente, pode ter agido como um agente estressor, principalmente para os animais que não eram submetidos ao estresse por restrição de movimento.

6. CONCLUSÃO

É possível concluir, com os resultados desse estudo, que o protocolo de estresse crônico foi eficaz em induzir comportamentos do tipo depressivos em camundongos, evidenciados pelo menor tempo de imobilidade dos animais do grupo controle (H₂O/SE) em relação aos demais grupos, no teste de NF. Além disso, foi possível observar um efeito protetor da GR, quando administrada aos animais submetidos ao estresse, embora a GR por si só não tenha diminuído o tempo de imobilidade no grupo não submetido ao estresse.

Também é importante a realização de novos estudos sobre o efeito da GR em indivíduos saudáveis, para assegurar que esta não seria prejudicial nesse caso, uma vez que o grupo (GR/SE) apresentou comportamento do tipo depressivo quando comparado ao seu controle (H₂O/SE).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHEIRA, F.V.; BRASIL, M.A.A.; **O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão.** Rev Psiquiatr RS maio/ago 2005.

ALVES, T.C.T.F.; Depressão – bases biológicas e neuroanatomia [Internet]. **RevSaúde Pública**,2010.

Ames, B. N., et al. “Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging.” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 90, no 17, setembro de 1993, p. 7915–22.

ANDRADE, A. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 386p.

BERNTSON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. **Ascending visceral regulation of cortical affective information processing.** Eur J Neurosci. v. 18, n. 8, p. 2103-2109. 2003.

FUKUHARA, K.; KVETNANSKY, R.; CIZZA, G.; PACAK, K.; OHARA, H.; GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamopituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *Journal of Neuroendocrinol*, v. 8, p. 533-541, 1996.

GUIMARÃES, L.M.A.D.; TEIXEIRA, R.R.; ESPÍNDOLA, F.S.; Avaliação bioquímica e comportamental de camundongos suplementados oralmente com geléia real. **VII Encontro interno XII Seminário de Iniciação Científica**, 2008.

HASHIMOTO, M; KANDA, M; IKENO, K; HAYASHI, Y; NAKAMURA, T; OGAWA, Y; FUKUMITSU, H; NOMOTO, H; FURUKAWA, S. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of adult mouse brain. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.69, n.4, p.800-805, 2005 Apr.

HATTORI, N.; NOMOTO, H.; FUKUMITSU, H.; MISHIMA, S.; FURUKAWA, S. royal jelly and its unique fatty acid, 10- hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomedical Research**, v.28, n.5, p.261–266, 2007 Oct.

HATTORI, N.; NOMOTO, H.; FUKUMITSU, H.; MISHIMA, S.; & FURAKAWA, S. Royal jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma PC12 cells requires integrin signal independent of activation of extracellular signal-regulated kinases. **Biomedical Research**, 2007.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosciences*, v. 20, p. 8-84, 1997.

ITO, S.; NITTA, Y.; FUKUMITSU, H.; SOUMIYA, H.; IKENO, K.; NAKAMURA, T.; FURUKAWA, S. 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.**, 2012.

JEZOVA, D.; OCHEDALSKI, T.; GLICKMAN, M.; KISS, A.; AGUILERA, G. Central corticotropinreleasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. *Neuroscience*, v. 94, p. 797-802, 1999.

KATAOKA, M.; SASAKI, M.; HIDALGO, A.R.; NAKANO, M.; SHIMIZU, S.; 2001. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms, **Biosci Biotechnol Biochem.**, Vol.10, pp. 226570.

KAZLAUCKAS, V. et al. Distinctive effects of unpredictable subchronic stress on memory, serum corticosterone and hippocampal BDNF 82 levels in high and low exploratory mice. **Behavior Brains Research**, v. 218, p. 80-86, 2011.

KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O.; ARAI, N.; IWAKI, K.; KURIMOTO, M.; 2004 Royal Jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages, **Biosci Biotechnol Biochem.**, Vol 1, pp. 138-45.

Kvetnanský, R., Pacák, K., Fukuhara, K., Viskupic, E., Hiremagalur, B., Nankova, B., et al. (1995). Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 771, 131–158.

Liu, Z., Huang, Y., Hu, W., Huang, S., Wang, Q., Han, J., Zhang, Y.Q. dAcs1, the Drosophila Ortholog of Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 3 and 4, Inhibits Synapse Growth by Attenuating Bone Morphogenetic Protein Signaling via Endocytic Recycling. **J. Neurosci**, 2014.

LOPES, C.S.; FAERSTEIN, E.; CHOR, D.; **Eventos de vida produtores de estresse e transtornos mentais comuns: resultados do Estudo Pró-Saúde.** Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003.

MARCONDES, F.K.; Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Setembro 2002.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A.F.; SILVEIRA, R.O. **Relação entre estressores, estresse e ansiedade**. R. psiquiatr RS, 25'(suplemento 1): 65-74, abril 2003.

NAGAI, T.; INOUE, R.; 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly, **Food Chemistry**, Vol. 84, pp. 181-186.

NAKAJIN, S.; OKIYANA, L.; YAMASYITA, S.; AKIYAMA, Y.; SHINODA, M.; 1982. Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits, **Yakugaku Zasshi**, Vol.,36, p.65-69.

Nibuya, M., et al. "Regulation of BDNF and TrkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments". **The Journal of Neuroscience**, vol. 15, no 11, novembro de 1995, p. 7539-47..

PACÁK, K.; PALKOVITS, M.; KVTNANSKÝ, R.; YADID, G.; KOPIN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Annals NY Acad Sci*, v.771, p. 115-30, 1995.

POSSAMAI, F. **Teste do Nado Forçado repetido: Avaliação dos efeitos da imipramine sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal dos ratos alojados em ambiente enriquecido**. Florianópolis, 2013.

ROMEIRO, L. A. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal **Química Nova**, v.26, n.3, p.347-358, 2003.

SIBA, P. I. **Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo da miricitrina em modelos animais**. Curitiba, 2013.

McARTHUR, R.; BORSINI, F. **Animal models of depression in drug discovery**. *Pharmacol Biochemistry and Behav.* v. 84, p. 436-452. 2006.

THIEN FC, LEUNG R, BALDO BA, WEINER JA, PLOMLEY R, CZARNY D: Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. **Clin Exp Allergy** 1996, 26(2):216-222

TOKUNAGA, A, K. H.; YOSHIDA, C.; SUZUKI, K.M.;MURUYAMA, H.; FUTAMURA, Y.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; 2004. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats, **Biol Pharm Bull.**, Vol 2, pp. 189-92.

YONEI Y, SHIBAGAKI K, TSUKADA N, NAGASU N, INAGAKI Y, MIYAMOTO K, SUZUKI O, KIRYU Y: Case report: haemorrhagic colitis associated with royal jelly intake. **J Gastroenterol Hepatol** 1997, 12(7):495–499

ANEXO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da suplementação com geleia real sobre comportamentos e parâmetros fisiológicos em camundongos adultos expostos a estresse crônico”, protocolo nº 042/17, sob a responsabilidade de **Foued Salmen Espindola** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **15 de setembro de 2017**.

(We certify that the project entitled “Efeitos da suplementação com geleia real sobre comportamentos e parâmetros fisiológicos em camundongos adultos expostos a estresse crônico”, protocol 042/17, under the responsibility of Foued Salmen Espindola - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 15th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 24/09/2017 Término: 24/09/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico
Número de animais	61
Peso / Idade	- / 60 dias
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 19 de setembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU