

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

YAGO RODRIGUES MARQUES FORNAZIER

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GELEIA REAL
RELACIONADOS À PERDA DE MEMÓRIA E
SOCIABILIDADE EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS AO
ESTRESSE CRÔNICO**

Uberlândia - MG

2021

YAGO RODRIGUES MARQUES FORNAZIER

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GELEIA REAL
RELACIONADOS À PERDA DE MEMÓRIA E
SOCIABILIDADE EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS AO
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. Erika Renata Barbosa Neiro.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Érika Renata Barbosa Neiro

Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Profa. Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Dra. Simone Ramos Deconte

Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia, outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Máisa, que sempre se preocupou em fazer o melhor para mim e para os meus irmãos, me apoiando quando precisei e sempre batalhando pra nos proporcionar tudo o que estava ao seu alcance. Obrigado por ser um exemplo, uma inspiração, por ter me ajudado a me moldar como pessoa, pelo apoio e pela confiança.

Aos meus irmãos Camila e Thyago, que cresceram comigo e sempre foram meus parceiros durante toda a minha vida.

Ao meu melhor amigo Rodrigo, que foi meu ponto de apoio e meu companheiro desde o início da faculdade e esteve sempre ao meu lado, cuidando de mim.

À minha amiga Giovanna, que possui um carinho enorme e tenho como se fosse minha irmã. Obrigado pelo companheirismo, pela amizade e especialmente por ter me acompanhado em diversos momentos da elaboração desse trabalho.

Ao meu namorado e amigo Igor, que sempre se preocupa comigo, é meu companheiro em todo e qualquer momento, e me enche de alegria até nos momentos difíceis, sempre fazendo tudo ser mais leve e tranquilo.

À minha orientadora e professora Erika Neiro, que me fez ter a primeira paixão dentro da biologia, que foi a fisiologia humana. Obrigado por sempre ter sido muito compreensiva, principalmente nos tempos de pandemia e por ter me orientado sempre com muita atenção, contribuindo para a minha formação e meu crescimento profissional.

A todos os meus amigos e familiares, que sempre me deram muito carinho e suporte, e constantemente agregam de forma positiva a minha vida pessoal e profissional.

RESUMO:

O estresse é uma situação que ameaça a homeostase, sendo uma reação natural do organismo diante de estímulos físicos e/ou psicológicos que desafiam esse equilíbrio. O estresse crônico é o tipo de estresse que ocorre constantemente, seja ele por longos períodos ou com alta reincidência, podendo acarretar diversos problemas psicológicos e cognitivos, incluindo a deterioração da memória e a perda de sociabilidade, que pode estar relacionada à depressão causada pelo estresse. Uma vez que os fármacos utilizados para tratar esses problemas comportamentais podem ter inúmeros efeitos adversos sobre o organismo, cada vez mais é necessário a descoberta de tratamentos alternativos e naturais para esses transtornos. Uma das sugestões para esses tratamentos alternativos é a geleia real, que apresenta diversas atividades favoráveis ao organismo, como efeito neuroprotetor durante situações estressoras, potencialização da memória e da aprendizagem, capacidade de aumentar a neurogênese e atividade antioxidante. Por isso, o presente estudo avalia a possibilidade de utilizar a suplementação de geleia real (GR) como tratamento para a perda de memória e sociabilidade em camundongos expostos ao estresse crônico. Para isso, os camundongos foram induzidos ao estresse, através da restrição de movimento, por quatorze dias. Além disso, dois grupos foram suplementados com GR, e os outros dois apenas com água, para observar os possíveis efeitos reversores da GR, em relação aos danos causados pelo estresse. Para analisar estes efeitos, os animais foram submetidos aos testes de reconhecimento de objeto e de interação social, a fim de avaliar a perda de memória e de sociabilidade. Os resultados demonstraram que a geleia real foi capaz de reverter os danos causados pelo estresse crônico, em relação à perda de sociabilidade. O teste de reconhecimento de objetos não foi conclusivo, necessitando de uma nova averiguação, para concluir se a GR teve um fator determinante para reverter os efeitos da perda de memória.

Palavras-chave: geleia real; estresse crônico; memória; sociabilidade.

ABSTRACT:

Stress is a situation that threatens homeostasis, which is the state of stability that maintains an organism's balance. This is the body's natural reaction to physical and/or psychological stimuli that challenge this balance. Chronic stress is the type of stress that occurs constantly, whether for long periods or with high recurrence. This type of stress can lead to several psychological and cognitive problems, including memory deterioration and loss of sociability, which can be related to depression caused by stress. Since the drugs used to treat these cognitive problems can be very aggressive to the body, it is increasingly necessary to discover alternative and natural treatments for these disorders. One of the suggestions for these alternative treatments is royal jelly, which has several activities favorable to the body, such as a neuroprotective effect during stressful situations, memory and learning enhancement, capacity to increase neurogenesis, and antioxidant activity. Therefore, the present study evaluates the possibility of using royal jelly (RJ) supplementation as a treatment for memory and sociability loss in mice exposed to chronic stress. For this, the mice were induced to stress, through restriction of movement, for fourteen days. In addition, two groups were supplemented with RJ, and the other two only with water, to observe the possible reversal effects of RJ, in relation to the damage caused by stress. To analyze these effects, the animals were submitted to object recognition and social interaction tests, in order to assess memory and sociability loss. The results showed that royal jelly was able to reverse the damage caused by chronic stress, in relation to the loss of sociability. The object recognition test was not conclusive, requiring further investigation to conclude whether GR had a determining factor in reversing the effects of memory loss.

Keywords: royal jelly; chronic stress; memory; sociability.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO:.....	7
2.	JUSTIFICATIVA:.....	10
3.	OBJETIVOS:.....	10
3.1	Objetivos Gerais	10
3.2	Objetivos Específicos	11
4.	METODOLOGIA:	11
4.1.	Animais:	11
4.2.	Delineamento experimental:.....	11
4.3.	Etapas do experimento:	12
4.4.	Administração de Geleia Real (GR) ou água deionizada:.....	12
4.5.	Metodologia de indução de estresse crônico	13
4.6.	Testes comportamentais:	14
4.6.1.	Teste Reconhecimento de Objeto:.....	14
4.6.2.	Teste de Interação Social:.....	15
4.7.	Eutanásia dos animais:.....	17
4.8.	Análise Estatística	17
5.	RESULTADOS	18
5.1.	Reconhecimento de objeto (RO)	18
5.2.	Interação social (IS) – Teste de sociabilidade	19
5.3	– Interação social (IS) – Teste de preferência por novidade social	20
6.	DISCUSSÃO	21
7.	CONCLUSÃO.....	23
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO:

Grande parte das pessoas passa por situações de estresse em seu cotidiano, e o excesso dessas situações pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento de diversos distúrbios relacionados à saúde, incluindo distúrbios psiquiátricos como ansiedade e depressão, além de perda de memória e dificuldade de aprendizagem. Estresse é inicialmente definido como uma situação que ameaça a homeostase de um organismo (AKIL & MORANO, 1995). Homeostase é o nome dado ao estado de estabilidade que mantém o equilíbrio do organismo. Dessa forma, situações onde ocorrem estímulos físicos e/ou psicológicos que desafiam esse equilíbrio são considerados fatores estressores (TAFET & BERNARDINI, 2003).

Segundo Fontana (1994, apud ARALDI-FAVASSA *et al.*, 2005) o estresse crônico pode causar efeitos psicológicos e cognitivos, entre esses estão a diminuição da concentração e atenção, e a deterioração da memória de curto e longo prazo.

Embora nem toda situação de estresse seja nociva, o estresse agudo e/ou o estresse crônico podem acarretar consequências fisiológicas negativas ao indivíduo. Estresse crônico é de uma natureza mais constante, ocorrendo por longos períodos ou com alta recorrência (DHABHAR, 2000 apud TANNO, 2002) sendo que muitas vezes o organismo não é capaz de controlar de forma correta as alterações fisiológicas decorridas da situação estressora que se prolonga (ANDRADE, 2002). O estresse agudo é relacionado com o contato com estímulos estressores por um curto período de tempo, porém muitas vezes com uma intensidade exagerada (ANDRADE, 2002).

Quando uma resposta comportamental não é eficiente para aliviar o estresse sofrido pelo organismo, o seu estado biológico é alterado, a partir do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e do Sistema Neuroendócrino (ANDRADE, 2002). Uma dessas alterações é o aumento da secreção de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal desencadeado pela ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e de catecolaminas pela medula adrenal em resposta a ativação simpática, que são importantes para a reação do organismo diante a situações de estresse (MARGIS *et al.*, 2003). No estresse crônico, a elevação dos níveis de glicocorticoides mantida por grandes períodos de tempo pode acarretar em efeitos prejudiciais para o organismo (FERIN, 2000 apud TANNO, 2002).

O cortisol é um dos principais glicocorticoides produzidos pelo organismo humano e durante uma situação de estresse crônico, ele auxilia na promoção de energia para que o organismo possa resolver a situação (HANNIBAL *et al.*, 2014). Após a situação estressora, os níveis de cortisol normalmente se reestabelecem e retornam aos níveis basais, porém quando isso não ocorre, seja pela exposição ao estresse muito exagerada ou um grande período de estresse, o alto nível de cortisol pode afetar negativamente o organismo, alterando a função de vários órgãos e sistemas, inclusive sob estruturas encefálicas como o hipocampo (HODGSON *et al.*, 2004). Altos níveis de cortisol por um tempo prolongado podem causar um estresse oxidativo no encéfalo (ZAFIR & BANU, 2009), que está fortemente relacionado a doenças neurodegenerativas. O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e desoxidantes em favor a um número excessivo de radicais livres, causando danos oxidativos em células e tecidos (BARBOSA *et al.*, 2010).

Situações de estresse físico (como por restrição de movimento) exercem um efeito similar ao estresse psicológico, e ambos acarretam no aumento dos níveis de corticosterona em animais. Esse aumento dos níveis de corticosterona acarretados por estresse pode causar danos oxidativos nos tecidos cerebrais, podendo prejudicar o funcionamento correto das funções cerebrais, incluindo as de memória e aprendizagem (TEIXEIRA *et al.*, 2017)

O hipocampo está diretamente relacionado à memória e aprendizagem (EICHENBAUM *et al.*, 1992) e a exposição crônica aos corticoides que ocorre estresse crônico pode afetar a árvore dendrítica de neurônios hipocampais, resultando em déficits cognitivos relacionados à memória e aprendizagem (WATANABE *et al.*, 1992; LUINE *et al.*, 1994; MAGARIÑOS *et al.*, 1997). Além disso, essas situações de estresse podem causar a diminuição da neurogênese no giro dentado do hipocampo (GOULD, 1999). Além do estresse crônico, o estresse agudo, transtornos de estresse pós-traumático (TEPT), distúrbios de ansiedade podem acarretar na incapacidade de regulação de memória e atenção (SUSSMAN *et al.*, 2016).

Situações estressoras crônicas também podem diminuir a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), podendo causar atrofia nos neurônios ou até mesmo a sua morte, e conseqüentemente a diminuição do volume de estruturas encefálicas, bem com comprometimento de sua função (NIBUYA *et al.*, 1995). O BDNF faz parte de uma família de neurotrofinas que em estruturas como o hipocampo

está fortemente associado à memória e aprendizagem (SAMBATARO *et al.*, 2010). Em casos de depressão maior observa-se também a diminuição da expressão do BDNF, podendo resultar em mudanças degenerativas no hipocampo (TAFET & BERNARDINI, 2003). Dessa forma, o volume do hipocampo em pessoas com depressão pode sofrer uma diminuição, causada pelo estresse excessivo, sendo capaz de resultar em anormalidades relacionadas à memória e sociabilidade (AKIL & MORANO, 1995).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015), quatrocentos milhões de pessoas no mundo todo possuem algum distúrbio psiquiátrico e com toda a pressão que é imposta pela sociedade atualmente nos diversos níveis, a tendência desse número é ser cada vez maior. Já existem diferentes tipos de tratamentos para os diversos tipos de transtornos psiquiátricos, e cada vez mais, alternativas aos fármacos convencionais são procuradas, a fim de reduzir os efeitos colaterais que os fármacos tradicionais podem causar no organismo, como por exemplo: sonolência, confusão mental, falta de coordenação motora, amnésia e dependência (CONSTANTE, 2008 apud NUNES & BASTOS, 2016).

Uma das possíveis alternativas que tem sido estudada, é o uso da geleia real como tratamento para esses distúrbios. A geleia real serve de alimento para a abelha rainha durante toda sua vida, sendo produzida pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas operárias (HAYDAK, 1970; PATEL *et al.*, 1960 apud NAGAI, 2004). Sabe-se que a geleia real desempenha diversas atividades biológicas em diferentes células animais (NAGAI, 2004).

A geleia real possui atividades antialérgicas (KATAOKA *et al.*, 2004), anti-inflamatórias (KOHNO *et al.*, 2004) e ação vasodilatadora (TOKUNAGA *et al.*, 2004). Estudos apontam que também a geleia real pode ser uma grande potencializadora da memória e aprendizagem (GUIMARÃES *et al.*, 2008), uma vez que ela pode aumentar a expressão do fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) e de RNAm de neurofilamento H, que estão associados à integridade das células nervosas. Essas células são fundamentais para o bom funcionamento das funções cerebrais, incluindo as de aprendizagem e memória (HASHIMOTO *et al.*, 2005). Além disso, ela oferece um efeito neuroprotetor que auxilia durante uma situação de estresse, elevando os níveis de glutatona, um composto importante para o sistema de defesa antioxidante do cérebro (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

A geleia real possui em sua composição o ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico (HDEA) (ITO *et al.*, 2012) que segundo a literatura pode ser capaz de auxiliar na melhora dos sintomas relacionados ao estresse crônico e da depressão maior (ITO *et al.*, 2012). Por sua propriedade de aumentar os níveis de neurogênese em áreas como hipocampo, o HDEA possui efeitos semelhantes ao BDNF e pode, assim, influenciar positivamente na memória – principalmente a memória espacial - e na aprendizagem. O HDEA também possui diversas propriedades como ação antitumoral, promoção da produção de colágeno e ação antibiótica (TOWNSEND *et al.*, 1961; KOYA-MIYATA *et al.*, 2004; BLUM *et al.*, 1959 apud HATTORI *et al.*, 2007). Ele também apresenta alto potencial antioxidante, que contribui para evitar diversos tipos de distúrbios como diabetes e doenças relacionadas ao sistema nervoso (AMES *et al.*, 1993), incluindo os distúrbios psiquiátricos e os que afetam a memória. Como a geleia real possui atividade antioxidante, ela pode auxiliar no combate ao estresse oxidativo, oferecendo uma proteção antioxidante, e também influenciar diretamente na queda dos altos níveis de corticosterona (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA:

Uma vez que o número de casos de indivíduos com distúrbios psiquiátricos, assim como a perda de memória e problemas de aprendizagem, vem aumentando constantemente, novas alternativas aos tratamentos convencionais para esses distúrbios são necessárias, a fim de diminuir a agressividade e as reações adversas que os fármacos convencionais podem causar sobre o organismo. Nesse sentido, este trabalho procura investigar os possíveis efeitos positivos da suplementação dietética com geleia real como um tratamento para alterações de memória, aprendizagem e sociabilidade em camundongos que foram submetidos ao estresse crônico.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos causados pelo estresse crônico em comportamentos relacionados à memória e sociabilidade em modelo animal, assim como os efeitos da suplementação com geleia real na expressão desses parâmetros comportamentais.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos causados pelo estresse por restrição de movimento em relação à memória e sociabilidade em modelo animal.

- Observar e analisar se as alterações de memória e sociabilidade causadas pelo estresse crônico podem ser revertidas através da suplementação dietética com Geleia Real.

4. METODOLOGIA:

4.1. Animais:

Para a realização do trabalho experimental foram disponibilizados pela Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia 50 camundongos machos da linhagem Balb C, com idade de 60 dias, sendo que 48 animais foram utilizados para grupos experimentais e 02 animais de ninhadas diferentes dos animais teste utilizados como “animal não familiar” no Teste de Interação Social. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, pelo protocolo **de nº 042/17**.

Foram mantidas as condições padrões de luz (12h :12h, claro: escuro) e alimentação (*ad libitum*), com bebedouros com água potável e filtrada.

4.2. Delineamento experimental:

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais de 12 animais cada.

Grupo 1: Camundongos machos não submetidos a estresse por restrição de movimentos e suplementados com água deionizada.

Grupo 2: Camundongos machos submetidos a estresse por restrição de movimentos e suplementados com água deionizada.

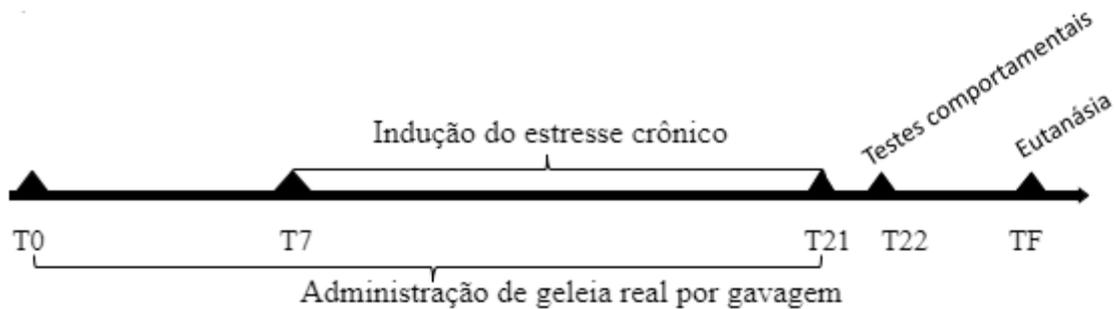
Grupo 3: Camundongos machos não submetidos a estresse por restrição de movimentos e suplementados com Geleia Real.

Grupo 4: Camundongos machos submetidos a estresse por restrição de movimentos e suplementados com Geleia Real.

4.3. Etapas do experimento:

Para uma melhor compreensão das fases do experimento, ele foi dividido em etapas:

1. Administração de geleia real ou água por gavagem (T01 até T21);
2. Indução do estresse crônico (T07 até T21);
3. Testes comportamentais (T22);
4. Eutanásia dos animais (TF);



4.4. Administração de Geleia Real (GR) ou água deionizada:

Todos os grupos tiveram disponibilidade de comida e água à vontade. A GR utilizada foi da marca Apiários Girassol (MG), e era armazenada no laboratório de fisiologia ICBIM, dentro do freezer a -20°C . A dosagem da GR foi de 200mg/Kg do peso do animal, e diluída em 200 μl de água deionizada. O seu preparo foi realizado diariamente, antes da suplementação, no período da manhã. A suplementação com GR (200mg/Kg) ocorreu por 21 dias consecutivos, às 7h15m, nos grupos 3 e 4 (descritos no item 4.2) e a via de administração foi por gavagem. Ela teve início sete dias antes da exposição à situação estressora e continuou por mais 17 dias enquanto os animais eram submetidos ao estresse. As gavagens ocorreram com o auxílio de uma agulha própria com ponta romba de 4 cm de comprimento (figura 1), sempre 45 minutos antes das sessões de estresse por restrição de movimento. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam gavagem de água deionizada no lugar da GR.

Figura 1. Agulha de gavagem



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

4.5. Metodologia de indução de estresse crônico

Os grupos 2 e 4 (descritos no item 4.2) foram expostos a situação de estresse crônico por restrição de movimento em aparato especial, confeccionado em acrílico (figura 2), onde o animal poderia apenas se movimentar levemente para frente e para trás, sem a possibilidade de movimentação para os lados ou movimentação da cabeça.

A restrição de movimento ocorreu de forma individual por duas horas diárias, no período da manhã (das 8h às 10h da manhã). A situação foi aplicada por 14 dias consecutivos, como representado na linha do tempo.

Figura 2. Aparato utilizado pra restrição de movimento



Fonte: <https://insightltda.com.br/produto/eb-286co-contensor-para-camundongo-de-0-80-gramas/>

4.6. Testes comportamentais:

4.6.1. Teste Reconhecimento de Objeto:

Os roedores apresentam normalmente uma tendência a interagir por um tempo maior com um objeto novo do que com um já conhecido. Desta forma, essa tendência tem sido utilizada para auxiliar em estudos de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, que se apresentam diminuídas em alguns transtornos psiquiátricos. O Teste de Reconhecimento de Objeto foi realizado em uma caixa de polipropileno branca (figura 3), opaca e quadrada (40cmx40cm).

Figura 3: Aparato e objetos utilizados no teste



Fonte: imagem capturada durante os experimentos

Durante três dias antes do início dos testes os animais foram submetidos a um período de aclimação ao aparato comportamental e ao ambiente onde o mesmo seria realizado. Durante a aclimação, os animais eram colocados por 15 minutos para a livre exploração do aparato.

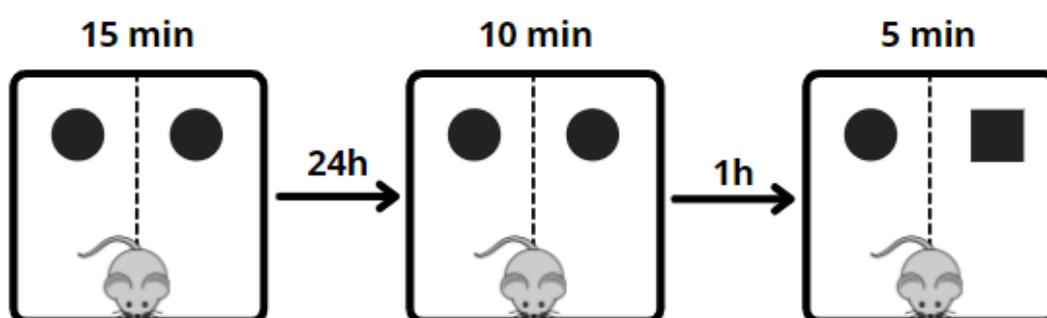
Na fase do experimento conhecida como Pré-teste, cada animal passou por uma sessão de habituação à caixa de experimentação, na presença de 2 objetos iguais; cada sessão do pré-teste teve duração de 15 minutos.

No dia do experimento (Fase de Teste), os animais foram submetidos a duas avaliações. Durante a primeira fase (Teste de aquisição T1), eles foram colocados na caixa contendo dois objetos de formas semelhantes ao do pré-teste, por um período de 10 minutos. A exploração definiu-se pelo direcionamento da face do animal ao objeto até uma distância aproximada de 2cm enquanto a observava, cheirava ou tocava. Para a

segunda avaliação (Teste T2), realizada 60 minutos após T1, os objetos presentes em T1 foram trocados por um objeto idêntico presente em T1 (Objeto conhecido, OC) e por um objeto novo (ON), de forma diferente ao anterior, sendo assim um objeto não conhecido.

A memória de reconhecimento foi avaliada determinando-se a diferença entre o tempo de exposição do objeto novo e objeto conhecido em relação ao tempo de exploração total dos dois objetos.

Figura 4: Representação das etapas do Teste de Reconhecimento de Objeto



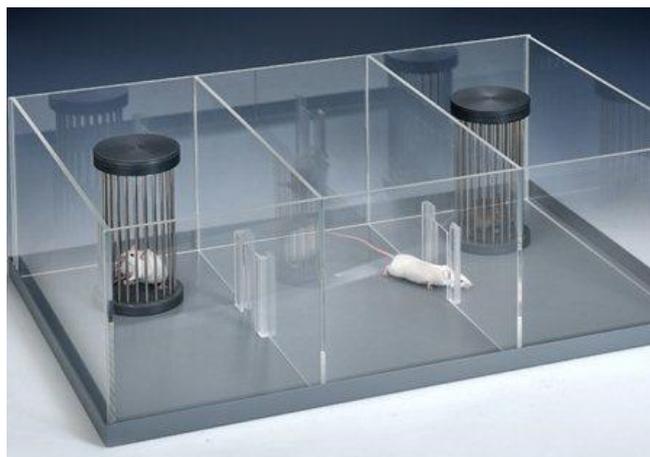
Fonte: Autoral, 2021.

4.6.2. Teste de Interação Social:

O teste de interação social foi baseado no Teste de Sociabilidade Crawley ou Teste de Preferência por Novidade Social, utilizado para estudar a interação social e memória social em roedores e baseia-se no princípio de livre escolha dos animais em passar o tempo em qualquer um dos três compartimentos que formam o aparato, em um intervalo de 10 min. Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a câmera posicionada acima do aparato.

O aparato utilizado para a realização do teste foi uma caixa de vidro dividida em três câmaras (CA, CB e CC) (figura 5). Duas gaiolas de metal, foram posicionadas nos compartimentos CA e CC, onde eram colocados camundongos controles (não pertencentes aos grupos experimentais), para testar a sociabilidade e a preferência social dos animais experimentais.

Figura 5: Caixa de acrílico semelhante à utilizada para o Teste de Crawley



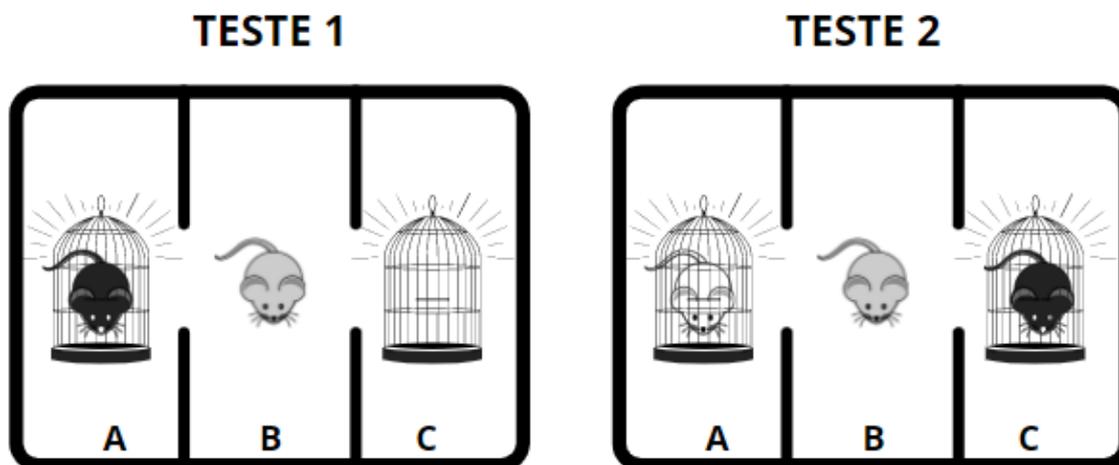
Fonte: <http://www.lintoninst.co.uk/Products/tabid/63/ProdID/285/Language/en-US/CatID/87/46503sociabilityapparatusleaflet.aspx>

A sociabilidade foi avaliada a partir da análise do vídeo, considerando o número total de contatos, duração total de contatos diretos (em segundos) entre o animal experimental e a gaiola de metal vazia em comparação com o tempo de contato com a gaiola contendo o animal controle. Cada animal passou por uma sessão de habituação na arena, com os compartimentos abertos e gaiolas vazias, onde o animal pode explorar livremente o aparato por 5 minutos. 24 horas após a sessão de habituação foi realizado o Teste 1 (T1), o Teste de Sociabilidade Crawley, no qual um animal controle 1 foi colocado na gaiola de metal localizada em CA, o animal experimental foi colocado no compartimento central CB e no compartimento CC colocou-se a gaiola vazia. A seguir todas as divisórias foram removidas e o animal experimental explorou o aparato livremente entre os compartimentos, podendo interagir tanto com a gaiola contendo a animal controle, quanto com a gaiola vazia.

Após o término de T1, os animais eram removidos do aparato e o mesmo foi limpo com álcool 70% para que em seguida iniciasse o Teste 2, o Teste de Preferência por Novidade Social, onde a tendência é o animal optar por interagir com um animal que seja novidade, ao invés de interagir com o animal já conhecido. Neste teste, o animal controle 1 utilizado no teste anterior em CA, foi colocado na gaiola em CC, sendo utilizado como animal familiar. E agora, em CA foi posicionado um novo animal controle (animal controle 2), que era o animal não familiar. Após o posicionamento dos animais, as divisórias foram removidas e o animal experimental pode explorar o

aparato, agora com um animal familiar (compartimento CC) e um animal não familiar (compartimento CA).

Figura 6: Etapas do Teste de Sociabilidade



Fonte: Autoral, 2021

4.7. Eutanásia dos animais:

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por meio de aprofundamento de anestesia com cetamina 80 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg, seguido de deslocamento cervical.

4.8. Análise Estatística

Para as análises dos resultados obtidos através dos vídeos dos experimentos, as estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, pelo método Two-Way ANOVA, seguido de pós teste de Bonferroni, com valores considerados significativos de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS

5.1. Reconhecimento de objeto (RO)

Os resultados do RO estão representados pela figura 7, onde estão as interações entre os camundongos com o objeto conhecido (OC) e o objeto novo (ON).

No RO os animais dos grupos G3 e G4 apresentaram uma tendência a interagirem mais tempo com o ON ($20,22 \pm 4,29$; $46,89 \pm 8,75$, respectivamente), do que com o OC ($11,67 \pm 2,87$; $32,22 \pm 5,92$, respectivamente), enquanto os animais de G1 e G2 interagiram praticamente o mesmo tempo com o ON ($22,67 \pm 3,38$; $25,89 \pm 4,21$, respectivamente) e com OC ($18,67 \pm 3,62$; $26,11 \pm 6,30$, respectivamente). Para esse teste, nenhum dos grupos obteve uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre o tempo de interação entre o OC e o ON.

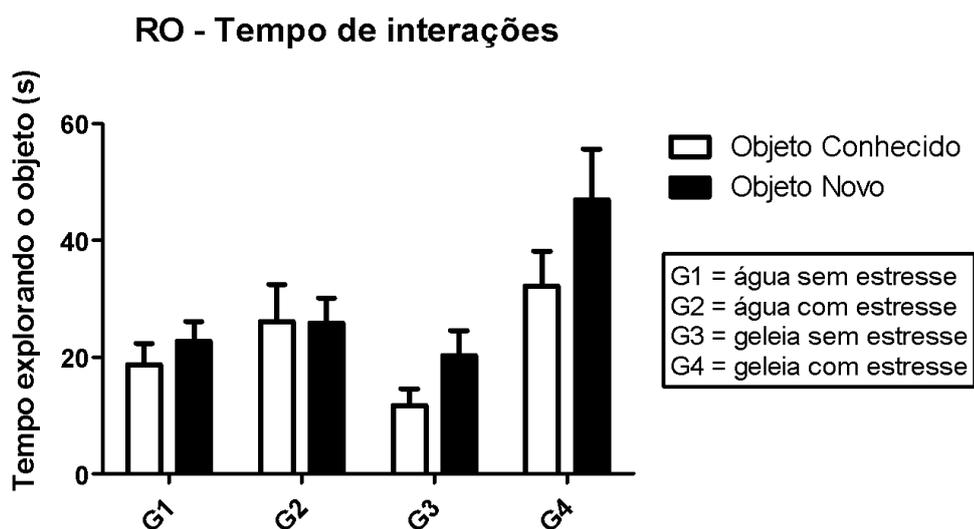


Figura 7. Tempo de exploração em segundos dos camundongos em relação aos OC e ON. Os resultados foram expressos pelas médias dos grupos e o EPM.

5.2. Interação social (IS) – Teste de sociabilidade

Para o teste de sociabilidade, os dados estão demonstrados na figura 8, onde está representado o tempo de interação entre os camundongos com a gaiola contendo o animal controle (GA) e a gaiola vazia (GV).

Neste teste, os animais dos grupos G1, G3 e G4 interagiram significativamente ($p \leq 0,05$) mais com a GA ($69,22 \pm 10,44$; $78,22 \pm 8,12$; $71,56 \pm 10,64$ respectivamente) do que com a GV ($36,22 \pm 4,66$; $47,22 \pm 6,39$; $49,44 \pm 5,09$). Já os animais de G2, a diferença não foi significativa, sendo GA ($71,13 \pm 8,23$) e GV ($55,00 \pm 6,38$), com os animais do grupo interagindo da mesma forma com GA e GV.

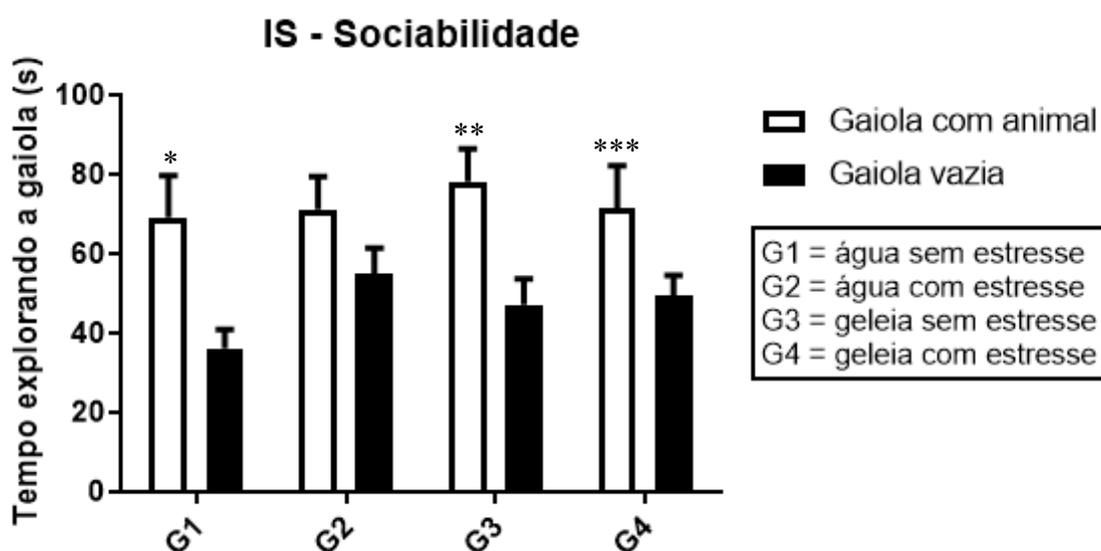


Figura 8. Tempo de interação entre os camundongos e as gaiolas GA e GV. * diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de interação com a gaiola com animal e a gaiola vazia do G1. ** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de interação com a gaiola com animal e a gaiola vazia do G3. *** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de interação com a gaiola com animal e a gaiola vazia do G4. Os resultados foram expressos pelas médias dos grupos e o EPM.

5.3 – Interação social (IS) – Teste de preferência por novidade social

Para o teste de preferência por novidade social, os resultados estão representados pela figura 9, onde estão os tempos das interações entre os camundongos e o animal conhecido (AC) e o animal novo (AN).

Para esse teste, os animais de G3 interagiram significativamente ($p \leq 0,05$) mais com o AN ($82,44 \pm 11,85$) do que com o AC ($50,11 \pm 5,90$), enquanto que os animais de G1, G2 e G4 não apresentaram diferenças significativas no tempo de interação com o AN ($73,89 \pm 8,33$; $71,17 \pm 9,82$; $77,00 \pm 6,65$, respectivamente) e com o AC ($50,33 \pm 5,35$; $84,17 \pm 10,57$; $82,00 \pm 15,50$ respectivamente).

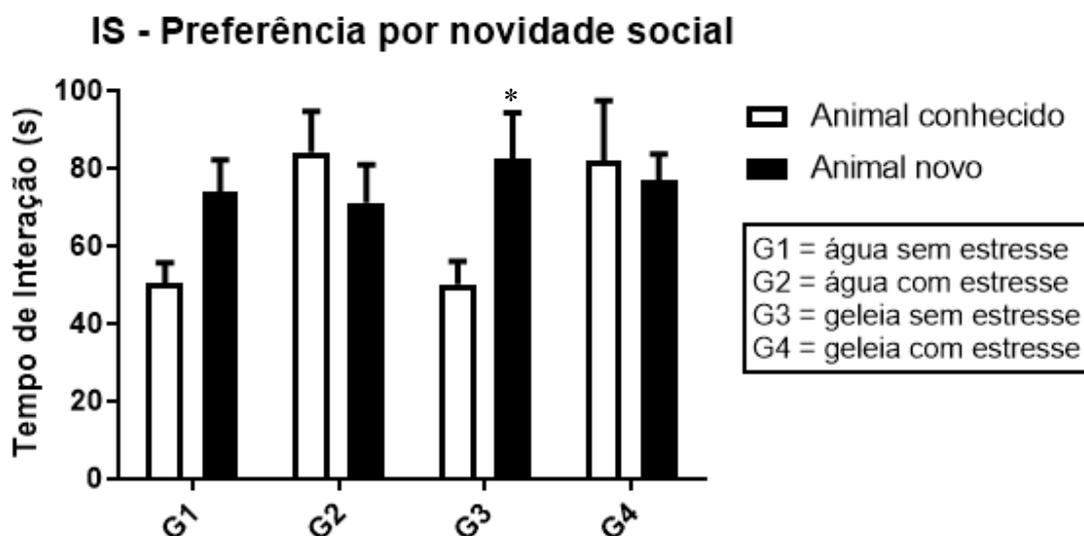


Figura 9. Tempo de interação dos camundongos com AC e NA. * diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de interação com o animal novo e o animal conhecido do G3. Os resultados foram expressos pelas médias dos grupos e o EPM.

6. DISCUSSÃO

O estresse físico causado pela restrição de movimento realizada no presente estudo exerce um efeito similar ao estresse psicológico e ambos elevam os níveis de glicocorticoides, sendo eles o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, que podem causar danos oxidativos nos tecidos cerebrais, podendo prejudicar funções cerebrais relacionadas à memória e aprendizagem (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Em níveis normais, os glicocorticoides podem auxiliar no aprendizado e na memória, porém níveis elevados e por longos períodos de tempo podem estar relacionados à uma série de distúrbios, incluindo os de memória (DA CAMARA, 2021; PINTO, 2010). Esses déficits podem estar relacionados à hipertrofia do hipocampo causada pela alta exposição aos glicocorticoides (ALHEIRA, 2005).

Situações estressoras crônicas também podem diminuir a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), podendo causar comprometimento de sua função (NIBUYA *et al.*, 1995) e também resultar em anormalidades relacionadas à memória, uma vez que ele faz parte de uma família de neurotrofinas que está fortemente associado à memória e aprendizagem (SAMBATARO *et al.*, 2010).

A GR é uma possível alternativa para fármacos usados no tratamento de distúrbios psiquiátricos, inclusive distúrbios relacionados à perda de memória, visto que ela pode oferecer um efeito neuroprotetor durante situações estressoras (TEIXEIRA *et al.*, 2017), potencializando a memória e aprendizagem (GUIMARÃES *et al.*, 2008) aumentando a expressão do fator neurotrófico derivado de células da glia (GNDF) e de RNAm de neurofilamento H, que são fundamentais para o bom funcionamento das funções cerebrais, incluindo as de aprendizagem e memória (HASHIMOTO *et al.*, 2005); e possuir atividade antioxidante. A GR possui em sua composição o ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico (HDEA), conhecido por contribuir na melhora de sintomas relacionados ao estresse crônico e depressão maior (ITO *et al.*, 2012), aumentar os níveis de neurogênese em áreas como hipocampo, influenciando positivamente na memória e na aprendizagem.

No presente estudo, para verificar se os efeitos da suplementação com a GR foram capazes de ajudar a reverter os danos ocasionados pelo estresse crônico, os animais foram submetidos ao RO e Teste de Sociabilidade Crawley ou Teste de Preferência por Novidade Social, que engloba os testes de sociabilidade e de preferência por novidade social.

Os resultados referentes ao teste de RO não foram os inicialmente esperados para o presente trabalho, uma vez que os animais do grupo controle (G1) e de G2 interagiram praticamente o mesmo tempo com o ON e o OC, enquanto que os animais de G3 e G4 apresentaram apenas uma tendência a interagirem mais tempo com o ON quando comparado ao tempo de interação com o OC. Pela hipótese levantada inicialmente, esperava-se que os animais de G1, G3 e G4 interagissem significativamente mais com o ON do que com o objeto já conhecido, o que indicaria que a suplementação com a GR poderia ter auxiliado na recuperação dos danos causados à memória pela indução do estresse. Os animais do grupo que foi submetido ao estresse crônico e não foi tratado com GR (G2), interagiram praticamente o mesmo tempo com ambos os objetos, indicando que a exposição à situação estressora pode ter comprometido funções cognitivas relacionadas à memória (FONTANA, 1994, apud ARALDI-FAVASSA *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 1992; LUINE *et al.*, 1994; MAGARIÑOS *et al.*, 1997), mas como os animais de G1 tiveram comportamento semelhante aos do G2, isso pode indicar que algo na metodologia aplicada pode ter falhado. Quando analisamos os resultados de G3 e G4, tais dados poderiam indicar que a GR pode ter tido uma influência positiva sobre a memória, uma vez que ela pode ser uma grande potencializadora da memória e aprendizagem (GUIMARÃES *et al.*, 2008), aumenta a expressão do fator neurotrófico derivado de células da glia (GNDF), e possui alto potencial antioxidante que contribui para evitar distúrbios relacionados ao sistema nervoso (AMES *et al.*, 1993), como a degradação da memória. Mas os dados do presente estudo para esse teste foram inconclusivos e os experimentos teriam que ser ampliados.

Em relação ao primeiro teste de Interação Social, o teste de sociabilidade, os animais do grupo que não recebeu tratamento com GR e foi submetido ao estresse crônico (G2) interagiu da mesma forma com a gaiola contendo outro animal e a gaiola vazia, indicando que a situação de estresse induzido realizada no presente trabalho pode ter afetado a sociabilidade do animal, uma vez que a tendência é que o animal tenha

preferência por interagir mais com outro animal (SCHNEIDER & PRZEWTOCKI, 2005). Já o grupo suplementado com GR e exposto ao estresse crônico (G4), interagiu significativamente mais com a gaiola com outro animal do que com a gaiola vazia, o que pode ser relacionado aos efeitos neuroprotetores da GR (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Também por possuir o ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico (HDEA) em sua composição, a GR pode ter auxiliado na melhora dos sintomas relacionados ao estresse crônico e da depressão maior (ITO *et al.*, 2012), que podem causar a perda de sociabilidade.

Já no teste de preferência por novidade social, assim como no teste de RO, os resultados das estatísticas do grupo controle (G1) não foram significativos. Os animais do grupo que não foi submetido à indução do estresse crônico e foi tratado com GR (G3) foram os únicos que interagiram mais tempo com o animal novo do que com o animal conhecido. Para a obtenção de dados conclusivos, os experimentos também precisariam ser ampliados.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pelo presente estudo, podemos concluir que a indução do estresse crônico nos camundongos foi capaz de provocar danos relacionados à perda de memória e de sociabilidade. Como demonstrado pelos resultados do teste de sociabilidade, a suplementação com geleia real foi capaz de amenizar os efeitos de perda de sociabilidade causados pelo estresse crônico.

Como os resultados para os testes de reconhecimento de objeto e de preferência por novidade social não foram os esperados, a realização de novos estudos relacionando esses testes com a GR é necessária, para averiguar se a suplementação com o composto pode auxiliar a amenizar e reverter os efeitos prejudiciais do estresse crônico em relação a memória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIL, H. A.; MORANO, M. I. **Stress**. In: BLOOM, F. E; KUPFER, D. J. (Eds.). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven, 1995. p. 773-785.

ALHEIRA, Flávio V; BRASIL, Marco A A. **O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão**. *Revista de Psiquiatria do RS*. Ago. 2005.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, n.17, p.7915–7922, 1993.

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

ARALDI-FAVASSA, C. T., ARMILIATO, N. & KALININ I. (2005) **Aspectos fisiológicos e psicológicos do estresse**. *Revista de Psicologia da UnC*, 2 (2), 84-92.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. *Revista de nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.

DA CÂMARA, Felipe Alves et al. **Correlação do uso de glicocorticoides com manifestações adversas neuropsíquicas e metabólicas**. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 1, p. 1811-1828, 2021.

ERIKSSON, P.; PERFILIEVA, E.; ERIKSSON, T.B.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D. & GAGE, F. **Neurogenesis in the adult human hippocampus**. *Nature America*, 1998.

EICHENBAUM, Howard; OTTO, Tim; COHEN, Neal J. **The hippocampus—what does it do?**. *Behavioral and neural biology*, v. 57, n. 1, p. 2-36, 1992.

GOULD, E., BEYLIN, A., TANAPAT, P., REEVES, A., & SHORS, T. J. (1999). **Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation**. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265. doi:10.1038/6365

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.

HANNIBAL, Kara E.; BISHOP, Mark D. **Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation.** Physical therapy, v. 94, n. 12, p. 1816-1825, 2014.

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.; & 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.

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.

HAYDAK, Mykola H. **Honey bee nutrition.** Annual review of entomology, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.

HERMAN, J. P.; SCHAFER, M. K. H.; YOUNG, E. A.; THOMPSON, R.; DOUGLASS, J.; AKIL, H.; WATSON, S. J. **Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.** Journal of Neuroscience, v.9, n.9, p.3072-3082, 1989.

HODGSON, Nancy et al. **Biobehavioral correlates of relocation in the frail elderly: salivary cortisol, affect, and cognitive function.** Journal of the American Geriatrics Society, v. 52, n. 11, p. 1856-1862, 2004.

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.

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.

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.

LIU, D.; ZHANG, Q.; GU, J.; WANG, X.; XIE, K.; XIAN, X.; JIANMEI, W.; JIANG, H.; WANG, Z. **Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v.49 p.21-29, 2014 Mar.

LUINE, V., VILLEGAS, M., MARTINEZ, C., & MCEWEN, B. S. (1994). **Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance.** Brain research, 639(1), 167–170.

MAGARIÑOS, A. M., VERDUGO, J. M. G., & MCEWEN, B. S. (1997). **Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(25), 14002-14008.

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.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. **Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments.** The Journal of Neuroscience, v.75, n.11, p. 7539-7547, 1995 Nov.

NUNES, Bianca Silva; BASTOS, Fernando Medeiros. **Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos.** Saúde & ciência em ação, v. 2, n. 2, p. 71-82, 2016.

PINTO, João Guedes. **Corticosteróides e Problemas Psiquiátricos.** Revista: Arquivos de Medicina da FMUP. Abr. 2010.

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.

SAMBATARO, F. et al. **BDNF modulates normal human hippocampal ageing.** Molecular psychiatry, v. 15, n. 2, p. 116-118, 2010.

SCHNEIDER T, PRZEWTOCKI R. **Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valpróico acid: animal model of autism.** Neuropsychopharmacol, 30: 80-89, 2005

SUSSMAN, D.; PANG, E. W.; JETLY, R.; DUNKLEY, B. T.; TAYLOR, M. J. **Neuroanatomical features in soldiers with post-traumatic stress disorder.** BMC Neuroscience, 2016.

TAFET, G. E., & BERNARDINI, R. (2003). **Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 27(6), 893–903.

TANNO, Ana Paula; MARCONDES, Fernanda Klein. **Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, p. 273-289, 2002.

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.

WATANABE, Y., GOULD, E., & MCEWEN, B. S. (1992). **Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons.** Brain Research, 588(2), 341–345.

ZAFIR, Ayesha; BANU, Naheed. **Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats.** 2009.