

Avaliação da eficácia do constituinte da própolis verde ácido cinâmico em teste experimental de depressão

Autores: Laura Colombo Pelicano¹, Priscila de Freitas Lima²

Colaboradores: Raphael Rian Cabral de Lima³, Vanessa Leiria Campo⁴

^{1,2,3,4} Centro Universitário Barão de Mauá

¹*laura15cope@gmail.com - Medicina,* ²*priscila.freitas@baraodemaua.br*

Resumo

Os transtornos depressivos são definidos por tristeza profunda, anedonia, sensação de vazio, irritabilidade e outras alterações cognitivas e somáticas que afetem a funcionalidade e a saúde psicológica dos indivíduos. Nesse aspecto, a depressão possui bases biológicas, sendo uma patologia de extrema importância, e que ainda carece de atenção, tratamento e diagnóstico adequados. O presente estudo objetivou avaliar a eficácia aguda do composto ácido cinâmico (derivado da própolis verde) em camundongos quanto às suas eventuais propriedades antidepressivas. De acordo com os dados obtidos, baixas doses do ácido cinâmico se mostraram equivalentes à fluoxetina administrada para diminuição da manifestação de sintomas depressivos testados por *splash test*.

Introdução

A depressão é uma patologia considerada, em sua epidemiologia, muito frequente, estando presente, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2018), em cerca de 300 milhões de pessoas.

Entende-se que a depressão é um distúrbio de humor, crônico e recorrente, além de ser correlacionado com alterações cognitivas e psicomotoras, o que prejudica o relacionamento social, emocional e profissional do indivíduo acometido (DINIZ et al., 2020).

Os principais sintomas apresentados são fadiga, sensação de culpa, frustração, pensamentos suicidas, ansiedade, problemas com sono, falta de concentração, alterações de autoestima, ânimo irritável e falta de motivação, dentre outros (RUFINO et al., 2018).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os critérios

diagnósticos devem, além de permanecer por duas semanas, ser suficientes para prejudicar o funcionamento psicossocial ou causar um sofrimento significativo ao indivíduo.

Nesse contexto, a depressão tem no tratamento farmacológico uma importante estratégia terapêutica. Porém, estima-se que 10-15% dos pacientes com depressão não respondem à farmacoterapia, e outros 30-40% demonstram apenas remissão parcial dos sintomas (FREITAS-LIMA, KANASHIRO, 2018). Notoriamente, casos resistentes à farmacoterapia implicam em mau prognóstico, risco de suicídio, prejuízos laborais, sociais e familiares, além de declínio da saúde física (SCHLAEPFER et al., 2013), o que reforça a necessidade de especial atenção a estes quadros e investimentos em alternativas viáveis para tratamento. Os impactos sociais, pessoais e econômicos dos transtornos depressivos colocam este grupo de manifestações clínicas em lugar de destaque no âmbito das políticas públicas de saúde.

Com relação a esse distúrbio, embora o mecanismo da depressão ainda não tenha sido completamente elucidado, acredita-se que envolva a diminuição de neurotransmissores monoamínicos como a serotonina (5-HT)/norepinefrina (NE) ou a alteração de seus receptores em número e sensibilidade. (FREITAS- LIMA, KANASHIRO, 2018).

Com o amplo efeito que os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina, como a Fluoxetina, desempenham sobre o tratamento da depressão, a serotonina se tornou o neurotransmissor mais associado aos transtornos depressivos. E embora a noradrenalina e a serotonina sejam efetivamente as aminas biogênicas mais frequentemente associadas à fisiopatologia depressiva, a dopamina, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e peptídeos neuroativos, como a vasopressina e opióides endógenos, também parecem estar implicados no surgimento desses sintomas depressivos.

Perante a importante porcentagem de pacientes que não respondem à farmacoterapia, é nítida a necessidade de buscar métodos e terapêuticas alternativas para o tratamento dos sintomas depressivos, principalmente entre compostos naturais ainda pouco explorados.

No que se refere a distúrbios neurocomportamentais, atividades antidepressivas e ansiolíticas têm sido demonstradas experimentalmente para o extrato etanólico de própolis (LI et al., 2012; LEE et al., 2013; REIS et al., 2014). Importantes constituintes da própolis verde são representados por derivados fenólicos como o ácido cinâmico, que apresenta importantes atividades biológicas tais como antimicrobianas, antitumorais, hipoglicemiantes e anti-inflamatórias (CASTRO, SALGUEIRO, 2016).

Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial antidepressivo agudo do ácido cinâmico, composto derivado da própolis verde, em camundongos submetidos a teste experimental de depressão.

Materiais e Métodos

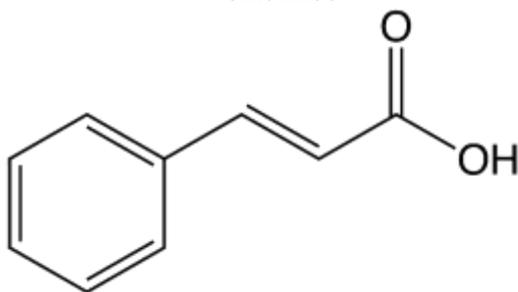
Tipo de estudo

O presente trabalho caracteriza-se como *estudo experimental*.

Composto ácido cinâmico

Segundo as normas da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o ácido cinâmico (Figura 1) recebe o nome de Ácido 3-fenil-2-propenoico, e sua fórmula molecular é $C_9H_8O_2$.

Figura 1 – Estrutura química do Ácido cinâmico



Fonte: próprio autor.

O ácido cinâmico utilizado neste experimento foi isolado a partir do extrato de própolis verde, sendo inicialmente realizado processo de extração com solução hidroalcoólica seguido de fracionamento utilizando cromatografia clássica em coluna com solução de hexano/acetato de etila (8:2). Subsequentemente, as frações obtidas foram analisadas e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com obtenção do composto ácido cinâmico com 97% de pureza (RODRIGUES et al., 2023).

Para administração aos animais, o ácido cinâmico foi diluído em solução 0,05% dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada, resultando na obtenção das três doses de teste, sendo elas 1mM; 0,5 mM e 0,1mM.

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados no total 37 camundongos machos, adultos jovens, com peso aproximado de 30 gramas, todos pertencentes à linhagem Swiss. Todos os animais foram criados e mantidos pelo biotério do Centro Universitário Barão de Mauá em caixas de polipropileno, agrupados em 5 animais por caixa, sob condições padronizadas de temperatura entre 24°C e 25°C, ciclo de luz claro-escuro com intervalos de 12h, água e ração *ad libitum* até alcançarem peso desejado.

Aspectos éticos

Os experimentos foram conduzidos em conformidade com a aprovação sob o processo de número 502/23 do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEPAN) do Centro Universitário Barão de Mauá.

Teste comportamental

Os animais foram submetidos a um teste comportamental visando avaliar a resposta ao uso do ácido cinâmico no controle agudo de sintomas relacionados à depressão, com base na reação dos camundongos.

Splash test

O *splash test* é um protocolo inicialmente proposto por Isingrini e colaboradores (2010) que consiste em espirrar uma solução 10% sacarose no dorso do animal, para avaliar uma forma de comportamento motivacional.

A latência (tempo entre o spray e o começo de comportamento de *grooming* – comportamento

de se esfregar para se limpar) frequência e duração do *grooming* são gravados por 5 minutos e analisados como indicativo de autocuidado e comportamento motivado. Assim, a redução do comportamento de *grooming* é indicativo, em camundongos, de comportamento equivalente à depressão. Caso o animal apresente sintomas do tipo depressivo, ocorrem comportamentos de anedonia e apatia, fazendo com que o tempo de início do *grooming* seja maior.

Delimitação experimental

O teste se iniciava com um período de aclimatação dos camundongos, provenientes do biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, na sala de experimentação.

Esses animais eram colocados no referido ambiente 30 minutos antes do início dos protocolos, priorizando a redução da intensidade da iluminação e atenuação de ruídos, além da temperatura mantida entre 24°C e 25°C.

Os animais eram separados, um animal por caixa, para que fossem distinguidos por suas respectivas numerações durante a experimentação.

Após o período de habituação, os animais recebiam os compostos previamente designados, por meio da técnica de gavagem (via oral), conforme organização abaixo:

- G1: Controle de manipulação (n=2); animais não recebem qualquer medicamento ou substância em investigação; mas são sujeitos ao mesmo teste comportamental dos demais animais.

- G2: Controle de veículo (n=12); animais recebem apenas o mesmo veículo do composto em investigação e dos medicamentos-controle (solução 0,05% DMSO em água destilada), na sequência passando pelo teste comportamental.

- G3: Controle para depressão (n=13); animais recebem dose de fluoxetina 10 mg/kg e são sujeitos ao teste comportamental.

- G4: Dose 1 ácido cinâmico (n=7); animais recebem agudamente uma dose de 1mM do composto e são sujeitos ao teste comportamental.

- G5: Dose 2 ácido cinâmico (n=7); animais recebem agudamente uma dose de 0.5 mM do composto e são sujeitos ao teste comportamental.

- G6: Dose 3 ácido cinâmico (n=7); animais recebem agudamente uma dose de 0.1 mM do composto e são sujeitos ao teste comportamental.

Os animais retornavam às suas caixas, onde ficavam por mais 30 minutos até iniciarem a testagem comportamental.

Sendo assim, eles passavam por todas as etapas do experimento sob supervisão e filmagem, para maior fidedignidade das análises.

Entre um animal e outro, a caixa era devidamente higienizada com álcool etílico 10% e seca em ar corrente.

Ao final dessa sequência, os animais eram devolvidos às suas respectivas caixas, ainda na sala de experimentos, para que então fossem levados a outra sala onde era feita a indução de morte após 30 minutos da finalização dos experimentos

Para tanto, os animais eram anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e ketamina (270 mg/kg) por via intraperitoneal. Assim que o efeito anestésico era letal nos animais, as amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo orbital.

O soro (cerca de 300 µL) foi obtido a partir de centrifugação das amostras de sangue total (1000 rpm por 10min) e congelado, identificados de acordo com os números dos animais e disponíveis para análises futuras.

Análises de dados

A análise dos dados foi pautada na avaliação comportamental dos animais quando submetidos ao *splash test* (Figura 2), e o antidepressivo utilizado para comparação e controle dos dados foi a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina.

Todos os experimentos foram integralmente gravados e esse material foi editado para ser analisado visualmente pelo experimentador. Feita a análise dos comportamentos no *Splash Test*, os dados coletados foram submetidos à análise estatística pela ANOVA de uma via pelo software GraphPad Prism 8®.

Figura 2 – Camundongo submetido ao *Splash Test*



Fonte: acervo do autor.

Resultado e Discussão

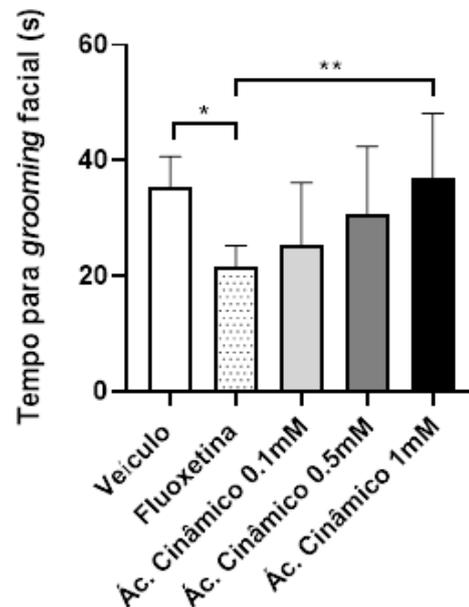
O *splash test* foi desenvolvido como um índice de autocuidado e comportamento motivacional, considerado paralelo com alguns sintomas de depressão, como o comportamento anedônico. O *splash test* é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (*grooming*) dos animais, após a borrifagem dos mesmos com solução de sacarose a 10%. Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo despendido neste comportamento (YALCIN, AKSU, BELZUNG, 2005).

Nesse contexto, é esperado que animais que manifestem sintomas depressivos levem mais tempo para se preocuparem com a autolimpeza.

A partir da condução do teste de Rout (coeficiente $Q=1\%$) não foram identificados quaisquer *outliers* nos grupos analisados. Os dados foram então analisados por ANOVA de uma via com teste de comparações múltiplas de Tukey, ao que se refere ao tempo que o animal leva para iniciar a atividade de *grooming* (auto-limpeza) de acordo com o composto de interesse e controles.

É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ANOVA de uma via: [Tempo para *grooming* facial (s): $F(4, 32)= 3,994$; $p= 0,0097$] (Figura 3). A aplicação do teste Brown-Forsythe não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os desvios-padrão dos dados.

Figura 3 – Dados de *splash test* sob administração de Ácido cinâmico



Fonte: Acervo do autor. Análise do tempo decorrido até o início do *grooming* facial nos camundongos sujeitos ao *splash test* após diferentes administrações. * $p=0,03$; ** $p=0,01$. Dados representados como médias e desvios-padrão.

Com base nos resultados obtidos, observou-se que embora não haja diferenças estatisticamente significativas entre o ácido cinâmico 0.1mM e o 0.5 mM, destaca-se que ambos estão próximos aos dados obtidos para o controle. Portanto, as duas primeiras doses apresentam potencial relevância, uma vez que se assemelham ao padrão antidepressivo da literatura, a fluoxetina. A diferença estatisticamente significativa entre veículo e fluoxetina corrobora a sensibilidade do ensaio experimental adotado (*splash test*).

Por outro lado, o ácido cinâmico 1mM se equipara aos dados do veículo. Dessa forma, comprova-se que a dosagem mais alta do ácido cinâmico não apresenta efeitos antidepressivos potencialmente relevantes.

Conclusão

Observa-se que o ácido cinâmico, composto bioativo da própolis verde, mostrou-se em baixas doses, equivalente à fluoxetina administrada agudamente para diminuição da manifestação de sintomas depressivos por *splash test*.

Referências

- CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.
- DINIZ, J. P.; et al. Ação dos neurotransmissores envolvidos na depressão. **Ensaio e Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 4, p. 437-443, 2020.
- FREITAS-LIMA, P.; KANASHIRO, A. Depressão. In: **Farmacoterapia: Guia Terapêutico de Doenças mais Prevalentes**. Vol 2. 2 ed. Org: Paulo Roque Obreli Neto, André de Oliveira Baldoni, Camilo Molino Guindoni, Leonardo Régis Leira Pereira. Pharmabooks, 2018.
- ISINGRINI, E., et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4:e10404, 2010.
- LEE, M.; KIM, Y. H.; PARK, W.; AHN, W. G.; PARK, O. K.; KWON, S.; MORITA, K.; SHIM, I.; HER, S. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- LI, Y-J; XUAN, H-Z; SHOU, Q-Y; ZHAN, Z-G; LU, X; HU, F-L. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, p. 157-165, 2012.
- ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Folha Informativa – Depressão. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- REIS, J. S. S.; OLIVEIRA, G. B.; MONTEIRO, M. C.; MACHADO, C. S.; TORRES, Y. R.; PREDIGER, R. D.; MAIA, C. S. F. Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1466-1472, 2014.
- RODRIGUES, D. M. et al. Novel synthetic derivatives of cinnamic and p-coumaric acids with antiproliferative effect on breast MCF-7 tumor cells. **Natural Product Research**, v. 37, n. 24, p. 4210-4220, 2023.
- RUFINO, S.; LEITE, R. S.; FRESCHI, L.; VENTURELLI, V. K.; OLIVEIRA, E. D.; MASTROROCCO FILHO, D. A. M. Aspectos gerais, sintomas e diagnóstico da depressão. **Revista Saúde em foco**, v. 10, n. 1, p. 837-843, 2018.
- SCHLAEPFER, T. E.; BEWERNICK, B. H.; KAYSER, S.; M^{ADLER}, B.; COENEN, V. A. Rapid effects of deep brain stimulation for treatment-resistant major depression. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1204-1212, 2013.
- YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal Of Pharmacology**, v. 514, n. 2-3, p. 165-174, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.03.029>. Acesso em: 10 abr. 2024.