

## **Análise sérica de marcador de inflamação e estresse em camundongos tratados agudamente com ácido cafeico e ácido cinâmico**

**Autores: Luana Gabrielly Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Priscila de Freitas Lima<sup>2</sup>**

**Colaboradores: Raphael Rian Cabral de Lima<sup>3</sup>, Vanessa Leiria Campo<sup>4</sup>**

**<sup>1,2,3,4</sup>Centro Universitário Barão de Mauá**

*<sup>1</sup>luanagabrielly\_97@hotmail.com - Medicina, <sup>2</sup>priscila.freitas@baraodemaua.br*

### **Resumo**

Exposição a estresse crônico pode predispor ao desenvolvimento de transtorno de ansiedade e de humor, doenças cardiovasculares e osteomusculares, dentre outras. Tais patologias relacionam-se ao aumento de marcadores, como citocinas, hormônios e proteína c-reativa (PCR), os quais atuam mediando respostas inflamatórias no organismo. Este estudo avaliou a presença da PCR no soro de camundongos submetidos a testes comportamentais de estresse com uso de compostos para potencial controle de sintomas depressivos. De acordo com os dados analisados é possível concluir que a PCR pode ser encontrada no soro de camundongos sujeitos a situações experimentalmente compatíveis com estresse e ansiedade, mas que a fluoxetina, o ácido cinâmico e o ácido cafeico, nas doses testadas em administração aguda por via oral, não foram capazes de reduzir de modo expressivo a presença desta no soro.

### **Introdução**

A resposta metabólica ao estresse baseada nos marcadores de inflamação participa ativamente na homeostase do organismo. Sabe-se que alterações nestes marcadores de estresse, associadas a fatores genéticos e ambientais, são capazes de levar a mudanças comportamentais responsáveis por influenciar, de forma positiva, a mudança de atitudes diante do instinto de sobrevivência. Contudo, a quebra de equilíbrio dos marcadores também atua de forma negativa, como no desenvolvimento de distúrbios endócrinos – prejuízo de crescimento –, metabólicos e, inclusive, autoimunes – fibromialgia –, e psiquiátricos – depressão e ansiedade (CHARMANDARI; TSGIOS; CHROUSOS, 2005).

Em relação aos marcadores inflamatórios, a proteína c-reativa (PCR), característica de fase

aguda da inflamação, pode aumentar exponencialmente seu nível circulante em resposta a infecção ou lesão tecidual, desempenhando importante papel como regulador da resposta de defesa e de inflamação (JI et al., 2023).

Esta elevação basal conhecida da PCR, em certas situações, é usada clinicamente como exame complementar para avaliar infecções, inflamações, principalmente de cunho sistêmico, além de permitir o monitoramento da evolução de doenças crônicas. Nesse sentido, a escolha da PCR como exame complementar se dá justamente por se tratar de um biomarcador de fácil avaliação e pela confiabilidade em quantificá-la, tornando-a uma referência em comparação a outros mediadores imunológicos mais desafiadores de avaliação em cenário clínico, tais como citocinas, por exemplo (FRIEND et al., 2020).

Detalhando bioquimicamente, a PCR é sintetizada pelo fígado por meio do estímulo de citocinas inflamatórias presentes devido a algum processo inflamatório ou infeccioso. Os mecanismos pelos quais a PCR atua são vários e ainda estão sendo investigados, mas sabe-se que ela se deposita em tecidos danificados e é responsável por ativar a via clássica do sistema complemento, assim realizando a fagocitose de macrófagos de células já mortas. Em relação a inflamação, possuem participação na eliminação de neutrófilos, na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, possui papel conhecido em infecções e traumas agudos, sendo alvo de estudos nesses casos (FRIEND et al., 2020).

Contudo, focando em situações crônicas e não apenas em agudas, o estresse psicossocial e físico também é capazes de aumentar os índices de inflamação basal como resultado da atuação de hormônios, neurotransmissores, citocinas e da própria PCR, desequilibrando a homeostase

(JOHNSON et al., 2013). Assim, há estudos que evidenciam que a exposição ao estresse crônico, por um período prolongado, é fator de risco para o desenvolvimento ou agravamento de diversas patologias, sejam elas psíquicas ou clínicas, como as doenças cardiovasculares – nas quais a PCR pode estar relacionada à formação de placas ateroscleróticas, devido à inflamação constante nas paredes dos vasos (GOKUL et al., 2019) –, a Síndrome de Burnout, a insônia crônica, os transtornos de ansiedade e psicóticos (SINGH; CHAUDHURI, 2014) agravados por situações de estresse no trabalho ou em relações interpessoais (FRIEND et al., 2020).

Diante disso, a depressão, um transtorno psiquiátrico relacionado a mudanças de humor e de comportamento e associado a estressores ambientais, é uma das principais causas de incapacidade atualmente. Sabe-se que o desenvolvimento dessa doença está interligado a diversos mecanismos diferentes, sendo alguns deles relacionados ao funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o que enfatiza a potencial produção de marcadores inflamatórios diversos, citocinas pró-inflamatórias e PCR (GOKUL et al., 2019).

Nesta perspectiva, novos estudos buscam analisar a relação da concentração desta proteína em pacientes diagnosticados com transtorno depressivo maior a fim de estabelecer uma relação entre tais achados. No estudo de Danese et al. (2008), é evidenciado que pessoas deprimidas, as quais passaram por estresse prolongado, como disciplina severa, rejeição, abusos, apresentavam 1,48 vezes mais probabilidade de ter níveis elevados de PCR (> 3 mg/L) quando comparadas a pessoas sem doenças psíquicas sujeitas a estresse.

Em um estudo mais recente de Danese et al. (2010), crianças expostas a abusos físicos e deprimidas apresentaram níveis significativamente mais elevados de PCR em relação a crianças apenas depressivas sem exposição a situações de estresses e a crianças sem depressão e sem exposição a estresse.

Perante o exposto, evidencia-se que o estresse físico ou psicossocial crônico acontece devido a diversas situações, sendo capaz de modular a aparição ou o progresso de doenças psiquiátricas. Embora a maioria dos estudos publicados demonstrem uma relação significativa entre o aumento do nível de marcadores inflamatórios, como a PCR, e a presença de um fator estressante, é necessário amostras maiores e exclusão adequada de variáveis de confusão a fim

de confirmar as hipóteses já geradas relacionada a essa temática.

## Objetivo

O presente projeto teve como objetivo analisar amostras de soro de camundongos sujeitos à administração aguda de ácido cafeico ou ácido cinâmico (derivados da própolis verde) para fins de efeitos antidepressivos e ansiolíticos quanto à presença e quantidade do marcador de inflamação PCR.

## Materiais e Métodos

### Tipo de estudo

O presente trabalho caracteriza-se como estudo experimental.

### Animais

Todos os animais foram provenientes do Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá (CBM), com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEPAN), obedecendo todos os critérios e normas estabelecidas por Guias de Cuidados e Uso de Animais Laboratoriais. Os animais utilizados na pesquisa foram camundongos machos da linhagem Swiss, com peso aproximado de 30 gramas (adultos jovens).

No total, foram coletadas 82 amostras de soro de camundongos como parte dos projetos desenvolvidos pelas alunas Luísa Ferreira Costa e Laura Colombo Pelicano, pertencentes à mesma linha de pesquisa conduzida pela Professora Doutora Priscila de Freitas Lima. As coletas foram realizadas durante o mês de julho a setembro, sendo 35 animais testados em julho (14, 17 e 29 de julho), 23 animais em agosto (26 de agosto) e 24 animais em setembro (02 de setembro). As análises aqui apresentadas contemplam 34 animais.

### Aspectos éticos

Os experimentos com os animais foram realizados em concordância com a aprovação do projeto sob o número de protocolo 502/23 do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEPAN) do Centro Universitário Barão de Mauá (CBM).

### Testes comportamentais previamente à coleta

Todos os testes comportamentais foram conduzidos no Centro Universitário Barão de

Mauá. Meia hora antes do início dos experimentos os animais eram conduzidos à sala de teste para aclimação e habituação. Foram mantidas condições ideais para realização dos experimentos: atenuação dos níveis de ruído, baixa intensidade de iluminação e temperatura controlada (24-25°C).

Com base em dados da literatura, foram testadas três diferentes doses dos compostos ácido cafeico (0,01mM, 0,1mM e 1mM) e ácido cinâmico (0,1mM, 0,5mM e 1mM), assim como o controle ansiolítico diazepam (1mg/Kg) e o controle antidepressivo fluoxetina (10mg/Kg). Todos foram diluídos no veículo água destilada+0,05% dimetilsulfóxido (DMSO) e administrados por gavagem de forma aguda, 30 minutos antes dos testes comportamentais. Todos os experimentos foram filmados para garantir a máxima fidedignidade possível nas análises. Ao final de cada experimento os animais anestesiados e eutanasiados tiveram o sangue coletado via plexo orbital para análises séricas (Figura 1).



**Figura 1 - Mesa de procedimentos para anestesia, eutanásia e coleta de material biológico.**

Cada animal foi sujeito a todos os seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, campo aberto e *splash test*.

Em relação aos testes, no teste do labirinto em cruz elevado, tem-se um aparato composto por duas peças de braços fechados e duas peças de braços abertos, os quais são montados perpendicularmente e que permanecem montados em um nível elevado acima do chão (cerca de 50cm). Com isso, o roedor é colocado no centro da peça com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento é analisado durante 5 minutos, objetiva-se ver a reação dos animais diante lugares altos, iluminados e desprotegidos, com possível efeito ansiolítico, caso haja predileção pelos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

O teste claro-escuro é composto por uma caixa com um compartimento claro, iluminado possuindo

suas paredes e piso brancos e por um compartimento escuro, com nenhuma luminosidade, possuindo paredes e piso pretos. Ele analisa a capacidade de exploração do animal, movendo-se para o desconhecido, instigando-o a um ambiente novo (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

O teste de campo aberto é composto por uma plataforma circular cercada por paredes acrílicas, a qual analisa os padrões comportamentais de movimentação do animal, com sinais menos ansiosos relacionados a roedores que exploram mais o centro da arena e, mais ansiosos, os que permanecem nas bordas (JOHNSTON; FILE, 1991).

O *splash test* é um experimento realizado ao espirrar uma solução 10% sacarose no dorso do animal. Essa solução irá promover um comportamento de *grooming* (auto-limpeza); caso haja uma redução desse comportamento, tal achado pode ser compatível com sintomas depressivos (ISINGRINI et al., 2010).

### **Delineamento experimental**

Foram testados os possíveis efeitos antidepressivos e ansiolíticos dos compostos ácido cinâmico e ácido cafeico, ambos isolados da própolis verde, mediante administração aguda destes por gavagem. Os controles antidepressivos e ansiolíticos envolveram administração de diazepam e fluoxetina pela mesma via, além do controle veículo (solução 0,05% de DMSO em água destilada). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, 5 animais por caixa, acondicionados em condições padronizadas de temperatura (24-25°C), ciclo de luz claro/escuro de 12h, água e ração *ad libitum*.

A coleta de sangue foi conduzida 30 min após a finalização dos protocolos comportamentais. Foi administrada sobrecarga anestésica com xilazina (20mg/kg) e ketamina (270mg/kg) por via intraperitoneal. Assim que aconteceu o efeito anestésico letal nos animais, as amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo orbital. O sangue obtido passou por uma sequência de centrifugação das amostras de sangue total (1000 rpm por 10min). O soro (cerca de 300µL) foi congelado e armazenado na sala de pesquisas do CBM, todos identificados de acordo com os números dos animais, com posterior encaminhados para análise.

A técnica qualitativa para avaliação da presença do marcador de estresse de interesse, a PCR, seguiu protocolo padronizado pelo laboratório de pesquisa do Centro Universitário Barão de Mauá.

### Análises de dados

Para a determinação da PCR no soro do animal foi realizado teste de aglutinação por meio do látex. Esse teste é baseado na aglutinação das partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-PCR humana e misturado com soro contendo uma concentração de PCR igual ou superior a 6 mg/L. É um teste simples e rápido de ser realizado, não sendo necessária diluição prévia da amostra (em casos de soros positivos, pode ser realizada titulação para fins de quantificação – o que não foi objetivado no presente trabalho).

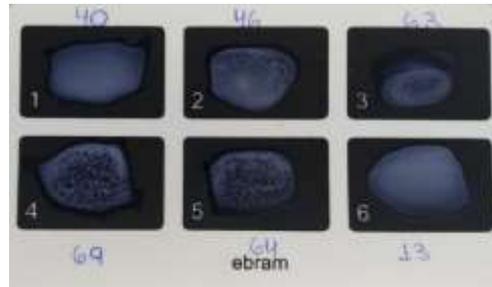
Na placa de reação, colocam-se os controles de soro positivo e negativo, sendo o controle positivo com uma concentração de PCR maior ou igual a 10mg/L e o controle negativo soro humano em tampão fosfato salino (cloreto de sódio 8,5g).

Todas as amostras foram retiradas do congelador e deixadas para atingirem a temperatura ambiente. Na placa de reação, foi pipetada uma gota dos controles positivo e negativo e 300µL de soro a ser analisado. Realizou-se homogeneização do látex PCR e acréscimo de uma gota de Látex PCR próxima aos soros, os quais foram misturados por um palito descartável procurando abranger toda a superfície interior da área, com cuidado de não utilizar o mesmo palito entre as amostras a fim de evitar a contaminação. Além da mistura manual, foi realizado agitação da placa durante no mínimo 1 minuto inclinando-a para frente e para trás, com movimentos oscilatórios. Após isso, foi verificada por inspeção visual direta se havia presença ou não de aglutinação, comparando o resultado da amostra com os padrões obtidos com os controles positivo e negativo.

### Resultados e Discussão

Os resultados das reações de aglutinação foram analisados macroscopicamente, sem necessidade de usar de microscópio ou lupa. Desse modo, para os resultados negativos, observou-se uma suspensão homogênea com ausência de aglutinação. Para os resultados tidos como positivos, observou-se presença de aglutinação (formação de grumos, variando entre grupos finos a grumos grosseiros). A exemplo, na Figura 2, temos os soros dos animais 40 e 13 sem aglutinação, ou seja, com resultados negativos, e os soros dos animais 46, 63, 69 e 64 com aglutinação, ou seja, com resultados positivos. Para esse estudo foram analisados 34 animais, sendo animais controle veículo (solução 0,05% de DMSO em água destilada), uma dose do composto

ácido cafeico (1mM) e a mesma dose do composto ácido cinâmico, além do controle antidepressivo fluoxetina (10 mg/Kg).



**Figura 2 - Placa de reação de aglutinação com resultados positivos e negativos.**

Dos 10 animais controle veículo, 6 apresentaram PCR em seus soros; dos 10 animais controle antidepressivo fluoxetina não houve diferença na presença ou não da proteína; dos 7 animais controle ácido cafeico na maior dose, 5 apresentaram presença da proteína; e dos 7 animais controle ácido cinâmico, 3 apresentaram a presença da proteína (Tabela 1).

**Tabela 1 – Dados qualitativos de PCR nas amostras de soro de camundongo (n=34).**

Análise	Veículo (n=10)	Fluoxetina (n=10)	Ácido cafeico 1mM (n=7)	Ácido cinâmico 1mM (n=7)
PCR +	6	5	5	3
PCR -	4	5	2	4

Fonte: próprio autor.

Assim, após a análise macroscópica, observou-se que a maioria dos animais estudados (19) apresentaram PCR em seus soros, evidenciando que é um marcador inflamatório fácil de ser encontrado e analisado, apesar de estarem sujeitos a reações falso-negativas que podem ocorrer quando a concentração de PCR no soro estiver muito elevada (efeito prozona).

Os achados de PCR indistintos em relação aos controles antidepressivos fluoxetina surpreenderam, visto suas propriedades como inibidor seletivo da recaptção da serotonina (ISRS). Embora a fluoxetina seja um antidepressivo bastante eficaz para casos leves a moderados de depressão e um controle amplamente empregado na literatura para investigações experimentais de natureza semelhante à aqui apresentada, aparentemente

ela não é capaz de reduzir expressivamente a presença da PCR em situações agudas (como a adotada neste trabalho).

Em congruência, dos 7 animais testados para ácido cinâmico 1mM, 4 não apresentaram PCR e 3, sim. Relativamente ao ácido cafeico, nota-se que ele, na dose de 1mM, também não foi capaz de reduzir substancialmente a presença da PCR nos animais testados.

## Conclusão

De acordo com os dados analisados é possível concluir que a PCR pode ser encontrada no soro de camundongos sujeitos a situações experimentalmente compatíveis com estresse e ansiedade, mas que a fluoxetina, o ácido cinâmico e o ácido cafeico, nas doses testadas em administração aguda por via oral, não foram capazes de reduzir de modo expressivo a presença desta no soro.

## Referências

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 259-284, 2005.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

DANESE, A.; et al. Elevated Inflammation Levels in Depressed Adults With a History of Childhood Maltreatment. **Archives of General Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 409, 2008.

DANESE, A.; et al. Biological embedding of stress through inflammation processes in childhood. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 244-246, 2010.

FRIEND, S. F.; et al. C-Reactive Protein: marker of risk for post: traumatic stress disorder and its potential for a mechanistic role in trauma response and recovery. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9-10, p. 2297-2310, 2020.

GOKUL, M.; et al. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology And Pharmacology**, v. 30, n. 5: 20180215, 2019.

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. 4:10404, 2010.

JI, S.; et al. C-Reactive Protein: the most familiar stranger. **The Journal of Immunology**, v. 210, n. 6, p. 699-707, 2023.

JOHNSON, T. V.; et al. Systematic Review of the Evidence of a Relationship Between Chronic Psychosocial Stress and C-Reactive Protein. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 17, n. 3, p. 147-164, 2013.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.

PELLOW, S.; et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

SINGH, B.; CHAUDHURI, T. K. Role of C-reactive protein in schizophrenia: an overview. **Psychiatry Research**, v. 216, n. 2, p. 277-285, 2014.