

Avaliação da eficácia do constituinte da própolis verde ácido cafeico em modelos experimentais de depressão

Autores: Luísa Ferreira Costa¹, Priscila de Freitas Lima²

Colaboradores: Raphael Rian Cabral de Lima³; Vanessa Leiria Campo⁴

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

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

Resumo

Os impactos sociais, pessoais e econômicos dos transtornos de humor, como a depressão, colocam este grupo de manifestações clínicas em lugar de destaque no âmbito das políticas públicas de saúde globalmente. A terapia farmacológica, a despeito de suas limitações, constitui-se ainda como uma importante estratégia no tratamento desses pacientes. Este estudo investigou a eficácia do ácido cafeico, derivado da própolis verde, como tratamento potencial para depressão. Para isso, camundongos foram submetidos a testes experimentais de verificação das potenciais atividades antidepressivas do ácido cafeico comparativamente a controles. Com base nos resultados obtidos, observou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre o ácido cafeico e os controles.

Introdução

Caracterizada pela presença persistente e com impactos significativos sobre o funcionamento do indivíduo de sintomas tais como humor triste, vazio ou irritável, perda de interesse ou prazer e prejuízo das capacidades de concentração e de tomada de decisão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), 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 remissão dos sintomas.

Não obstante, as taxas de resposta a tais tratamentos convencionais não ultrapassam cerca de 66% enfatizando, também para o caso dos transtornos de ansiedade, a necessidade de crescente investimento em alternativas terapêuticas para se evitar os frequentes abandonos de tratamento, recaídas, recorrências e piora de prognóstico observáveis neste cenário. Embora o mecanismo da depressão ainda não tenha sido completamente compreendido, supostamente ele envolve a diminuição de neurotransmissores monoamínicos como a serotonina (5-HT)/norepinefrina (NE) ou a alteração de seus receptores em número e sensibilidade, disfunções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e alterações relacionadas à neuroplasticidade (FREITAS-LIMA; KANASHIRO, 2018).

No que se refere a opções alternativas de tratamento para distúrbios neurocomportamentais, atividades antidepressivas e ansiolíticas têm sido demonstradas experimentalmente para o extrato etanólico de própolis (LI et al., 2012; LEE; BULL; HO, 2013). Importantes constituintes da própolis verde são representados por derivados fenólicos, sendo o ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicínâmico) um importante representante por apresentar relevantes atividades biológicas tais como antimicrobianas, hipoglicemiantes, antitumorais e anti-inflamatórias. O ácido cafeico exerce muitos efeitos benéficos bem estabelecidos e essas características são amplamente confirmadas em diferentes tecidos e condições, principalmente em casos de doenças crônicas e degenerativas. (JUNG et al., 2006; CHEN et al., 2011; MURTAZA et al., 2014; KOSTIĆ et al., 2022).

Mais especificamente, a literatura aponta que a estrutura do ácido cafeico consiste em um núcleo aromático substituído na posição 1 por uma cadeia insaturada de três carbonos contendo um grupo carboxílico e nas posições 4 e 5 por dois grupos hidroxila. Pertencente ao chamado grupo do ácido hidroxicínâmico (ácidos aromáticos com um esqueleto C6–C3), o ácido cafeico pode aumentar

a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase para manter o equilíbrio do redox intracelular. A estrutura do ácido cafeico representa uma armadilha eficaz para os radicais livres a partir da combinação de um núcleo aromático com uma cadeia lateral conjugada. Essa capacidade antioxidante compõe uma base importante para muitos efeitos farmacológicos (HUANG et al., 2019).

Com relação a sua absorção e transformação metabólica, o ácido cafeico passa por diferentes órgãos e barreiras para ser absorvido no corpo. Primeiro, transportadores de ácido monocarboxílico e fluxo transepitelial participam da absorção do composto livre no trato gastrointestinal. A microbiota intestinal também desempenha um papel significativo no metabolismo do ácido cafeico de modo que, em condições anaeróbias, as bactérias que possuem tirosina descarboxilase podem induzir descarboxilação gerando o ácido propiônico, que possui ainda maior atividade antioxidante. A transformação metabólica ocorre no fígado e nos rins e a maior concentração plasmática ocorre após 1h. A taxa de excreção está na faixa de 5,9% a 27% ocorrendo principalmente através da urina. O derivado do ácido cafeico, o ácido fenetil éster, tem um peso molecular de 284,31 g/mol e possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (WU et al., 2007). O composto confere uma função neuroprotetora podendo suprimir a inflamação e inibir a via de morte neuronal para combater o dano hipóxico-isquêmico (HI) induzido no córtex, hipocampo e tálamo. Ademais, tem habilidades de resgate de memória, incluindo o efeito de atenuar a morte neuronal dopaminérgica, e tais funções têm sido associadas intimamente com os papéis do composto na regulação da apoptose (JUNG et al., 2006; CHENG et al., 2003).

Conforme evidenciado, derivados da própolis apresentam inúmeras atividades biológicas. No entanto, embora ações antioxidantes e anti-inflamatórias de tais compostos os coloquem como potencialmente benéficos para o controle de doenças psiquiátricas como depressão e ansiedade (DINIZ et al., 2019), investigações biológicas empregando testes neurocomportamentais especificamente com os componentes isolados da própolis verde como o ácido cafeico carecem na literatura.

Objetivo

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

Materiais e Métodos

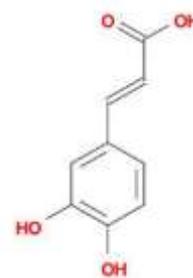
Tipo de estudo

A presente proposta caracteriza-se como *estudo experimental*.

Composto ácido cafeico

O composto ácido cafeico (Figura 1) aplicado no presente estudo tem fórmula molecular $C_9H_8O_4$. Todas as etapas analíticas para sua obtenção foram conduzidas pela Profa Dra Vanessa Leiria Campo e equipe, numa pareceria entre o Centro Universitário Barão de Mauá e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Figura 1 - Estrutura química do ácido cafeico



Fonte: CAPARICA et al., 2020.

O composto ácido cafeico foi isolado a partir do extrato de própolis verde, sendo inicialmente realizado processo de extração com solução hidroalcolólica 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. Para administração aos animais, o ácido cafeico foi diluído em solução 0,05% dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada resultando na obtenção das três doses de teste 1mM, 0,1 mM e 0,01mM.

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados 47 camundongos machos, adultos jovens (peso aproximado de 30 gramas), todos pertencentes à linhagem Swiss.

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

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. 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 auto-cuidado e comportamento motivado. Redução do comportamento de *grooming* é indicativo, em camundongos, de comportamento equivalente à depressão.

Delineamento experimental

Os camundongos, provenientes do biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, passaram por um processo de aclimação na sala de experimentação. Os animais foram colocados no referido ambiente 30 minutos antes do início dos protocolos, onde havia redução da intensidade da iluminação e atenuação de ruídos, além da temperatura mantida entre 24°C e 25°C. Os animais foram separados, um animal por caixa, para que fossem distinguidos por suas respectivas numerações. Após esse período de habituação, os animais receberam os compostos previamente designados por meio da técnica de gavagem (via oral) conforme organização abaixo:

- G1: Controle de manipulação (n=2); animais não receberam qualquer medicamento ou substância em investigação; foram sujeitos ao mesmo teste comportamental dos demais animais.
- G2: Controle de veículo (n=12); animais receberam 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=12); animais receberam dose de 10mg/kg de fluoxetina e foram sujeitos ao teste comportamental.
- G4: Dose 1 ácido cafeico (n=7); animais receberam agudamente 1000 µg/kg do composto e foram sujeitos ao teste comportamental.
- G5: Dose 2 ácido cafeico (n=7); animais receberam agudamente 3000 µg/kg do composto e foram sujeitos ao teste comportamental.

- G6: Dose 3 ácido cafeico (n=7); animais receberam agudamente 10000 µg/kg do composto e foram sujeitos ao teste comportamental.

Os animais retornaram às suas caixas, onde ficaram por mais 30 minutos até serem colocados no aparato de teste 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, cada aparato era devidamente higienizado com álcool etílico 10% e secos em ar corrente. Ao final do teste, os animais foram devolvidos às suas respectivas caixas, ainda na sala de experimentos, para que então fossem levados a outra sala onde foi feita a indução de morte após 30 minutos de finalização dos experimentos.

Por fim, os animais foram 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 sangue obtido (cerca de 300 µL por animal) passou por uma sequência de centrifugação para separação do soro, tendo sido as amostras congeladas para posteriores análises.

Análises de dados

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

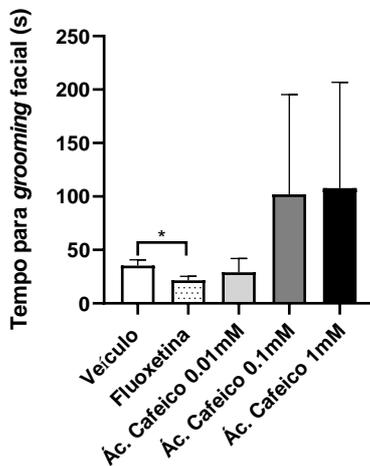
Resultado e Discussão

O *splash test* foi 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, foi esperado que animais que manifestassem sintomas depressivos levassem mais tempo para se preocuparem com a autolimpeza.

A partir da condução do teste de Rout (coeficiente Q=1%) não foram identificados *outliers* nos grupos analisados que precisassem ser excluídos, embora o teste de Bartlett tenha apontado diferença estatisticamente significativa entre os desvios-padrão ($p < 0,0001$).

Os dados foram então analisados por ANOVA de uma via com teste de comparações múltiplas de Tukey no que se refere ao tempo que o animal levou para iniciar a atividade de *grooming* (auto-limpeza) de acordo com os compostos de interesse e controles (Figura 3, dados representados como médias e desvios-padrão).

Figura 3. Dados de *splash test* sob administração de ácido cafeico



Fonte: acervo do autor

É possível inferir que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados no que se refere ao composto de interesse. ANOVA de uma via: [Tempo para grooming facial (s): $F(4, 32) = 3,668$; $p = 0,01$]. A aplicação do teste evidenciou diferença entre os grupos veículo e fluoxetina ($*p = 0,03$).

Com base nos resultados obtidos, observou-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre o Ácido Cafeico e os controles. A diferença estatisticamente significativa entre veículo e fluoxetina corrobora a sensibilidade do ensaio experimental adotado (*splash test*).

Conclusão

Infer-se que o ácido cafeico, composto bioativo da própolis verde, não se mostrou estatisticamente superior ao controle fluoxetina administrada agudamente para diminuição da manifestação de sintomas depressivos por *splash test*.

Referências

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Disponível em: <<http://www.institutopebioetica.com.br/documentos/manual-diagnostico-e-estatistico-de-transtornos-mentais-dsm-5.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2023.

CAPARICA, R.; BABY, A. R.; ALMEIDA, T.; COSTA, J. G. In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. **Biomedical And Biopharmaceutical Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.19277/bbr.17.1.225>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CHEN, I-C.; HILL, J. K.; OHLEMÜLLER, R.; ROY, D. B.; THOMAS, C. D. Rapid Range Shifts of Species Associated with High Levels of Climate Warming. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 1024-1026, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1206432>. Acesso em: 10 abr. 2024.

CHENG, S.; HSIA, C. Y.; LEONE, G.; LIOU, H-C. Cyclin E and Bcl-xL cooperatively induce cell cycle progression in c-Rel-/- B cells. **Oncogene**, v. 22, n. 52, p. 8472-8486, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206917>. Acesso em: 11 abr. 2024.

DINIZ, L. P.; MATIAS, I.; ARAUJO, A. P. B.; GARCIA, M. N.; BARROS-ARAGÃO, F. G. Q.; ALVES-LEON, S. V.; SOUZA, J. M.; FOGUEL, D.; FIGUEIREDO, C. P.; BRAGA, C. α -synuclein oligomers enhance astrocyte-induced synapse formation through TGF- β 1 signaling in a Parkinson's disease model. **Journal Of Neurochemistry**, v. 150, n. 2, p. 138-157, 2019. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14710>. Acesso em: 11 abr. 2024.

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.

HUANG, D.; ZHANG, L.; YANG, J-Q.; LUO, Y.; CUI, T.; DU, T-T.; JIANG, X-H. Evaluation on monoamine neurotransmitters changes in depression rats given with sertraline, meloxicam or/and caffeic acid. **Genes & Diseases**, v. 6, n. 2, p. 167-175, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.005>. Acesso em: 11 abr. 2024.

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.

JUNG, M.; PARK, M.; LEE, H.; KANG, Y-H.; KANG, E.; KIM, S. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1203-1218, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/092986706776360860>. Acesso em: 10 abr. 2024.

KOSTIĆ, M.; JANKOVIĆ, S.; DESNICA, J.; LUKIĆ, S.; MIJAILOVIĆ, S.; ANĐELKOVIĆ, M.; PIRKOVIĆ, M. S.; MILOVANOVIĆ, O.; SPASIĆ, M.; VOJINOVIĆ, T. Resource Use and Costs Related to Hematological Complications of Chemotherapy: cost of illness study based on data from balkan country with recent history of socioeconomic transition. **Iranian Journal Of Public Health**, v. 51, n. 11, p. 2573-2581, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18502/ijph.v51i11.11175>. Acesso em: 10 abr. 2024.

LEE, K.; BULL, R.; HO, R. M. H. Developmental Changes in Executive Functioning. **Child Development**, v. 84, n. 6, p. 1933-1953, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/cdev.12096>. Acesso em: 15 mar. 2023.

LI, W.; JIN, Y.; PRAZAK, L.; HAMMELL, M.; DUBNAU, J. Transposable Elements in TDP-43-Mediated Neurodegenerative Disorders. **Plos One**, v. 7, n. 9:44099, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044099>. Acesso em: 23 fev. 2024.

MURTAZA, G.; KARIM, S.; AKRAM, M. R.; KHAN, S. A.; AZHAR, S.; MUMTAZ, A.; ASAD, M. H. H. B.

Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/145342>. Acesso em: 10 abr. 2024.

SCHLAEPFER, T. E.; BEWERNICK, B. H.; KAYSER, S.; MÄDLER, 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.034>. Acesso em: 01 fev. 2023.

WU, W-M.; LU, L.; LONG, Y.; WANG, T.; LIU, L.; CHEN, Q.; WANG, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: a structure: activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107-115, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.049>. Acesso em: 11 abr. 2024.

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.