AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO ANSIOLÍTICO E O MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO NO TESTE CLARO/ESCURO EM *ZEBRAFISH*

Alana Garcia (PROVIC), Edmar Miyoshi (Orientador), e-mail: edmar@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Área de conhecimento: Farmacologia
Subárea de conhecimento: Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: Ansiedade, Ácido ferúlico, *Zebrafish*.

Resumo
Os distúrbios de ansiedade pertencem a um grupo de transtornos mentais onde os pacientes apresentam medo e ansiedade excessivos. A prevalência dessas doenças vem aumentando no decorrer dos anos. O estresse oxidativo é um processo fisiopatológico importante envolvido nesses transtornos. Assim, o ácido ferúlico, que tem como melhor atividade documentada a antioxidante, foi escolhido para ser testado quanto a sua atividade ansiolítica e seu possível mecanismo de ação em *zebrafish*. Foi realizado o teste de preferência claro/escuro após exposição dos animais ao ácido ferúlico e outros fármacos já consolidados no tratamento da ansiedade, a fim de comparar o comportamento dos animais e verificar a ação ansiolítica dessa substância. Já para sugerir o possível mecanismo de ação, foi realizado o pré-tratamento com flumazenil, seguido do tratamento com o ácido ferúlico e/ou controle positivo, com posterior realização do mesmo teste. Os resultados encontrados sugerem presença de atividade ansiolítica e possível mecanismo de ação ligado ao sistema gabaérgico.

Introdução

Os transtornos mentais comuns na atualidade como ansiedade e depressão são um crescente fardo humano e econômico. Sabendo disso, entende-se a importância de compreender melhor esses transtornos mentais e buscar novas terapias (LENZE; WETHERELL, 2011).

A necessidade de descoberta de novos fármacos para tratamentos de doenças que atingem o sistema nervoso central (SNC) é clara, visto que os tratamentos já existentes para os tratamentos de epilepsia e ansiedade, por exemplo, tem eficácia subótima (SHAMS et al., 2017).

Steemkamp et al. (2017) avaliaram a relação entre o estresse oxidativo e a gravidade da depressão e sintomas de ansiedade em indivíduos com transtorno depressivo maior (TDM). Para isso, eles avaliaram marcadores plasmáticos de estresse oxidativo em indivíduos com TDM, fisicamente saudáveis e sem uso de medicamentos. Eles concluíram que o estresse oxidativo está mais relacionado à ansiedade do que com os sintomas de depressão.

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio nas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), também chamados de radicais livres, que são resultado do metabolismo celular aeróbio normal e moléculas ou enzimas antioxidantes que modulam esses radicais. O sistema antioxidante desempenha seu papel de prevenção de danos que podem ser causados pelos radicais livres. No entanto, o mecanismo de defesa desequilibrado dos antioxidantes, a superprodução ou a incorporação de radicais livres no organismo

ISSN 1676-0093

levam à neurodegeneração. As células neurais sofrem perda funcional ou sensorial em doenças neurodegenerativas (UTTARA et al., 2009).

Uma substância com atividade antioxidante bem documentada é o ácido ferúlico (AF), um composto fenólico presente em muitos alimentos básicos. Por ter essa atividade, ele pode ser útil para tratar doenças ligadas ao estresse oxidativo e neurotoxicidade, nas quais espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) geradas no cérebro podem levar a oxidação de proteínas, DNA, RNA, peroxidação lipídica, disfunção e/ou morte neuronal (GOHIL; KSHIRSAGAR; SAHANE, 2012).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade ansiolítica do ácido ferúlico no teste claro/escuro com *zebrafish (Danio rerio)*.

Material e Métodos

A pesquisa utilizou-se de peixes *zebrafish* adultos, de 4 a 6 meses e proporção de 50% machos e 50% fêmeas. Os animais foram mantidos em aquários preenchidos com água sem cloro, filtração física e química, com temperatura de 26±2°C e pH entre 7,0 e 8,0 e iluminados por lâmpadas fluorescentes com um ciclo claro/escuro de 14/10h. Todos foram alimentados com uma ração comercial para peixes (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil).

Após esta semana de ambientação, realizou-se o experimento de avaliação do envolvimento do sistema gabaérgico no mecanismo de ação do ácido ferúlico (AF). Com o objetivo de caracterizar as respostas comportamentais do *zebrafish* a um antagonista de benzodiazepínico e relacionar com a ação do AF, o experimento foi composto por três fases:

A primeira fase se deu pela determinação da concentração efetiva de flumazenil no bloqueio do clonazepam 0,75 mg/L (controle positivo). Nela, os peixes foram divididos em 4 grupos (n=14 por grupo): (1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L), 2) clonazepam 0,75 mg/L, 3) flumazenil 1 mg/L + clonazepam 0,75 mg/L e 4) flumazenil 1,25 mg/L + clonazepam 0,75 mg/L.

A segunda fase foi a verificação da especificidade do efeito do flumazenil em bloquear os efeitos de fármacos que atuam no sítio de ligação de benzodiazepínico no receptor $GABA_A$. Os peixes foram divididos nos grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) fluoxetina 10 mg/L e 3) flumazenil 1,25 mg/L + fluoxetina 10 mg/L.

E a terceira fase foi a verificação da relação do sistema gabaérgico na ação do AF. Determinada a concentração efetiva de flumazenil, ele foi associado ao tratamento de AF. Os peixes foram divididos nos grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) AF 500 mg/L e 3) flumazenil 1,25 mg/L + AF 500 mg/L.

Sabendo que o *zebrafish* demonstra preferência por zonas escuras, após o tratamento realizado, os animais foram colocados no aquário para a realização do teste claro/escuro, o qual é utilizado para avaliar o efeito dos ansiolíticos em peixes. O teste claro/escuro é realizado dividindo um aquário em duas partes iguais, a primeira com as laterais, fundo e tampa pretos (lado escuro) e a outra metade com as laterais e fundo brancos e sem a presença de tampa, permitindo a entrada de luz (lado claro). O peixe é colocado do lado claro do aquário, com água até uma altura de 3 cm, e mantido lá por 5 minutos, após este tempo, é aberta uma comporta de comunicação entre os dois lados no fundo do aquário, permitindo que o mesmo passe para o lado escuro. Avaliando-se por meio de filmagem durante 5 minutos: 1) A latência para a primeira entrada no

ISSN 1676-0093

compartimento escuro; 2) O tempo gasto no compartimento claro; e 3) O número de cruzamentos entre os compartimentos. Geralmente as drogas ansiolíticas induzem o aumento no número de entradas na área iluminada, assim como, o tempo de permanência e exploração deste compartimento enquanto que as drogas ansiogênicas provocam o efeito contrário Geralmente as drogas ansiolíticas induzem o aumento no número de entradas na área iluminada, assim como, o tempo de permanência e exploração deste compartimento enquanto que as drogas ansiogênicas provocam o efeito contrário (CAMPOS, 2016; GEBAUER et al., 2011).

Os dados obtidos no teste de claro/escuro foram analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de comparação múltipla de Dunn's. Se apresentaram uma distribuição normal eles foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Em todas as análises, o nível de significância é de $p< 0,05$. O programa estatístico utilizado para realizar as análises é o GraphPad Prism 6.

Resultados e Discussão

Fase 1: determinação da concentração efetiva de flumazenil no bloqueio do clonazepam 0,75 mg/L (controle positivo).

Acerca do tempo de permanência no compartimento claro, o grupo que recebeu o tratamento com o clonazepam tem um maior tempo de permanência em relação ao grupo controle. Em comparação a esse grupo, pode-se ver que o grupo pré-tratado com flumazenil 1,25 mg/L reduziu muito o tempo na área clara, assemelhando-se ao controle. Já o grupo pré-tratado com flumazenil 1 mg/L, não teve redução significativa desse parâmetro. Sendo assim, a concentração de 1,25 mg/L foi mais eficaz para antagonizar os efeitos do BZD na concentração testada. Acerca da latência para a primeira entrada no compartimento escuro e o número de cruzamentos entre as áreas, não houve diferença entre os grupos nesses dois parâmetros.

Fase 2: verificação da especificidade do efeito do flumazenil em bloquear os efeitos de fármacos que atuam no sítio de ligação de benzodiazepínico no receptor $GABA_A$.

Para auxiliar na sugestão do mecanismo de ação, foi realizado o mesmo teste com pré-tratamento de flumazenil na mesma concentração e tratamento com fluoxetina 10 mg/L. Os resultados confirmam que este antagonista de BZD não exerce influência sobre a ação do ISRS, já que não há diferença significativa em nenhum dos 3 parâmetros analisados entre os grupos tratado apenas com fluoxetina e o que recebeu o pré-tratamento com flumazenil.

Fase 3: verificação da relação do sistema gabaérgico na ação do AF.

Sabendo que a concentração efetiva de flumazenil para antagonizar o efeito do controle positivo é de 1,25 mg/L, seguiu-se para o experimento para verificar se ele também seria capaz de reverter a ação do AF. Nessa fase, foi realizado o teste com controle negativo, AF 500 mg/L e o grupo com pré-tratamento de flumazenil 1,25 mg/L seguido de tratamento com AF 500 mg/L, a fim de comparar os efeitos do fármaco e da possível reversão com o antagonista de BDZ no receptor $GABA_A$.

Podemos ver que o pré-tratamento com flumazenil diminuiu significativamente o tempo gasto no lado claro, assim como a latência para a primeira entrada no lado escuro, mas não interferiu no número de cruzamentos. Isso indica que houve bloqueio da ação do AF, sem prejudicar a atividade locomotora dos animais. Essa reversão da ansiólise por pré-tratamento com flumazenil sugere um possível envolvimento do receptor $GABA_A$ nos efeitos ansiolíticos do AF e o experimento anterior, com a fluoxetina, reforça essa sugestão, já que mostra a especificidade do flumazenil.

Conclusão

Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que o AF apresenta atividade ansiolítica e sua ação aparentemente ocorre por meio de interação com o receptor GABAA em zebrafish, utilizando o teste de preferência claro/escuro.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao professor Edmar pela oportunidade de estar realizando esta pesquisa e fazer parte do seu projeto de Iniciação Científica. À Fundação Araucária, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

Referências

CAMPOS, E. G. **"Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada"**. 2016, 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–6, set. 2011.

GOHIL, K. J.; KSHIRSAGAR, S. B.; SAHANE, R. S. Ferulic acid – a comprehensive pharmacology of an important bioflavonoid. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 1, p. 700–710, 2012.

KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1925–1944, 2017.

LENZE, E. J.; WETHERELL, J. L. A Lifespan view of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 381–399, 2011.

SHAMS, S. et al. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2017.

STEENKAMP, L. R. et al. Severity of anxiety- but not depression- is associated with oxidative stress in Major Depressive Disorder. **Journal of affective disorders**, v. 219, p. 193–200, 1 set. 2017.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.