EFEITO DA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE OS EFEITOS ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO ÁCIDO FERÚLICO.

Larissa de Fátima Oliveira (PIBIC/CNPq/UEPG), Marcelo Machado Ferro (Orientador), e-mail: mferro@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral/SEBISA.

2.10.03.00-9 - Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: Depressão, Ansiedade, Ácido Ferúlico, Óxido Nítrico.

Resumo

A Depressão e a Ansiedade são doenças que afetam diretamente a qualidade de vida dos pacientes e nem sempre os tratamentos conseguem ser eficazes. Por esse motivo tem aumentado a busca por novas opções de tratamento. Uma das alternativas é o ácido ferúlico, composto que já possui atividade anti-inflamatória e antioxidante bem estabelecida, o que pode estar relacionado com o seu potencial no tratamento de doenças do sistema nervoso central. A partir de alguns estudos foi demonstrada atividade antidepressiva em ratos e camundongos, indicando o efeito serotoninérgico. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar se o efeito antidepressivo e ansiolítico do ácido ferúlico, em ratos, depende da modulação da síntese de óxido nítrico. Foram utilizados 44 ratos Wistar machos pesando de 250-300g. Os grupos de estudo foram Salina-Salina, Salina-L-Arginina, Ácido Ferúlico-Salina e Ácido Ferúlico-L-Arginina. Foram utilizados os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado para avaliar o comportamento ansiolítico e o teste de natação forçada para avaliar o comportamento depressivo. Ao analisar os resultados não tivemos resultados conclusivos porque o AF não apresentou efeito antidepressivo ou ansiolítico.

Introdução

A depressão e a ansiedade são doenças que acometem uma grande parcela da população atualmente. Ambas envolvem um desequilíbrio nos neurotransmissores e/ou atividade anormal dos receptores, principalmente das vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e gabaérgicas (ZENI et al, 2012). Apesar da disponibilidade de diferentes estratégias terapêuticas para o tratamento, muitos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento (MENEZES et al., 2007). Assim, é cada vez mais crescente a busca por novas alternativas levando em conta tanto a eficácia quanto seus efeitos colaterais.

O ácido ferúlico (AF) está presente em folhas e sementes de diversas plantas e constitui um ingrediente bioativo de muitas espécies. Possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e estudos indicaram atividade antidepressiva em camundongos e ratos (ZENI et al, 2012). Ele atua como antagonista do receptor NMDA, que quando ativado resulta na produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que se utiliza da L-arginina. Portanto, ao inibir esta via, ocorre supressão da síntese do NO. (ZENI et al, 2012).

O NO é um neurotransmissor e neuromodulador que, após sua produção, apresenta diversos alvos intreacelulares. Um deles ocasiona aumento dos níveis de GMPc que

modula a atividade de quinases e de canais iônicos. Evidências em estudos pré-clínicos apontam para o envolvimento da redução nos níveis de GMPc e da inibição dos canais de K^+ no efeito tipo antidepressivo de diversos compostos (BETTIO, 2012). Ainda, vários grupos têm demonstrado a participação do NO no mecanismo de ação de drogas serotoninérgicas. Segundo Zhang et al. (2011), o receptor serotoninérgico 5HT1-A inibe a NOS, e essa inibição é essencial para o efeito ansiolítico. Desta forma, conclui-se que o óxido nítrico, formado em algumas regiões cerebrais, pode ser ansiogênico, além de ter papel chave na fisiopatologia da depressão.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 44 ratos Wistar machos, pesando de 250-300g provenientes do biotério da UEPG. Os animais foram separados em grupos de 5 animais por caixa. Os grupos de estudo foram: Salina-salina, Salina – L-Arg, Ácido Ferúlico – salina e Ácido Ferúlico – L-Arginina.
O ácido ferúlico foi administrado via oral através da técnica de gavagem, diretamente no estômago do animal por meio de uma cânula. A administração do ácido ferúlico foi realizada sempre 15 minutos antes do início dos testes. O grupo controle recebeu solução salina também por gavagem.
A droga utilizada para investigação do mecanismo de ação, ou seja, a L-Arginina, foi administrada na concentração de 750mg/kg através de injeção intraperitoneal.
Para a análise comportamental, os animais foram submetidos primeiramente aos testes de Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto, e quinze dias depois ao teste de Natação Forçada.
No teste do campo aberto (CA), as medidas de ambulação e número de levantadas para exploração foram utilizados para avaliar a capacidade motora dos animais. O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) permitiu avaliar o comportamento tipo ansioso dos animais pelo tempo gasto em braços fechados com paredes em relação ao tempo gasto em exploração de braços abertos. O teste de natação forçada (TNF) foi utilizado para avaliar a atividade tipo depressivo do ácido ferúlico, medindo-se o tempo gasto em natação ou escalada nas paredes de cilindros com água em relação ao tempo gasto apenas flutuando, sem tentativa de escapada.
Após o último teste comportamental, os animais foram guilhotinados, seus cérebros foram removidos e seus hipocampos dissecados e congelados imediatamente em freezer -80°C, para análises bioquímicas posteriores.
Os resultados dos testes do mecanismo de ação foram avaliados por ANOVA de duas vias, considerando o AF e o fármaco inibidor como variável independente. As diferenças significantes ($p \leq 0,05$) foram analisadas pelo teste pos-hoc de Newman Keuls, utilizando software GraphPad Prism 5.01.

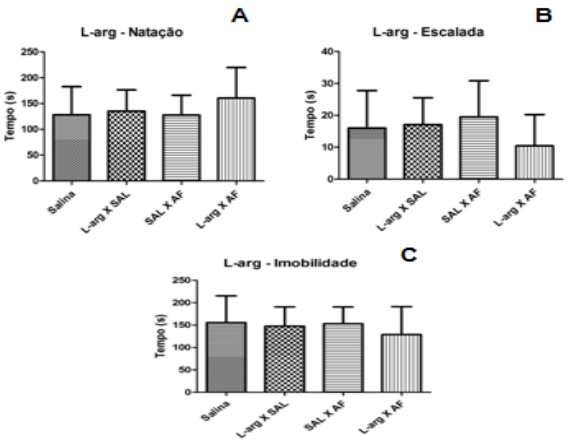
Resultados e Discussão

Ao investigar a atividade antidepressiva do ácido ferúlico esperava-se que a administração via IP de L-arginina revertesse o seu efeito, pelo consequente aumento da concentração de óxido nítrico. Como pode ser analisado no gráfico 1, não foi possível confirmar a reversão da atividade do AF pela da L-arginina, já que não houve diferença estatística entre os grupos analisados em nenhum dos três parâmetros do TNF.

Na investigação dos parâmetros do teste do CA, não puderam ser observadas diferenças no comportamento dos ratos nem no parâmetro da Ambulação, através do número de linhas cruzadas pelas patas traseiras, nem na Exploração Vertical, por meio do número de rearing (apoio nas patas traseiras), como observado nos gráficos 2.

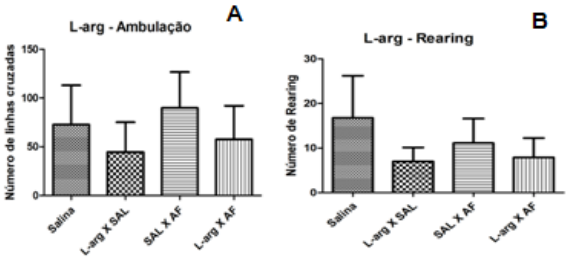
Nos parâmetros comportamentais investigados no LCE, a L-arginina não conseguiu reverter o efeito do AF, tanto nos tempos de permanência nos braços do labirinto quanto na frequência de entradas e passagens durante o período do teste. Nesta avaliação também não foi possível reproduzir os efeitos do AF encontrados na primeira fase experimental do projeto, durante a determinação da curva dose-resposta. Portanto, não foi possível estabelecer uma correlação no antagonismo esperado da L-arginina.

GRÁFICO1– Avaliação da Atividade da L-Arginina X Ácido Ferúlico no TNF



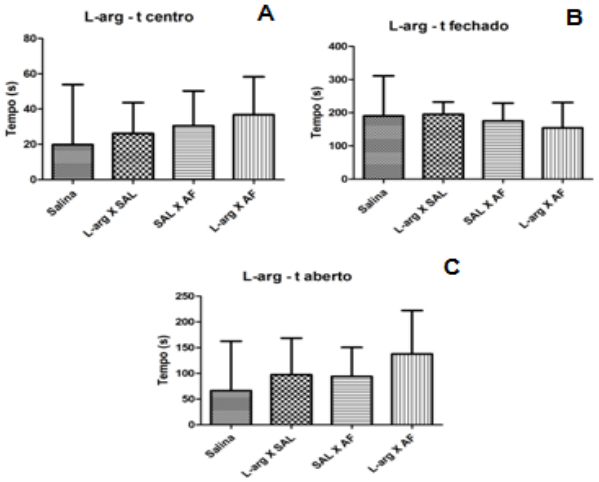
Legenda: Gráficos dos respectivos tempos de: A) Natação; B) Escalada; C) Imobilidade no teste de natação forçada. O eixo horizontal apresenta os grupos controle (Salina), sendo que a nomenclatura dos grupos seguintes representa a administração via IP e via oral respectivamente. O eixo vertical apresenta os tempos de cada parâmetro dentro do tempo de 300 segundos. As barras indicam o desvio padrão em relação às médias. Não foram apontadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.
Fonte: Camila Baptista.

GRÁFICO 2 – Avaliação da Atividade da L-Arginina X Ácido Ferúlico no CA



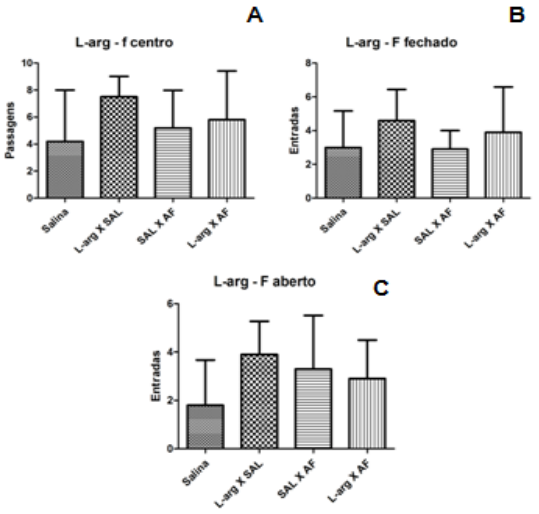
Legenda: Gráficos dos respectivos tempos de: A) Ambulação e B) Exploração Vertical, no teste do campo aberto. O eixo horizontal apresenta os grupos controle (Salina), sendo que a nomenclatura dos grupos seguintes representa a administração via IP e via oral respectivamente. O eixo vertical no gráfico A representa o número de linhas cruzadas pelo animal, enquanto que no gráfico B, representa o número de explorações verticais, dentro do tempo de 300 segundos do teste. As barras indicam o desvio padrão em relação às médias. Não foram apontadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

GRÁFICO 3 – Avaliação da Atividade do L-Arginina X Ácido Ferúlico nos tempos de permanência no LCE



Legenda: Gráficos dos respectivos tempos de permanência nos A) Centro, B) Braço Fechado e C) Braço Aberto no teste do LCE. O eixo horizontal apresenta os grupos controle (Salina), sendo que a nomenclatura dos grupos seguintes representa a administração via IP e via oral respectivamente. O eixo vertical apresenta os tempos de cada parâmetro dentro do tempo de 300 segundos. As barras indicam o desvio padrão em relação às médias. Não foram apontadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.
Fonte: Camila Baptista.

GRÁFICO 4 – Avaliação da Atividade da L-Arginina X Ácido Ferúlico no Número de Entradas/Passagens no LCE



Legenda: Gráficos dos respectivos números de passagem pelo A) Centro,e os números de entradas no B) Braço Fechado e C) Braço Aberto no teste do LCE. O eixo horizontal apresenta os grupos controle (Salina), sendo que a nomenclatura dos grupos seguintes representa a administração via IP e via oral respectivamente. O eixo vertical apresenta os tempos de cada parâmetro dentro do tempo de 300 segundos. As barras indicam o desvio padrão em relação às médias. Não foram apontadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.
Fonte: Camila Baptista

Conclusões

Não foi possível concluir se os efeitos antidepressivo e ansiolítico do AF podem ser revertidos pela L-arginina, pois não foi possível reproduzir os resultados da atividade antidepressiva do AF conseguidos na construção da curva dose-resposta. Os resultados obtidos podem ser consequência dos interferentes à que os testes comportamentais com animais estão sujeitos. Durante a execução do projeto ocorreram alguns contratempos, como sons ambientes agressivos aos animais, animais irritados por irregularidade na dieta ou na limpeza das caixas e possível erro na manipulação dos animais no momento dos testes e no momento da administração das drogas por diferentes vias.
Portanto será necessário repetir estas análises e finalizar a análise da quantificação indireta do NO no hipocampo de animais em que foi administrado L-arginina.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus. Agradeço a UEPG e ao meu orientador professor Marcelo por me darem a oportunidade de estar realizando pesquisa na área do meu interesse e também o CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências

BETTIO, L. E. B. **Envolvimento dos receptores NMDA e da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc no efeito tipo- antidepressivo da Guanosina.** Tese de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/96253/302703.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13/12/2015.

MENEZES, G.B.; FONTENELLE, L.F.; MULULO, S.; VERSIANE, M. **Resistência ao tratamento nos transtornos de ansiedade: fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico**. Rev. Bras. Psiquiatria, vol 29, pág. 55-60, 2007.

ZENI, A.L.B. et al. **Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system.** European Journal of Pharmacology, vol. 679, pág. 68 - 74, 2012.

ZHANG, Y. et al. **Neuroprotective effects of sodium ferulate and its antidepressant-like effect measured by acute and chronic experimental methods in animal models of depression.** ournal of Behavioral and Brain Science, vol. 1, nº2, 2011.