

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DO NIM EM ZEBRAFISH ADULTO: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS ASICS

(Antinociceptive effect of the ethanolic extract of nim fruits in adult Zebrafish: possible participation of asics channels)

Izamar de Araújo ABRANTE* ; Brenda Silva do PRADO; Izabel de Araújo ABRANTE; Francisco Lucas Alves BATISTA; Djane Ventura de AZEVEDO; Francisco Ernani Alves MAGALHÃES

Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), CECITEC, Tauá, Ceará. *E-mail: izamar.abrante@aluno.uece.br

RESUMO

Os ASICs (Canais Iônicos Sensíveis a Ácido) são ativados por prótons. São expressos nos gânglios da raiz dorsal e amplamente distribuído por todo o cérebro. Estudos revelam que os ASICs estão presentes em neurônios sensoriais, onde tem papel na nocicepção, paladar e possivelmente outras modalidades. Assim o trabalho objetiva investigar o efeito do extrato etanólico dos frutos do Nim (EEtFrNim) sob a nocicepção em zebrafish adulto induzida por salina ácida (agonista ASICs). Como resultado, EEtFrNim (5,0 mg/mL) reverteu significativamente (A = 71,5%; $p < 0,01$ vs. Controle) a nocicepção em ZFa induzida por salina ácida pois, foi significativamente semelhante ao efeito da morfina (A = 82,7%; $p < 0,001$ vs. Controle). Portanto serão realizados novos estudos para investigar possível mecanismo de ação.

Palavras-chave: Zebrafish adulto, nocicepção, ASICs.

INTRODUÇÃO

A dor nociceptiva ocorre pela ativação de nociceptores sensíveis a estímulos nocivos, localizados na pele, músculos e vísceras, que após esta ativação várias substâncias podem ser liberadas no tecido lesionado, na qual são chamadas de mediadores nociceptivo ou inflamatórios (DAL BÓ, 2012). Com isso Baggio (2010) vem a descreve-la como o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores.

Os ASICs (Canais Iônicos Sensíveis a Ácido) são ativados por prótons e expressos nos gânglios da raiz dorsal e amplamente distribuídos por todo o cérebro (SILVEIRA, 2014), e esses canais com proteção de prótons ou sensíveis a ácidos estão presentes em neurônios sensoriais, onde tem papel na nocicepção, paladar e possivelmente outras modalidades, conforme Pidoplichko e Dani (2006). A salina ácida é um agonista dos canais ASICs, que é considera um modelo de hiperalgesia único na medida em que não provoca danos musculares e a hipersensibilidade generalizada, conforme citou Sharma (2009).

*Endereço para correspondência:
izamar.abrante@aluno.uece.br

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais (VIEGAS JR *et al.*, 2006). As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Estudos apontam extratos de plantas medicinais ricas em compostos antinociceptivos antagonistas de canais ASICs (MAGALHÃES *et al.*, 2018a).

Recentemente, do Nascimento *et al.* (2018) utilizou o zebrafish como modelo animal para investigar ação dos canais AISCs induzida por salina ácida.

Azadirachta indica A. Juss. (Meliaceae) é uma das plantas medicinais mais versáteis, que cresce na Índia, Nepal, Paquistão, Bangladesh, Sri Lanka, Maldivas e Vietnã (NGUYEN *et al.*, 2018). Muitos estudos têm sido realizados procurando justificar o uso popular de plantas medicinais em doenças e processos inflamatórios e/ou infecciosos. (MALVAR *et al.*, 2004).

Baseando-se no exposto esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito do EEtFrNim sob a nocicepção em zebrafish adulto induzida pela salina ácida (agonista ASICs).

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico: Foi utilizado o extrato etanólico dos frutos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim), EEtFrNim, coletada em Tauá-Ce (BATISTA, 2017), armazenados no nosso laboratório (LBPNB-UECE-CECITEC).

Zebrafish: Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de 3,5±0,5 cm e peso 0,4±0,1 g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (30x15x20cm), contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração ad libitum 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

Protocolo Geral: Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017; 2018b) e Ekambaram *et al.* (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controles, via intraperitoneal (i.p.). Em seguida foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via intraperitoneal (i.p.) ou tópico foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G.

*Endereço para correspondência:
izamar.abrante@aluno.uece.br

Atividade antinociceptiva comportamental: Para as análises comportamentais, seguiu-se mesmas metodologias descritas por Magalhães *et al.* (2017; 2018). Nenhum vídeo foi utilizado para analisar os comportamentos antinociceptivos. Os ensaios foram analisados às cegas, conforme modelos de roedores (BAGGIO *et al.*, 2012) e aplicado em zebrafish adulto por do Nascimento *et al.* (2018).

Os animais (n=8/grupo) foram tratados com EEtFrNim (1,0 ou 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20 µL; i.p.) ou veículo (Controle, DMSO 3%; 20 µL; i.p.) ou morfina (10,0 mg/mL; i.p.) utilizada como controle positivo. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, a nocicepção foi induzida com salina ácida (agonista ASICs; ácido acético 0,1% dissolvido em salina; 5,0 µL i.m), aplicada na calda dos animais. Após tratamentos com agente nociceptivo, os animais foram colocados em uma placa de Petri de vidro (10x15cm), divididos em quadrantes, e a resposta antinociceptiva foi caracterizada pelo aumento da atividade locomotora ou cruzamentos de linhas (CL), analisadas durante 20 min. A porcentagem de analgesia (A%) foi calculada individualmente.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como valores da média ± erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 6.01. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos trabalhos anteriores, empregamos o zebrafish adulto como modelo substitutivo ao uso de roedores em testes de nocicepção (MAGALHÃES *et al.*, 2018; do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Assim, empregamos o mesmo modelo para avaliar o efeito do extrato etanólico dos frutos do Nim (EEtFrNim) sob a nocicepção em zebrafish adulto induzida pela salina ácida (ácido acético 0,1% diluído em salina 0,9%, pH 3.8). Como resultado, EEtFrNim (5,0 mg/mL) reverteu significativamente ($p < 0,01$ vs. Controle) a nocicepção em ZFa induzida por salina ácida, pois apresentou analgesia de 71,5%. Tal efeito antinociceptivo foi significativamente semelhante ao efeito da morfina (A = 82,7%; $p < 0,001$ vs. Controle), Fig. 1.

*Endereço para correspondência:
izamar.abrante@aluno.uece.br

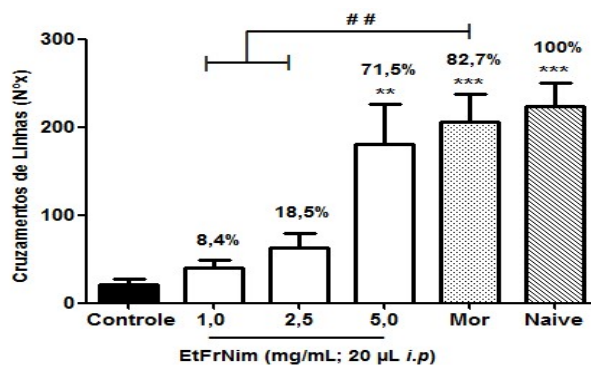


Figura 1: Efeito do EEtFrNim sob a nocicepção em zebrafish adulto induzida pela salina ácida (0,1%), analisados individualmente (0-20 min).

Obs.: Os números nas colunas indicam porcentagem de antinocicepção (analgesia). Os valores representam média \pm erro padrão da média (E.P.M) para grupos de 6 animais. ANOVA seguida pelo teste de Tukey (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle).

Segundo Magalhães *et al.* (2017) em seus experimentos foi validado o uso do Zebrafish adulto como um modelo de nocicepção induzida por ácido acético, e a morfina foi utilizada como inibidora da nocicepção, assim como em nossos testes ela foi utilizada como antagonista. Em nossos experimentos com o EEtFrNim (5,0 mg/mL), observou-se que o comportamento do animal quando submetido ao agonista salina ácida (ácido acético 0,1%) teve efeito significativamente semelhante ao efeito da morfina (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle) inibindo a nocicepção.

Baseando-se em do Nascimento *et al.* (2018) estímulos nocivos em Zebrafish é caracterizada pela redução locomotora do animal. Assim pôde-se observar que os resultados obtidos do EEtFrNim (1,0 ou 2,5 mg/mL) teve alteração locomotora ao comparados com o antagonista morfina (^{##} $p < 0,01$ vs Mor).

CONCLUSÕES

Nossos resultados apontam que o extrato etanólico dos frutos do Nim (EEtFrNim) pode atuar como antagonista dos canais ASICs, que são canais iônicos sensíveis a ácido. Porém novos estudos serão realizados para investigar possível mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

BATISTA, F.L.A. Bioprospecção de atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos frutos do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae) em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. 61p. Monografia: Especialização em Ensino das Ciências da Natureza e Matemática. Tauá, Ceará, Brasil, 2017.

BAGGIO, C.H. Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e antiinflamatória da (1-3) (1_6) B-glucana isolada do *Pleurotus Pulmonarius* (Fr.) Quel. 120p. Tese: Doutorado em Farmacologia. Curitiba. Paraná. Brasil, 2010.

*Endereço para correspondência:
izamar.abrante@aluno.uece.br

BAGGIO, C.H. et al. Antinociception of beta-D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, p.872-877, 2012.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

DAL BÓ, W. Efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de dor muscular orofacial em camundongos: participação dos receptores glutamatérgicos, TRPs e ASICs. 137p. Tese: Doutorado em Neurociências. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2012.

do NASCIMENTO, J.E.T. et al. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.107, p.1030-1036, 2018.

EKAMBARAM, S.P. et al. Efeito antiinflamatório da DC de *Naravelia zeylanica* pela supressão de mediadores inflamatórios no edema abdominal induzido por carragenina em modelo de peixezebra. *Inflammopharmacology*, v.25, n.1, p.147-158, 2017.

MAGALHÃES, F.E.A. et al. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.97, p.1575-1585, 2018a

MAGALHÃES, F.E.A. et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of corneal antinociceptive compounds. *Zebrafish*. DOI: 10.1089/zeb.2018.1633, 2018b.

MAGALHÃES, F.E.A. et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*, v.14, n.5, p.422-429, 2017.

MALVAR, D.C. et al. A influência do pré-tratamento com o sumo do *Sedum dendroideum* (Bálsamo) sobre a nocicepção de camundongos (*Mus musculus*). *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida*, v.24, n.2, p.135-140, 2004.

NGUYEN, N.Y.T. et al. Nimbandiolactone-21 and nimbandioloxifyfuran, two new 28-norlimonoids from the leaves of *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Journal of Asian Natural Products Research* 1-6, 2018. DOI: 10.1080/10286020.2018.1476498

SHARMA, N.K. et al. Hiperálgia mecânica primária e secundária induzida por salina ácida em ratos. *The Journal of Pain*, v.10, n.12, p.1231-1241, 2009.

SILVEIRA, N. A. Agonistas-adrenérgicos modulam canais iônicos nociceptivos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal. 56p. Tese: Mestrado em Fisiologia e Farmacologia.. Minas Gerais. Belo Horizonte. Brasil, 2014.

PIDOPLICHKO, V.I.; DANI, J.A. Os canais iônicos sensíveis ao ácido nos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são sensíveis ao amônio, o que pode contribuir para o dano da hiperamonemia. *Proceeding of the National Academy of Sciences, EUA* A 103:11376-80, 2006.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

*Endereço para correspondência:

izamar.abrante@aluno.uece.br