

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

EFEITO ANTINOCICEPTIVO CORNEAL DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS DE *AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS. (NIM, MELIACEAE) EM ZEBRAFISH ADULTO

Francisco Lucas Alves Batista^{1,2}, Letícia Kelly Jurema Barbosa²,
Francisca Leidivânia Alves Batista², Francisco Ernani Alves Magalhães²

1. Mestrando em Bioprospecção Molecular (FUNCAP/URCA), Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. flucasbatista@outlook.com;

2. Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará. fernanimagalhaes@yahoo.com.br;

Resumo: Em nossos estudos iniciais, propusemos o uso do zebrafish adulto (ZFa) como modelo animal substitutivo em testes de nocicepção da córnea, pois a mesma assemelha-se com a dos humanos. Ao longo da história o homem tem usado diversas formas de terapia para o alívio da dor, dentre eles, as plantas medicinais, assim como *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). Nesse trabalho foi investigado o efeito antinociceptivo do extrato etanólico dos frutos do Neem (EtFrNeem) frente ao ZFa. Como resultado, EtFrNeem (40 ou 100 ou 200 mg/kg) inibiu a nocicepção corneal em ZFa induzida por salina hipertônica (NaCl 5M). Portanto, o EtFrNeem pode apresentar relevância para o tratamento da dor corneal. Novos estudos serão realizados para investigar possíveis mecanismos de ação.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*. Nocicepção corneal. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

1. Introdução

A córnea é considerada um tecido mais espessamento inervado do corpo e são ativados por estímulos térmicos, químicos e nocivos (LEITE et al., 2014). Dor na córnea, frequentemente conhecida como “olho seco”, pode ser uma condição de dor neuropática com anormalidades do plexo nervoso (BORSOOK e ROSENTHAL, 2011). A dor neuropática da córnea resulta de nervos disfuncionais, causando percepções como ardência e dor ocular (GOYAL e HAMRAH, 2016).

Recentemente, empregamos o zebrafish adulto (ZFa) como modelo substitutivo ao uso de roedores em estudos de doenças oculares, pois a córnea dos mesmos se assemelha com a córnea humana (MAGALHÃES et al., 2018a).

A dor orofacial é de difícil controle com os medicamentos disponíveis, com isso a atenção se volta para a utilização de produtos naturais com o intuito de investigar os possíveis efeitos antinociceptivos, quando submetidos a um agente

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

nocivo (salina hipertônica) na superfície da córnea de roedores (**DAMASCENO et al., 2016; LEITE et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2018b**).

Azadirachta indica A. Juss. é uma árvore tropical perene, nativa do subcontinente indiano e também encontrada no Brasil (**BRASIL, 2013**). É utilizada na medicina popular devido às suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas e antígenotóxicas (**PATEL et al., 2016**). Os frutos do Neem são popularmente usados no tratamento de infecções, diarreia, febre, bronquite, doenças de pele, queimaduras infectadas e hipertensão (**SCHMUTTERER, 1995**), além de ser ricos em compostos químicos antioxidantes com ação analgésica e anti-inflamatória (**BATISTA et al., 2018**).

2. Objetivo

O trabalho teve como objetivo investigar o efeito antinociceptivo corneal do extrato etanólico dos frutos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem, Meliaceae) em zebrafish adulto.

3. Metodologia

3.1. Material botânico

Foi utilizado o extrato etanólico dos frutos de *Azadirachta Indica* A. Juss. (Neem), EtFrNeem, coletada em Tauá-Ce (**DA SILVA, 2014**), armazenados no nosso laboratório (LBPNB-UECE-CECITEC).

3.2. Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos, com idade entre 60-90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso $0,4 \pm 0,1$ 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 (30 x 15 x 20 cm), 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.

3.3. Protocolo geral

Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por **Magalhães et al. (2017; 2018a)** 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.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

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.

3.4. Atividade antinociceptiva comportamental

Para as análises comportamentais, seguiu-se mesmas metodologias descritas por **Magalhães et al. (2018a)**. Os animais (n=6/grupo) foram tratados com EtFrNeem (40 ou 100 ou 200 mg/kg; *i.p.*) ou veículo (Controle, DMSO 3%; 20 µL; *i.p.*) ou morfina (200 mg/kg; *i.p.*), utilizada como controle positivo. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, a nocicepção corneal foi induzida com solução de NaCl (agonista TRPV1; 5,0 M; 5,0 µL) aplicada na superfície da córnea direto ou esquerda do ZFa. Após tratamentos com agente nociceptivo, os animais foram colocados em uma placa de Petri de vidro (10 x 15 cm), divididos em quadrantes, e a resposta antinociceptiva foi caracterizada pelo aumento da atividade locomotora ou cruzamentos de linhas (CL), analisadas durante 5 min. A porcentagem de analgesia (A%) foi calculada individualmente, conforme:

$$HA\% = \{ [CL(\text{naive}) - CL(\text{tratamento})] / CL(\text{naive}) \} \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

$$A\% = HA\%(\text{controle}) - HA\%(\text{tratamento}) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde HA é a hiperalgesia e CL é a média dos cruzamentos de linhas.

3.5. 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% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Em nossos trabalhos iniciais, o extrato etanólico dos frutos do Neem (EtFrNeem) não se mostrou tóxico, não alterou locomoção e inibiu o efeito antinociceptivo em zebrafish adulto induzido pela formalina, glutamato e solução salina ácida (**BATISTA et al., 2018**). Com o intuito de dar continuidade aos nossos estudos com esse extrato, empregamos o zebrafish adulto como modelo animal para avaliar o efeito do EtFrNeem sob a nocicepção corneal em zebrafish adulto induzida pela salina hipertônica (NaCl 5 M). Como resultado, EtFrNeem (40 ou 100 ou 200 mg/kg; *i.p.*) reverteu significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$ vs. Controle) a nocicepção corneal em ZFa induzida por salina hipertônica, pois apresentou analgesia variando de 63,30% a 87,76%.

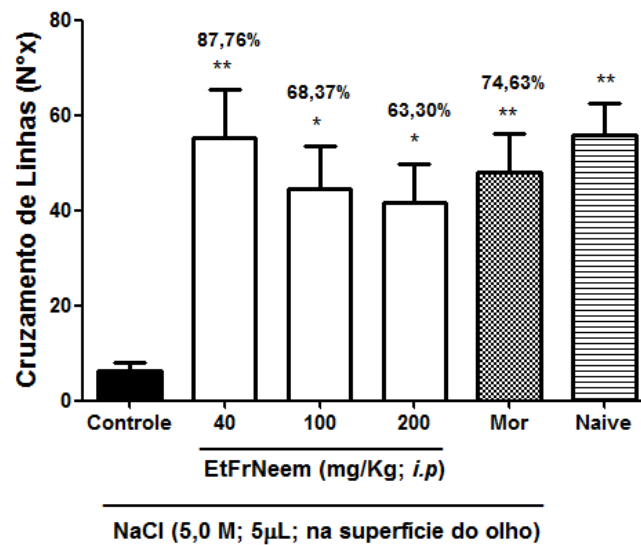


Figura 1: Efeito do EtFrNeem sob a nocicepção corneal em zebrafish adulto induzida pela salina hipertônica (NaCl; 5,0 M; 5,0 µL), analisados individualmente (0-5 min). Controle – DMSO 3% (20 µL; *i.p.*). Mor – Morfina (200 mg/kg; *i.p.*). Naive – animais não tratados. Os números nas colunas indicam porcentagem de antinocicepção (analgesia). Os valores representam média ± erro padrão da média (E.P.M) para grupos de 6 animais. ANOVA seguida pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. controle).

A nocicepção corneal foi induzida com salina hipertônica (NaCl; 5 M) aplicada na superfície da córnea do ZFa, o qual ativa os canais iônicos moduladores de nocicepção da córnea, como os receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), entre outros. A morfina, um agonista do sistema opioide, é usada como um agente analgésico padrão para inibir essa nocicepção (**MAGALHÃES et al., 2018a**). EtFrNeem (40 ou 100 ou 200 mg/kg) apresentou efeito antinociceptivo corneal significativamente semelhante ao efeito da morfina ($A = 74,63\%$; $p < 0,01$ vs. Controle), Figura 1.

O presente estudo apontou mais uma ação farmacológica do EtFrNeem como um inibidor da nocicepção corneal, sugerindo, assim, o Neem com potencial fitofármaco para o tratamento da dor orofacial.

5. Conclusão

Nossos resultados apontam que o extrato etanólico dos frutos do Neem (EtFrNeem) pode apresentar relevância clínica para o tratamento da dor corneal. Porém novos estudos serão realizados para investigar possível mecanismo de ação.

6. Agradecimentos

A todos os colaboradores do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR, Em especial a Profa. Dra. Adriana Rolim Campos e Sacha Aubrey A. R. Santos. Ao grupo de pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN) da UECE-CECITEC-Tauá-CE. A UECE, UNIFOR, CNPq e FUNCAP pelo apoio e suporte financeiro.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

7. Referências

- BATISTA, F.L.A.; LIMA, L.M.G.; ABRANTE, I.A.; DE ARAÚJO, J.I.F.; BATISTA, F.L.A.; ABRANTE, I.A.; MAGALHÃES, E.A.; DE LIMA, D.R.; LIMA, M.D.C.L.; DO PRADO, B.S.; MOURA, L.F.W.G.; GUEDES, M.I.F.; FERREIRA, M.K.A.; DE MENEZES, J.E.S.A.; SANTOS, A.S.A.R.; MENDES, F.R.S.; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CAMPOS, A.R.; MAGALHÃES, F.E.A. Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 17:108, 408-416, 2018.
- BORSOOK, D.; ROSENTHAL, P. Dor corneana e blefarospasmo crônico (neuropáticos): cinco relatos de caso. **Pain**, v. 152, p. 2427-2431, 2011.
- BRASIL, R. B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM). **Enciclopédia Biosfera**, 9(17), 3213-3252, 2013.
- da SILVA, D. V. (2014). **Prospecção de metabólitos especiais e atividade larvicida de extratos etanólicos de Azadirachta Indica A. Juss. (Nim), coletada em Tauá-Ce frente a larvas de mosquitos Aedes aegypti**. 56p. Monografia: Licenciatura em Química. Tauá, Ceará, Brasil.
- DAMASCENO, M. B. M. V. et al. Frutalina reduz comportamentos nociceptivos agudos e neuropáticos em modelos de roedores de dor orofacial. **Interações químico-biológicas**, v. 256, p. 9-15, 2016.
- 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, p. 147-158, 2017.
- GOYAL, S.; HAMRAH, P. Understanding neuropathic corneal pain—gaps and current therapeutic approaches. **Seminars in Ophthalmology**, v. 31, p. 59-70, 2016.
- LEITE, L. H. I. et al. Topical antinociceptive effect of *Vanillosmopsis arborea* Baker on acute corneal pain in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- 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.
- 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, 2018a.
- MAGALHÃES, F.E.A. et al. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 97, p. 1575–1585, 2018b.
- PATEL, S.M.; VENKATA, K C. N.; BHATTACHARYYA, P.; SETHI, G. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases, Semin. **Cancer Biol.**, 40(41), 100-115, 2016.
- SCHMUTTERER, H. The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other Meliaceous Plants: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes, VCH, Germany, New York, 1995 696 pages.