

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

## EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO FIXO DAS SEMENTES DE *O. FIELDINGIANA* EM ZEBRAFISH ADULTO: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS TRPV1

**José Ismael Feitosa de Araújo (PG)<sup>1,2</sup>; Antonia Tamyres Gomes de Sousa<sup>2</sup> (IC); Djane Ventura de Azevedo<sup>2</sup> (PQ); Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>2\*</sup> (PQ)**

1. *Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Ceará (UECE), CECITEC, Tauá-CE; \*[joseismael.feitosa@gmail.com](mailto:joseismael.feitosa@gmail.com)*
2. *Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará (UECE), CECITEC, Tauá-CE; \*[fernanimagalhaes@yahoo.com.br](mailto:fernanimagalhaes@yahoo.com.br);*

### Resumo:

Em nossos trabalhos anteriores detectamos o potencial antinociceptivo orofacial do Kaempferol-3-O-rutinosídeo, isolado do extrato etanólico das sementes de *Ouratea fieldingiana*, em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Com o intuito de darmos continuidade aos nossos estudos com a mesma planta, nesse trabalho investigamos o efeito do óleo fixo de sementes de batiputá (*O. fieldingiana*; # 55224; UFC), OFSBat, sobre a nocicepção orofacial em zebrafish adulto (ZFa) induzida pela capsaicina. ZFa (60-90 dias; 0,4 ± 0,1 g; n = 6/grupo), machos e fêmeas, foram anestesiados com água gelada (12-15 °C), acondicionados em esponja húmida e tratados por via oral, com pipeta automática, com 20 µL de OFSBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/kg) ou veículo (Controle; DMSO 3%; 20 µL) ou morfina (200 mg/kg). Após os tratamentos, os ZFa foram, individualmente, acondicionadas em becker (250 mL) contendo 150 mL de água retirada do aquário. Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. Após 1 h dos tratamentos, 5,0 µL de solução capsaicina (agonista TRPV1; 40,99 µM) foram aplicados na calda do ZFa. Aproximadamente por 10 segundos, cada animal foi adicionado em placa de Petri de vidro (dividida em quadrantes) e a resposta antinociceptiva foi caracterizada pelo aumento do número de cruzamentos realizados durante 10-20 min. O estudo foi aprovado pelo CEUA-UECE (nº 7210149/2016). OFSBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/kg) inibiu significativamente (p<0,0001; p<0,01; p<0,01 vs. Controle) a nocicepção em ZFa induzida por capsaicina. Tal efeito foi significativamente semelhante ao efeito da morfina. Os resultados sugerem possível antagonismo de OFSBat aos canais TRPV1. Novos estudos devem ser realizados para confirmarmos possíveis mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** Óleo fixo; *O. fieldingiana* (batiputá); Nocicepção; TRPV1; Zebrafish (*Danio rerio*) adulto;

## **Introdução**

A dor neuropática pode ser causada por lesões e/ou disfunções no sistema somatossensorial. A transmissão da informação nociceptiva ocorre através das fibras aferentes primárias que iniciam a transmissão da informação dolorosa e expressam o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1), um receptor chave envolvido na transmissão e modulação de sinais de dor (PARISI, J. R. 2016).

O zebrafish (*Danio rerio*) é atualmente uma opção viável para pesquisa em dor, devido à simetria genética e fisiológica das espécies para mamíferos, incluindo entre 70 e 80% de similaridade com humanos, além de apresentar baixo custo e fácil manuseio e manutenção comparado para outros modelos animais, como roedores. Evidências sugerem que o desenvolvimento, organização e processamento dos sistemas nociceptivos periféricos e centrais são semelhantes entre zebrafish e outros vertebrados. O zebrafish adulto foi proposto como um método auxiliar para o uso de roedores em testes nociceptivos (DO NASCIMENTO et al., 2018).

*Ouratea fieldingiana* devido a sua disponibilidade no Nordeste Brasileiro e, mais especificamente, no Estado do Ceará, as espécies de *O. fieldingiana*, são bastante utilizadas pela população como tônicas, adstringentes, anti-inflamatórias e em doenças da pele e no tratamento de doenças gástricas. O extrato hexânico dos frutos do Batiputá apresentou atividades antibacteriana e antifúngica (ARAÚJO, et al. 2015)

Em nossos estudos iniciais, propusemos o uso de zebrafish adulto como modelo animal substitutivo ao uso dos roedores em testes de nocicepção (Magalhães et al., 2017; 2018). Assim, investigamos o efeito do óleo de sementes de batiputá (*O. fieldingiana*; # 55224; UFC) sobre a nocicepção em zebrafish adulto (ZFa) induzida pela capsaicina.

## **Objetivo**

Avaliar o efeito do óleo fixo de sementes de batiputá (*O. fieldingiana*; # 55224; UFC), OFSBat, sobre a nocicepção em zebrafish adulto (ZFa) induzida pela capsaicina.

## **Material e métodos**

### **Óleo fixo das sementes de batiputá (OFSBat)**

O óleo fixo das sementes de batiputá (*O. fieldigiana*; exsicata N° 55224; UFC), foi obtido conforme descrito por Souza Filho (2014) e armazenado no nosso laboratório em geladeira (5° C) até utilização.

### **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). Cada grupo 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 circadiano 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 com zebrafish adultos foram realizados baseando-se em metodologias propostas por **Magalhães et al. (2017)**, **Ekambaram et al. (2017)** e **Collymore, Rasmussen e Tolwani (2003)**. No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controles, via oral (v.o.). Em seguida foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 µL. Para os tratamentos via intramuscular (i.m.) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G.

### **Atividade antinociceptiva comportamental**

A concentração da solução do agente nocivo, bem como o tempo de análise de ação nociceptiva foram utilizadas baseando-se nos testes conforme descrito por **do Nascimento et al. (2018)**. O comportamento dos animais foi registrado por analisadores calibrados e cegos, de acordo com os modelos de nocicepção empregados com roedores (**Pelissier et al. 2002**).

### **Comportamento nociceptivo induzido por capsaicina**

A nocicepção foi induzida com capsaicina (agonista TRPV1, 40,93 µM, 5,0 µL *i.m.*), na calda dos animais (n=6/grupo), 1 h após pré-tratamento com OFSBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/Kg; v.o.) ou morfina (200 mg/Kg; v.o.), utilizada como controle positivo, ou veículo (Controle, DMSO 3%; 20 µL; v.o.). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após tratamento com agente nociceptivo, os animais foram, individualmente, adicionados em uma placa de Petri de vidro (10 x 15 cm), divididos em quadrantes, e a resposta nociceptiva foi quantificada em termos de atividade locomotora ou cruzamentos de linhas (CL) realizadas durante 10-20 min. Usando os CL do Naive como baseline (100% de CL ou 0,0% de Hiperalgisia, HA) foi calculada a porcentagem de analgesia (A%) individualmente (**Magalhães et al. 2017**) conforme:

$A\% = \%HA \text{ (Controle)} - \%HA \text{ (Tratamento)}$ . Onde: HA% (controle) é o percentual de atividade hiperalgésica no grupo controle, e HA% (tratamento) é a porcentagem de atividade hiperalgésica no grupo de tratamento..

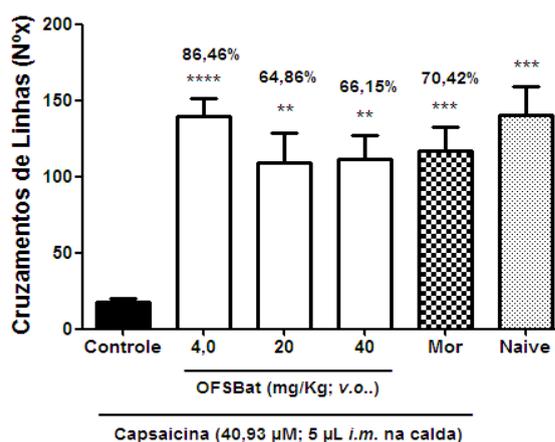
Sendo que  $HA\% = [CL(\text{Naive}) - CL(\text{Tratamento}) / CL(\text{Naive})] \times 100\%$ . Onde: LC (Naive) é a média de cruzamentos de linhas no grupo controle, e LC (tratamento) é a média de cruzamentos de linhas no grupo de tratamento.

### **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

Neste estudo, usamos o zebrafish (*Danio rerio*) adulto como modelo substitutivo ao uso de roedores em testes de nocicepção induzida por capsaicina. Como resultado, OFSBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/Kg; v.o.) inibiu significativamente ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,01$  vs. Controle) a nocicepção induzida por capsaicina aplicada na calda do ZFa. Tal efeito foi significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante ao efeito da morfina (200 mg/Kg; v.o.;  $p < 0,001$  vs. Controle), Figura 1.



**Figura 1.** Efeito do óleo fixo das sementes de *O. fieldingiana* (OSFBat) sob a nocicepção em zebrafish adulto induzida por capsaicina, analisados individualmente durante 10-20 min. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (n=6/grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de analgesia (%A). Controle (DMSO 3%; 20 µL v.o.). Mor-morfina (200 mg/Kg; v.o.). Naive - grupo não tratado. ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle;

Nossos resultados corroboram com achados por **do Nascimento et al. (2018)**. Nesse trabalho, os autores empregaram o zebrafish adulto como modelo animal para investigar o potencial antinociceptivo orofacial do Kaempferol-3-O-rutinosídeo (KR), isolado do extrato etanólico das sementes de *Ouratea fieldingiana*. Como resultado KR (2,5 ou 5,0 mg/mL; 20 µL; i.p.) inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$  vs. Controle) a nocicepção orofacial em ZFa induzida pela capsaicina.

Capsaicina é responsável pela sensação de queimação na mucosa e ativa os receptores vanilóides (TRPV1) presentes nas terminações nervosas da boca. Atua também nas fibras C, responsáveis pela ativação de terminações nervosas aferentes livres que capturam estímulos nocivos. Injeção intramuscular de capsaicina em humanos ativa a musculatura nociceptores e induz uma sensação de dor profunda e intensa, bem como hiperalgesia mecânica (**DO NASCIMENTO et al. 2018**).

## Conclusão

O presente estudo apontou mais uma ação farmacológica do óleo das sementes de *Ouratea fieldingiana* como um inibidor da nocicepção induzida pela capsaicina, sugerindo, assim, possível efeito via dos canais TRPV1. Novos estudos devem ser realizados para confirmarmos possível mecanismos de ação.

## **Agradecimentos**

Aos colaboradores do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da UNIFOR, principalmente a Profa. Dra. Adriana Rolim Campos e Sacha Aubrey A. R. Santos. Aos colaboradores do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UECE, em especial a Profa. Dra. Eveline Solon B. Cavalcanti. Aos colaboradores do Grupo de Pesquisa em Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN) da UECE-CECITEC-Tauá-CE, bem como CNPq, FUNCAP e UECE pelo apoio financeiros e de infraestrutura.

## **Referências**

- ARAÚJO, A. K. L., Pinheiro, A. D. N., da Rocha Tomé, A., de Moraes, S. M., de Oliveira, M. L. M., de Figueiredo, R. C. B. Q., & Nunes-Pinheiro, D. C. S. Atividade cicatrizante do óleo fixo de *Ouratea* spp. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 9(2), 154-171, 2015.
- COLLYMORE, C., Rasmussen, S., Tolwani, R.J. 2013. Gavaging adult zebrafish. *J Vis Exp.* 78(e50691), 1-5.
- CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em [www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22\\_02\\_18.pdf](http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf). Acesso em 22/4/18.
- CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA J. Contribution of natural products to the Discovery of the transient receptor potential (TRP) channels Family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics** 106:179-208, 2005.
- CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta** 1772:978-988, 2007.
- DO NASCIMENTO, J. T. E. J. MORAISA, M. S. LISBOAB, S.D. SOUSAB, O.M. SANTOS, S. A. A.R. MAGALHÃES, F.E.A. CAMPO, A. R. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107; 1030–1036, 2018.
- LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta** 1772:989-1003. 2007.
- MAGALHÃES, F.E.A., de Sousa, C.A.P.B., Santos, S.A.A.R., Menezes, R.B., Batista, F.L.A., Abreu, A.O., de Oliveira, M.V., Moura, L.F.W.G., Raposo, R.S., Campos, A.R., 2017. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish** 4(5):422-429.2017
- MAGALHÃES, F.E.A., BATISTA, F.L.A. LIMA, G.M.L. BRANTE, A. A. BATISTA, F. L. A. ABRANTE, A. A. ARAUJO, J. I, F. SANTOS, S, A, A, R. OLIVEIRA, B. A. RAPOSO, R.S. CAMPOS. A. R. Adulto zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the corneal antinociceptive compounds. DOI: 10.1089/zeb.2018.1633.
- MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov** 10:601-620, 2011.
- PARISI, J. R. (2016). **Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) no controle da dor neuropática**. 60pg. *Dissertação: Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde*. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.
- PELLISSIER, Teresa; PAJOT, Jacques; DALLEL, Radhouane. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96(1-2):81-87, 2002.