

## EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO FIXO DAS SEMENTES DE *Ouratea fieldingiana* EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS ASICs

Sandra M. B. de Araújo<sup>1,2</sup> (IC), Ismael F. de Araújo<sup>2</sup> (IC), Franciglauber S. Bezerra<sup>2</sup> (PQ)  
Francisco Ernani A. Magalhães<sup>2</sup> (PQ)

<sup>1</sup>Licencianda em Química, Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará;  
[\\*sandra.taua@hotmail.com](mailto:*sandra.taua@hotmail.com);

<sup>2</sup>Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB),  
Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará.

[fernanimagalhaes@yahoo.com.br](mailto:fernanimagalhaes@yahoo.com.br);

### Resumo

Em nossos trabalhos anteriores detectamos o potencial antinociceptivo orofacial em zebrafish (*Danio rerio*) adulto do Kaempferol-3-O-rutinosídeo, isolado do extrato etanólico das sementes de *Ouratea fieldingiana*. Com o intuito de darmos continuidade aos nossos estudos com a mesma planta, nesse trabalho investigamos o efeito do óleo fixo das sementes de *Ouratea fieldingiana* (OFsBat) sob a nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa) induzido pela salina ácida. Animais (60-90 dias;  $0,5 \pm 0,2$  g;  $n=6$ /grupo) foram tratados via oral, com soluções do OFsBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/kg), veículo (Controle, DMSO 3%; 20  $\mu$ L; v.o.) ou morfina (200 mg/kg; v.o.), utilizada como controle positivo. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após 1 h dos tratamentos, 5,0  $\mu$ L de solução salina ácida (0,1% de ácido acético; antagonista ASICs) 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 quantificada pelo aumento da atividade locomotora durante 0-20 min. O estudo foi aprovado pela CEUA-UECE (#7210149/2016). OFsBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/kg) e morfina inibiram significamente ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$  vs. controle) a nocicepção em ZFa induzida por salina ácida. Os resultados obtidos sugerem ação antinociceptiva via participação dos canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs). Porém, estudos adicionais são necessários afim de caracterizar o mecanismo de ação responsável por esta atividade.

**Palavras-chave:** *Ouratea fieldingiana* (batiputá). Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Efeito antinociceptivo. ASICs.

### 1. Introdução

O processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo é chamado de nocicepção (NAIDU; PHAM, 2015). Os canais iônicos que incluem os receptores de potencial transitório (TRP) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) vêm sendo relacionados como participantes importantes no processo doloroso (DAI, 2015).

O tratamento farmacológico da dor inclui os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes (antiepilépticos), anestésicos locais, dentre outros (GUINDON, 2017). Contudo, devido aos seus frequentes efeitos adversos, têm sido desenvolvidos vários

estudos a fim de descobrir novos fármacos para tratar essa condição, visando, dentre os objetivos, reduzir os efeitos colaterais (LI; ZHANG, 2012).

Nessa perspectiva, o zebrafish (*Danio rerio*) tem sido sugerido, nas últimas três décadas, como um modelo animal propício para o estudo de sensação nociceptiva (MALAFOGLIA et al., 2013).

A *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl, conhecida popularmente como batipúta, é uma espécie arbórea pertencente à família *Ochnaceae* (PINTO, 2017). Estudos desenvolvidos com *O. fieldingiana* apresentaram atividades biológicas relevantes como cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica (DO NASCIMENTO et al. 2018). Em nossos trabalhos anteriores verificamos o potencial antinociceptivo orofacial em zebrafish (*Danio rerio*) adulto do Kaempferol-3-O-rutinosídeo, isolado do extrato etanólico das sementes de *Ouratea fieldingiana* (DO NASCIMENTO et al., 2018).

Com o intuito de darmos continuidade aos nossos estudos com a mesma planta, nesse trabalho investigamos o efeito do óleo fixo das sementes de *Ouratea fieldingiana* (OFSBat) sob a nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa) induzido pela salina ácida.

## 2. Material e Métodos

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

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

### 2.2 Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa)

Foram utilizados peixe-zebra com idade entre 60 a 90 dias ( $0,5 \pm 0,2$  g), selvagens, de ambos os sexos, obtidos de um fornecedor comercial em Fortaleza, Ceará, Brasil. Os animais (40-50 animais) foram mantidos em aquário de vidro (30 x 15 x 20 cm), com capacidade para 10 L, à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclos de claro-escuro de 14/10 horas. Usou-se água da torneira (pH 7,0) previamente trata com anticloro (*ProtecPlus*<sup>®</sup>) e bomba de ar com filtro submerso. Os animais receberam ração ad libitum. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada ( $2-4^{\circ}\text{C}$ ), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Os bioensaios foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (#7210149/2016).

### 2.3 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 (2013). 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.) (COLLYMORE,

RASMUSSEN e TOLWANI, 2013). 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*<sup>®</sup> BD) com uma agulha de calibre 30G.

## 2.4 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 Magalhães et al. (2017). O comportamento dos animais foi registrado por analisadores calibrados e cegos, de acordo com os modelos de nocicepção empregados com roedores (BAGGIO et al., 2012).

## 2.5 Comportamento nociceptivo induzido por salina ácida

A nocicepção foi induzida com salina ácida (agonista ASICs; 0,1% de ácido acético; pH 3,28), 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 (Controle positivo; 200 mg/Kg; *v.o.*), ou veículo (Controle, DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após tratamentos 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 Hiperalgésia, HA) foi calculada a porcentagem de analgesia (A%) individualmente conforme Magalhães et al. (2017):

$A\% = \%HA \text{ (Controle)} - \%HA \text{ (Tratamento)}$ . 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.

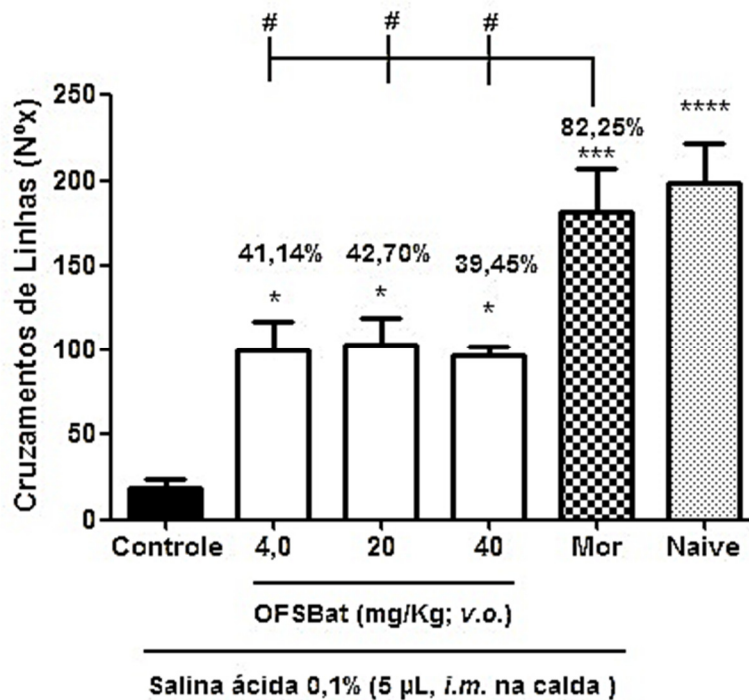
Sendo que  $HA\% = [CL(\text{Naive}) - CL(\text{Tratamento}) / CL(\text{Naive})] \times 100\%$ . Onde: LC (Naive) é a média de cruzamentos de linhas no grupo controle, e LC (tratamento) é a média de cruzamentos de linhas no grupo de tratamento.

## 2.6 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% ( $p < 0,05$ ).

## 3. Resultados

A Figura 1 mostra que a administração do OFSBat (4,0 ou 20 ou 40 mg/kg; *v.o.*) ou morfina inibiram ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  vs. controle) a nocicepção em ZFa induzida por solução salina ácida (0,1%; 5 µL; *i.m.* na calda).



**Fig. 1.** Efeito do óleo fixo das sementes de *O. fieldingiana* (OSFBat) sob a nocicepção induzida por solução salina ácida em zebrafish adulto (*Danio rerio*), analisado individualmente durante 0-20 min. Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão (n=6/grupo). Números acima das barras indicam a porcentagem de analgesia. Controle: veículo (3% DMSO; 20  $\mu$ L; *i.p.*). Mor - morfina (200 mg/kg; *v.o.*). Naive: grupo sem tratamento. *One-way* ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey (\* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,001; \*\*\*\* $p$ <0,001 vs. controle; # $p$ <0,05 vs. Mor).

Logo, os índices de analgesia de 41,1%, 42,7%, 39,4% nesse estudo sugerem uma possível ação antagônica aos Canais Iônicos Sensíveis a Ácidos. (DYMOWSKA et al., 2015). Os resultados corroboram com estudos descrito por Do Nascimento et al. (2018). Os autores reportaram que o Kaempferol-3-O-rutinosídeo (KR) isolado do extrato etanólico das sementes de *O. fieldingiana*, inibiu a nocicepção induzido por solução salina ácida nos lábios do zebrafish adulto.

## 4. Conclusão

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

## 5. 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.

## 6. Referencias

- BAGGIO, C.H. et al. Antinociception of beta-Dglucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition, *Int. J. Biol. Macromol.* 50:872–877, 2012.
- 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.
- COLLYMORE, C. et al. Gavaging adult zebrafish. *J Vis Exp*. Doi: 10.3791/50691, 2013.
- DAI, Y. TRPs and pain. *Semin. Immunopathol.* 38(3):277-291, 2015.
- 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*, 107:1030–1036, 2018.
- DYMOWSKA, A.K. et al. The role of acid-sensing ion channels in epithelial Na<sup>+</sup> uptake in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol* 218:1244–1251, 2015.
- EKAMBARAM, S. P. et al. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacol.* Doi:10.1007/s10787-016-0303-2, 2017.
- GUINDON, J. A novel inhibitor of endocannabinoid catabolic enzymes sheds light on behind the scene interplay between chronic pain, analgesic tolerance, and heroin dependence. *Neuropharmacology*, 114:168-171, 2017.
- MAGALHÃES, F.E.A. et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish* 14(5):422–429, 2017.
- KWEON H.J. et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. *BMB Rep* 46:295–304, 2013.
- LI, J.; ZHANG, Y. Emerging drug targets for pain treatment. *European Journal of Pharmacology*, 681:1-5, 2012.
- MALAFOGLIA, V. et al. The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology*, 228(10), 1956–1966, 2013.
- NAIDU, R. K.; PHAM, T. M. Pain management. In: SIKKA, P. K.; BEAMAN, S. T.; STREET, J. A. *Basic Clinical Anesthesia*. New York: Springer, 2015. p. 265-296.
- PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*, 105: 508–519, 2016.
- PINTO, T. R. M. (2017). **Estudo do potencial farmacológico do óleo de batiputá (*Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl.) como insumo farmacêutico**. 83 p. *Dissertação: Mestrado em Ciências Farmacêuticas*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- SOUZA-FILHO, A. C. F. (2014). **Estudo químico e biológico do óleo fixo das sementes de *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl.** 78 p. Monografia: Graduação em Licenciatura Plena em Química. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.