

# IV SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS MÉDICAS 30 DE NOVEMBRO DE 2018

## Efeito antinociceptivo do Triterpeno CLF-1 em zebrafish (*Danio rerio*) adulto: possível participação dos canais TRPV1

Francisca Crislândia Oliveira Silva<sup>1a\*</sup> (PG), Maria Kueirislene Amâncio Ferreira<sup>1a</sup> (PG), Edson Holanda Teixeira<sup>b</sup> (PQ), Hécio Silva dos Santos<sup>c</sup> (PQ), Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>c</sup> (PQ), Jane Eire Silva Alencar de Menezes<sup>a</sup> (PQ)

<sup>1</sup> Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará; <sup>a</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará; <sup>b</sup> Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará; <sup>c</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais, Síntese e Biocatálise de Compostos Orgânicos (LBPNSB), Universidade do Vale do Acaraú, Fortaleza, Ceará; <sup>d</sup> Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Tauá, Ceará.

[\\*crislandiao@yahoo.com](mailto:*crislandiao@yahoo.com)

### Resumo

A dor é um sintoma comum de várias doenças crônicas e um dos primeiros sinais observados pelos clínicos. Portanto, a crescente busca por novas drogas como tratamento alternativo para a dor é um desafio. Nesse contexto, avaliamos o efeito do triterpeno 3 $\beta$ -6 $\beta$ -16 $\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno (CLF-1), isolado das folhas de *Combretum Leprosum*, sob a nocicepção em zebrafish adulto (ZFa) induzida pela capsaicina (Agonista TRPV1). Animais machos e fêmeas (60-90 dias; 0,4  $\pm$  0,1 g; n =6/grupo), foram tratados via intraperitoneal (*i.p.*) com CLF-1 (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg) ou veículo (Controle, solução salina a 0,9%, 20  $\mu$ L) ou morfina (160 mg/kg; *i.p.*). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. Após 30 min, os animais receberam solução de capsaicina (Agonista TRPV1; 49,93  $\mu$ M; 5,0  $\mu$ L), aplicada na cauda. Em seguida, foram colocados individualmente em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm) e o efeito antinociceptivo foi quantificado através do aumento do número de cruzamentos de linhas (CL) durante 10-20 minutos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA, seguido do Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). O estudo foi aprovado pela CEUA-UECE (# 7210149/2016). Como resultado, CLF-1 (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*) reverteram significativamente ( $p < 0,001$  vs. Controle) a nocicepção induzida pela capsaicina aplicada na calda dos animais. Tal efeito foi significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante ao efeito da morfina (160 mg/kg; *i.p.*;  $p < 0,001$  vs. controle). Os resultados sugerem ação antagonista aos canais TRPV1. Porém, novos estudos devem ser realizados para investigação dos possíveis mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** Efeito antinociceptivo. CLF-1. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

---

## INTRODUÇÃO

A dor é um sintoma comum de várias doenças crônicas e um dos primeiros sinais observados pelos clínicos. A dor é classificada como aguda ou crônica, frequentemente causada por processos inflamatórios ou neuropáticos. Portanto, a crescente busca por novas drogas como tratamento alternativo para a dor é um desafio (BATISTA *et al.*, 2018).

O Zebrafish (*Danio rerio*) é considerado um modelo promissor para o uso e investigação do potencial terapêutico de determinadas drogas, incluindo vários fármacos do Sistema Nervoso Central (KALUEFF *et al.*, 2016; RESENDE e SOCCOL, 2015). Contudo, o uso do zebrafish apresenta diferentes vantagens em relação aos modelos mamíferos como manutenção de baixo custo, alta taxa de reprodução, prática e experimentação executável em espaços reduzidos (DE CAMPOS, 2016).

Na literatura, o triterpeno 3 $\beta$ -6 $\beta$ -16 $\beta$ -tri-hidroxilup-20 (29) -eno (CLF-1) isolado das folhas de *Combretum Leprosum*, conhecida popularmente por mofumbo, têm demonstrado diferentes propriedades anti-inflamatórias (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2011), antinociceptiva (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2011, 2012), cicatrizante (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2015), antimicrobiano, antibacteriano e antioxidante (EVARISTO *et al.*, 2014; 2017).

Baseando-se no exposto, esse trabalho reporta o efeito do triterpeno 3 $\beta$ -6 $\beta$ -16 $\beta$ -tri-hidroxilup-20 (29) -eno (CLF-1), isolado das folhas do *C. leprosum*, sob a nocicepção em zebrafish adulto induzido pela capsaicina.

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostra

Nesse trabalho utilizamos o triterpeno 3 $\beta$ -6 $\beta$ -16 $\beta$ -tri-hidroxilup-20 (29) -eno (CLF-1), isolado das folhas do *C. leprosum* conforme metodologia de Evaristo *et al.* (2014) e armazenado no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-UECE).

### Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de  $3.5 \pm 0.5$  cm e peso  $0.4 \pm 0.1$  g foram obtidos da Agroquímica 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*<sup>®</sup>) 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; 2018) 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 intramuscular (*i.m.*) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G.

### **Atividade antinociceptiva comportamental**

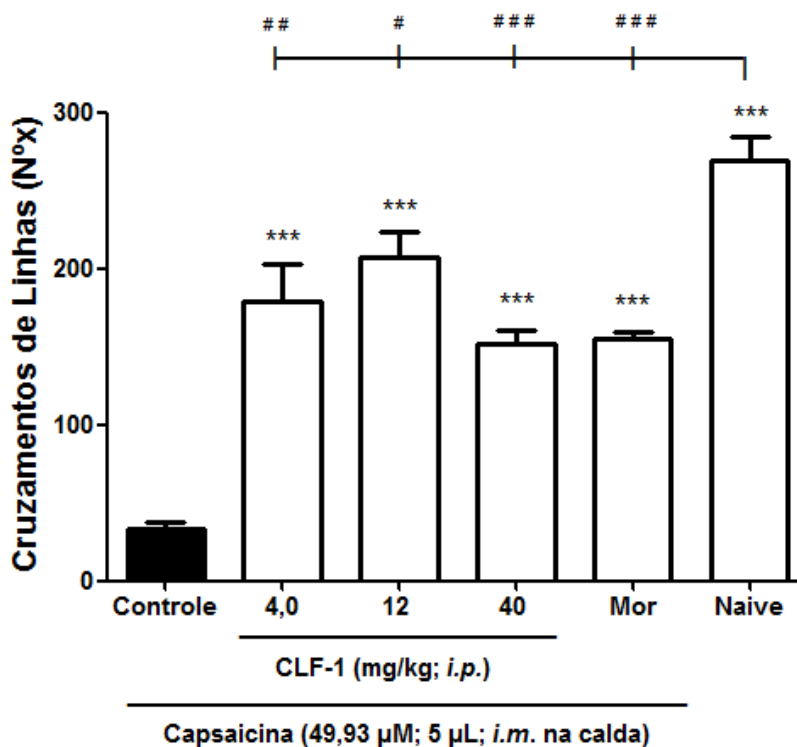
Para as análises comportamentais, seguiu-se as mesmas metodologias descritas por Magalhães *et al.* (2017; 2018). Os animais (n=8/grupo) foram tratados com CLF-1 (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*) ou veículo (Controle, salina 0,9%; 20 µL; *i.p.*) ou morfina (160 mg/kg; *i.p.*) utilizada como controle positivo. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, a nocicepção foi induzida com solução de capsaicina (agonista TRPV1; 49,93 µM; 5,0 µL) aplicada na cauda dos animais. 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 10-20 min.

### **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 DISCUSSÕES

Em nossos estudos iniciais, o CLF-1 não se mostrou tóxico e não alterou atividade locomotora dos animais (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2017), bem como também não reverteu a nocicepção corneal induzida por salina hipertônica (HOLANDA *et al.*, 2018). Com o intuito de continuar os estudos com o CLF-1, empregamos o zebrafish adulto como modelo animal para avaliar o seu efeito sob a nocicepção induzida pela capsaicina (Agonista TRPV1). Como resultado, CLF-1 (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*) reverteu significativamente ( $p < 0,001$  vs. Controle) a nocicepção induzida pela capsaicina aplicada na cauda dos animais. Tal efeito da CLF-1 foi significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante ao efeito da morfina (160 mg/kg; *v.o.*;  $p < 0,001$  vs. controle), Fig. 1.



**Fig. 1.** Efeito de CLF-1 (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg; *i.p.*) sob a nocicepção induzida por capsaicina em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 10-20 min. Cada coluna representa a média  $\pm$  erros padrão da média ( $n=6$ /grupo). ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (\*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  vs. Naive). Controle - salina 0,9% (20  $\mu$ L; *i.p.*). Mor-morfina (160 mg/kg; *i.p.*); Naive: grupo não tratado.

Dados reportados na literatura, apontam o efeito antinociceptivo da CLF-1 frente a outros agentes nocivos. Podemos citar como exemplo, pesquisas desenvolvidas com Longhi-

balbinot *et al.* (2011). Nesse trabalho, foi realizado a avaliação da atividade antinociceptiva de CLF-1 em camundongos, onde a mesma reduziu a nocicepção induzida por glutamato (agonista NMDA). Em outro trabalho, CLF-1 também apresentou atividade antinociceptiva quanto aos sistemas inibitórios endógenos da dor, como os opioidérgicos e sistemas serotoninérgicos (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2012).

Nesse trabalho, os resultados apontam mais uma aplicação farmacológico do CLF-1 como inibidor da dor em zebrafish adulto induzida pela capsaicina, um antagonisata dos canais TRPV1.

---

## CONCLUSÃO

O triterpeno 3 $\beta$ -6 $\beta$ -16 $\beta$ -tri-hidroxilup-20 (29) -eno (CLF-1), isolado das folhas do *C. leprosum*, reverteu nocicepção em zebrafish (*D. rerio*) adulto induzido pela capsaicina. Tais resultados sugerem ação antagonista aos canais TRPV1. Porém, novos estudos devem ser realizados para investigação dos possíveis mecanismos de ação.

---

## REFERÊNCIAS

ARELLANO-AGUIAR, O. *et al.*; Use of the Zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com** 9 (4):052-062, 2015.

BATISTA, F. L. A.; LIMA, L. M. G.; ABRANTE, I. A.; ARAÚJO, J. I. F.; BATISTA, F. L. A.; ABRANTE, I. A.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, D. R.; LIMA, M. C. L.; PRADO, B. S.; MOURA, L. F. W. G.; GUEDES, M. I. F.; FERREIRA, M. K. A.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, S. A. A. R.; MENDES, F. R. S. MOREIRA, R. A.; 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 e Pharmacotherapy**, v. 108, p. 408- 416, 2018.

DE CAMPOS, E. G. (2016). Zebrafish como organismo modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada. 72p. Dissertação: Mestrado em Ciências: Área Química. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

EVARISTO *et al.* Antibacterial effect on mature biofilms of oral streptococci and antioxidant activity of 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene from *Combretum leprosum*. **MEDICINAL Chemistry Research**, v. 26, p. 3296-3306, 2017.

\_\_\_\_\_. EVARISTO, F.F. *et al.* Antimicrobial Effect of the Triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -Trihydroxylup 20(29)-ene on Planktonic Cells and Biofilms from Gram Positive and Gram Negative Bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 58–62, 2014.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMA, S. S.; PAVADA, S.; 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.

HOLANDA, C. L. A. *et al.* Bioprospecção de atividade antinociceptiva corneal da CLF-1 em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. In: XXXIII Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 2018, Fortaleza. Resumo expandido, apresentação oral.

LIIMA, G. R. M. *et al.* Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**, v. 17, p. 9142-9206, 2012.

LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al.* Anti-inflammatory effect of triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 59-64, 2012.

KALUEFF, A.V. *et al.*; International Zebrafish Neuroscience Research Consortium, Z. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquat Toxicol** 170:297-309, 2016.

LONGHI-BALBINOT, D. T. *et al.* Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **J. Pharmacol.**, v. 653, p. 32-40, 2011.

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, 2018.

MAGALHÃES, F.E.A *et al.*; Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**. DOI. 10.1089/zeb.2017.1436, 2017.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; EVARISTO, F. F. V.; ALVES, M. F. A.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; ARRUDA, F. V. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 116-120, 2015.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Vol. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2015.

## AGRADECIMENTOS

Ao Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais (MARENA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e a todos os colaboradores do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), da UECE. Ao Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR, FUNCAP, CNPq pelo apoio e suporte financeiro.