



## EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO NIM (*A. INDICA*) EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA

**Francisco Lucas. A. Batista<sup>1a</sup> (IC)**, Luiza. M. G. Lima<sup>a</sup> (IC), Erlândia A. Magalhães<sup>a</sup> (PQ), Maria Kueirislene A. Ferreira<sup>2b</sup> (PG), Jane Eire S. A. de Menezes<sup>b</sup> (PQ), Sacha A. A. R. Santos<sup>c</sup> (IC), Breytiner A. de Oliveira<sup>c</sup>, Adriana R. Campos<sup>c</sup>, Francisco Ernani. A. Magalhães<sup>a,b\*</sup>

<sup>1</sup> Especialização em Ensino das Ciências da Natureza e Matemática, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Campus Tauá-CE \*[flucasbatista@outlook.com](mailto:flucasbatista@outlook.com);

<sup>2</sup> Mestrado em Recursos Naturais (MARENA), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará;

<sup>a</sup> Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC), Tauá-CE, \*[ernani.magalhaes@uece.br](mailto:ernani.magalhaes@uece.br);

<sup>b</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, [jane.menezes@uece.br](mailto:jane.menezes@uece.br);

<sup>c</sup> Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-CE; [adriolim@unifor.br](mailto:adriolim@unifor.br);

---

### Resumo

Mudanças na transmissão glutamatérgica causam distúrbios psiquiátricos. Alguns desses sintomas são imitados pelo uso de agonistas ou antagonistas glutamatérgicos (receptores N-Metil-D-aspartato, NMDA) em roedores. Receptores NMDA também já foram caracterizados em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). Assim, investigamos o possível efeito do extrato etanólico dos frutos do Nim (*A. indica*) (EtFrNim) sobre os receptores NMDA em ZFa. Animais (60-90 dias; 0,4±0,1 g; n=6/grupo) foram tratados, via intraperitoneal, com soluções de EtFrNim (1,0; 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20 µL), veículo (Controle, DMSO 3 %, 20 µL) ou morfina (5,0 mg/mL, 20 µL). Um grupo naive, sem tratamentos, também foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, os ZFa receberam injeção de glutamato, agonista NMDA (12,5 µM; 5 µL *i.m.*), na cauda. A resposta nociceptiva foi caracterizada pela diminuição da atividade locomotora, analisada durante 0-15 min, no teste de campo aberto. O estudo foi aprovado pela CEUA-UECE (#7210149/2016). EtFrNim (1,0 ou 2,5 mg/mL) e morfina inibiram ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  vs Controle) a nocicepção em ZFa induzida por glutamato. Assim, os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do Nim pode estar associado ao antagonismo aos receptores NMDA. Novos estudos deverão ser realizados para investigar possíveis mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** *Azadirachta indica* A. Juss. Receptores NMDA. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.



## **Introdução**

Os receptores de N-Metil-D-aspartato (NMDA) são canais de íons com ligação em sinapses excitatórias em todo o sistema nervoso. Eles desencadeiam a potencialização ao longo prazo (LTP) e a depressão de longo prazo (DLT) da força sináptica e estão implicados na formação da memória, desenvolvimento de sinapse, refinamento de circuitos, distúrbios neuropsiquiátricos, excitotoxicidade e neurodegeneração **(NABAVI et al., 2014)**.

Mudanças na transmissão glutamatérgica causam distúrbios psiquiátricos. Alguns desses sintomas são imitados pelo uso de agonistas ou antagonistas glutamatérgicos (receptores N-Metil-D-aspartato, NMDA) em roedores **(MENEZES et al., 2015)**.

O Zebrafish (*Danio rerio*) está rapidamente ganhando popularidade como telas sensíveis para pequenas moléculas, incluindo vários fármacos do Sistema Nervoso Central **(KALUEFF, ECHEVARRIA e STEWART, 2014; KALUEFF et al., 2016)**. Receptores NMDA centrais já foram expressos em zebrafish e tais animais são altamente sensíveis a um amplo espectro de antagonistas de NMDA, incluindo ketamina, PCP, MK-801 e ácido cinurênico **(ROBINSON et al., 2013; KYZAR e KALUEFF, 2016)**.

O Nim é uma planta medicinal fortemente erradicado na tradição indiana. Todas as suas partes são amplamente utilizadas para muitas doenças e, nas áreas rurais indianas, a planta é chamada de "farmácia da aldeia". As utilizações medicinais foram documentadas no Atharva Veda, o Grihathyasutras e também no Sutragranthas. Suas propriedades medicinais são descritas no 'Puranas' e o neem é comumente usado no medicamento 'Ayurvedic' e 'Unani' para aliviar tantas dores diferentes, febres, infecções e outras queixas **(NICOLETTI E MURUGAN, 2013)**. Os diferentes extratos de *Azadirachta indica* (Nim, Meliaceae) possuem propriedades anti-inflamatórias, assim como também antinociceptivas **(SOARES et al., 2014)**.

Baseando-se no exposto, investigamos o possível efeito do extrato etanólico dos frutos do Nim (*A. indica*) (EtFrNim) sobre os receptores NMDA em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.



---

## **Materiais e Métodos**

### **Material vegetal**

Nesse trabalho foi utilizado o extrato etanólico dos frutos do Nim (*A. indica*) (**da SILVA, 2014**), armazenado em geladeira (5 °C) no nosso laboratório (LBPNB, Tauá-CE) até utilização.

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

Foram utilizados animais selvagens, com idade entre 60 a 90 dias ( $4,0 \pm 0,1$  g), de ambos os sexos, obtidos através do fornecedor Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, proveniente de Fortaleza, Ceará. A manipulação e aclimação dos animais foram realizados no Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza – NUBEX/UNIFOR. Os animais foram mantidos em aquário de vidro com temperatura de 24°C, com água da torneira tratada com anticloro da marca *ProtecPlus*<sup>®</sup>. Os procedimentos do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 7210149/2016, da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará.

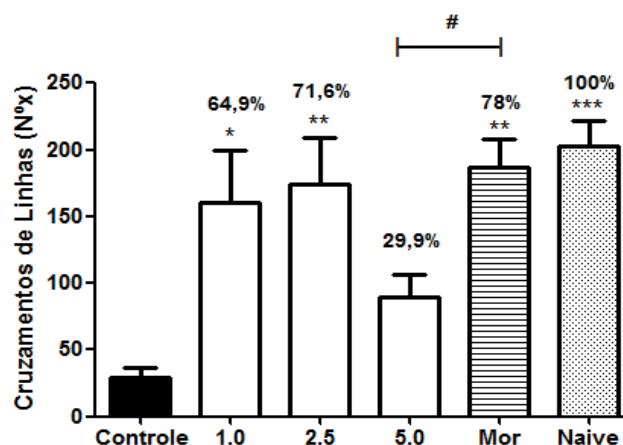
### **Efeito antinociceptivo em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto**

Os animais foram anestesiados com água gelada (12-15 °C) e tratados, via intraperitoneal, com soluções de EtFrNim (1,0; 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20 µL), veículo (Controle, DMSO 3 %, 20 µL) ou morfina (5,0 mg/mL, 20 µL). Um grupo naíve, sem tratamentos e agente nocivo, também foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, os ZFa receberam injeção de glutamato (12,5 µM; intramuscular; 5 µL; agonista NMDA) na cauda. Em seguida, os animais foram posicionados em placa de Petri (dividida em quadrantes) e a resposta nociceptiva foi caracterizada pela diminuição da atividade locomotora (**Magalhães et al., 2017**), analisada durante 0-15 min.



## Resultados e Discussão

Recentemente, usamos o EtFrNim em Zebrafish (*Danio rerio*) para reverter a nocicepção induzida por Formalina (Batista et al., 2017). Como continuidade dos estudos, investigamos a modulação de tal efeito do NIM empregando-se o glutamato como agonista de receptores NMDA. Como resultado, o EtFrNim (1,0 ou 2,5 mg/mL; 20  $\mu$ L *i.p.*) inibiu significativamente ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  vs Controle) a nocicepção em ZFa induzida por glutamato, Figura 1.



**Figura 1.** Os Números nas colunas indicam porcentagem de analgesia. Controle – DMSO 3% (20  $\mu$ L, *i.p.*); EtFrNim 1,0 mg/mL (20  $\mu$ L, *i.p.*); EtFrNim 2,5 mg/mL (20  $\mu$ L, *i.p.*); EtFrNim 5,0 mg/mL (20  $\mu$ L, *i.p.*); Mor – Morfina 5,0 mg/mL (20  $\mu$ L, *i.p.*); Naive – Grupo sem tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle; # $p < 0,05$  vs Mor.

Os animais tratados com EtFrNim 1,0 ou 2,5 mg/mL (20  $\mu$ L *i.p.*) inibiram a nocicepção induzida por glutamato com percentual de analgesia de 64,9% e 71,6%, respectivamente, significativamente semelhante ( $p > 0,05$ ) a morfina (A = 78%).

Estes resultados são considerados importantes, pois o EtFrNim pode atuar como antagonista aos receptores NMDA e evitar a mudanças na transmissão glutamatérgica. Segundo Marvin et al. (2013), tal variação pode causar distúrbios neurodegenerativos crônicos, como o



glaucoma, doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Marvin *et al.*, 2013), bem como psiquiátricos (Menezes *et al.*, 2015).

---

## Conclusão

O extrato etanólico dos frutos do Nim (*A. indica*) inibiu a nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto induzida por glutamato, sugerindo-se assim, seu possível efeito antinociceptivo como antagonista aos receptores de NMDA. Novos estudos deverão ser realizados para investigar possíveis mecanismos de ação.

---

## Agradecimentos

Aos colaboradores do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN-UECE-CECITEC-TAUA). Ao NUBEX-UNIFOR, FUNCAP e CNPq.

---

## Referências

- BATISTA, F. L. A.; LIMA, L. M. G.; SILVA, J. A.; DE OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; SANTOS, S. A. A. R.; SOUSA, C. A. P. B.; RAPOSO, R. S.; BARROS, A. R. C. Efeito antinociceptivo de *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) em Zebrafish: participação dos canais TRPA1. In: III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica. **Anais...** Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2017.
- Anais do III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica 2017, 2017. v. único. p. 11.
- DA SILVA, D. A. (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: Graduação em Licenciatura Plena em Química.* Universidade Estadual do Ceará, Tauá, Ceará, Brasil.
- KALUEFF, A.V.; ECHEVARRIA, D.J.; STEWART, A.M.; Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, 55:1-6, 2014.
- 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.
- KYZAR, E.J.; KALUEFF, A.V. Exploring hallucinogen pharmacology and psychedelic medicine with zebrafish models. **Zebrafish** 13(5):379-90, 2016.
- 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.
- MARVIN, J.S. et al.; An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. **Nature Methods** 10(2):162-170, 2013.
- MENEZES, F. P.; KIST, L. W.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; DA SILVA, R. S.; Evaluation of Age-

# III SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS MÉDICAS



Dependent Response to NMDA Receptor Antagonism in Zebrafish. **Zebrafish**, 2015. DOI: 10.1089/zeb.2014.1018.

NABAVI, S.; FOX, R.; PROULX, C.D.; LIN, J.Y.; TSIEN, R.Y.; MALINOW, R. Engenharia de memória com LTD e LTP. **Natureza**, 511, 2014. DOI: 10.1038/nature13294.

NICOLETTI, M.; MURUGAN, K. Neem the tree of XXI century. **Pharmacologyonline** 3:115-121, 2013.

ROBINSON, K.S. et al.; Psychopharmacological effects of acute exposure to kynurenic acid (KYNA) in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior** 108:54-60, 2013.

SOARES, D.G. et al.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of azadirachtin in mice. **Planta Med.** 80(8-9):630-6, 2014.