

## **AValiação DO EFEITO ANSIOLÍTICO DO ÁCIDO 5-HIDROXI-ARJUNÓLICO EM MODELO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO**

Ana E. F. Silva<sup>1</sup>; Ivana C. Romão<sup>2</sup>; Joilna A. Silva<sup>3</sup>; Maria E. U. Bezerra<sup>4</sup>; Maria K. A. Ferreira<sup>5</sup>; Jane E. S. A. Menezes<sup>6</sup>;

<sup>1</sup>aeloysafreitas@gmail.com, <sup>2</sup>ivana.romao@aluno.uece.br, <sup>3</sup>joilnaalves2011@yahoo.com.br,

<sup>4</sup>dudauchaoo@gmail.com, <sup>5</sup> kueirislene@hotmail.com, <sup>6</sup>jane.menezes@uece.br

**Palavras-Chave:** Ansiedade, Combretum mellifluum, Diazepam.

### **Introdução**

A ansiedade é tratada como um estado emocional, onde o sujeito sente uma angústia, e ou, euforia com algum evento que possa, ou não, acontecer. Esse sentimento também está muito relacionado ao medo e a insegurança. É uma desordem complexa e com grande relevância clínica, cujo estudo com modelos animais é importante para pesquisar sobre os mecanismos e drogas para o seu tratamento. (Zamignani, 2015)

O estudo de compostos naturais com potencial ansiolítico tem atraído grande atenção devido a sua ampla diversidade química e ao menor risco de efeitos colaterais. (Calvacante-Silva et al., 2013). O Ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6) é um composto orgânico extraído da espécie *Combretum mellifluum* Eichler que pertence à família *Combretaceae* do gênero *Combretum*. Esse gênero é reconhecido por inúmeras propriedades medicinais como por exemplo no tratamento de diarreia e tumores (Guimarães et al., 2017).

Pesquisas nessa área necessitam da utilização de modelo animal para a sua comprovação. Muitos estudos apresentam o modelo animal com roedores, porém, atualmente os estudos têm utilizado o modelo de zebrafish, características biológicas e neurológicas são comparáveis aos mamíferos, como modelo complementar a esses estudos. Esse modelo se adequa perfeitamente aos princípios dos 3Rs (redução, substituição e refinamento) na bioética de experimentação animal (Magalhães, 2017).

O estudo da avaliação ansiolítica do Ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6) em zebrafish (*Danio rerio*) adulto permitirá compreender melhor como essa substância age diante do nosso organismo auxiliando em futuros estudos e no desenvolvimento de fármacos O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial farmacológico ansiolítico do Ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6) em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto via neuromodulação de receptor gabaérgica.

### **Material e Métodos**

O Ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6) foi fornecido pelo Laboratório de Bioensaios Químico-Farmacológico e Ambiental da Universidade Estadual do Ceará. Todos os experimentos estão de acordo a CEUA-UECE nº 04983945/2021. Para avaliar a toxicidade da CM6, Zebrafish adultos foram separados em grupos (n=6) e tratados via intraperitoneal (*i.p*) com 20 µL da amostra CM6 (4, 20 e 40 mg/kg). Um grupo controle foi incluso (DMSO A 3%). Durante as 96 horas de análise, foi analisado o número de mortos e os valores submetidos a estatística, estimando-se a concentração letal para matar 50% (CL<sub>50</sub>) ZFa através do método matemático Trimmed Spearman-Karber com intervalos de confiança de 95% (Arellano-Aguiar et al., 2015).). Outros grupos (n=6) foram tratados v.i. com a amostra, outro grupo com Diazepam (4 mg/kg) e DMSO 3% (grupos controles). Após 30 min, os animais foram adicionados em placas de Petri (10 x 15 cm), e analisada a locomoção dos animais através da contagem do número de cruzamento de linhas presentes na placa, durante cinco minutos (Gonçalves et al., 2020). O comportamento de ansiedade de um animal pode ser observado através do teste claro/escuro. Semelhante aos roedores, o zebrafish evita naturalmente as áreas

iluminadas (Gonçalves *et al.*, 2020). O experimento foi realizado em um aquário de vidro (30 cm x 15 cm x 20 cm) dividido em uma área clara e uma área escura. O aquário foi cheio até 3 cm com água da torneira sem cloro, o que simulou um novo ambiente raso diferente do aquário convencional e capaz de induzir comportamentos de ansiedade. Nos animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) 20  $\mu\text{L}$  da amostra de CM6 foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 4, 20 e 40 mg/kg. Os grupos de controle negativo e positivo consistiram em DMSO a 3% e solução de Diazepam 0,1 mg/mL, respectivamente. Após 30 min, os animais foram colocados individualmente na zona clara e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo gasto na zona clara do aquário dentro de 5 minutos de observação (Gebauer *et al.*, 2011). O mecanismo de ação testado para o possível efeito ansiolítico da CM6 foi realizado por meio do pré-tratamento com flumazenil (modulador neutralizante de moduladores positivos de GABA<sub>A</sub>) (Benneh *et al.*, 2017). Zebrafish ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram pré-tratados com flumazenil (0,1 mg/mL; 20  $\mu\text{L}$ ; i.p.). Após 15 min, foi administrada a melhor dose efetiva da CM6 (20 mg/kg; 20  $\mu\text{L}$ ; i.p.) encontrada no teste piloto, 3% DMSO (veículo; 20  $\mu\text{L}$ ; i.p.) foi usado como controle negativo. DZP (4 mg/kg, 20  $\mu\text{L}$ ; i.p.) e fluoxetina (0,05 mg/mL; i.p.) foram usados como agonistas GABA<sub>A</sub>, respectivamente. Após 30 min de tratamento, os animais foram submetidos ao teste claro/escuro conforme descrito na seção anterior.

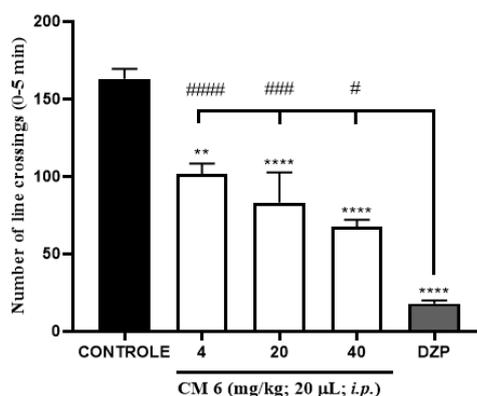
## Resultados e Discussão

Recebendo cada vez mais espaço no mundo acadêmico, o zebrafish, modelo animal proposto para ser utilizado como o primeiro contato de uma substância com um organismo, se faz presente em diversos estudos dentre eles, os experimentos de toxicidades que podem ser realizados em estágio embrionário, larval e adultos, (Silva *et al.*, 2020). As vantagens que tornam o zebrafish tão popular, se cercam em seu desenvolvimento, reprodução, manuseio, custo-benefício e em destaque, além de sua semelhança de genoma ao ser humano, sua resposta quase que imediata aos estímulos externos e internos, obtendo resultados concisos e rápidos (Silva *et al.*, 2020).

Utiliza-se o zebrafish adulto para realizar o teste de toxicidade aguda nas substâncias em estudo. A amostra CM6 não foi tóxica para zebrafish adulto até 96 h de análise (DL50 > 40 mg/kg), pois não houve um quantitativo de morte significativo e nenhuma alteração anatômica aparente nos animais durante este período ( $p > 0,05$ ).

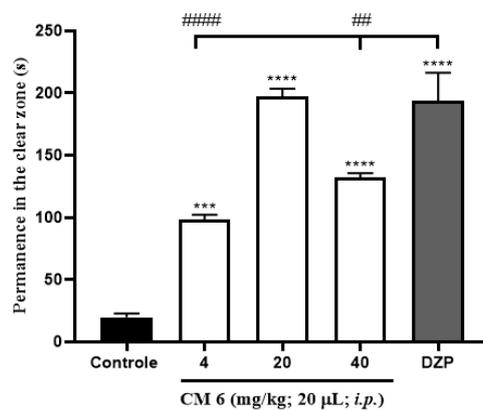
O teste de campo aberto se faz apropriado ao designar certos parâmetros que irão levar em consideração a atividade natatória do animal, assim como sua movimentação para analisar se houve a restrição da locomoção, resultando em um animal mais estático ou se, seu nado continua demonstrando um padrão regular (Gebauer *et al.*, 2011).

Os resultados apresentaram que todas as doses de CM6 se comportaram de maneira diferente do controle negativo (DMSO3%) (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs DMSO3%) demonstrando uma diferença significativa (Fig. 1).



**Fig. 1.** Efeito da CM6 no comportamento locomotor do peixe-zebra adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de *Tukey*. (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ; vs. Controle).

Os resultados demonstram (Fig. 2) que todas as concentrações da CM6 apresentaram diferença significativa do controle negativo (DMSO 3%) corroborando com a ocorrência de uma possível reversão do comportamento natural ansioso do animal. Além disso, todas as concentrações e em especial a concentração de 0,5 mg/ml revelaram resultados semelhantes ao comportamento apresentado pelo controle positivo Diazepam evidenciando um potencial efeito ansiolítico, com animais que ficaram um maior tempo na zona clara do aquário.

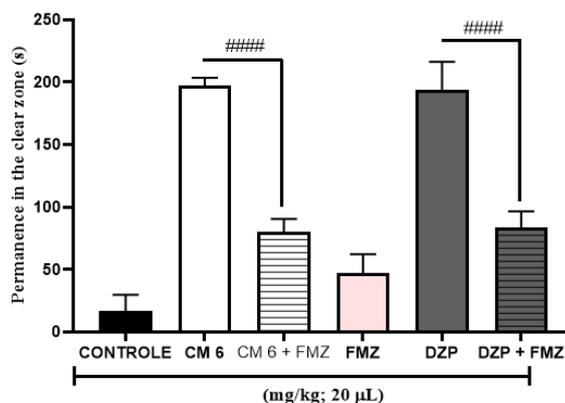


**Fig. 2** – Teste de claro/escuro CM6. Efeito ansiolítico das amostras em zebrafish (*Danio rerio*) adulto pelo Teste do Claro/ Escuro (0-5min). Controle (DMSO 3%; 20  $\mu$ L; *i.p.*); Dzp – Diazepam (1,0 mg/mL; *i.p.*). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de *Tukey*. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um mensageiro químico que transmite informações de um neurônio para outro, regulando o sistema nervoso. Ele é considerado o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central, sendo liberado por neurônios chamados Gabaérgicos e se conecta a receptores específicos dos outros neurônios. Dentre os seus receptores, o receptor do ácido  $\gamma$ -aminobutírico do tipo A (GABAA) é o receptor de ação rápida mais amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. Os receptores GABAA são canais iônicos pentaméricos transmembranares e apresentam alta heterogeneidade entre suas subunidades. Quando estes receptores são ativados pelo neurotransmissor GABA, permitem a passagem de íons cloreto para dentro dos neurônios, resultando em uma hiperpolarização destas células, as tornando menos reativas a neurotransmissores excitatórios, ou seja, esses neurônios receptores passam então por uma diminuição na condução neuronal, provocando a inibição do sistema nervoso. Os receptores GABAA são alvos de vários grupos farmacológicos com propriedades anestésicas e sedativas (Smith, 2005).

Para investigar o mecanismo de ação da CM6 (0,5 mg/mL) que apresentou efeito ansiolítico (melhor concentração efetiva no teste de claro/escuro) analisamos o mecanismo de neuromodulação da ansiedade via GABA<sub>A</sub>. De modo geral, esperasse que durante o teste de neuromodulação o antagonista flumazenil promova o bloqueio dos receptores gabaérgicos impedindo que a amostra atue nos mesmos, desse modo, os animais, que naturalmente apresentam comportamento ansioso continuam exibindo tal conduta. Nesta perspectiva, a amostra CM6 (0,5 mg/mL, Fig. 3) teve seu efeito ansiolítico neuromodulado pelo receptor

GABA<sub>A</sub> por apresentar diferença estatística significativa entre a amostra e a amostra mais o antagonista flumazenil (CM6 ## $p < 0,01$  vs CM 6cON+Fmz; Fig 3), ou seja, o efeito ansiolítico foi bloqueado pelo flumazenil.



**Fig. 3** - Mecanismo de ação ansiolítica via GABA da amostra **CM6 (0,5mg/ml)**. (*Danio rerio*) adulto no Teste do Claro & Escuro (0-5min). Controle – DMSO 3% (20 µL; *i.p.*). DZP – Diazepam (1,0 mg/mL; 20 µL; *i.p.*). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (## $p < 0,01$  vs. Fmz + CM 5; ### $p < 0,01$  vs. Fmz +DZP).

## Conclusão

Os experimentos concluíram que em todas as doses a amostra CM6 não foram tóxicas, e não causaram alteração na locomoção dos animais. Quanto ao seu possível efeito ansiolítico, a dose testada de 20 mg/kg da CM6 promoveu comportamento semelhante ao Diazepam, um dos maiores ansiolíticos utilizados para o controle da ansiedade, demonstrando a ocorrência de um possível efeito ansiolítico pela amostra, além disso, a amostra apresentou atuação pela via GABA<sub>A</sub>.

## Agradecimentos

Agradecimento ao Laboratório de Bioensaios Químico-Farmacológico e Ambiental pelo auxílio nos testes e a Universidade Estadual do Ceará pelo espaço para a realização deste trabalho e ajuda financeira.

## Referências

- ARELLANO-AGUIAR, O., et al. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. *Journal of FisheriesSciences*, v. 9, n. 4, p. 52, 2015.
- BENNEH, C. K. et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish- Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *J. Ethnopharmacol.*, v. 207, p. 129–145, 2017.
- FERREIRA, M. K. A., Da Silva, A. W., dos Santos Moura, A. L., Sales, K. V. B., Marinho, E. M., Cardoso, J. N. M., Marinho, M. M., Bandeira, P. N., Magalhães, F. E. A., Marinho, E. S., De Menezes, J. E. S. A., & Dos Santos, H. S. (2021). Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. *Epilepsy Behav.*, 117, 107881. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107881>
- GEBAUER, D. L., Pagnussat, N., Piato, Â. L., Schaefer, I. C., Bonan, C. D., & Lara, D. R. (2011). Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021>
- GONÇALVES, N. G. G. et al. Protein fraction from Artocarpus altilis pulp exhibits antioxidant properties and reverses anxiety behavior in adult zebrafish via the serotonergic system. *JFF*, v. 66, p. 1-12, 2020
- GUIMARÃES, D. G. et al. Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática. *Rev. Virtual Quim*, v. 9, n. 6, p. 2551-2592, 2017.



MAGALHÃES FEA et al. Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception, **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 422–42. 2017.]

SILVA A.W. da; Ferreira M.K. A.; Rebouças E.L.; Silva C.O.; Holanda C.L.A.; Barroso S.M.; Reis J.; Batista F.L.A.; Mendes R.S.; Campos A.R.; Eire J.; Menezes S.A. De; Ernani F.; Magalhães A.; Siqueira S.M.C. Anxiolytic-like effect of *Azadirachta indica* A . Juss . ( *Neem* , *Meliaceae* ) bark on adult zebrafish ( *Danio rerio* ); participation of the Serotonergic and GABAergic systems. *Pharm. Pharmacol. Int. J.*, 2020, volume 8, pp. 256–263.

ZAMIGNANI DR, Banaco, RA. Um panorama analítico-comportamental sobre os transtornos de ansiedade. *Rev Bras Ter Comport Cogn.* 2005; 7 (1):77-92