

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DA FORMALINA PARA AVALIAR NOCICEPÇÃO  
EM *Danio rerio* E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO  
BRUTO DE *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems.**

Dissertação de Mestrado apresentada por

WANDERSON PRAXEDES SANTOS

SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2016

WANDERSON PRAXEDES SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DA FORMALINA PARA AVALIAR NOCICEPÇÃO  
EM *Danio rerio* E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO  
BRUTO DE *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems.**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiani Isabel Banderó Walker**

SÃO CRISTÓVÃO - SE  
2016

### Ficha catalográfica

Santos, Wanderson Praxedes

Padronização do teste da formalina para avaliar nocicepção em *Danio rerio* e avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto de *Sinningia warmingii* (*hiern*) *chautems*, São Cristóvão, 2016

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiani Isabel Banderó Walker

Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Sergipe. Pró-Reitoria de Pós- Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Atividade antinociceptiva 2. *Sinningia warmingii*, 3. Zebrafish, 4. Teste da formalina

WANDERSON PRAXEDES SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DO TESTE DA FORMALINA PARA AVALIAR NOCICEPÇÃO  
EM *Danio rerio* E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO  
BRUTO DE *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems.**

Dissertação apresentada a Universidade  
Federal de Sergipe, como parte das exigências  
para a obtenção de título de Mestrado

São Cristóvão- SE, 27 de Janeiro de 2016

Aprovada em: 27/01/2016

  
Orientador: Profa. Dra. Cristiani Isabel Banderó Walker

  
1º Examinador: Profa. PhD. Rosilene Moretti Marçal

  
Examinador: Prof. Dr. Josemar Batista de Sena

## RESUMO

A dor representa uma sensação desagradável, mas é fundamental para a sobrevivência do indivíduo, devido a sua função protetora. Apesar disso, devido seu caráter incapacitante em certas condições patológicas, tem-se buscado substâncias analgésicas eficazes com poucos efeitos adversos. Neste contexto, as plantas representam uma importante fonte para a busca de novas moléculas analgésicas. Para isto a pesquisa etnofarmacológica é fundamental. A *Sinningia warmingii* pertencente a família Gesneriaceae é uma espécie de uso tradicional importante para o tratamento da dor nas regiões sul e suldeste do Brasil. Entretanto, existem poucos estudos que demonstrem a eficácia analgésica desta planta. Assim, nosso estudo propõe a avaliação das propriedades antinociceptivas desta planta utilizando como modelo animal o *zebrafish*. As respostas comportamentais do *zebrafish*, induzidas pela injeção subcutânea de formalina em diferentes concentrações na cauda do peixe foram avaliadas através dos seguintes parâmetros: tempo de freezing (s), tempo de permanência no fundo do aquário (s) e distância percorrida (cm), os quais indicam alterações na atividade natatória. Observamos que a formalina 0,1% obteve uma melhor resposta nociceptiva em *zebrafish*. Além disso, a morfina (3mg/kg) foi capaz de reverter significativamente as alterações na atividade natatória provocados pela formalina 0,1%. O extrato da *Sinningia warmingii* (0,3; 1 e 3 mg/kg; i.p.) também reverteu estes comportamentos de maneira dose-dependente. Estes resultados demonstraram que *Sinningia warmingii* apresenta atividade antinociceptiva em *zebrafish*, confirmando a atividade antinociceptiva indicada pelo uso popular.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva, *Sinningia warmingii*, *zebrafish*, teste da formalina.

## ABSTRACT

The pain is an unpleasant feeling, but it is critical to the individual's survival, given its protective function. However, due to their disabling character in certain pathological conditions have been sought effective analgesic drugs with fewer adverse effects. In this context, the plants represent an important source for finding new analgesic molecules. For this the ethnopharmacological research is fundamental. The *Sinningia warmingii* belonging to Gesneriaceae family is a plant of important traditional use for the treatment of pain in southern and south-east of Brazil. However, there are few studies that demonstrate the analgesic efficacy of this plant. Thus, our study proposes the evaluation of the antinociceptive properties of this plant using the *zebrafish* as an animal model. The behavioral responses of *zebrafish* induced by subcutaneous injection of formalin in different concentrations in the fish's tail were evaluated using the following parameters: time of freezing (s), permanence time in the tank bottom (s) and distance traveled (cm) which indicate changes in the swimming activity. We observed that 0.1% formalin got better nociceptive response in *zebrafish*. Furthermore, morphine 3 mg / kg was able to significantly reverse the change in swimming activity induced by formalin 0.1%. The *Sinningia warmingii* extract (0.3, 1 and 3 mg / kg; ip) also reversed these behaviors dose-dependent manner, confirming its antinociceptive activity indicated by the popular use.

Keywords: Pain, Antinociceptive activity, *Sinningia warmingii*, *Zebrafish*, Formalin test.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de <i>Danio rerio</i> da linhagem selvagem. ....	7
Figura 2 - Regiões onde se injetam substâncias nocivas para desencadear o processo doloroso em experimentos de analgesia em <i>zebrafish</i> . ....	12
Figura 3- Tuberculos da <i>Sinningia warmingii</i> .....	15
Figura 5 - Indicação (seta) da região adiposa da nadadeira caudal do <i>zebrafish</i> .....	20
Figura 6 - Esquema da sequência experimental para avaliar atividade natatória em <i>zebrafish</i> para padronização teste da formalina.....	22
Figura 7 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$ de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> nas fases FN, FI1 e FI2 sobre o comportamento nociceptivo aferido como $\Delta$ da permanência na zona inferior do aquário (s). ....	25
Figura 8 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$ de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> nas fases FN, FI1 e FI2 sobre o comportamento nociceptivo aferido como $\Delta$ do tempo de freezing (s). ....	26
Figura 9 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$ de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> nas fases FN, FI1 e FI2 sobre o comportamento nociceptivo aferido como $\Delta$ do distância percorrida (cm). ....	28
Figura 10 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como $\Delta$ da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2	29
Figura 11 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como $\Delta$ do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2. ....	30
Figura 12 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como $\Delta$ da	

distância percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	31
Figura 13 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como $\Delta$ da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	32
Figura 14 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como $\Delta$ do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	33
Figura 15 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como $\Delta$ da distância percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ l de formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	34
Figura 16 – Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> 3 mg/kg e morfina 3 mg/kg, aferido como $\Delta$ da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ l de formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	35
Figura 17 - Comparação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> 3 mg/kg e Morfina 3 mg/kg, aferido como $\Delta$ do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	36
Figura 18 - Comparação do efeito nociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> 3 mg/kg e Morfina 3 mg/kg, aferido como $\Delta$ da distancia percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do <i>zebrafish</i> , nas fases FN, FI1 e FI2.....	37



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Divisão de grupos por tratamento (i.p.) e administração na região adiposa caudal (s.c.) -----Pág 20

Quadro 2 - Comportamentos observados na padronização da concentração de formalina, por grupo e por fase do teste da formalina -----Pág.24

## LISTA DE ABREVIATURAS

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina ( $\alpha$ )

FAE - Fase de Aclimação Experimental

FI1 - Fase Inflamatória 1

FI2 - Fase Inflamatória 2

FN - Fase Neurogênica

s - segundos

SNC - Sistema Nervoso Central

$\Delta$ DP -  $\Delta$  da Distância Percorrida ( $\alpha$ ) em centímetros (cm).

$\Delta$ PZI -  $\Delta$  da Permanência na Zona Inferior do Aquário em segundos

$\Delta$ TF -  $\Delta$  do Tempo de "Freezing" em segundos

Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)

SUS - Sistema Único de Saúde

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1 Dor e nocicepção.....	3
2.2 Evidência de dor em peixes.....	4
2.3 - <i>Danio rerio</i> .....	6
2.4 – Indicadores e parâmetros envolvidos na percepção da dor em peixes .....	10
2.5 - Teste da formalina em animais.....	11
2.6- Uso de plantas para o tratamento farmacológico da dor.....	13
2.7 - <i>Sinningia warmingii</i> ( <i>Hiern</i> ) <i>Chautems</i> .....	14
3- OBJETIVOS .....	17
3.1- Objetivo geral .....	17
3.2 - Objetivos específicos.....	17
4. METODOLOGIA .....	18
4.1 - Animais .....	18
4.2 - Obtenção do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> ( <i>Hiern</i> ) <i>Chautems</i> .....	18
4.3 - Aclimação no aquário teste.....	18
4.4 - Drogas e Tratamentos.....	19
4.5 - Teste da formalina .....	19
4.6.2- Avaliação de alterações comportamentais.....	22
4.7 - Análise estatística .....	22
5- RESULTADOS.....	23
5.1- Avaliação comportamental na Fase Neurogênica (FN), Fase Inflamatória 1(FI1) e Fase Inflamatória 2 (FI2).....	23
5.2- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ da Permanência na Zona Inferior do Aquário ( $\Delta$ PZI) em segundos (s) .....	24

5.3- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ do Tempo de "Freezing" ( $\Delta TF$ ) em segundos (s).....	25
5.4- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ da Distância Percorrida ( $\Delta DP$ ) em centímetros (cm).....	27
5.5- Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina no teste da formalina em <i>zebrafish</i> .....	28
5.6- Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da <i>Sinningia warmingii</i> no teste da formalina em <i>zebrafish</i> .....	31
6. DISCUSSÃO .....	38
7- CONCLUSÃO .....	45
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## 1- INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), o termo dor conceitua-se como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada à lesão tecidual real ou potencial, que envolve a transdução de estímulos nocivos ambientais e o processamento cognitivo pelo encéfalo. É uma consequência fisiopatológica de diversas morbidades e de suas repercussões, mas que na maioria das vezes configura-se como uma função protetora, representando, em muitos casos, o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças (OLIVEIRA et al., 2009).

Quanto aos fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico e/ou antiinflamatório ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Assim, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (RANG et al., 2012).

Para isto, a compreensão de estratégias de tratamento da dor em estudos pré-clínicos requer a padronização de métodos já conhecidos, utilizando espécies animais que possibilitem a triagem de extratos vegetais com potencial analgésico. O modelo animal escolhido deve reproduzir vários aspectos fisiológicos, comportamentais e bioquímicos dos seres humanos para se adequarem a uma série de requisitos que garantam a sua eficácia e utilidade (STEWART et al., 2011).

Neste contexto, o *Danio rerio* surge como um modelo que atende a esses requisitos, sendo bastante útil para o estudo das funções neurocomportamentais da dor. O *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish*, paulistinha ou peixe-zebra, é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas (BEST E ALDERTON, 2008), e ainda para a triagem e descoberta de novos fármacos (MÁLAGA-TRILLO et al., 2011; TAKAKI et al., 2012; YU et al., 2012). O interesse pela espécie pode ser observado pelo número crescente de grupos de pesquisa que o utilizam como modelo experimental, com a vantagem de ser uma espécie filogeneticamente próxima aos humanos (PIATO et al., 2011; HEUR et al., 2012).

Algumas características indicam esta espécie para estudo de nociceção e estão relacionadas à identificação de quatro tipos de receptores opioides, os quais exibem um elevado grau de semelhança com os receptores opioides  $\delta$ ,  $\mu$  e  $\kappa$  dos mamíferos com um padrão de distribuição (ALVAREZ et al., 2006; BARRALLO et al., 2000; BARRALLO et al., 1998a, b). Além disto, as respostas comportamentais frente a um evento potencialmente doloroso (injeção de ácido) que promovem a diminuição da atividade natatória são facilmente visualizadas dentro de um ambiente controlado como tanques transparentes (ASHLEY et al., 2009).

Assim, o *zebrafish* mostra-se um modelo útil para a triagem de extratos e partições de plantas com promissora atividade antinociceptiva, a exemplo da *Sinningia warmingii* (Hiem) Chautems, uma espécie endêmica nas regiões sul e suldeste do Brasil, conhecida como batata-de-índio, utilizada pela população para o tratamento de processos dolorosos e inflamatórios (CHAUTEMS et al., 2000).

Esta planta pertence à família *Gesneriaceae*, que compreende cerca de 3.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais ao redor do mundo. Apenas alguns estudos sobre atividades biológicas têm sido realizados com espécies desta família, que confirmaram as propriedades analgésica e anti-inflamatória sugeridas pelas comunidades étnicas que as utilizam. Quanto ao estudo fitoquímico, o total de 300 compostos foram relatados em algumas espécies, incluindo flavonóides, terpenos e esteróides, glicosídeos fenólicos, compostos fenólicos simples, quinonas, lignanas, xantonas (VERDAN e STEFANELLO, 2012).

Considerando que estudos prévios revelaram propriedades analgésicas para os extratos e alguns compostos isolados de plantas da família *Gesneriaceae* e a importância de produtos naturais como fonte de novas substâncias analgésicas, propõe-se avaliar as propriedades antinociceptivas do extrato bruto dos tubérculos da *Sinningia warmingii*, indicadas pelo uso popular. Para esta avaliação decidimos primeiro padronizar o teste da formalina utilizando o *zebrafish*, uma vez que este método de avaliação nociceptiva ainda não foi investigado nesta espécie de peixe e não existem dados na literatura sobre a sua utilização para a triagem de plantas com potencial antinociceptivo.

## 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Dor e nocicepção

A dor é um dos sinais cardinais da inflamação e segundo a IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor, ela pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano tecidual real ou potencial. Além de envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva, incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (KLAUMANN et al., 2008).

A sensação dolorosa envolve mecanismos periféricos pois origina-se na ativação dos nociceptores aferentes, que são pequenos terminais nervosos livres localizados em vários tecidos corporais como pele, vísceras, vasos sanguíneos e fibras do músculo esquelético, responsáveis pela detecção e transmissão da informação frente a um potencial dano tecidual (MACHIN, 2007). Estes nociceptores estão associados a pelo menos três tipos de fibras responsáveis pela transmissão do estímulo doloroso. As fibras A $\beta$  são intensamente mielinizadas, possuem maior diâmetro (10  $\mu$ m), apresentam maior velocidade de condução (30-100 m/s) e estão associadas a estímulos mecânicos e térmicos intensos. Entretanto, a maioria dos nociceptores está associada às fibras de pequeno (0,4-1,2  $\mu$ m) e médio diâmetro (2-6  $\mu$ m), que constituem respectivamente as fibras C, não mielinizadas, e as fibras A $\delta$ , pouco mielinizadas. Estas fibras estão associadas a respostas a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (LIVINGSTON, 2000; PELLEGRINO, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001; MILLAN, 2002).

A transmissão do estímulo doloroso pode seguir duas direções: a dos neurônios motores dos músculos flexores, provocando ações reflexas (transmissão espinhal) ou seguir pelas estruturas supra-espinhais, provocando diferentes e variadas reações por todo o corpo (PELLEGRINO, 2000; FERREIRA, 2008).

A percepção ao nível central atribui emoções à experiência dolorosa, sendo responsável pelas respostas comportamentais que se referem ao processo afetivo-motivacional (ALMEIDA et al., 2004; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008). Portanto, a dor é uma experiência complexa que envolve não somente a transdução de estímulos nocivos provenientes do ambiente em que o indivíduo está inserido, mas

também o processamento cognitivo e emocional desta informação transduzida, por estruturas supra-espinhais (JULIUS e BASBAUM, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

O processo doloroso está envolvido também com a liberação de substâncias químicas moduladoras. O principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores é o glutamato, embora as fibras sejam também sensibilizadas por outras substâncias químicas endógenas liberadas no ambiente tecidual em condições anormais como a acetilcolina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, tomboxanos, ions  $K^+$ , neuropeptídeo Y, substância P, histamina, citocina (interleucinas e  $TNF-\alpha$ ), leucotrieno e purinas que são liberadas de células lesadas, leucócitos, mastócitos e plaquetas em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos e/ou isquêmicos (FANTONI; MASTROCINQUE, 2002, LUIZ, 2007). Isto mostra que a dor tem papel fundamental na proteção dos indivíduos. Enquanto que a dor aguda está envolvida com mecanismos de proteção que previnem danos futuros e possibilitam o reparo tecidual, a dor crônica tem menor ou nenhum valor de proteção, produz mudanças no sistema nervoso e pode intensificar e alterar produções sensoriais, resultando em alterações fisiológicas, metabólicas e imunológicas, ameaçando a homeostasia e contribuindo para doença e morte (MUIR, 2001).

Quando são realizados experimentos com metodologias que empregam estímulos dolorosos em animais é possível detectar reações comportamentais compatíveis com a sensação dolorosa, que resultam da ativação das vias nociceptivas através da liberação de substâncias químicas moduladoras. Entretanto, não é possível determinar objetivamente os componentes subjetivos da dor, uma vez que os animais não são capazes de se expressar verbalmente. Portanto, é possível denominar tais reações em animais experimentais como nocicepção, a qual não leva em consideração o componente emocional da sensação dolorosa (ALMEIDA et al., 2004). Logo, termos como dor e analgesia são empregados para estudos em humanos, enquanto que nocicepção e antinocicepção são mais utilizados para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório (KANDEL et al., 2003).

## **2.2 Evidência de dor em peixes.**

Todos os animais possuem componentes neuroanatômicos e neurofarmacológicos necessários para a transmissão, a tradução e a percepção dos estímulos nocivos (MACHIN, 2007). Porém, o grau de mobilização do organismo em



resposta ao estímulo é variável e depende da evolução do sistema nervoso, podendo manifestar-se como um ato reflexo comandado pela medula espinal ou por um sistema ganglionar passando pela experiência emocional (HOFFMANN, 2008).

Os componentes anatômicos, fisiológicos e bioquímicos básicos de percepção da dor que existem em mamíferos também existem em espécies não mamíferas, sugerindo que estas espécies têm a capacidade de sentir dor por possuírem componentes neurológicos apropriados para elucidar potenciais de ação responsáveis pelos estímulos doloroso, bem como são capazes de sintetizar substâncias endógenas que modulam a dor (MACHIN, 2007).

Alguns estudos têm demonstrado a percepção dolorosa em peixes. Os teleósteos apresentam tanto as áreas cerebrais quanto as conexões necessárias para o processamento da informação nociceptiva. Neles, assim como em outras espécies, os principais tratos envolvidos na nocicepção são os tratos trigeminal, que leva a informação da região da cabeça, e o trato espinotalâmico, que conduz a informação de todas as outras partes do corpo para o encéfalo (SNEDDON, 2004).

Da mesma forma que em mamíferos, o nervo trigeminal está relacionado com o processamento de informações mecânicas, químicas e nociceptivas das regiões oral e facial dos peixes (SNEDDON, 2003b). Nestes, o trato trigeminal se projeta para regiões encefálicas relevantes como tálamo, cerebelo, e bulbo, os quais também estão envolvidos na dor e na nocicepção em mamíferos. Já a via espinhal ascendente, conecta-se com a formação reticular, núcleo motor dorsal do vago, bulbo, cerebelo, *nucleus intercollicularis* e tálamo (SNEDDON, 2002).

Sneddon (2003b) verificou que a maioria das fibras aferentes primárias em teleósteos são do tipo A $\delta$ , mas fibras do tipo C também estão presentes no nervo trigeminal. Estudos eletrofisiológicos mostraram que os nociceptores polimodais achados nesta espécie apresentam propriedades similares (diâmetro das fibras, velocidade de condução, dentre outras) àquelas encontradas nos mamíferos.

Contudo, existe uma quantidade muito inferior de fibras do tipo C no nervo trigeminal quando comparados a outros animais (SNEDDON, 2002). Tipicamente, as fibras C compreendem 50% a 60% do total de fibras deste nervo em mamíferos, sendo que os teleósteos apresentam apenas 4 % dessas fibras (LYNN, 1994). Esse número reduzido de fibras C em peixes, e o aumento de sua proporção nos vertebrados terrestres, podem ser explicados evolutivamente pela passagem do modo de vida aquático para o modo de vida terrestre. Os vertebrados terrestres

podem estar sujeitos a uma maior chance de injúria devido à força da gravidade, gases nocivos, temperaturas extremas. Ao invés disso, no ambiente aquático, a flutuação contém a gravidade, as substâncias químicas podem ser diluídas e não existem grandes variações de temperatura como as que ocorrem em terra (SNEDDON, 2004).

Ainda, em várias espécies de peixes foram encontrados um grande número de nociceptores espalhados na região da cabeça, da boca e ao redor das guelras (SNEDDON et al., 2003a), bem como nas nadadeiras caudais, dorsais e peitorais, sendo as regiões onde se injetam substâncias nocivas para desencadear o processo doloroso em experimentos de analgesia (CHERCHOVA et al., 1997).

Nociceptores foram caracterizados pela primeira vez em peixes teleósteos em 2002, e o trabalho posterior mostrou que eles são fisiologicamente idênticos aos dos mamíferos, respondendo ao calor extremo, pressão mecânica e substâncias nocivas (ácido acético e veneno de abelha) (ASHLEY et al., 2007; SNEDDON 2003a, 2004; SNEDDON et al., 2003a).

Outro fator relevante para determinar a nocicepção em peixes é a determinar se são capazes de sintetizar receptores opioides endógenos e endorfinas, pois estas substâncias estão fortemente envolvidas na rede neural relacionada com a dor em mamíferos. Assim, identificar a presença desses receptores e peptídeos endógenos é um fator crucial para saber se a nocicepção ocorre também em peixes (GONZALEZ-NUNEZ e RODRÍGUEZ, 2009).

Foram identificados receptores opioides no cérebro de teleósteos (ALVAREZ et al., 2006) bem como substâncias endógenas como a imuno-encefalina na medula espinhal (SNOW et al., 1996) com um padrão de distribuição semelhante aos outros vertebrados. Os receptores opioides em peixes estão presentes nas regiões neurais envolvidos no processamento da informação nociceptiva, como medula espinhal, núcleo da rafe, formação reticular, substância cinzenta periaquedutal e tálamo (GONZALEZ-NUNEZ e RODRÍGUEZ 2009). Assim, esses dados sugerem que os peixes podem ser úteis como um modelo animal adequado para estudo de nocicepção.

### **2.3 - *Danio rerio***

A grande complexidade da biologia humana exige investigação e ensaios em animais que apresentam semelhanças com os seres humanos com o objetivo de

atingir resultados confiáveis e eficazes. Para o estudo de um fenômeno fisiopatológico em particular ou o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, bons modelos animais devem reproduzir vários aspectos fisiológicos para se adequarem a uma série de requisitos que garantam a sua eficácia e utilidade. Além disso, deve haver uma correlação entre o comportamento, aspectos bioquímicos e fisiológicos no modelo animal escolhido. Por isso é essencial validar um novo modelo experimental (PIATO et al., 2011; STEWART et al., 2011).

A maioria dos experimentos com modelos animais utilizam roedores, e para os novos modelos experimentais é essencial que utilizem animais filogeneticamente mais próximos aos humanos, a exemplo do *Danio rerio* (SNEDDON, 2009).

O *Danio rerio*, também conhecido como paulistinha ou *zebrafish* (Figura 1), é um pequeno teleósteo (3-5 cm) que pertence à família Cyprinidae, a família de vertebrados mais rica em espécies. É um peixe tropical de água doce cujo habitat natural centraliza-se no nordeste da Índia em plantações de arroz adjacentes ao rio Ganges. Este peixe caracteriza-se por um padrão de coloração distinto, baseado em listras horizontais, claras e escuras e alternadas (LIU e LEACH, 2011; SPENCE et al., 2000).



Figura 1 - Exemplares de *Danio rerio* da linhagem selvagem.

Fonte: <http://www.uniprot.org/taxonomy/7955>

Inicialmente, o foco da pesquisa com *zebrafish* estava na área de biologia do desenvolvimento, refletindo as diversas vantagens que o tornam interessante para a realização de pesquisas, tais como, um ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, embriões transparentes, fecundação e reprodução externas que geram grandes quantidades de ovos. Estes exigem pouco espaço para a sua manutenção, tem baixo custo e fácil observação comportamental (GUO, 2004; LIU e LEACH, 2011).

O *zebrafish* tornou-se um dos mais importantes modelos de vertebrados ao longo da última década exercendo um papel cada vez mais expressivo na área da pesquisa para muitas áreas da biologia, genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia, medicina, investigação de doenças humanas e para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos (XIA et al., 2012).

O genoma do *zebrafish* foi totalmente sequenciado, destacando que este possui uma elevada homologia genética (70-80%) com roedores e humanos (BARBAZUK et al., 2000), o que torna mais fácil o rastreamento genético em grande escala para investigar doenças humanas relevantes, como a epilepsia, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, quando comparado com outros modelos animais mais complexos, como ratos (XIA et al., 2012).

Considerando ainda que os modelos animais devem facilitar a compreensão de mecanismos biológicos do comportamento humano, ajudando no desenvolvimento de estratégias de tratamento, o *zebrafish* emergiu como um modelo complementar bastante útil para o estudo das funções neurocomportamentais, incluindo funções cognitivas (PIATO et al., 2011; STEWART et al., 2011).

As suas características únicas o tornam uma excelente ferramenta para a análise dos complexos mecanismos do Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que este é bem desenvolvido. A espécie apresenta uma complexidade organizacional com células neuronais especializadas, células gliais e circuitos neuronais semelhantes aos observados em mamíferos, apesar das diferenças no desenvolvimento do telencéfalo e diencefalo (PANULA et al., 2010).

Para viabilizar a utilização do *zebrafish* como modelo experimental no controle da dor, tornou-se essencial identificar os receptores opioides nesta espécie. Em estudos mais detalhados sobre o SNC do *zebrafish*, os principais tipos de receptores opioides que ocorrem em mamíferos foram identificados (STEVENS, 2004). Quatro receptores opioides que mostram alta semelhança de sequência genética com outros receptores em mamíferos foram clonados neste teleosteo: drDOR1 e drDOR2, que exibem um elevado grau de semelhança com receptor opioide  $\delta$  dos mamíferos; drMOR1 que é considerado homólogo do receptor opioide  $\mu$  em mamíferos (BARRALLO et al., 2000) e drKOR1 considerado homólogo do receptor opioide  $\kappa$  dos mamíferos (ALVAREZ et al., 2006).

A análise mais profunda destes receptores indica a existência de sete domínios transmembrana, demonstrando que são membros da superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR). Em geral, os receptores opioides apresentam uma vasta distribuição no cérebro do *zebrafish*, com expressão mais intensa nas regiões envolvida no processamento de informação sensorial e em áreas que fazem parte das vias analgésicas (ALVAREZ et al., 2006; PINAL-SEOANE et al., 2006).

O perfil farmacológico de sítios de ligação de opioides no homogenato de cérebro do *zebrafish* foi estudado usando técnicas de ligação radioativa. O antagonista não seletivo [3H]-diprenorfina mostrou uma ligação de alta afinidade em dois sítios diferentes ( $Kd1 = 0,08$  nM e  $Kd2 = 17,8$  nM), enquanto que o agonista não seletivo [3H]-bremazocina também se liga com alta afinidade aos receptores opioides em *zebrafish*, mas apenas em um sítio de ligação ( $Kd = 1,1$  nM) (GONZALEZ-NUNEZ et al. 2006).

Por outro lado, os agonistas seletivos sintéticos para receptores opioides de mamíferos (DPDPE, 3 DAMGO, 4 e U69, 5935) não conseguem deslocar eficazmente a ligação de [3H]-diprenorfina. Quanto aos agentes não seletivos (tais como naloxona ou morfina) e os peptídeos endógenos opioides (dinorfina A e metencefalina) foram demonstradas boas afinidades (GONZALEZ-NUNEZ et al., 2006).

A conclusão destes estudos sugere que os opioides não-seletivos se ligam de maneira semelhante tanto aos receptores opioides em mamíferos como em *zebrafish*. No entanto, os agentes opioides altamente seletivos com atividade comprovada em receptores homólogos de mamíferos, apresentam reduzida afinidade por receptores opioides do *zebrafish*. Estes resultados sugerem que o sítio de ligação dos receptores opioides é altamente conservada durante a evolução, ao passo que os domínios extracelulares que conferem seletividade aos ligantes são menos conservadas (GONZALEZ-NUNEZ et al., 2007b).

A caracterização dos receptores opioides do *zebrafish* permitiu uma avaliação mais profunda dos seus ligantes endógenos, possibilitando a clonagem e caracterização dos precursores opioides. Foram encontrados genes pro-encefalina (PENK1) (GONZALEZ-NUNEZ et al., 2003a), genes proopiomelanocortina (drPOMC) (GONZALEZ-NUNEZ et al., 2003c), um gene prodinorfina (drPDYN0)

(GONZALEZ-NUNEZ et al. 2007a), e um gene pronociceptina (drPNOC1) (GONZALEZ- NUNEZ et al. 2003b).

Os peptídeos opioides codificados em *zebrafish* estão presentes ou possuem homólogos em mamíferos. Neste contexto, este repertório de peptídeos opioides representa uma nova ferramenta para estudar as complexas interações entre os receptores e o seus ligantes correspondentes (GONZALEZ- NUNEZ et al., 2009).

#### **2.4 – Indicadores e parâmetros envolvidos na percepção da dor em peixes**

A percepção em animais de estímulos que causam dor, tais como pressão mecânica significativa, extremos de temperatura e substâncias nocivas, é facilmente demonstrável. Entretanto medir o componente afetivo negativo em animais, que pode ser descrito como o desconforto, sofrimento ou a consciência da dor é problemático. Contudo, a IASP (1979) acrescenta que "A incapacidade de se comunicar verbalmente não nega a possibilidade de que um indivíduo está experimentando dor "; e isto se aplica aos animais. (SNEDDON, 2009)

As alterações comportamentais que desempenham uma função protetora em resposta a um evento potencialmente doloroso são importantes indicadores de um componente afetivo negativo associado à experiência sensorial. Assim, a capacidade de aprender a evitar o estímulo nocivo é um indicador muito útil para avaliar se um animal está sentindo dor. Experimentos como um estímulo aversivo têm mostrado que peixes também são capazes de aprender a evitar um estímulo nocivo, de maneira semelhante ao que acontece com mamíferos, especialmente roedores (SNEDDON, 2004).

A maioria das mudanças comportamentais em peixes após estímulo nociceptivo ocorre no período imediatamente após o tratamento por até 120 minutos, com pico entre 60 e 90 minutos. Tais mudanças incluem comportamentos anômalos como esfregar a área afetada ("rubbing"), agitação excessiva das nadadeiras peitorais ("rocking") e diminuição da atividade natatória. Esses comportamentos são visíveis e facilmente observáveis quando os ensaios são realizados em tanques transparentes. A alteração da atividade é facilmente mensurável, mas exige uma medida existente do comportamento normal antes do tratamento. Na maioria dos estudos publicados, as observações iniciais ocorrem 15 a 30 minutos antes do tratamento (NEWBY e STEVENS, 2008).

Uma redução na atividade natatória em *zebrafish* também pode ter um papel protetor em termos do gasto de energia, permitindo o desvio desta para recuperação e na prevenção de novos danos e dor (ASHLEY et al., 2009; REILLY et al., 2008; SNEDDON, 2003a). Outros estudos demonstram que a administração de um analgésico como a morfina reduziu significativamente todas as alterações comportamentais descritas acima, demonstrando que elas ocorrem especificamente devido à dor (SNEDDON, 2003b).

Em estudos com a espécie *Oncorhynchus mykiss* e o *zebrafish*, que receberam injeção de ácido acético diluído na parte frontal dos lábios inferiores e superiores, foi verificado que os animais esfregaram a área afetada contra as paredes do tanque teste. Este comportamento tem a função de reduzir a intensidade da sensação nociva, como foi descrito em mamíferos, que esfregam a área afetada para reduzir dor. Em contraste, peixes injetados com solução salina não demonstraram este comportamento (ASHLEY et al., 2009; SNEDDON, 2003a).

## **2.5 - Teste da formalina em animais**

O teste de formalina consiste na aplicação de um estímulo algésico químico, sendo utilizado como ferramenta para modelar uma condição de dor aguda e tônica (MOGIL, 2009). Em roedores, este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal. Após a administração da formalina, o animal apresenta sacudidas rápidas da pata que recebeu a injeção bem como o comportamento de lambar e/ou de leves mordidas (DUBUISSON e DENIS, 1977; MARTINS et al., 2006).

A administração de formalina promove a expressão de respostas comportamentais que seguem um padrão bifásico, dividida em duas fases bem estabelecidas: A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A $\delta$  e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros. (DUBUISSON e DENIS, 1977; MARTINS et al., 2006, MOGIL, 2009)

Nesse teste, dependendo das concentrações de formalina podem ser avaliadas diferentes intensidades de respostas comportamentais. Estudos mostraram que ratos que receberam a injeção de formalina 10% apresentavam maior número e intensidade de respostas comportamentais provocadas pela dor quando comparados com animais que receberam injeção de formalina 0,1% (ALOISI et al.,1995).

O teste da formalina vem sendo adaptado para o estudo da nocicepção em várias espécies de animais como: camundongos (ROSLAND, 1991), gatos (SHIMA et al., 1987), primatas (ALREJA et al., 1984), coelhos (CARLI et al., 1976), crocodilos (KANUI et al., 1990) e anfíbios (OYADEYI et al., 2007). A injeção de formalina induziu uma resposta bifásica em sapos semelhante àquela encontrada em roedores, embora o curso temporal seja um pouco distinto, sugerindo mecanismos fisiológicos diferentes (OYADEYI et al., 2007).

As espécies de peixes *Leporinus macrocephalus* e *Oreochromis niloticus* foram utilizadas em protocolos de nocicepção com a injeção subcutânea de formalina (1%, 3% e 5%) na região subjascente à nadadeira adiposa, próxima à nadadeira caudal. Esta região foi escolhida por ter uma alta concentração de nociceptores, assim como outras regiões tais como a lâmina da nadadeira caudal (Fig.2, região 4), as barbatanas dorsal e peitoral (Fig.2, região 3), a pele ao redor das guelras (Fig.2, região 2) e a região dos lábios (Fig.2, região 1). Nestes estudos, a formalina 3% foi capaz de produzir alterações comportamentais, principalmente em sua atividade locomotora, sugerindo que a injeção subcutânea de formalina é um método eficaz em estudos de nocicepção em peixes(HOLFFMAN et al., 2013).

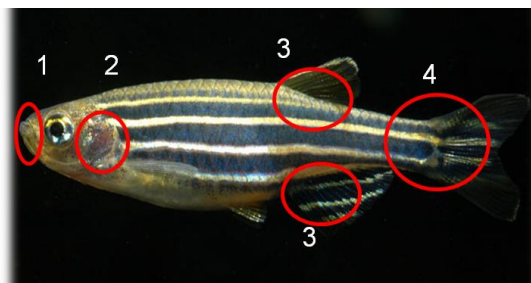


Figura 2 - Regiões onde se injetam substâncias nocivas para desencadear o processo doloroso em experimentos de analgesia em *zebrafish*. Fonte: <http://www.uniprot.org/taxonomy/7955>



Em relação ao *zebrafish*, não existem dados na literatura que mostram a utilização da formalina para se estudar a nocicepção nesta espécie. Logo, é de extrema importância padronizar o método, para saber se o curso temporal e os mecanismos fisiológicos após a aplicação de formalina são semelhantes àqueles obtidos com os roedores.

## **2.6- Uso de plantas para o tratamento farmacológico da dor**

A dor é uma sensação extremamente importante, pois permite a consciência de que a integridade do organismo está sendo ameaçada ou que ocorre alguma disfunção (FERREIRA et al., 2010). Por outro lado, pode trazer consigo consequências desagradáveis como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas, devendo, portanto, ser rápida e efetivamente controlada e tratada (BRENNAN et al., 2007)

Um dos exemplos mais difundidos é o uso da morfina e outros derivados opioides como fármacos de eleição para alívio da dor crônica. Existe uma grande variedade de opiáceos, de acordo com a sua origem e estrutura. Os principais opioides de ocorrência natural são alcaloides do tipo morfina, seguido daqueles com estrutura semelhante à morfina (codeína e tebaína) e, por fim alcaloides benzilisoquinolínicos (papaverina). Opiáceos semissintéticos (heroína, meperidina, oxicodona, buprenorfina e etorfina) têm uma estrutura do tipo morfina, ao passo que opiáceos totalmente sintéticos (metadona, fentanila, tramadol) exibem uma ampla gama de estruturas não relacionadas que apresentam propriedades farmacológicas semelhantes. (GONZALEZ- NUNEZ et al., 2009).

Os opioides, que são potentes analgésicos de ação central e também periférica, além de produzir sedação e hipnose, agem nos mecanismos inibitórios descendentes, inibem diretamente os terminais nociceptivos ou inibem as sinapses nociceptiva espinhais. Atualmente a administração sistêmica de opioides permanece como o meio mais efetivo de aliviar a dor severa em uma ampla gama de situações que incluem dor aguda, inflamatória persistente e neuropática (FALKENBERG, 2007).

Embora sejam altamente eficazes, os analgésicos de ação central geralmente estão associados a efeitos adversos importantes como depressão respiratória, constipação, dependência física, tolerância e vício. Adicionalmente, os antiinflamatórios de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (RANG et al., 2012).

Neste contexto, surge o grande interesse dos pesquisadores na descoberta de novos protótipos de fármacos provenientes de plantas, com mecanismos de ação diferenciados ou com melhor relação risco/benefício que os fármacos atualmente disponíveis no mercado. A diversidade estrutural encontrada na natureza é importante na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos e os produtos naturais constituem uma fonte para a obtenção de novos fármacos (SILVA et al., 2013; CALIXTO, 2001).

Uma das principais ferramentas na busca desses novos modelos moleculares é a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo químico e farmacológico das preparações utilizadas. A variedade de medicamentos fitoterápicos é reflexo do conhecimento da população quanto ao uso e manejo das plantas medicinais no tratamento de doenças (JUSTO e SILVA, 2008).

Há um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, sendo detentor de grande diversidade biológica, com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal (DUTRA, 2009). Um grande avanço nesse sentido é a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Essa política traz em suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que incentiva as pesquisas e dá diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (BRASIL, 2006).

Esse cenário favorece a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos com uso tradicional relevante nas diversas regiões brasileiras, com potencial farmacológico para o tratamento de diversas patologias.

## **2.7 - *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems**

Entre as plantas medicinais de uso tradicional importante no tratamento da dor, destaca-se a *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems (Figuras 3 e 4), uma espécie endêmica nas regiões sul e suldeste do Brasil, conhecida como batata-de-índio, utilizada pela população para o tratamento de processos dolorosos e inflamatórios. Esta planta pertence à família Gesneriaceae, que compreende cerca de 150 gêneros

e 3.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais ao redor o mundo. Constitui-se de ervas, cipós, ou arbustos, freqüentemente com potencial ornamental, devido à beleza de suas flores. Exemplos desta família são freqüentemente usados na medicina tradicional contra febre, problemas respiratórios (tosse, resfriado, gripe), inflamação, feridas, dor, picada de cobra, e doenças infecciosas. No Brasil, existem cerca de 50 espécies e a maioria delas encontra-se nas regiões sudeste e sul, sendo que o centro de diversidade do gênero é o sudeste do Brasil. (CHAUTEMS *et al.*, 2000).



Figura 3- Tuberculos da *Sinningia warmingii*; Figura 4- Inflorescências da *Sinningia warmingii*

Fonte: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia>

Embora várias espécies dessa família sejam utilizadas na medicina popular, há relativamente poucos estudos sobre a composição química das espécies dessa família. As primeiras investigações estavam concentradas na distribuição de compostos para contribuições quimiotaxonômicas, com interesse na composição química da família, de modo que um grande número de metabólitos secundários foi isolado. No total, 300 compostos têm sido relatados em espécies Gesneriaceae, incluindo flavonóides, terpenos e esteróides, glicosídeos fenólicos, compostos fenólicos simples, quinonas, lignanas, xantonas (VERDAN e STEFANELLO, 2012).

Existem apenas alguns estudos sobre atividades biológicas realizados com espécies da família Gesneriaceae. Extratos ou compostos puros foram testados e foram verificadas propriedades analgésicas, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras atividades como redução da hipermotilidade intestinal (VERDAN e STEFANELLO, 2012).

Quanto à espécie *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems os dados sobre sua atividade farmacológica são escassos. Dessa maneira, a importância do nosso estudo se justifica pela investigação das propriedades antinociceptivas do extrato bruto da *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems, no sentido de comprovar as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias indicadas pelo uso tradicional.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1- Objetivo geral**

Realizar a padronização do teste de formalina para a avaliação da nocicepção em *Danio rerio*, além de avaliar o potencial antinociceptivo da *Sinningia warmingii*.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Padronizar a concentração de formalina adequada para avaliar nocicepção em *Danio rerio*, utilizando como parâmetro a observação da atividade natatória.
  
- Caracterizar os parâmetros comportamentais na atividade natatória do *Danio rerio* mediante injeção de formalina.
  
- Caracterizar os parâmetros comportamentais na atividade natatória do *Danio rerio* nas fases nociceptiva e inflamatória do teste da formalina.
  
- Avaliar o potencial antinociceptivo do extrato bruto dos tubérculos da *Sinningia warmingii* através do teste da formalina em *zebrafish*

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 - Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados exemplares de *Danio rerio*, da linhagem selvagem, adultos (3-6 meses), de ambos os sexos, obtidos em lojas de aquarismo da cidade de Aracaju, no estado de Sergipe, Brasil. Eles foram aclimatados por pelo menos 14 dias antes dos experimentos em um aquário de 40L (20-30 animais), a uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , submetidos ao ciclo de claro/escuro de 12:12 horas. Os testes foram realizados entre 11:00 e 15 :00 h. Ao tanque foi fornecido um fluxo contínuo de água e oxigenação. Aos peixes foi fornecida a ração floculada, diariamente, no mesmo horário. A limpeza do aquário era realizada semanalmente. Todos os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética Da Universidade Federal de Sergipe sob o protocolo 03/2015 (CEPAP/PROSGRAP/UFS).

### 4.2 - Obtenção do extrato bruto da *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems.

Os tubérculos da *Sinningia warmingii* foram coletados, lavados, seccionados, pesados e submetidos à maceração a frio, em uma solução etanólica 70%, durante 14 dias com renovação de solvente no sétimo dia. O extrato obtido foi concentrado em um evaporador rotativo à pressão reduzida, à temperatura de 40-50°C. Em seguida, o extrato foi acondicionado em dessecador à vácuo, obtendo-se o extrato bruto. O rendimento foi calculado e o extrato bruto foi armazenado em freezer para posterior realização dos ensaios de atividade antinociceptiva.

### 4.3 - Aclimação no aquário teste.

Neste protocolo, a atividade natatória dos peixes foi avaliada em aquários com forma de trapézio (Figura 4; 15 cm de altura x 28 cm da aresta superior x 23 cm da aresta inferior x 7 cm de espessura) preenchido com 1,5L de água. A área do trapezio é dividida em duas porções iguais: zona superior e inferior. Este aparato é semelhante ao utilizado em estudos de ansiedade em *zebrafish*, sendo um modelo ideal para avaliar a locomoção dos peixes (EGAN et al., 2009; ROSEMBERG et al., 2011, 2012; WONG et al., 2010).

Nos dias dos experimentos, os peixes foram retirados do tanque de 40 L e submetidos a aclimação nos aquários teste o qual foi posicionado entre divisórias laterais revestidas com papel opaco, afim de isolar os peixes de estímulos visuais. A aclimação foi realizada individualmente, durante 15 minutos com o objetivo de eliminar o efeito ansiogênico causado pela exposição ao novo ambiente, conforme utiliza-se em estudos de ansiedade e que pode influenciar as alterações comportamentais no estudo da dor (KIM et al., 2005).

#### **4.4 - Drogas e Tratamentos**

Após os 15 minutos de aclimação, os peixes (n=8) do grupo controle veículo foram submetidos a administração por injeção intraperitoneal (i.p.) de 5 µL de salina, com o auxílio de uma seringa da BD Ultra fine (tamanho da agulha: 6 mm x 0,25 mm). Os peixes dos demais grupos receberam 5 µL das substâncias diluídas em salina pela mesma via. O sulfato de morfina, na dose de 3 mg/kg foi utilizada neste protocolo como controle (SNNEDON, 2003; HOFFMANN et al.,2013). A atividade antinociceptiva da *Sinningia warmigii* foi avaliada utilizando o extrato bruto desta planta nas doses 0,3mg/kg, 1 mg/kg e 3 mg/kg.

A cada administração de substâncias (i.p.) ou ou formalina (s.c.), os peixes foram cuidadosamente retirados da água com auxílio de uma rede de Nylon, colocados em placa de Petri contendo a mesma água e cobertos com uma gaze encharcada com água de modo que a oxigenação não fosse afetada. Uma vez que os peixes não podem permanecer fora da água por mais de 20 segundos, apenas as regiões do abdômem ou da cauda próxima a região adiposa foram expostas. Após cada etapa de injeções, os peixes eram colocados novamente no aquário teste.

#### **4.5 - Teste da formalina**

Após 20 minutos de tratamento, foram injetados por via subcutânea (s.c.) 2 µL de soluções de formalina (3%; 1%; 0,3%; 0,1%; 0,03%, por grupo) na região adiposa da nadadeira caudal dos peixes (Figura 5), com o auxílio de uma seringa da BD Ultra fine (tamanho da agulha: 3 mm x 0,25 mm).



Figura 5 - Indicação (seta) da região adiposa da nadadeira caudal do *zebrafish*

Fonte: <http://www.uniprot.org/taxonomy/7955>

O grupo veículo recebeu injeção de solução salina (0,9%, pH 6,0) na mesma região. As concentrações de formalina utilizadas neste protocolo estão descritas por grupos experimentais relacionados no Quadro 1.

**Quadro 1 - Divisão dos grupos por tratamento.**

Tratamento	Tratamento (i.p.) - 20 min	Injeção na região caudal
SAL + SAL (n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de Salina (0,9%)
SAL + FOR 3 (n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de formalina 3%
SAL + FOR 1 (n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de formalina 1%
SAL + FOR 0,3(n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de formalina 0,3%
SAL + FOR 0,1(n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de formalina 0,1%
SAL + FOR 0,03 (n=8)	5 µL de Salina (0,9%)	2 µL de formalina 0,03%
MOR+ FOR 0,1 (n=8)	5 µL Morfina 3 mg/kg	2 µL de formalina 0,1%
SIN 3+ FOR 0,1 (n=8)	5 µL Extrato seco de <i>Sinningia warmingii</i> 3 mg/kg	2 µL de formalina 0,1%
SIN 1+ FOR 0,1 (n=8)	5 µL Extrato seco de <i>Sinningia warmingii</i> 1 mg/kg	2 µL de formalina 0,1%
SIN 0,3+ FOR 0,1 (n=8)	5 µL Extrato seco de <i>Sinningia warmingii</i> 0,3 mg/kg	2 µL de formalina 0,1%



Imediatamente após a injeção de formalina (s.c.), os peixes foram devolvidos para o aquário teste e a atividade natatória imediatamente avaliada.

#### **4. 6 - Avaliação antinociceptiva**

##### **4.6.1- Avaliação da Atividade natatória**

A avaliação das alterações da atividade natatória dos peixes foi realizada através da mensuração dos parâmetros que indicam a percepção dolorosa: distância percorrida (cm)), tempo de "freezing" (congelamento maior que 5 s) e tempo de permanência na parte inferior do aquário (s) (CORREIA et al.,2011; HOFFMAN et al., 2013).

Durante os experimentos, os peixes foram monitorados através de uma webcam (2.0 Megapixel - acoplada a um computador) posicionada em frente ao aquário a uma distância de 50 cm. O registro em formato de vídeo da atividade natatória de cada peixe foi realizado nos seguintes intervalos de tempo:

- Intervalo 1 - 5 minutos finais da aclimatação no aquário teste antes do início do experimento - Fase de Aclimatação Experimental (FAE)
- Intervalo 2- 0 a 5 min imediatamente após injeção (s.c.) de formalina ou salina, que denominamos Fase Neurogênica - (FN);
- Intervalo 3 - 15 a 20 minutos após injeção (s.c.) de formalina ou salina - Fase Inflamatória 1(FI1);
- Intervalo 4 - 55-60 minutos após injeção (s.c.) de formalina ou salina - Fase Inflamatória 2 (FI2),

Posteriormente, os parâmetros foram analisados por um sistema de leitura de vídeos ANY-MAZE (versão 4.50). Toda sequência experimental está esquematizada na Figura 6.

Para todos os valores dos parâmetros avaliados, a atividade natatória foi expressa como a diferença ( $\Delta$ ) entre os valores registrados nas fases FN, FI1 e FI2 (pós estímulo) e a FAE (pré-estímulo), respectivamente, para cada peixe.

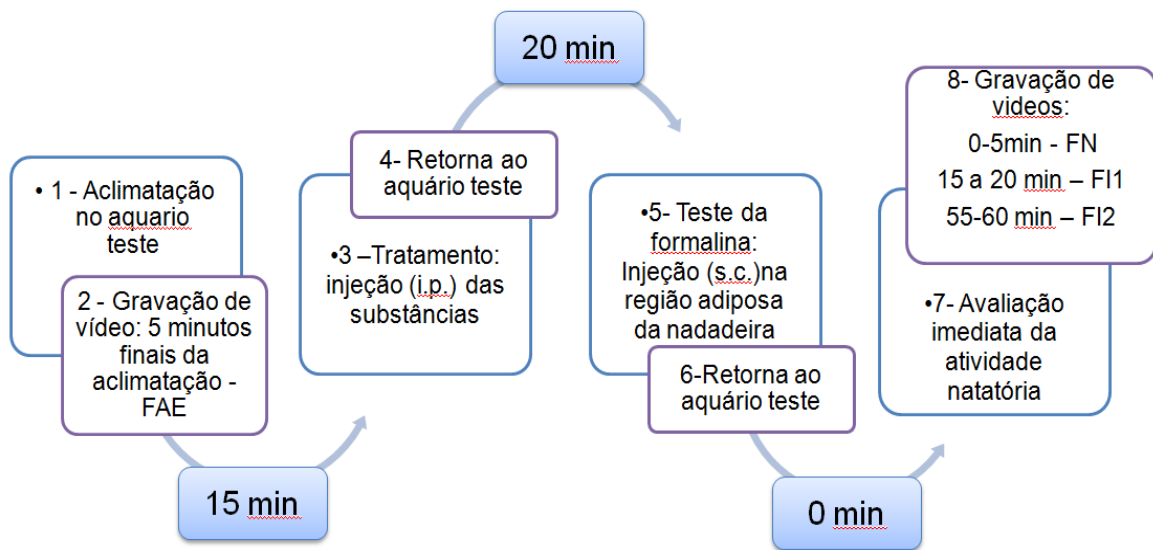


Figura 6 - Esquema da sequência experimental para avaliar atividade natatória em *zebrafish* para padronização teste da formalina

#### 4.6.2- Avaliação de alterações comportamentais.

Para avaliar as alterações comportamentais, observadores treinados registraram a porcentagem de animais que apresentaram movimentos erráticos (nado em zigzag) e perda de equilíbrio (ventre voltado para cima), indicativos robustos de nocicepção em peixes. Adicionalmente, foi registrado também a porcentagem de peixes que foram a óbito (HOFFMAN et al., 2013). Todos os parâmetros foram registrados nas três fases do teste da formalina: FN, F11 e F12.

#### 4.7 - Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste de Tuckey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Avaliação comportamental na Fase Neurogênica (FN), Fase Inflamatória 1(FI1) e Fase Inflamatória 2 (FI2).

O número e a porcentagem de exemplares de *zebrafish* que apresentaram mudanças comportamentais após a injeção de formalina em várias concentrações estão apresentados no Quadro 2. Os parâmetros de alteração da atividade natatória foram avaliados nas fases: FN, FI1 e FI2. Os resultados descritos demonstram que os animais do grupo SAL + SAL não apresentaram qualquer mudança na atividade natatória. Já os animais dos grupos SAL+FOR3%, SAL+FOR1% e SAL+FOR0,3% apresentaram alterações em todos os comportamentos avaliados na fase FN, mas morreram em menos de 10 minutos, impossibilitando o uso destas concentrações para avaliação nociceptiva nas fases FI1 e FI2.

Quanto ao grupo que recebeu formalina 0,1% (SAL + FOR0,1%), todos os animais apresentaram, em todas as fases, os seguintes comportamentos anômalos: perda de equilíbrio e nado em zig zag, indicadores robustos de nocicepção em peixes. Além disto, os animais deste grupo permaneceram vivos, permitindo a avaliação da atividade natatória nas fases FI1 e FI2.

No grupo de animais que receberam formalina 0,03% (SAL + FOR0,03%) nenhum apresentou alterações da atividade natatória, em todas as fases avaliadas, demonstrando comportamento similar ao grupo SAL + SAL.

Uma vez que as concentrações 0,1% e 0,03% possibilitaram a avaliação de todos os parâmetros em todas as fases do teste da formalina, decidimos utilizá-las para prosseguir com a padronização do método.

**Quadro 2 - Comportamentos observados na padronização da concentração de formalina, por grupo e por fase do teste da formalina.**

Grupos	Fase Neurogênica			Fase Inflamatória 1			Fase Inflamatória 2		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
<b>SAL + SAL</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>SAL + FOR 3</b>	100%	100%	0%	-	-	100%	-	-	100%
<b>SAL + FOR 1</b>	100%	100%	0%	-	-	100%	-	-	100%
<b>SAL + FOR 0,3</b>	100%	100%	0%	-	-	100%	-	-	100%
<b>SAL + FOR 0,1</b>	100%	100%	0%	100%	100%	0%	100%	100%	0%
<b>SAL + FOR 0,03</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Legenda: P1 - Parâmetro 1: Perda de equilíbrio (ventre voltado para cima); P2- Parâmetro 2: Nado em zigzag; P3- Parâmetro 3: Óbito. Dados expressos como porcentagem (%).

## **5.2- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ da Permanência na Zona Inferior do Aquário ( $\Delta$ PZI) em segundos (s).**

Através dos resultados apresentados nas Figura 7, foi possível observar que não houve diferença estatística entre os valores de  $\Delta$ PZI dos grupos SAL + SAL e SAL + FOR0,03%, em todas as fases do teste da formalina. Entretanto, ocorreu um aumento significativo nos valores do  $\Delta$ PZI para o grupo SAL + FOR em relação ao grupo SAL + SAL, indicando que a concentração de formalina a 0,1% foi a única capaz de aumentar de maneira significativa o tempo de permanência na zona inferior do aquário.

Na comparação entre as três fases do teste da formalina dentro de cada grupo, foi observado que o grupo SAL + FOR 0,1% foi o único no qual ocorreu um aumento significativo do  $\Delta$ PZI nas fases FI1 e FI2, em relação a fase FN. Na avaliação dentro dos grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,03% não foi observada esta diferença. Isto demonstra que o tempo de permanência no fundo do aquário é

significativamente maior nas fases inflamatórias FI1 e FI2 nos animais que receberam injeção de formalina 0,1%, em comparação a fase FN.

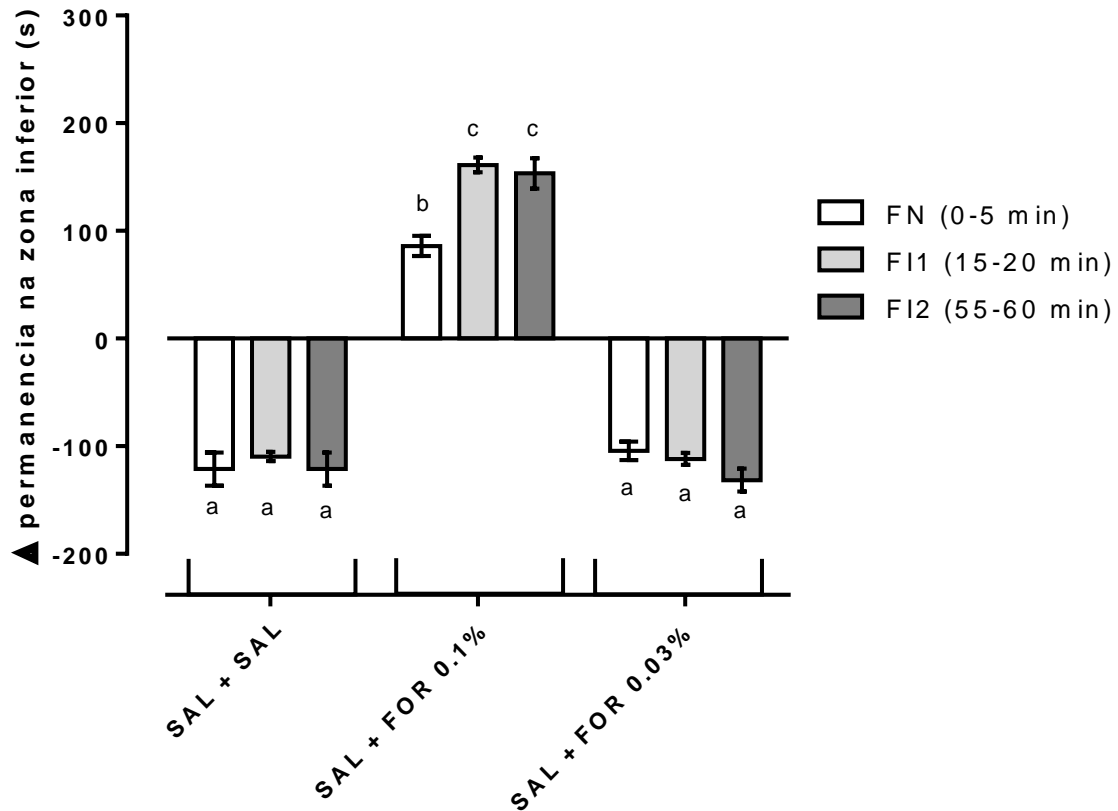


Figura 7 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$  de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do *zebrafish* nas fases FN, FI1 e FI2 sobre o comportamento nociceptivo aferido como  $\Delta$  da permanência na zona inferior do aquário (s). Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

### 5.3- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ do Tempo de "Freezing" ( $\Delta$ TF) em segundos (s).

Os resultados observados a partir da Figura 8 mostram que não houve diferença estatística entre os grupos SAL + SAL e SAL + FOR0,03% em relação ao  $\Delta$ TF, em todas as fases do teste da formalina. Entretanto, quando avaliamos o mesmo parâmetro comparando os grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,1%, foi possível observar que neste houve um aumento significativo nos valores do  $\Delta$ TF, indicando que a concentração de formalina a 0,1% foi a única capaz de aumentar de maneira significativa o tempo de freezing.

Foi observado que apenas no grupo SAL + FOR 0,1% ocorreu um aumento significativo do  $\Delta$ TF nas fases F11 e F12 em relação a fase FN. Isto demonstra que o tempo freezing é significativamente maior, nas fases inflamatórias, dos animais que receberam injeção de formalina 0,1%(s.c.). Na avaliação dentro dos grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,03% não foi observado diferença estatística entre todas as fases do teste da formalina.

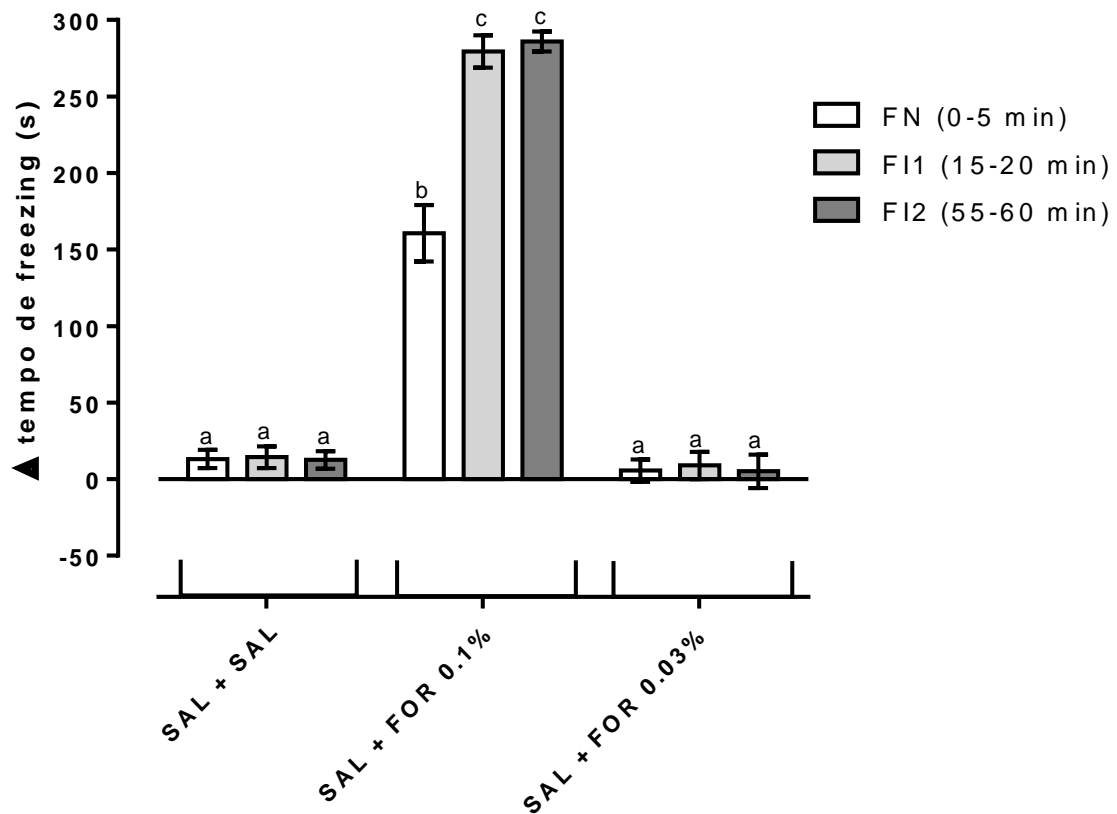


Figura 8 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$  de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do *zebrafish* nas fases FN, F11 e F12 sobre o comportamento nociceptivo aferido como  $\Delta$  do tempo de freezing (s). Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

#### **5.4- Avaliação da atividade natatória através do $\Delta$ da Distância Percorrida ( $\Delta$ DP) em centímetros (cm).**

Os resultados observados a partir da Figura 9 mostram que não houve diferença estatística entre os grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,03% em relação ao  $\Delta$ DP calculado em todas as fases do teste da formalina. A partir da comparação dos valores de  $\Delta$ DP calculados entre os grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,1%, foi possível observar que neste houve uma redução significativa, indicando que a concentração de formalina a 0,1% foi a única capaz de diminuir de maneira significativa a distância percorrida pelos animais.

Foi observado que, na comparação do  $\Delta$ TF calculado, dentro de cada grupo, apenas no grupo SAL + FOR 0,1% ocorreu uma redução significativa nas fases FI1 e FI2 em relação a fase FN. Isto demonstra que a distância percorrida pelos animais que receberam injeção de formalina 0,1%(s.c.) é significativamente menor nas fases inflamatórias. Na avaliação dentro dos grupos SAL + SAL e SAL + FOR 0,03% não foi observado diferença estatística entre todas as fases do teste da formalina.

Analisados em conjunto, esses dados mostram que a concentração de formalina 0,1% foi a única capaz de reduzir de maneira significativa a atividade natatória dos peixes em relação ao grupo veículo, em todas as fases do teste da formalina. Isto pode ser constatado pelo aumento significativo dos valores calculados de  $\Delta$ PZI e  $\Delta$ TF associados a uma redução significativa dos valores de  $\Delta$ DP, do grupo SAL + FOR 0,1% em relação ao grupo SAL + SAL. Esses dados corroboram para padronizar a concentração de 0,1% de formalina como a mais adequada para o avaliar o efeito nociceptivo de novas drogas, utilizando o *zebrafish* como modelo animal.

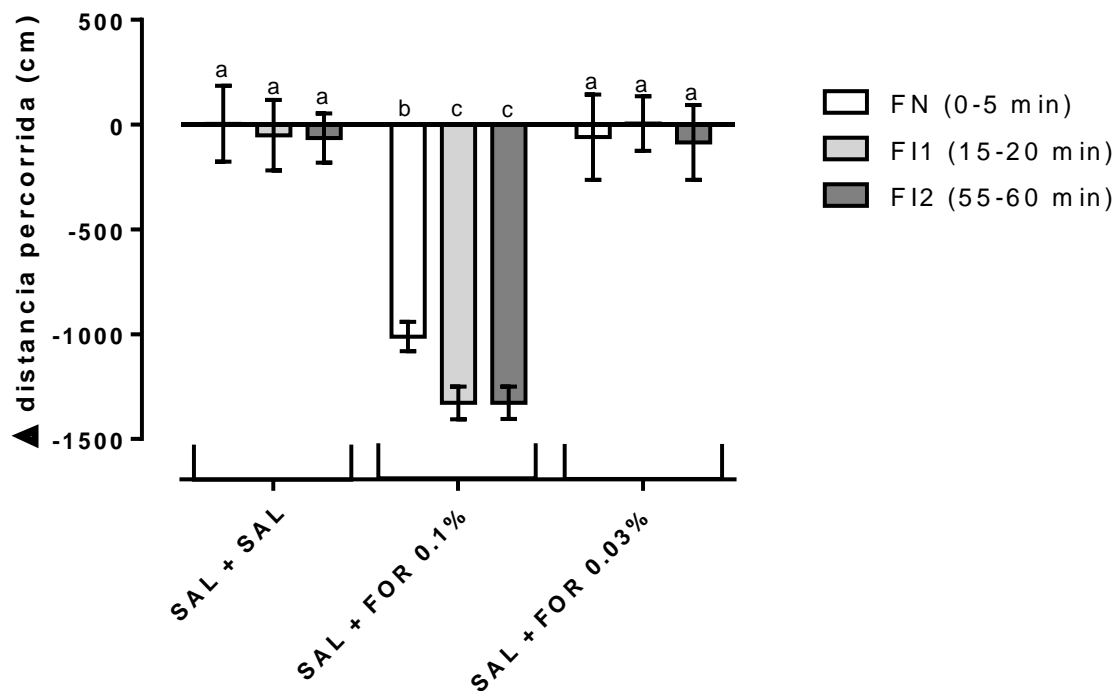


Figura 9 - Avaliação do efeito da injeção da subcutânea de 2 $\mu$  de Salina ou Formalina 0,1% e 0,03% na região adiposa da cauda do *zebrafish* nas fases FN, FI1 e FI2 sobre o comportamento nociceptivo aferido como  $\Delta$  do distância percorrida (cm). Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

### 5.5- Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina no teste da formalina em *zebrafish*.

O presente estudo verificou o efeito antinociceptivo da morfina na dose 3mg/kg através da redução significativa dos valores de  $\Delta$ PZI (Figura 10) e  $\Delta$ TF (figura 11), associado ao aumento significativo dos valores de  $\Delta$ DP (Figura 12) do grupo MOR3 + FOR 0,1% em relação ao grupo SAL + FOR 0,1%, em todas as fases do teste da formalina. Na avaliação da atividade natatória dentro de cada grupo, foi possível verificar que não houve diferença estatística dos valores de  $\Delta$ PZI,  $\Delta$ TF e  $\Delta$ DP (respectivamente Figuras 10, 11 e 12) dentro do grupo MOR 3 + FOR 0,1%, quando comparamos as fases FN, FI1 e FI2, demonstrando que o efeito antinociceptivo da morfina se manteve em todas as fases, sem variações significativas. Os resultados também mostram que não existe diferença estatística para os valores calculados de  $\Delta$ PZI,  $\Delta$ TF e  $\Delta$ DP entre os grupos SAL + SAL e MOR 3 + FOR 0,1% indicando que a morfina foi capaz de reverter de maneira



significativa as alterações da atividade natatória promovidas pela injeção de formalina 0,1% (s.c.).

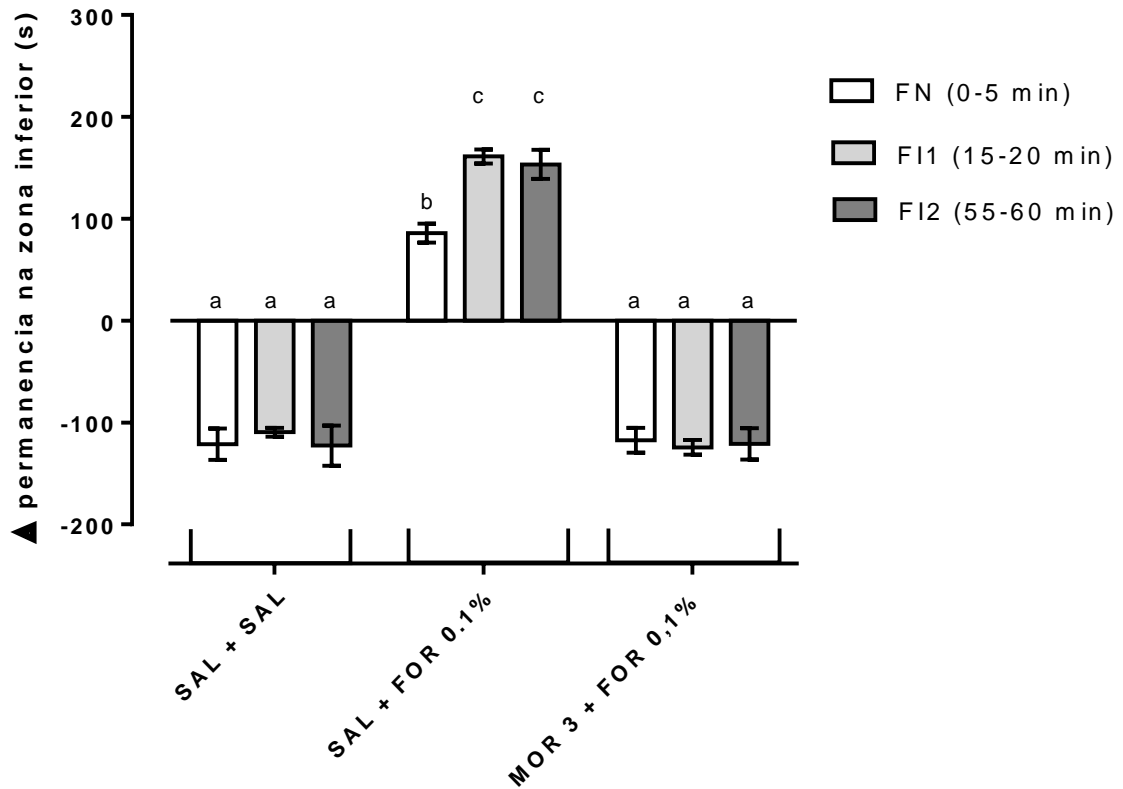


Figura 10 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como  $\Delta$  da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de  $2\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, FI1 e FI2. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

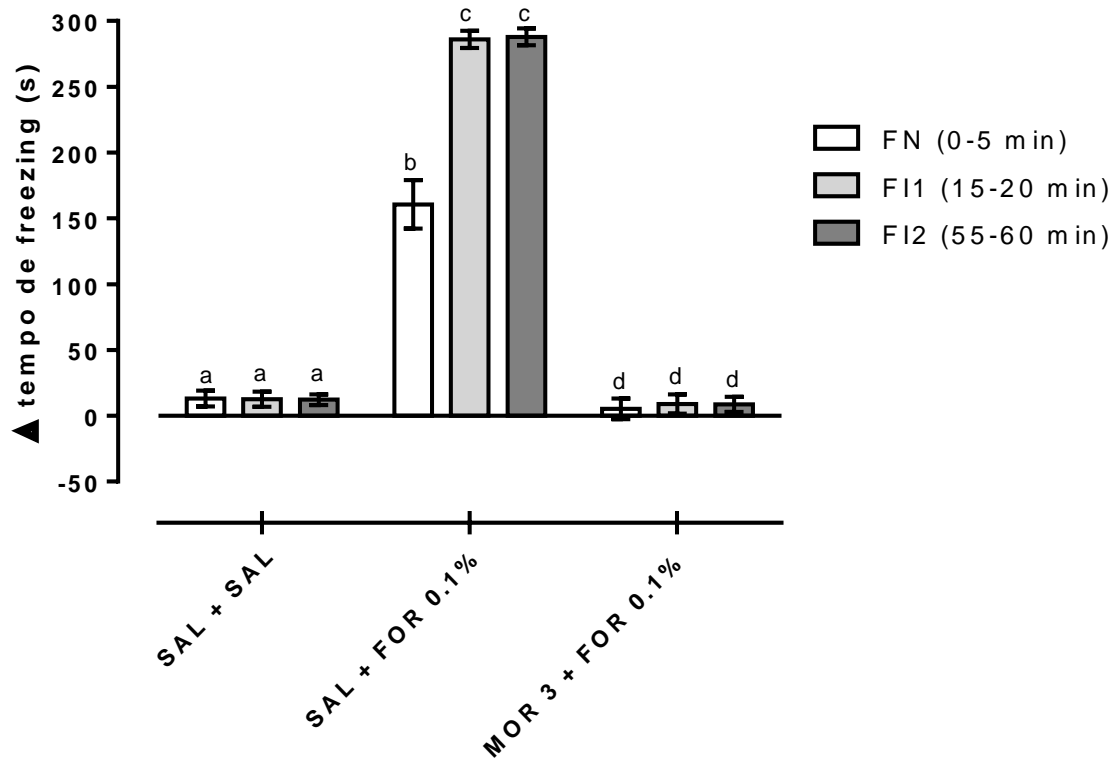


Figura 11 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como  $\Delta$  do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, F11 e F12. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

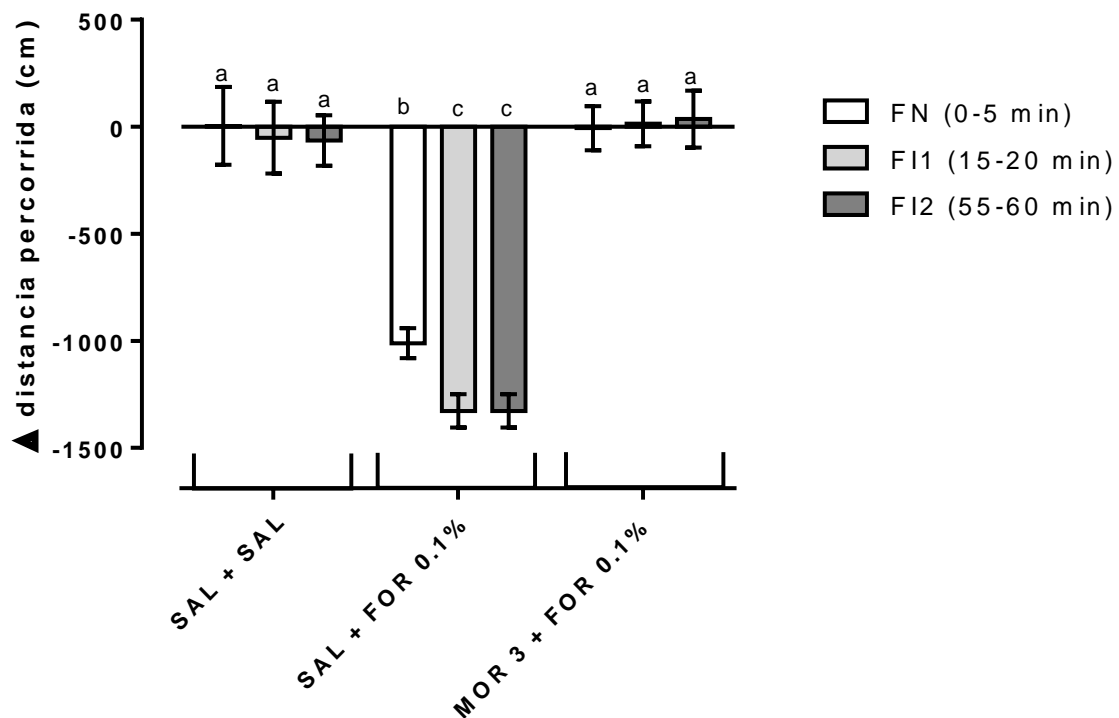


Figura 12 - Avaliação do efeito antinociceptivo da morfina 3mg/kg aferido como  $\Delta$  da distância percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, FI1 e FI2. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

### 5.6- Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* no teste da formalina em *zebrafish*

Na avaliação dos resultados para o tratamento com o extrato bruto da *Sinningia warmingii* (0,3mg/kg; 1 mg/kg e 3 mg/kg; s.c.) foi visto que, em todas as fases do teste da formalina, ocorreu uma redução significativa dos valores de  $\Delta$ PZI (Figura 13) e  $\Delta$ TF (Figura 14) associado ao aumento significativo dos valores de  $\Delta$ DP (Figura 15) dos grupos tratados com esta planta em relação ao grupo SAL + FOR 0,1%, de maneira dose-dependente.

Assim, no grupo SIN 3 + FOR 0,1%, a alteração dos valores de todos os parâmetros para avaliar a atividade natatória foi mais significativa em relação ao grupo SAL + FOR 0,1%. Os resultados também mostram que não foi observada diferença estatística em relação ao grupo SAL + SAL.

Na avaliação da atividade natatória dentro de cada grupo, foi possível verificar que não houve diferença estatística dos valores de  $\Delta$ PZI,  $\Delta$ TF e  $\Delta$ DP (respectivamente Figuras 13,14 e 15) para o grupo SIN 3 + FOR 0,1%, quando comparamos as fases FN, FI1 e FI2, demonstrando que o efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* na dose 3 mg/kg ocorre em todas as fases.

Os resultados também mostram que o extrato bruto da *Sinningia warmingii* na dose 3 mg/kg tem efeito antinociceptivo semelhante a morfina 3mg/kg uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nos valores de  $\Delta$ PZI (Figura 16),  $\Delta$ TF (Figura 17) e  $\Delta$ DP (Figura 18) entre os grupos SIN 3 + FOR 0,1% e MOR 3 + FOR 0,1%.

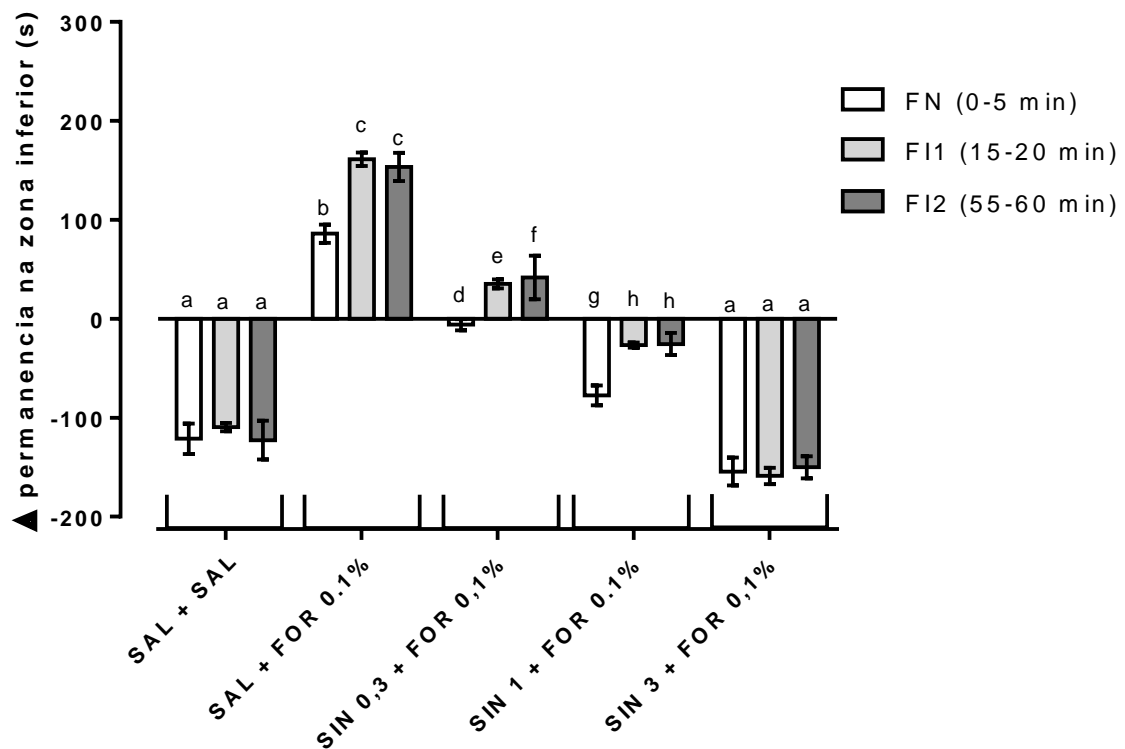


Figura 13 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como  $\Delta$  da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, FI1 e FI2. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

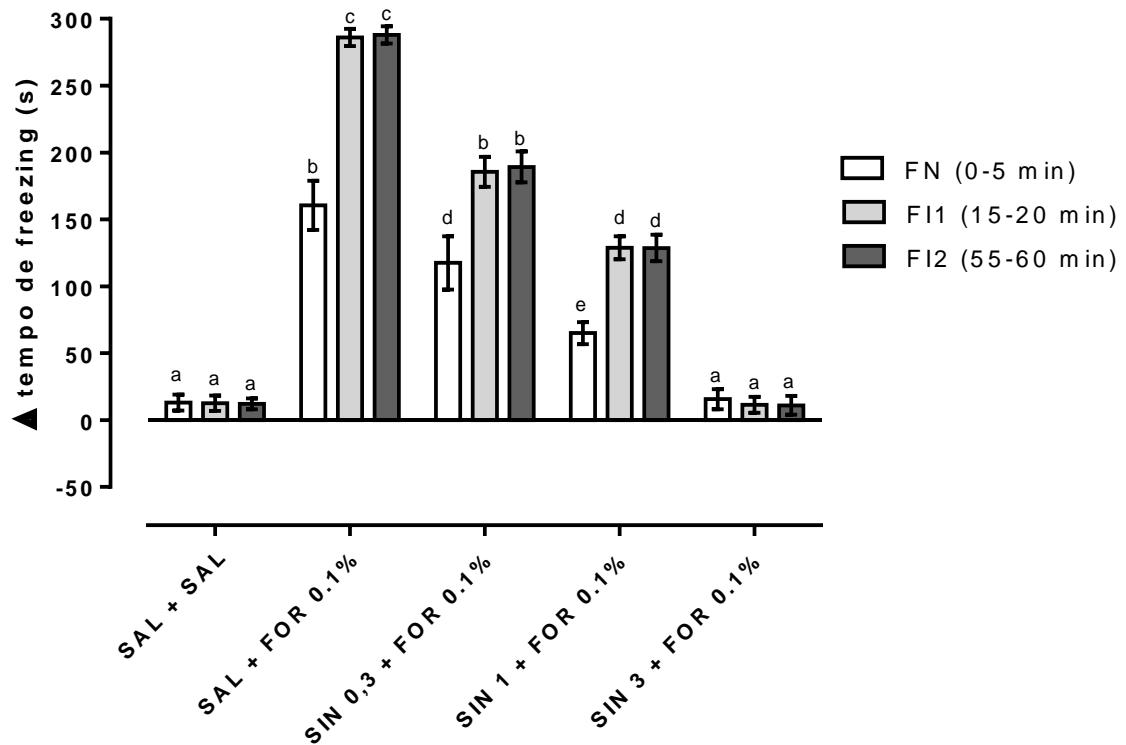


Figura 14 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como  $\Delta$  do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, F11 e F12. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

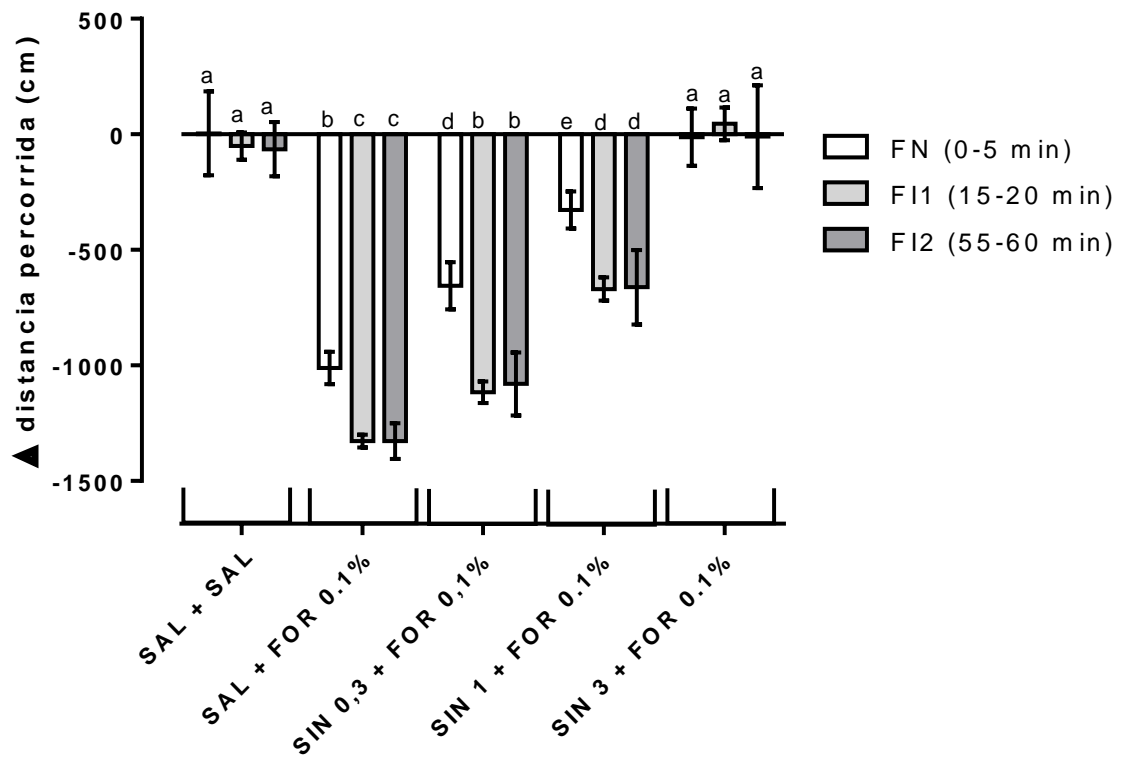


Figura 15 - Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* (0,3; 1 e 3 mg/kg) aferido como  $\Delta$  da distância percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ l de formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, F11 e F12. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

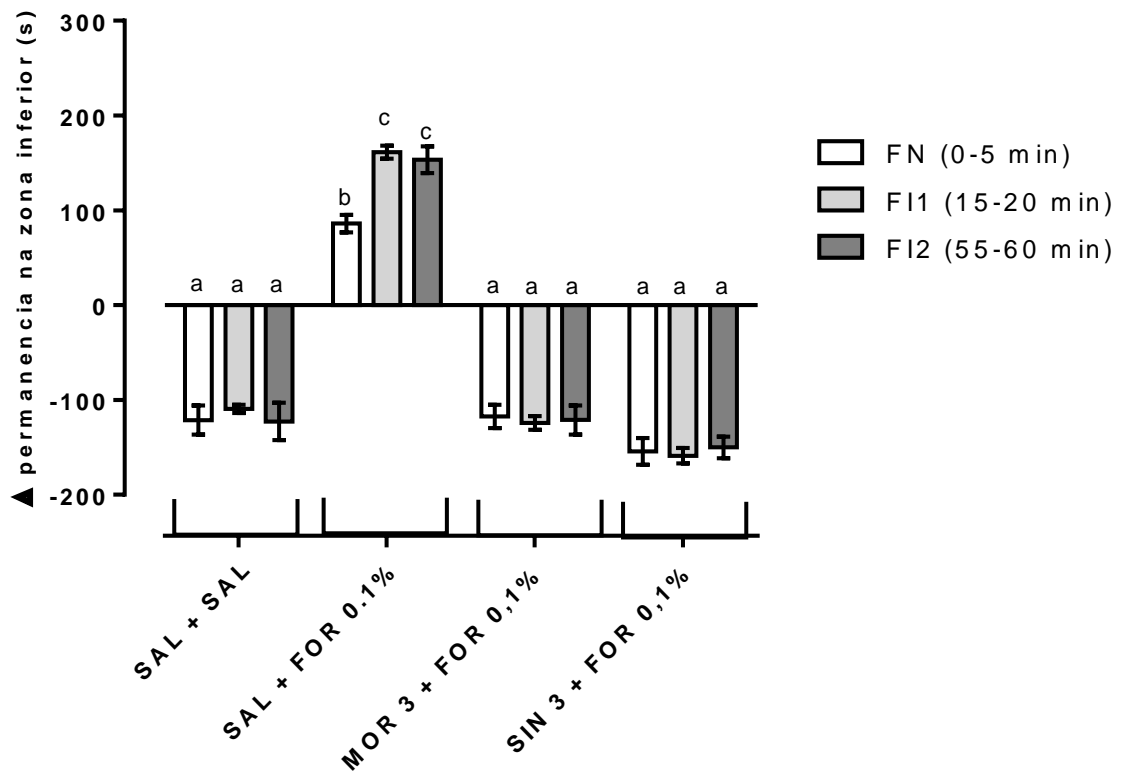


Figura 16 – Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* 3 mg/kg e morfina 3 mg/kg, aferido como  $\Delta$  da permanência na zona inferior do aquário (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$ l de formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, F11 e F12. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

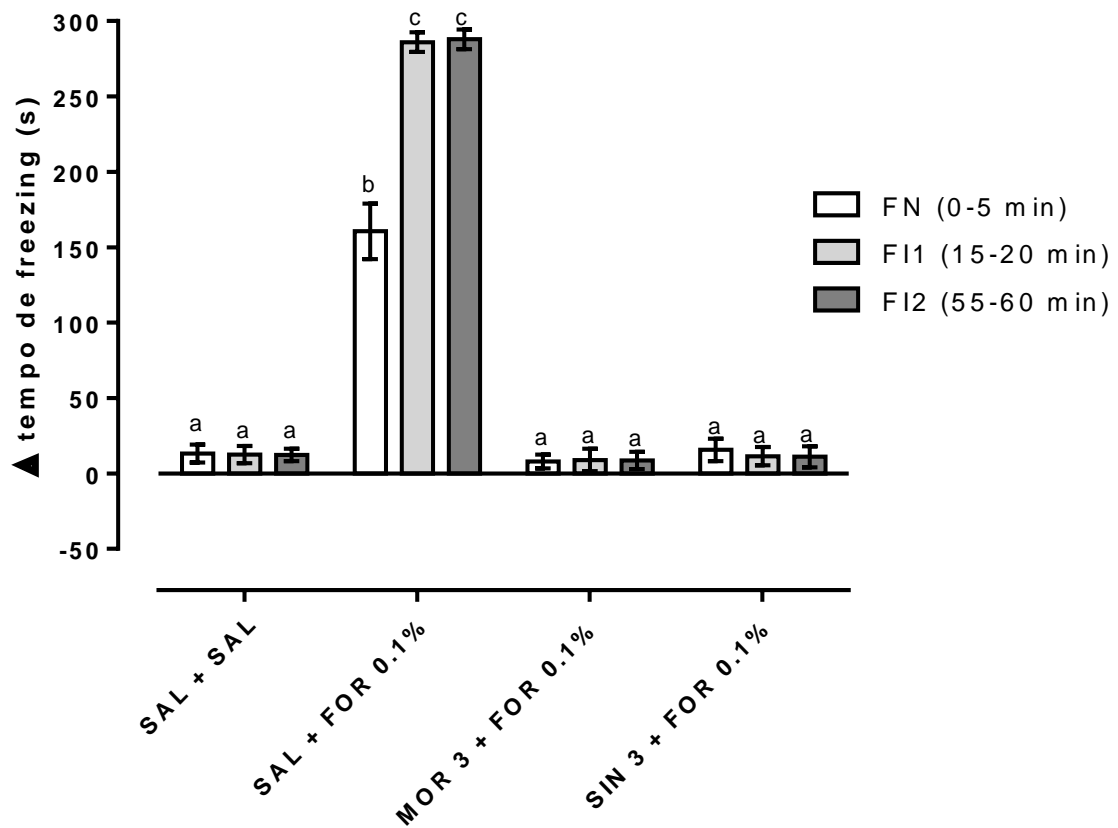


Figura 17 - Comparação do efeito antinociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* 3 mg/kg e Morfina 3 mg/kg, aferido como  $\Delta$  do tempo de freezing (s), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, F11 e F12. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.



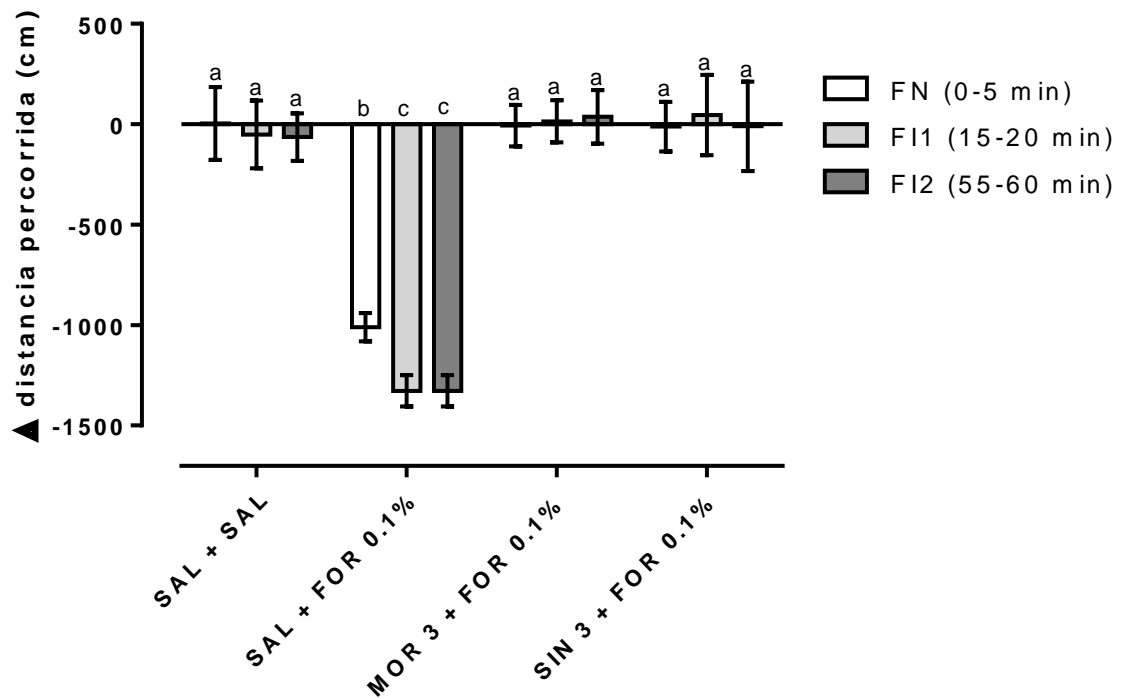


Figura 18 - Comparação do efeito nociceptivo do extrato bruto da *Sinningia warmingii* 3 mg/kg e Morfina 3 mg/kg, aferido como  $\Delta$  da distancia percorrida (cm), mediante injeção subcutânea de 2 $\mu$  de Formalina 0,1% na região adiposa da cauda do *zebrafish*, nas fases FN, FI1 e FI2. Letras iguais indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey). Os resultados expressam a Média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais.

## 6. DISCUSSÃO

A dor representa uma parte importante de defesa do organismo visto que a sensibilidade nociceptiva permite um animal ferido ou ameaçado a se mobilizar, desenvolvendo comportamentos defensivos, tais como fuga ou luta, necessários para minimizar os riscos ou a progressão de uma lesão (ALMEIDA et al., 2004). Até hoje, a maioria dos trabalhos relacionados a nocicepção é desenvolvida através de modelos animais mamíferos, uma vez que, pela proximidade filogenética, a compreensão dos mecanismos de resposta a estímulos dolorosos nos mamíferos pode ser diretamente associada àqueles envolvidos em humanos, entretanto, pesquisadores têm estudado a nocicepção em outros vertebrados, embora ainda exista pouca informação publicada a respeito deste assunto. (SNEDDON, 2003).

Nesse contexto, o teste da formalina tem se mostrado uma alternativa eficaz para a avaliação das alterações comportamentais em estudos nociceptivos em várias espécies de animais vertebrados como gatos, primatas, coelhos, crocodilos e anfíbios, e mais recentemente em peixes (HOLFMAN et al., 2013) sendo esse modelo uma ferramenta muito utilizada para a pesquisa de compostos com ação antinociceptiva (McNAMARA et al., 2007).

Basicamente, o teste da formalina é considerado um modelo bifásico, o que permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase (Fase 1), que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina, caracterizada pelo estímulo direto da formalina no nociceptor (dor de origem neurogênica) e a segunda fase (Fase 2), que considera-se ser o tempo entre 15 a 60 min após a administração da formalina que representa a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória, onde ocorre a liberação de mediadores inflamatórios (OYADEYI et al., 2007).

Em relação ao *zebrafish*, não existem dados na literatura a respeito da nocicepção induzida pela administração da formalina. No entanto, há diversas vantagens para a utilização deste modelo animal uma vez que possui baixo custo, reprodução externa, apresenta facilidades na avaliação comportamental, bem como proximidade genética com os seres humanos que se relaciona com a expressão dos principais tipos de receptores opioides que ocorrem em mamíferos (GONZALEZ-NUNEZ e RODRÍGUEZ, 2009).

Em outras espécies de peixes, a administração de formalina promove uma alteração da atividade natatória. Esta corresponde ao padrão comportamental mais

frequentemente avaliado em peixes pois envolve a integração de numerosos processos fisiológicos, sendo considerado um índice sensível para se estimar as respostas nociceptivas, as quais estão associadas a um padrão errático de locomoção em peixes submetidos ao estímulo nocivo, envolvendo movimentos de nado em zig zag, perda de equilíbrio (ventre voltado para cima), aumento ou redução da velocidade de locomoção, assim como o aumento do tempo de permanência na parte inferior do aquário e do tempo de "freezing" (HOFFMAN et al., 2013).

Entretanto, as respostas comportamentais, os mecanismos fisiológicos bem como o curso temporal das fases neurogênica e inflamatória envolvidas no processo nociceptivo estimulados pela formalina podem variar conforme a espécie (OYADEYI et al., 2007; NEWBY e STEVENS, 2008). Neste sentido, o presente estudo considerou relevante padronizar o teste da formalina em *zebrafish* com o objetivo de descrever e quantificar os comportamentos antinociceptivos desta espécie, uma vez que esses dados não foram encontrados na literatura.

Nosso protocolo experimental foi baseado em experimentos com outras espécies de peixes, a exemplo de *Leporinus macrocephalus* e *Oreochromis niloticus*, os quais foram submetidos a administração subcutânea de formalina (1%, 3% e 5%) na região subjacente à nadadeira adiposa caudal. Esta região foi escolhida por ter uma alta concentração de nociceptores, assim como as barbatanas dorsais e peitorais, a pele ao redor dos olhos e a região dos lábios. Nestes estudos, a formalina 3% foi capaz de produzir alterações comportamentais, principalmente relacionadas a atividade locomotora, sugerindo que a administração subcutânea de formalina é um método que pode ser aplicado para avaliar nocicepção em outros peixes (HOFFMAN, 2013).

Os nossos resultados mostraram os peixes pertencentes aos grupos que receberam 3%, 1% e 0,3% de formalina, morreram antes de 10 minutos de experimento, impossibilitando o uso dessas concentrações para avaliar a nocicepção em *zebrafish*. Para o grupo que recebeu 0,1% de formalina foi verificada uma redução significativa da atividade natatória bem como foi possível observar comportamentos anômalos estimulados pela formalina. Por outro lado, o grupo que recebeu 0,03% de formalina não apresentou diferença significativa nos comportamentos avaliados em relação ao grupo que recebeu salina, mostrando que não houve alterações nos padrões da atividade natatória dos peixes.

Na fase neurogênica do teste da formalina, os animais do grupo SAL + FOR 0,1% desenvolveram comportamentos anômalos logo após a injeção de formalina. Essas alterações comportamentais associadas aos processos nociceptivos, nesta fase, demonstraram que o *zebrafish* responde prontamente à aplicação de formalina, como ocorre com outras espécies de peixes, a exemplo do *Leporinus macrocephalus* (HOFFMAN et al., 2013).

Os resultados mostraram ainda que, em todas as fases estudadas, ocorre uma redução da atividade natatória relacionada com o aumento significativo do tempo de "freezing" e do tempo de permanência no fundo do aquário associados a uma redução significativa na distância percorrida, para os animais do grupo SAL + FOR 0,1%, quando comparado ao grupo SAL + SAL. Sabe-se que o *zebrafish* é uma espécie cuja atividade natatória exploratória ocorre preferencialmente na superfície da água. Entretanto, em resposta aversiva a situações de estresse ou de nocicepção, os peixes deixam de explorar a superfície e se direcionam para o fundo do aquário, aumentando o tempo de permanência na zona inferior (EGAN et al., 2009). Os resultados sugerem que a injeção de formalina (0,1%, s.c.) promoveu uma inversão neste padrão de comportamento do *zebrafish*, uma vez que os animais do grupo SAL + FOR 0,1% apresentaram um aumento significativo no tempo de permanência no fundo do aquário em relação ao grupo SAL + SAL, em todas as fases avaliadas, indicando a ocorrência de percepção dolorosa.

Quando comparamos o teste da formalina entre *zebrafish* e roedores, os resultados demonstram semelhanças referentes ao curso temporal das duas fases de comportamento nociceptivo, que envolvem dois diferentes estímulos (DUBUISSON E DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985; COWAN et al., 1989; ROSLAND, 1991).

Assim como em roedores, foi verificado que a fase neurogênica, em *zebrafish*, inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e tem duração de 3-5 minutos. Em mamíferos, dados experimentais mostram que a formalina pode ativar diretamente nociceptores através de receptores de potencial transitório, tipo anquirina 1 (McNAMARA et al., 2007), sendo capaz de degranular mastócitos, causando a liberação de histamina, serotonina (PARADA et al., 2001), que ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), nos terminais periféricos aferentes primários (GONÇALVES et

al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008), assim como a liberação de aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (OMOTE et al., 1998; MILANO et al., 2008).

Desta forma, os nossos resultados sugerem que estes mediadores químicos sejam os responsáveis pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção de formalina em *zebrafish*, uma vez que nesta espécie foram mapeadas estruturas neuroanatômicas e sistemas de neurotransmissão semelhantes aos humanos, tais como, sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico, glutamatérgico, glicinérgico e gabaérgico, enfatizando suas características como possíveis vias do processo nociceptivo (RICO et al., 2011).

Quanto à segunda fase, as semelhanças são mais uma vez encontradas entre os dois modelos animais visto que, para ambos, ela ocorre aproximadamente em 15-20 minutos (correspondente a FI1 em *zebrafish*) após a injeção de formalina e tem a duração de 20-40 min (correspondente a FI2 em *zebrafish*). Diferentemente da fase neurogênica, a fase inflamatória é mais duradoura e persistente, causada por inflamação local devido à formação e/ou liberação de mediadores como citocinas, eicosanóides, cininas, glutamato e óxido nítrico (CHICHORRO et al., 2004; TASSORELLI et al., 2006). Os mediadores inflamatórios agem aumentando a sensibilidade dos nociceptores, por receptores específicos acoplados à cascata de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos, reduzindo assim seu limiar de excitabilidade (ROCHA et al., 2007; LUIZ, 2007). É possível que a liberação dessas substâncias endógenas também ocorra em *zebrafish*, sugerindo um mecanismo semelhante para desencadear o processo inflamatório na segunda fase do teste da formalina, responsável pelas alterações na atividade natatória que persistiram até uma hora.

No que se refere à concentração de formalina, verificou-se que a injeção de formalina 0,1% demonstrou ser viável para a avaliação da atividade nociceptiva em *zebrafish* no teste da formalina, embora esta concentração seja menor que a normalmente utilizada em mamíferos (5 -10%) ou outras espécies de peixes como *Oreochromis niloticus* (3%) (IDE e HOFFMANN, 2002) e *Leporinus macrocephalus* (3%) (HOFFMANN et al., 2013).

Considerando a padronização do teste da formalina em roedores, concentrações inferiores a 1% podem ter vantagens em comparação com as concentrações convencionais. Uma baixa concentração como 0,25% de formalina

pode ser suficiente para induzir uma resposta nociceptiva bifásica em roedores, alterando padrões de comportamento como laber e morder a pata (TAKAHASHI et al., 1984). As concentrações entre 0,05-0,2% podem induzir a primeira fase da resposta com pequenas alterações histológicas subsequentes (ROSLAND et al., 1990). Com as concentrações inferiores de formalina, o comportamento nociceptivo exibido pode ser avaliado sem submeter o animal ao limite máximo de percepção dolorosa, facilitando a detecção dos efeitos de fármaco antinociceptivos menos potentes ou em doses menores. Além disso, o uso de baixas concentrações de formalina não induz ulceração e edema de longa duração e devem ser preferidos quando possível para reduzir o sofrimento dos animais (TAKAHASHI et al., 1984; SHIBATA et al., 1989; ROSLAND et al., 1990).

Os resultados do nosso estudo indicam que a morfina na dose de 3mg/kg foi capaz de inibir de forma significativa a fase neurogênica (FN) e a fase inflamatória (FI1 e FI2) induzida pela formalina 0,1%. O efeito antinociceptivo da morfina já é bastante conhecido em mamíferos, especialmente em humano. No entanto, poucos trabalhos têm estudado sua ação em peixes. Enquanto que as doses usuais de morfina usada em roedores submetidos a testes nociceptivos variam de 1-5mg/kg (STEVENS e KIRKENDALL, 1993), é possível que em não mamíferos como em *goldfish* (JANSEN e GREENE, 1970), lagartos (MAUK et al., 1981) e galinhas (BARDO e HUGHES, 1978) a morfina seja uma droga analgésica pouco potente, requerendo altas doses para se obter o efeito antinociceptivo (STEVENS e KIRKENDALL, 1993; STEVENS, 1988). Nordgreen e colaboradores (2009) demonstraram em seus experimentos que as doses de 40mg/kg e 50mg/kg de morfina não apresentaram efeito antinociceptivo no teste do limiar térmico realizado em *goldfish*. A morfina se liga preferencialmente a receptores opioides do tipo  $\mu$ , cuja distribuição é grande em ratos, intermediária em tartarugas e sapos, e muito pequena em *goldfish* (STEVENS, 1988; STEVENS, 2004) e por isto, o efeito analgésico da morfina não ocorreu nesta espécie apesar da utilização de altas doses.

Em nosso trabalho, a dose de 3mg/kg de morfina foi suficiente para exercer efeito antinociceptivo em *zebrafish*, sugerindo que o tipo e padrão de distribuição de receptores opioides nesta espécie tem semelhanças com roedores. De fato, em estudos mais detalhados sobre o SNC desta espécie, foram identificados os principais tipos distintos de receptores opioides que ocorrem em mamíferos

(STEVENS, 2004). Quatro receptores opioides em *zebrafish* mostram alta semelhança de sequência genética com os receptores opioides  $\delta$ ,  $\mu$  e  $\kappa$  dos mamíferos (ALVAREZ et al., 2006). Dentre eles o drMOR1 é considerado homólogo do receptor opioide  $\mu$  em mamíferos (BARRALLO et al., 2000). Esses dados sugerem que o efeito antinociceptivo da morfina em *zebrafish*, encontrado nos resultados do presente estudo pode direcionar novos experimentos para avaliar a sua interação com o receptor dr MOR1(homólogo do receptor  $\mu$ ), uma vez que a morfina e a maioria de seus análogos exercem seus efeitos analgésicos atuando principalmente nos receptores  $\mu$  (GUTSTEIN, AKIL, 2003; MERRER *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que existem consideráveis diferenças entre as espécies em relação à farmacocinética da morfina. A depuração plasmática da morfina na corrente sanguínea após a injeção intraperitoneal é muito mais lenta em duas espécies de peixes *Pseudopleuronectes americanus* e de *Oncorhynchus mykiss* do que aquelas encontradas em mamíferos, o que pode aumentar o tempo de efeito antinociceptivo da morfina (NEWBY et al., 2008). Logo, é de extrema importância que novos estudos, referentes ao sistema opioide de peixes sejam realizados avaliando a variação do efeito com o tempo de tratamento. O teste da formalina mostra-se adequado para este fim uma vez que apresenta vantagem sobre outros métodos de nocicepção por possibilitar a avaliação de dois mecanismos diferentes de nocicepção ao longo de um período prolongado de tempo, permitindo assim, o teste de antinociceptivos com diferentes mecanismos de ação (RANDOLPH, 1997; NEWBY et al., 2008).

Os resultados do nosso trabalho demonstraram que a morfina na dose 3 mg/kg apresentou efeito antinociceptivo similar na fase neurogênica (FN) e na fase inflamatória (FI1 e FI2) em *zebrafish*, demonstrando um efeito prolongado com um curso temporal semelhante aos roedores (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989).

Entretanto, novas drogas com potencial antinociceptivo podem apresentar efeitos distintos na primeira e segunda fase do teste da formalina. Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo nociceptivo, o teste da formalina mostra-se um modelo experimental útil para diferenciar uma possível atividade antinociceptiva de novos fármacos ou produtos naturais por mecanismos centrais envolvendo mediadores imediatos, ou por mecanismos periféricos

envolvendo mediadores liberados durante o processo inflamatório produzidos mais tardiamente (SILVA et al.,2013).

Fármacos opióides e antiinflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (PARENTE, 2000; FIORUCCI, 2001). Enquanto os opióides apresentam efeitos colaterais como depressão respiratória, constipação, dependência física e tolerância, os anti-inflamatórios podem acarretar perfuração e hemorragia do trato gastrintestinal, alterações renais e nos mecanismos de hemostase resultantes da inibição da atividade da prostaglandina E2 sintetase (SCHOLICH e GEISLINGER, 2006). Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias derivadas de produtos naturais com potencial analgésico e anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos (CALIXTO, 2001).

Uma das principais ferramentas nesta busca é a pesquisa etnofarmacológica. Neste contexto destaca-se a *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems, espécie muito utilizada popularmente para o tratamento de processos dolorosos e inflamatórios (CHAUTEMS et al., 2000). Entretanto, não existem estudos que demonstrem a eficácia analgésica e anti-inflamatória desta planta. Assim, esse trabalho propõe-se confirmar as propriedades antinociceptivas indicadas pelo uso popular desta planta.

Os resultados mostraram que o extrato bruto desta planta apresentou um efeito antinociceptivo de maneira dose dependente, nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, com maior efeito na dose 3mg/kg. Esta dose apresentou um efeito semelhante a morfina 3mg/kg visto que não foram encontradas diferenças significativas nos valores dos parâmetros avaliados entre os grupos MOR 3 + FOR 0,1% e SIN 3 + FOR 0,1%. Os resultados obtidos no presente estudo nos direcionam para confirmar as propriedades analgésicas indicada pelo o uso etnofarmacológico desta planta.



## 7- CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a concentração de 0,1% de formalina se mostrou a mais adequada para avaliar nocicepção em *Danio rerio*, utilizando como parâmetro a observação da atividade natatória e que o extrato da *Sinningia warmingii* apresentou um efeito antinociceptivo de maneira dose dependente no teste da formalina, com efeito máximo na dose 3mg/kg, a qual apresentou efeito semelhante a morfina (3 mg/kg). Estes dados corroboram para confirmar a atividade analgésica e antiinflamatória da *Sinningia warmingii*, sugeridas pelo uso popular. Assim, a padronização do teste da formalina em *zebrafish* indica este modelo animal para avaliação de novas drogas antinociceptivas em outros estudos.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. E.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain. Res.* 2004; 1000: 40-56.

ALOISI, A. M., ALNONETTI, M. E., CARLI, G. Behavioural effects of different intensities of formalin pain in rats. *Physiol. Behav.* 58: 603-610. 1995.

ALREJA, M., MUTALIK, P., NAYAR, U., MANCHANDA, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain* 20:97–105. 1984.

ALVAREZ, F.A.; RODRÍGUEZ-MARTIN, I.; GONZALEZ-NUNEZ, V.; DE VELASCO, E.M.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; RODRÍGUEZ, R.E.. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett.* 2006; 405:94-99.

ASHLEY, P.J.; RINGROSE, S.; EDWARDS, KL.. Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. *Anim Behav.* 2009; 77:403-410.

ASHLEY, P.J.; SNEDDON, L.U.; MCCROHAN, C.R. Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res.* 2007; 1166:47-54.

BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.A.; MCPHERSON, J.A.; JOHNSON, S.L. The syntenic relationship of the *Zebrafish* and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10:1351-1358.

BARDO, M.T., HUGHES, R.A.. Shock elicited flight response in chickens as an index of morphine analgesia. *Pharmacol.Biochem. Behav.* 9 (1), 147-149. 1978.

BARRALLO, A.; MALVAR, F.G.; GONZALEZ, R.; RODRÍGUEZ, R.E.; TRAYNOR, J.R. Cloning and characterization of a delta opioid receptor from *zebrafish*. *Biochem Soc Trans.* 1998b; 26:S360.

BARRALLO, A.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; ALVAR, F.; RODRÍGUEZ, R.E. Zfor2, a new opioid receptor-like gene from the teleost *zebrafish* (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;84:1-6.

BARRALLO, A.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; PORTEROS, A.; GARCIA-ISIDORO, M.; RODRÍGUEZ, R.E.. Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from *zebrafish* (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998a; 245:544-548.

BEST, J.D.; ALDERTON, W.K. *Zebrafish*: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008; 4: 567-576.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2006. 60 p.

BRENNAN, F., CARR, D. B., COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. *Anesthesia & Analgesia*, v.105, p.205-221, 2007.

CALIXTO, J.B. Estudo farmacológico Pré-Clínico de Planta Mediciniais. In: YUNES, R.A & CALIXTO, J.B. (Org). Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001, p. 77-99.

CARLI, G., FARABOLLINI, F., FONTANI, G. Responses to painful stimuli during animal hypnosis. *Adv. Pain. Res. Ther.* 1: 727-731. 1976.

CHAUTEMS, A. A família Gesneriaceae na região cacauera da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica.* 1991; 14, 51-59.

CHAUTEMS, A., BARACHO, G.S. & SIQUEIRA FILHO, J.A. A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) from northeastern Brazil. *Brittonia.* 2000; 52, 49-53.

CHERCHOVA, L. S. Pain sensitivity and behavior of fishes. *J. Ichthyol.* 37, 98-102.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *British Journal of Pharmacology*, v.141, p.1175-1184, 2004.

CORREIA, A.D.; CUNHA, S.R.; SCHOLZE, M.; STEVENS, E.D. A Novel Behavioral Fish Model of Nociception for Testing Analgesics. *Pharmaceuticals.* 2011; 4, 665-680.

COWAN, A., PORRECA, F., WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluation analgesics. *NIDA Research Monograph*, v.95, p.116-122, 1989.

DUBUISSON, D. e DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4, 161-74,1977.

DUTRA, M.G. *Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás*. 2009. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica. Anápolis.

EGAN, R.J., BERGNER, C.L., HART, P.C., CACHAT, J.M., CANAVELLO, P.R., ELEGANTE, M.F.I. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *zebrafish*. *Behav Brain Res* 2009;205:38–44.

FERREIRA, K.A.S.L. Dor e qualidade de vida relacionada a saúde de pacientes com câncer: influência das citocinas pro-inflamatória TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL1- $\beta$ . Tese de doutorado apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2008.

FERREIRA, S.H., FERRARI, L.F., CUNHA, T.M., NASCIMENTO, P.G.B.D., VERRI, W.A., CUNHA, F.Q. Dor Inflamatória. Disponível em: <<http://www.dolinf.br/Html/DorInflamatoria.html>>, Acessado em: outubro/2015.

FIORUCCI, S. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biomechanical Pharmacology*. v. 62, p. 1433. 2001.

GONÇALVES, J.C.; OLIVEIRA, F.S.; BENEDITO, R.B.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAÚJO, D.A. Antinociceptive activity of (-) Carvone: Evidence of association

decrease peripheral nerve excitability. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.31, p.1017-1020, 2008.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; BARRALLO, A.; TRAYNOR, JR.; RODRÍGUEZ, R.E.. Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316:900-904.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; RODRÍGUEZ, R.E. Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Brain Res*. 2003a; 114:31-39.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; RODRÍGUEZ, R.E. Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: Evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim Biophys Acta*. 2003b; 1629:114-118.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; RODRÍGUEZ, R.E.. Identification of two proopioidmelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res*. 2003c; 120:1-8.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; MARRON, E. F. V.; ARSEQUELL, G.; VALENCIA, G.; RODRÍGUEZ, R.E.. Identification of dynorphin A from zebrafish: A comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience*. 2007a; 144:675-684.

GONZÁLEZ-NUÑEZ, V.; RODRIGUEZ, R.E.. The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR Journal*. 2009; 50, 373-386.

GONZALEZ-NUNEZ, V.; TOTH, G.; RODRÍGUEZ, R.E. Endogenous heptapeptide met-enkephalin-gly-tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from *zebrafish*. *Peptides*. 2007b; 28:2340-2347.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from *Zebrafish*? *Genes Brain Behav*. 2004; 3: 63–74.

GUTSTEIN, H.B; AKIL, H. Analgésicos Opioides. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goodman & Gilman - As bases Farmacológicas da Terapêutica. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 427-482.

HEUR, M.; JIAO, S.; SCHINDLER, S.; CRUMP, J.G. Regenerative potential of the *Zebrafish* corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 2012.

HOFFMAN, A.; ALVES, F.L.; JUNIOR, A.B. Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiology & Behavior* 110–111 (2013) 58–62.

HOFFMANN, A. A dor na perspectiva da evolução filogenética. Reflexões em torno da dor. 2008; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, 14, 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. v. 30, n. 1, p. 103-104. 1987.

IASP (International Association for the Study of Pain). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain*. 1979; 6: 249-252.

IDE, L. M., HOFFMANN, A. Stressful and behavioral conditions that affect reversible cardiac arrest in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei). *Physiol. Behav.* 75: 119-126. 2002.

JANSEN, G., GREENE, N. Morphine metabolism and morphine tolerance in goldfish. *Anesthesiology*, v. 32, p. 231-235, 1970.

JULIUS, D; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001; 413: 203-210.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ J.H., JESSEL T.M. *Princípios de Neurociência*. São Paulo: Manole, 2003.

KANUI, T. I., HOLE, K., MIARON, J. O. Nociception in crocodiles: capsaicin instillation in formalin and hot plate tests. *Zool. Sci.* 7: 537-540. 1990.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*. 2005; v. 4, p. 335-347.

KLAUMANN, P. R., WOUK, A. F. P. F., SILLAS, T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*. v. 13, n.1, p.1-12. 2008.

LIU, S.; LEACH, S.D. *Zebrafish* models for cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 28:71-93.



LIVINGSTON, A.; CHAMBERS, P. The physiology of pain. In: FLECKNELL, P.; WATEMAN-PERASON, A. Pain management in animals. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 9-19.

LUIZ, AP. Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do extrato etanólico obtido das raízes da *Humirianthera ampla* Miers. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis.

LYNN, B. The fibre composition of cutaneous nerve and the classification and response properties of cutaneous afferents with particular reference to nociception. *Pain. Rev.* 1994; 1: 172-183.

MACHIN K. L. Boney fish (Lungfish, Sturgeon, and Teleost). In: WEST, G.; HEARD, D.; CAULKETT, N. Zoo animal & wildlife immobilization and anesthesia. BlackwellPublishing. 2007; p. 43-59.

MÁLAGA-TRILLO, E.; SALTA, E.; FIGUERAS, A.; PANAGIOTIDIS, C.; SKLAVIADIS, T. Fish models in prion biology: underwater issues. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 402-414

MARTINS, M.A., DE CASTRO BASTOS L., TONUSSI, C.R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *JPain.* 7(2): 100 – 107, 2006.

MAUK, M. D., OLSON, R. D., LAHOSTE, G. J., OLSON, G. A. Tonic immobility produces hyperalgesia and antagonizes morphine analgesia. *Science.* 213, 353-354. 1981.

McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.33, 2007.

MENESCAL DE OLIVEIRA, L. As Dores, In: LENT, R. eds. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. 2008; Guanabara Koogan S. A. 183-201.

MERRER, J., BECKER, J.A.J., BEFORT, K., KIEFFER, B.L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiol Rev*, 2009. v. 89, p. 1379–1412.

MILANO, J.; ROSSATO, M.F.; OLIVEIRA, S.M.; DREWES, C.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.P.; MELLO, C.F.; RUBIN, M.A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H.G. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sciences*, v.83, p.739-746, 2008.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999; 57: 1-164.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*, 10, 283-94,2009.

MUIR, W. W. Local anesthetic. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. *Handbook of veterinary anesthesia*. 3. ed. St Louis: Mosby, 2001. 504 p.

NEWBY, N. C.; STEVENS, D. R. The effects of the acetic acid "pain" test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008; 114: 260-269.

NORDGREEN, J., GARNER, J. P., MICHAEL JANCZAK, A., RANHEIM, B., MUIR, W. M., EINAR HORSBERG, T. Thermonociception in fish: Effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behavior in goldfish (*Carassius auratus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 119: 101-107. 2009.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.31, p.588-591, 2008.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Research*, v.787, p.161-164, 1998.

OYADEYI, A. S., AJAO, F. O., AFOLABI, A. O., UDOH, U. S., AZZEZ, O. M. The formalin test in African toad (*Bufo regularis*)- A novel pain model in amphibians. *Am-Euras. J. Sci. Res.* 2 (1): 24-28. 2007.

PANULA, P.; CHEN, Y.C.; PRIYADARSHINI, M.; KUDO, H.; SEMENOVA, S.; SUNDVIK, M.; SALLINEN, V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of *Zebrafish* CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis.* 2010; 40: 46-57.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, v.4, p.937-944, 2001.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipooxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? *The Journal of Rheumatology*. v. 28, p. 2375-2382. 2000.

PELLEGRINO, F. Organização funcional das vias da dor. In: OTERO, P. E. Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais. São Paulo: Interbook, 2000. p. 6-29.

PIATO, A.L.; CAPIOTTI, K.M.; TAMBORSKI, A.R.; OSES, J.P.; BARCELLOS, L.J.; BOGO, M.R.; LARA, D.R.; VIANNA, M.R.; BONAN, C.D. Unpredictable chronic stress model in *Zebrafish* (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011a; 35: 561-7.

PINAL-SEOANE, N., MARTIN, I.R., GONZALEZ-NUNEZ, V., DE VELASCO, E.M., ALVAREZ, F.A., SARMIENTO, R.G., RODRÍGUEZ, R.E.. Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol* 2006, 37:391-403.

RANDOLPH, B.C. e PETERS, M.A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth Prog*. 44(1): 11 – 16, 1997.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 808 pp.

REILLY, S.C.; QUINN, J.P.; COSSINS, A.R.; SNEDDON, L.U.. Behavioral analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Appl Anim Behav Sci*. 2008; 114:248-249.

RICO, E.P., ROSEMBERG, D.B., SEIBT, K.J., CAPIOTTI, K.M., DA SILVA, R.S., BONAN, C.D.,. *Zebrafish* neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (6), 608e617. 2011.

ROCHA, A. P. C. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 57, n. 1, 94-105. 2007.

ROSEMBERG, D.B., BRAGA, M.M., RICO, E.P., LOSS, C.M., CÓRDOVA, S.D., MUSSULINI, B.H.M. Behavioral effects of taurine pretreatment in *zebrafish* acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 2012;63:613–23.

ROSEMBERG, D.B., RICO, E.P., MUSSULINI, B.H.M., Piato, A.L., CALCAGNOTTO, M.E., BONAN, C.D. Differences in spatio-temporal behavior of *zebrafish* in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One* 2011;6:e19397.

ROSLAND, J. H (1991) The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain.* 45:211–216.

ROSLAND, J.; TJOLSEN, A.; MLTHLE, B. The formalin test in mice effect of formalin concentration, *Pain*, 42; 235-242.

SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Is mPEGS-1 a promising target for pain therapy? *Trends in Pharmacological Sciences.* v. 27, n.8, p. 399-401. 2006.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, *Pain*, 38, 1989b: 347-352.

SHIMA, K., NAKAHAMA, H., YAKAMOTO, M., AYA, K., INASE, M. Effects of morphine on two types of nucleus raphe dorsalis neurons in awake cats. *Pain*. 29: 375-386. 1987.

SILVA, J.C., SARAIVA, S.R.G.L., JUNIOR, R.G.O., ALMEIDA, J.R.G.S. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. *Rev. Bras. Farm.* 94 (1): 18-23, 2013.

SNEDDON, L. U. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neurosci. Lett.* 2002; 319: 167-171.

SNEDDON, L. U. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain. Res. Rev.* 2004; 46: 123-130.

SNEDDON, L. U. Trigeminal somatosensory innervation of the head of the rainbow trout with particular reference to nociception. *Brain. Res.* 2003b; 972: 44-52.

SNEDDON, L. U.; BRAITHWAITE, V. A.; GENTLE, J. M. Do fish have nociceptors: evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc. R. Soc. Lond.*, 2003; 270: 1115-1122.

SNEDDON, L.U. Pain perception in fish: Indicators and endpoints. *ILARJ.*2009; 50:338-342.

SNEDDON, L.U. The evidence for pain in fish: The use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci.* 2003a; 8:153-162.

SNOW, P.J.; RENSHAW, G.M.C.; HAMLIN, K.E. Localization of enkephalin immunoreactivity in the spinal cord of the long-tailed ray *Himantura fai*. *J Comp Neurol.* 1996; 367:264-273.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the *zebrafish*, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 83, p. 13-34, 2000.

STEVENS, G. W. Opioid antinociception in amphibian. *Brain. Res. Bull.* 21. 959-962. 1988.

STEVENS, G. W., KIRKENDALL, K. Time course and magnitude of tolerance to the analgesic effects of systemic morphine in amphibians. *Life Sci.* 52, 111-116. 1993.

STEVENS, G.W. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain. Res. Rev.* 2004;46, 204-215.

STEWART, A., WU, N., CACHAT, J., HART, P., GAIKWAD, S., WONG, K. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult *zebrafish* behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:1421–31.

TAKAHASHI, H., OHKUBO, T., SHIBATA, M. AND NARUSE, S., A modified formalin test for measuring analgesia in mice, *Jpn. J. Oral Biol.*, 26 - 1984a 543-548.

TAKAKI, K.; COSMA, C.L.; TROLL, M.A.; RAMAKRISHNAN, L. An in vivo platform for rapid high-throughput antitubercular drug discovery. *Cell Rep.* 2012; 2: 175-184.

TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *European Journal Pharmacology*, v.534 p.103-107, 2006.

VERDAN, M.H.; STEFANELLO, E.A. Secondary Metabolites and Biological Properties of Gesneriaceae Species. *Chemistry & Biodiversity.* 2012; 9 : 2701-2731.

WONG, K.; ELEGANTE, M.; BARTELS, B.; ELKHAYAT, S.; TIEN, D.; ROY, S.; GOODSPEED, J.; SUCIU, C.; TAN, J.; GRIMES, C.; CHUNG, A.; ROSENBERG, M.; GAIKWAD, S.; DENMARK, A.; JACKSON, A.; KADRI, F.; CHUNG, K. M.; STEWART, A.; GILDER, T.; BEESON, E.; ZAPOLSKY, I.; WU, N.; CACHAT, J.; KALUEFF, A.V. Analyzing habituation responses to novelty in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research.* 2010; 208:450–457.

XIA, S.; ZHU, Y.; XU, X.; XIA, W. Computational techniques in *Zebrafish* image processing and analysis. *J Neurosci Methods.* 2012; S0165-0270: 00465-7.

YU, X.; TONG, Y.; HIN-FAI KWOK, F.; CHO-WING SZE, S.; ZHONG, L.; BIK-SAN LAU, C.; GE, W. Anti-angiogenic activity of Erxian Decoction, a traditional Chinese herbal formula, in *Zebrafish*. *Biol Pharm Bull.* 2012.