

POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTICONVULSIVANTE DE ÁCIDO 5-HIDROXI-ARJUNÓLICO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Maria E. U. Bezerra¹; Jéssica B. Maciel¹; Jane E. S. A. De Menezes¹; Hélcio S. Dos Santos¹; Otília L. Pessoa².

¹Universidade Estadual do Ceará.

²Universidade Federal do Ceará.

eduarda.uchoa@aluno.uece.br

Palavras-Chave: Zebrafish, Triterpeno, Convulsão.

Introdução

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico caracterizado por uma atividade anormal dos neurônios cerebrais, que resulta em convulsões recorrentes e repentinas. Essa atividade desregulada provoca descargas elétricas excessivas, comprometendo o funcionamento cerebral e afetando diretamente a consciência e os movimentos físicos dos indivíduos acometidos (Long, 2020).

Estima-se que cerca de 30% dos pacientes com epilepsia não conseguem controlar adequadamente as crises com os medicamentos anticonvulsivantes atualmente disponíveis, o que impacta significativamente sua qualidade de vida (Milder, 2022). Outro aspecto relevante é que esses fármacos apresentam diversos efeitos colaterais, como sedação, prejuízo cognitivo, desconforto gastrointestinal e hepatotoxicidade. Outro fator preocupante é o elevado custo do tratamento: em 2019, os gastos globais com a epilepsia chegaram a US\$ 119,27 bilhões (Malanik, 2023).

Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por novas alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento das convulsões (Challal, 2014). Nesse contexto, os metabólitos secundários derivados de plantas têm se destacado como fontes promissoras de compostos bioativos com potencial anticonvulsivante (Knap, 2023). Um exemplo notável é o canabidiol (CBD), um composto isolado da *Cannabis sativa*, que tem sido utilizado clinicamente como terapia auxiliar no tratamento de convulsões refratárias, especialmente em crianças e adolescentes (He, 2024).

Entre as plantas estudadas com esse potencial terapêutico, destaca-se o gênero *Combretum*, conhecido pela produção de diversos metabólitos bioativos, incluindo triterpenos. Pesquisas conduzidas por Silva et al. (2021) demonstraram que a espécie *Combretum lanceolatum* apresenta atividade anticonvulsivante significativa, mediada pela modulação da via GABAérgica, uma das principais vias envolvidas no controle das convulsões. Esses achados evidenciam o potencial do gênero *Combretum* no desenvolvimento de terapias para distúrbios neurocomportamentais, como a epilepsia.

Dentro desse grupo, o ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6), um triterpeno cíclico isolado da espécie *Combretum mellifluum* Eichler, tem se mostrado um composto de interesse. Estudos indicam que sua ação também ocorre por meio da via GABAérgica (Silva, 2024). No entanto, ainda não existem investigações específicas sobre seu potencial anticonvulsivante.

Para avaliar os efeitos biológicos de novos fármacos, a utilização de modelos animais é indispensável. Embora os mamíferos, como roedores e camundongos, sejam amplamente utilizados, modelos alternativos, como o zebrafish (*Danio rerio*), têm ganhado destaque devido à sua excelente performance experimental (Lemos, 2025). O zebrafish compartilha aproximadamente 85% dos genes associados à epilepsia humana (Malanik, 2023), sendo, por isso, amplamente reconhecido como um modelo *in vivo* eficaz para estudos sobre epilepsia, especialmente em triagens de compostos com potencial terapêutico (Knap, 2023).

Material e Métodos

Amostra

O ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6) foi cedido pela Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, do Laboratório de Produtos Naturais e Marinhos, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Zebrafish

Foram utilizados zebrafish adultos da espécie *Danio rerio*, linhagem selvagem, com idade entre 60 e 90 dias, adquiridos de fornecedor comercial em Fortaleza–CE. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), protocolo nº 04983945/2021.

Protocolo geral

Os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram anestesiados, posicionados em esponja umedecida e tratados por via intraperitoneal (i.p.) com 20 μL de CM6 (4, 20 ou 40 mg/kg), diazepam (DZP, 4 mg/kg) ou veículo (DMSO 3%). Os dados foram analisados no software GraphPad Prism v.8.0, com significância estatística considerada para $p < 0,05$.

Toxicidade aguda (96h)

Para avaliar a toxicidade aguda, os animais ($n = 6/\text{grupo}$) receberam CM6 (4, 20 ou 40 mg/kg; i.p.) ou DMSO 3% e foram monitorados por 96 h quanto à mortalidade. A dose letal capaz de matar (DL_{50}) foi estimada pelo método Trimmed Spearman-Kärber, com IC de 95% (OECD, 2019; Arellano-Aguiar, 2015).

Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Os zebrafish ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados com CM6 (4, 20 ou 40 mg/kg) ou DMSO 3%. Após 30 minutos, foram individualmente alocados em placas de Petri ($10 \times 15 \text{ cm}$) divididas em quatro quadrantes. A atividade locomotora foi registrada por 5 minutos, com contagem dos cruzamentos de linha.

Convulsão induzida por pentilenotetrazol PTZ

Os animais ($n = 6/\text{grupo}$) foram tratados com CM6 (4, 20 ou 40 mg/kg), DZP (4 mg/kg) ou DMSO 3%. Após 1 hora, foram imersos em solução de PTZ (10 mM). Os comportamentos convulsivos foram classificados em três estágios: estágio I, aumento acentuado da atividade de natação; estágio II: comportamento de natação em espiral, estágio III: convulsões do tipo clônus, seguidas de perda de postura. O tempo necessário para atingir cada estágio foi cronometrado. Após a avaliação, os animais foram eutanasiados por imersão em água gelada, conforme recomendações éticas (Siebel, 2015).

Avaliação da neuromodulação GABAérgica

Para investigar a via GABAérgica, dois grupos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com flumazenil (4 mg/kg; i.p.). Após 15 minutos, receberam CM6 (4 mg/kg) ou DZP (4 mg/kg). Trinta minutos depois, foram expostos ao PTZ (10 mM), e os estágios convulsivos foram avaliados conforme descrito anteriormente.

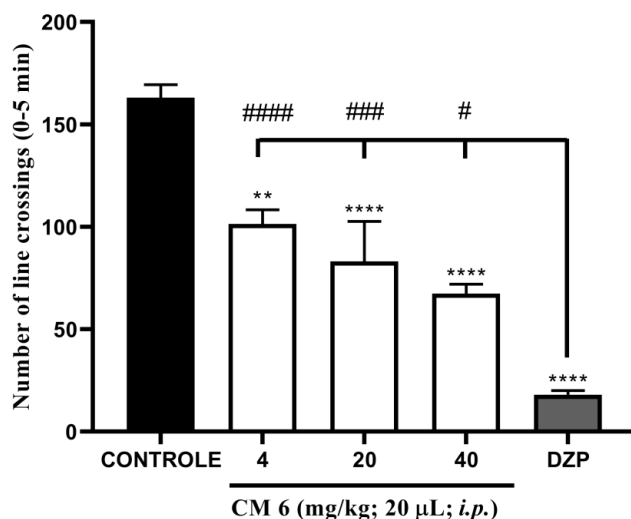
Resultados e Discussão

Avaliação da atividade locomotora

As três concentrações de CM6 (4, 20 e 40 mg/kg) promoveram um aumento significativo no número de cruzamentos de linha em comparação ao Diazepam, sugerindo que

o composto não induziu comprometimento locomotor nos animais durante o período de observação de 5 minutos.

Figura 1 - Atividade locomotora de Zebrafish adulto frente ao CM6



Efeito da CM 6 no comportamento locomotor do peixe-zebra adulto no Teste de Campo Aberto (0–5 min). Os valores representam a média \pm erro padrão da média para 6 animais/grupo; ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; vs. Controle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ vs. DZP).

Toxicidade aguda 96h

A amostra CM6 não apresentou toxicidade em *Danio rerio* adulto durante o período de 96 horas de avaliação, com DL_{50} superior a 40 mg/kg. Além disso, não foram observadas alterações anatômicas macroscópicas nos animais tratados.

Tabela 1 - Resultados dos testes de toxicidade aguda 96h

Amostra	Mortalidade				96h $DL_{50} > 40$ (mg/kg) / IC
	CN	D1	D2	D3	
Ácido 5-hidroxi-arjunólico	0	3	2	1	

Legenda: CN- Grupo controle negativo: DMSO 3%. D1 – Dose 1 (4 mg/kg). D2 – Dose 2 (20 mg/kg). D3 – Dose 3 (40 mg/kg). DL_{50} -dose letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IC – intervalo de confiança.

Convulsão induzida por pentilenotetrazol PTZ

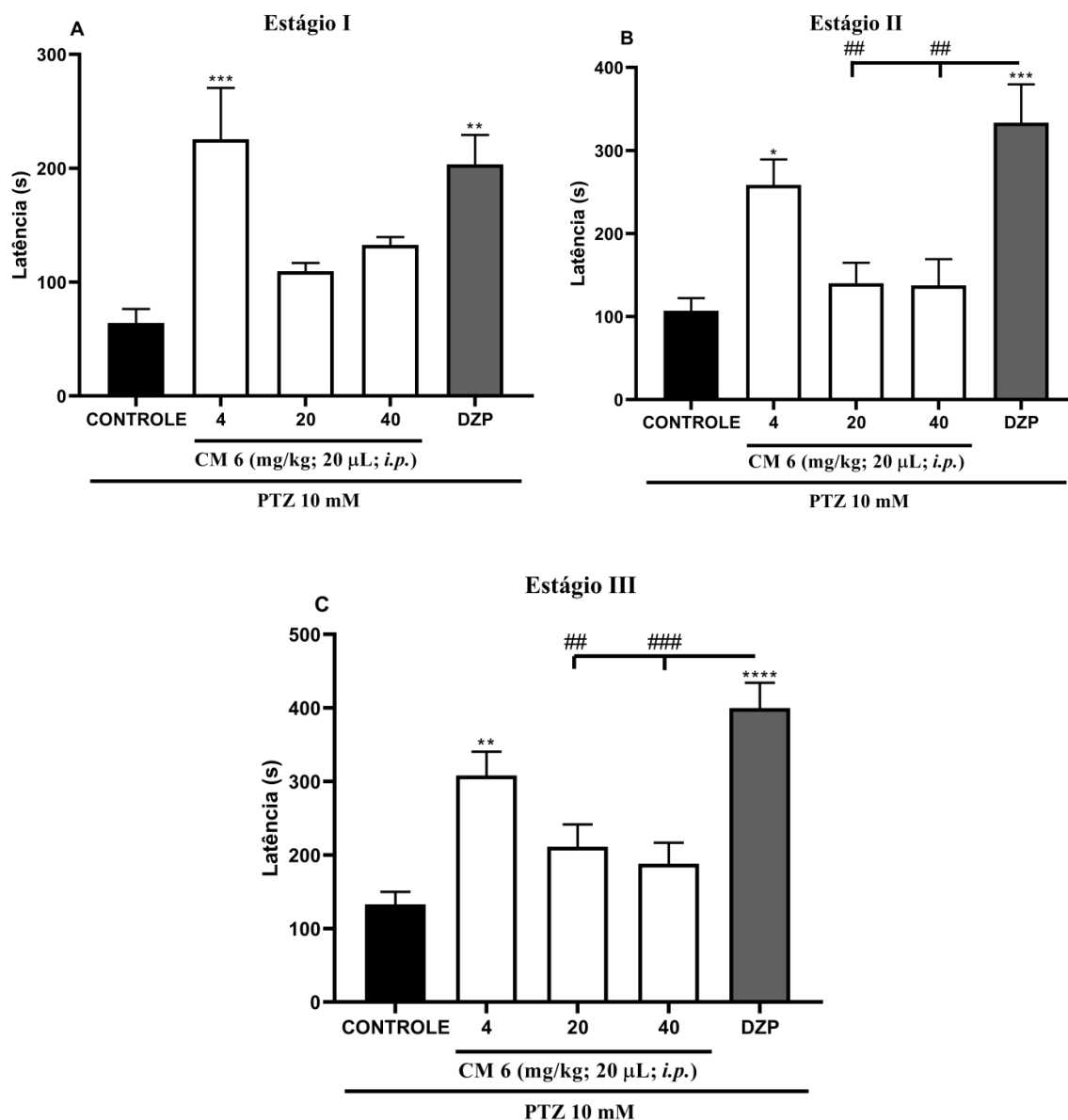
Os resultados indicam que a dose de 4 mg/kg do CM6 apresenta eficácia semelhante ao controle positivo Diazepam nos três estágios. Ambos os tratamentos aumentaram o tempo de latência para o início das três fases de convulsão analisadas. Esse resultado evidencia um potencial efeito anticonvulsivante do CM6 em convulsões induzidas por PTZ.

O PTZ (Pentilenotetrazol) é amplamente utilizado como modelo de indução de convulsão, pois age como antagonista dos receptores $GABA_A$ no SNC de mamíferos, causando bloqueio seletivo da ação inibitória do GABA, um dos mecanismos centrais para o desencadeamento das crises convulsivas (Macdonald; Barker, 1977).

Nesse sentido, a maioria dos agentes antiepiléticos atua favorecendo a resposta do receptor $GABA_A$ ao neurotransmissor inibitório GABA (Lima, 2021). Desse modo, o retardo na manifestação das três fases da convulsão indica que o Ácido 5-hidroxi-arjunólico causa possível redução da excitabilidade neural no SNC de modo semelhante aos benzodiazepínicos, como o diazepam (DZP).

Tal resultado é promissor, visto que existem relatos na literatura de terpenos naturais capazes de modular o sistema $GABAérgico$ e tratar doenças neurológicas, favorecendo novas perspectivas para o tratamento de distúrbios, como a convulsão (Manany, 2016).

Figura 2 - Efeito do CM6 frente à convulsão induzida por PTZ em Zebrafish adulto



Teste anticonvulsivante da **CM6** (A) Estágio I. (B) Estágio II (C) Estágio III. Efeito anticonvulsivante da amostra em zebrafish (*Danio rerio*) adulto a partir da indução de convulsão por PTZ. Controle (DMSO 3%; 20 μ L; i.p.); Dzp – Diazepam (4 mg/kg; i.p.). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, vs. Controle; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs. DZP).

Avaliação da neuromodulação GABAérgica

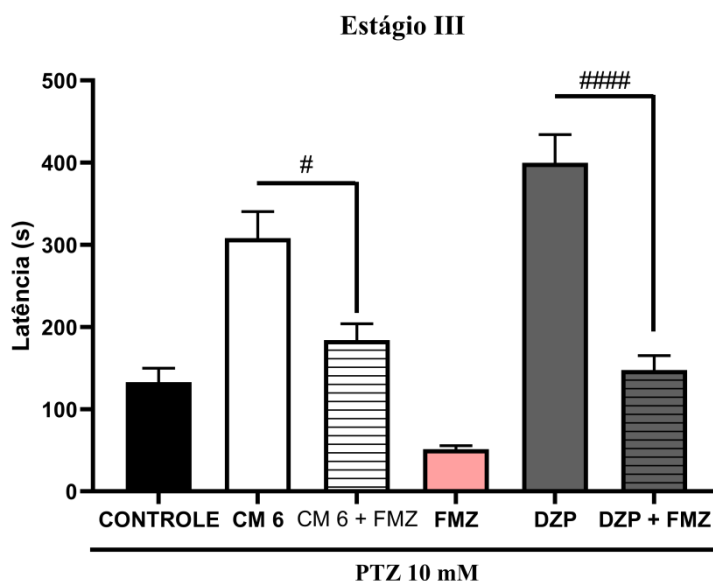
O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, cuja atuação ocorre principalmente na via GABAérgica (Seelhammer et al., 2018). Em particular, pode se conectar ao receptor ionotrópico GABA_A e ativá-lo para permitir a entrada de íons cloro na célula e reduzir a excitabilidade neuronal (Rocha; Lara, 2020).

Na epilepsia, a disfunção ou perda de neurotransmissores inibitórios no córtex cerebral compromete a inibição dos neurônios excitatórios e essa hiperexcitabilidade leva à atividade convulsiva descontrolada (Chen; Sharma, 2025). Dessa forma, muitos anticonvulsivantes amplamente utilizados, como o diazepam, exercem efeito modulador da via GABAérgica, aumentando a ação inibitória do GABA.

Em contra partida, o PTZ é um estimulante que bloqueia o receptor GABA_A, impedindo a entrada de Cl⁻ nos neurônios, o que propicia uma excitação exacerbada dos neurônios, culminando na indução de convulsões.

A avaliação do mecanismo de ação envolvido no possível efeito anticonvulsivante do CM6 foi realizada utilizando a dose de 4 mg/kg, escolhida por ter apresentado o maior tempo de latência para atingir o estágio III da convulsão, considerado o mais relevante por corresponder a convulsões do tipo clônicas.

Figura 3 - Avaliação do mecanismo de ação da amostra CM6



Mecanismo de ação anticonvulsivante via GABA da amostra **CM 6 (4mg/kg)** no Estágio III. (*Danio rerio*) adulto no Teste de indução de convulsão por PTZ. Controle – DMSO 3% (20 µL; *i.p.*). DZP – Diazepam (4 mg/kg; 20 µL; *i.p.*). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (####*p*<0,0001 DZP vs. Fmz + DZP; #*p*<0,05 CM 6 vs. Fmz + CM 6).

Os dados indicaram que, após o bloqueio dos receptores GABA_A com flumazenil, houve uma redução significativa no tempo de latência para o início das convulsões, sugerindo que o efeito anticonvulsivante do CM6 é possivelmente mediado pela via GABAérgica. Esse resultado foi corroborado por análise estatística, que revelou diferença significativa entre os grupos tratados com CM6 isoladamente e CM6 associado ao flumazenil (CM6 vs. CM6 + Fmz, # *p*< 0,05; Fig. 2).

Esses resultados corroboram o efeito anticonvulsivante do ácido 5-hidróxi-arjunólico, uma vez que fármacos anticonvulsivantes comercialmente utilizados atuam de forma semelhante na via GABAérgica. Essa correspondência sugere que o mecanismo de ação do composto é consistente com os princípios farmacológicos já estabelecidos, reforçando a relevância dos achados.

Conclusões

Conclui-se que o ácido 5-hidroxi-arjunólico (CM6), nas concentrações testadas, não apresentou toxicidade nem alterações anatômicas aparentes em zebrafish durante o período de 96 horas de análise. Ademais, não foram observadas alterações significativas na locomoção dos animais, conforme demonstrado no teste de campo aberto. Além disso, a dose de 4 mg/kg demonstrou um possível efeito anticonvulsivante, evidenciado pelo aumento do tempo de latência em todos os estágios de convulsão induzidos por PTZ. A reversão desse efeito pelo antagonista flumazenil sugere o envolvimento dos receptores GABA_A na sua ação

neuromodulatória. Esses achados ressaltam o potencial farmacológico do CM6 e apontam para novas perspectivas terapêuticas no desenvolvimento de alternativas para o tratamento da epilepsia.

Referências

- ARELLANO-AGUIAR, O.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; SALGADO-MIRANDA, C.; BERNAL-HERNÁNDEZ, Y.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M. A.; PÉREZ-ROJAS, J. J. Use of the Zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, 9(4), 52–62, 2015.
- CHALLAL, S.; BUENAFE, O. E. M.; QUEIROZ, E. F.; MALJEVIC, S.; MARCOURT, L.; BOCK, M.; KLOETI, W.; DAYRIT, F. M.; HARVEY, A. L.; LERCHE, H.; ESGUERRA, C. V.; DE WITTE, P. A. M.; WOLFENDER, J.-L.; CRAWFORD, A. D. Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. **ACS Chemical Neuroscience**. 5 (8), 785–796, 2014.
- CHEN, R. J.; SHARMA, S. Receptor GABA. In: STATPEARLS. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 2025.
- HE, X.; CHEN, X.; YANG, Y.; XIE, Y.; LIU, Y. Medicinal plants for epileptic seizures: Phytoconstituents, pharmacology and mechanisms revisited. **Journal of Ethnopharmacology**, 320, 117386, 2024.
- ROCHA, C. R. J.; LARA, J. N. A AMBIGUIDADE EXERCIDA PELO ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA): UM RESUMO SOBRE O PAPEL DO GABA NA INIBIÇÃO E NA EXCITAÇÃO. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 2, 2020.
- KNAP, B.; NIEOCZYM, D.; KUNDAP, U.; KUSIO-TARGONSKA, K.; KUKULA-KOCH, W.; TURSKI, W. A.; GAWEL, K. Zebrafish as a robust preclinical platform for screening plant-derived drugs with anticonvulsant properties: a review. **Frontiers in Molecular Neuroscience** 16, 2023.
- LEMOES, C. G. **Potencial neurofarmacológico do flavonoide robinina isolada de *Solanum asperum* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto**. 2025. Orientadora: Jane Eire Silva Alencar de Menezes. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, UECE, 2025.
- LIMA, J. R.; FERREIRA, M. K. A.; DA SILVA, A. W.; MAGALHÃES, F. E. A.; DOS SANTOS, H. S.; BEZERRA, A. J. N.; DE MENEZES, J. E. S. A. Efeito anticonvulsivante da chalcona sintética (2E-1-(-2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **II Biotec Meeting – Encontro Internacional de Biotecnologia em Saúde Humana e Animal**, Fortaleza, 2021.
- LONG, X. Y.; WANG, S.; LUO, Z.W.; ZHANG, X.; XU, H. Comparison of three administration modes for establishing a zebrafish seizure model induced by N-Methyl-D-Aspartic Acid. **World J Psychiatry**.10(7), 150-161, 2020.
- MACDONALD, R., BARKER, J. P. Pentylentetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. **Nature**, 267, 720–721, 1977.



MALANÍK, M.; ČULENOVÁ, M.; SYCHROVÁ, A.; SKIBA, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; ŠMEJKAL, K. Treating epilepsy with natural products: Nonsense or possibility? **Pharmaceuticals**, 16(8), 1061, 2023.

MILDER, P. C.; ZYBURA, A. S.; CUMMINS, T. R.; MARRS, J. A. Neural activity correlates with behavioral responses to anticonvulsant treatment in the pentylenetetrazol seizure model in zebrafish. **Frontiers in Pharmacology**. 13, 836573, 2022.

MANAYI, A.; NABAVI, S. M; DAGLIA, M.; JAFARI. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, 68(4), 671–679, 2016.

OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing, Section 2: Effects on Biotic Systems. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, 203, 10, 2019.

SIEBEL, Anna Maria *et al.* Role of adenosine signaling on pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. **Zebrafish**, 12(2), 127-136, 2015.

SILVA, A. E. F.; ROMÃO, I. C.; SILVA, J. A.; BEZERRA, M. E. U.; FERREIRA, M. K. A.; MENEZES, J. E. S. A. **Avaliação do efeito ansiolítico do ácido 5-hidroxiarjunólico em modelo zebrafish (Danio rerio) adulto.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 63., 2024, Salvador. Anais... Salvador: Associação Brasileira de Química.

SILVA, A., W.; FERREIRA, M., K., A.; PEREIRA, L. R.; REBOUÇAS, E. L.; COUTINHO, M. R.; LIMA, J. R.; GUEDES, M. I. F.; BANDEIRA, P. N.; MAGALHÃES, F. E. A.; MENEZES, J. S. A.; MARINHO, M. M.; TEIXEIRA, A. M. R.; TREVISAN, M. T. S.; SANTOS, H. S. dos; MARINHO, E. S. *Combretum lanceolatum* extract reverses anxiety and seizure behavior in adult zebrafish through GABAergic neurotransmission: an in vivo and in silico study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 40(20), 9801–9814, 2021.