

KAMILA SOARES LOPES

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIÉPILEPTICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA
PEÇONHA DA VESPA SOCIAL *Chartergellus communis* (Hymenoptera:
Vespidae).**

Neuropharma
lab



BRASÍLIA, 2018

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

KAMILA SOARES LOPES

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA
PEÇONHA DA VESPA SOCIAL *Chartergellus communis* (Hymenoptera:
Vespidae).**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

**BRASÍLIA
2018**

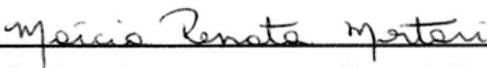
KAMILA SOARES LOPES

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIEPILEPTICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA
PEÇONHA DA VESPA SOCIAL *Chartergellus communis* (Hymenoptera:
Vespidae).**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em _03_/_07_/_2018_

BANCA EXAMINADORA



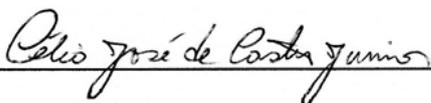
Profa. Dra. Márcia Renata Mortari (Presidente)
Universidade de Brasília



Profa. Dra. Djane Braz Duarte
Universidade de Brasília



Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Universidade Católica de Brasília



Prof. Dr. Célio José de Castro Júnior
Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte

Profa. Dra. Victória Monge-Fuentes
Universidade de Brasília (suplente)

Dedico este trabalho...
À Deus, fonte da minha determinação.
À minha família, os acolhedores dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Sou enormemente grata a Deus, por ter me dado forças nos momentos de maior precisão, guiado meus passos pelos melhores caminhos e abençoado as minhas escolhas. Amém!

Serei eternamente grata à excelente educação que meus pais puderam me proporcionar. Duas pessoas que nunca mediram esforços para garantir a mim, e aos meus irmãos, tudo o que nós precisávamos para sermos pessoas bem instruídas, honestas e íntegras.

Agradeço ao carinho dos meus irmãos (Kércia, Silvio e Marcelo). Sei o quanto torcem pelo meu sucesso, e que sempre poderei contar com seus ombros amigos para quaisquer momentos de dificuldade.

Tenho, e sempre terei, uma gratidão enorme pelo meu querido marido Kelson Costa. Um exemplo de pessoa humilde, amiga e companheira. Passamos por muitos contratempos nesses últimos 4 anos, mas a nossa força de vontade e, acima de tudo, o compromisso que temos um com o outro fizeram com que pudéssemos crescer juntos. A sua compreensão, em inúmeros momentos, foi essencial e acolhedora. Você tem uma parcela considerável nessa vitória.

Agradeço o companheirismo de todos os colegas integrante tanto do grupo Neuropep quanto do laboratório de Neurofarmacologia da UnB. Em especial aos alunos de iniciação científica que me ajudaram diretamente na execução dessa pesquisa (Luiz Felipe, Fernanda, Adriana e Gabriela), e às colegas que fizeram e ainda fazem parte do grupo de pesquisa em Epilepsia do laboratório (Juliana, Flávia, Lilian e Maria). Muito obrigada pelos ensinamentos e dedicação no desempenho de importantes ensaios.

À Andréia, Jacqueline, Priscilla e Luana. Obrigada pela ajuda e acolhimento em diversos momentos.

Sou grata à Profa. Márcia, pelos esforços para que esta pesquisa fosse realizada da melhor forma possível. Garantiu o financiamento necessário e as condições de excelência ao desempenho de ensaios confiáveis. Agradeço também pelas oportunidades dadas e confiança depositada.

Muito obrigada também ao técnico de laboratório Adolfo, pelo auxílio essencial com a execução dos procedimentos de cromatografia e MALDI. Assim como também sou grata pela disponibilidade e ajuda fundamental do Prof. Possani e do Fernando Zamudio na obtenção dos dados de degradação automática de Edman.

Gostaria de agradecer também aos financiadores dessa pesquisa: CAPES, FAPDF, CNPq e Rede Pró-Centro-Oeste.

Por fim, agradeço a todas as dificuldades que enfrentei e barreiras superadas. Tenho certeza que elas me ensinaram a ser uma pessoa mais madura e preparada para o enfrentamento das adversidades desse mundo.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguimos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

“O homem deve saber que, de nenhum outro lugar, se não do cérebro vem a alegria, o prazer, o riso e a recreação, e a tristeza, melancolia, pessimismo e as lamentações. E então, de uma maneira especial, adquirimos sabedoria e conhecimento, e vemos e ouvimos para saber o que é justo e o que não é, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é sem sabor... E pelo mesmo órgão tornamos-nos loucos e delirantes, e sentimos medo e o terror nos assola... Todas essas coisas provêm do cérebro quando este não está sadio... Dessa maneira sou da opinião de que o cérebro exerce um grande poder sobre o homem.”

(Hipócrates, Da Doença Sacra, IV A.C)

RESUMO

Lopes, KS. **ESTUDO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DA VESPA SOCIAL *Chartergellus communis* (Hymenoptera: Vespidae)**. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2018.

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo. O objetivo dessa pesquisa foi buscar por moléculas úteis à farmacoterapia de crises epiléticas, a partir da peçonha de vespas sociais. Inicialmente, foi feita a coleta e extração de peçonha das vespas *Chartergellus communis*. Após obtenção desta, foi feito o fracionamento, sequenciamento e identificação dos peptídeos. Foram identificados 6 peptídeos. Quatro destes peptídeos (denominados communis 07, communis 11, communis 18 e communis 19) foram sintetizados, para posterior utilização em ensaios comportamentais de avaliação do potencial antiepilético (indução aguda de crises pelo uso dos compostos químicos pentilenotetrazol – PTZ e pilocarpina - PILO) e análise do perfil neurofarmacológico (avaliação da atividade geral espontânea e de alteração na coordenação motora). Foi verificado que o peptídeo communis 19 (3,0 µg/animal) apresentou resultados mais proeminentes, devido às alterações benéficas em alguns dos parâmetros avaliados tanto no ensaio com PTZ (latência e duração de crises máximas) quanto no ensaio com PILO (latência, duração e proteção contra crise máxima, e redução da mediana das classes de crises). Como os melhores resultados ocorreram no modelo utilizando a PILO, então communis 19 foi avaliado em 3 outras doses (0,3, 1,5 e 6,0 µg/animal), porém a dose de 3,0 µg/animal continuou apresentando melhor desempenho, com DE₅₀ estimada em 1,49 µg/animal. Na avaliação eletroencefalográfica do efeito de communis 19 (3,0 µg/animal) foi verificada uma melhora da latência, quantidade e percentual de proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas no modelo de PILO. Além do mais, communis 19 (3,0 e 30 µg/animal) não causou efeitos adversos na atividade geral espontânea e na coordenação motora dos animais. Em conclusão, foi identificado na peçonha de *C. communis* um peptídeo potencialmente útil à farmacoterapia da epilepsia.

Palavras-chave: peptídeos de vespa; epilepsia; pentilenotetrazol; pilocarpina.

ABSTRACT

Lopes, KS. **STUDY OF ANTIEPILEPTIC POTENTIAL OF PEPTIDES ISOLATED FROM SOCIAL WASP VENOM *Chartergellus communis* (Hymenoptera: Vespidae)**. Doctoral thesis – Post-graduate Program in Health Sciences, Brasília University, 2018.

Epilepsy is one of the most common neurological diseases in the world. The objective of this research was to search for molecules useful to the pharmacotherapy of Epilepsy, from the venom of the social wasps. Initially, the venom of *Chartergellus communis* wasps was collected and their venom was extracted. Afterwards, the fractionation, sequencing and identification of peptides was carried out. Six peptides were identified. Four of these peptides (named communis 07, communis 11, communis 18 and communis 19) were synthesized for later use in behavioral evaluation tests to assess antiepileptic potential (induction of acute crisis using the chemical compounds pentylenetetrazole - PTZ and pilocarpine - PILO) and analysis of neuropharmacological profile (evaluation of general spontaneous activity and alteration in motor coordination). Among the peptides tested, it was verified that peptide communis 19 (3.0 µg/animal) presented the most prominent results, since it caused beneficial alterations in some of the parameters evaluated in both the PTZ (latency and duration of maximum crisis) and PILO (latency and duration of, and protection against, maximum crisis, and reduction of the median of the crisis classes). As the best results occurred with induction of epileptic seizures by PILO, then communis 19 was evaluated in 3 other doses (0.3, 1.5 and 6.0 µg/animal), however the dose of 3.0 µg/animal continued to be the best, with estimated ED₅₀ of 1.49 µg/animal. Electroencephalographic evaluation of the effect of communis 19 (3.0 µg/animal) showed a improve in latency, quantity and percentage of protection against generalized electroencephalographic crisis in the PILO model. In addition, communis 19 (3.0 and 30 µg/animal) did not cause adverse effects on general spontaneous activity and motor coordination of animals.

Keywords: wasp peptides; epilepsy; pentylenetetrazole; pilocarpine.

LISTA DE FIGURAS

- 1 Representação esquemática padrão dos tipos de crises epiléticas, segundo a classificação da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE). Modificada a partir de Fisher et al., 2017 (16). 27
- 2 Representação esquemática de alguns fármacos antiepiléticos comercialmente disponíveis e seus principais alvos terapêuticos. Modificado a partir de Loscher & Schmidt, 2012 (35). 30
- 3 Fotografia da vespa social *Chartergellus communis* nas vistas lateral (a), dorsal (b) e ventral (c). Foto: Leandro Campos; Janeiro de 2016. 40
- 4 Processo de extração manual das glândulas e reservatórios de peçonha utilizando pinças. Foto: Luana Cristina; Fevereiro de 2016. 49
5. Um dos passos envolvidos na implantação da cânula-guia na região do ventrículo lateral cerebral direito dos animais (a) e o procedimento de administração por via intracerebroventricular utilizando uma bomba de infusão (b). Foto: Kamila Soares, fevereiro de 2018. 55
- 6 Fatia do cérebro de camundongo Swiss (*Mus Musculus*), no plano coronal, demonstrando o local de incisão da cânula-guia (seta preta), e a difusão do corante azul de metileno pela área dos ventrículos laterais. Foto: Kamila Soares, fevereiro de 2018. 56
- 7 Esquema do delineamento experimental utilizado para indução de crises epiléticas através da administração do composto químico Pentilenotetrazol (PTZ). 57
- 8 Esquema do delineamento experimental utilizado para indução de crises epiléticas através da administração do composto químico Pilocarpina (PILO). 58
- 9 Em (a) são demonstrados o dispositivo eletrônico conector (*) e os eletrodos a serem implantados no córtex cerebral (#). Em (b) observa-se o esquema ilustrativo da posição dos seis eletrodos implantados no encéfalo do animal, necessários para aquisição dos registros eletroencefalográficos. Em (c) é demonstrado o dispositivo eletrônico conectado aos eletrodos (finalização do procedimento cirúrgico). Fotos: Kamila Soares, fevereiro de 2018. 62

- 10 Arena circular de acrílico que foi utilizada no ensaio de Campo Aberto, para a determinação da atividade geral espontânea. Foto: Kamila Soares, março de 2018. 65
- 11 Equipamento Rotarod (Insight Equipamentos[®], Brasil) que foi utilizado para avaliação da coordenação motora. Foto: Kamila Soares, março de 2018. 67
- 12 Ninhos da vespa social *Chartergellus communis*, coletados no Parque Municipal do Itiquira, em Formosa – GO. (a) Ninho aderido a um poste de iluminação localizado no interior do parque. Foto: Flávia Maria; Maio, 2014. (b) Ninho aderido a uma estrutura de madeira localizada na entrada do parque. Foto: Kamila Soares; Abril, 2015. 71
- 13 Cromatograma da peçonha ultrafiltrada de *C. communis* utilizando uma coluna semi-preparativa C18 Phenomenex. Peçonha reconstituída em água e acetonitrila a 5%. (A) corresponde às frações que não serão analisadas nesse estudo. *Communis* 01 a *communis* 19 correspondem às frações que tiveram suas massas moleculares analisadas por espectrometria de massas. 74
- 14 Cromatogramas obtidos após os procedimentos de recromatografias para purificação dos peptídeos de interesse. Foi utilizada uma coluna analítica C18 Phenomenex. (a) *communis* 07, eluição em 21,5% do solvente B. (b) *communis* 11, eluição em 32% do solvente B. (c) *communis* 15, eluição em 47,5% do solvente B. (d) *communis* 16, eluição em 46,2 % do solvente B. (e) *communis* 18, eluição em 49% do solvente B. (f) *communis* 19, eluição 50,2% do solvente B.
- 15 Espectros de massa dos peptídeos de interesse obtidos por MALDI TOF/TOF, demonstrando o grau de pureza das amostras $[M+H]^+$. (a) *communis* 07. (b) *communis* 11. (c) *communis* 15. (d) *communis* 16. (e) *communis* 18. (f) *communis* 19. 79
- 16 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo *communis* 07. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 80
- 17 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo *communis* 11. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 81

- 18 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 15. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 82
- 19 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 16. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 83
- 20 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 18. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 84
- 21 Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 19. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. 85
- 22 Alinhamento das sequências primárias dos peptídeos isolados a partir da peçonha da vespa social *Chartergellus communis* com aquelas anteriormente descritas na peçonha de outros Himenópteros. (AA) corresponde à quantidade de aminoácidos. (%Id) corresponde ao percentual de identidade do peptídeo correspondente isolado de *Chartergellus communis* em relação a outros peptídeos anteriormente descritos. (*) resíduo igual; (:) modificação conservativa; (.) modificação semi-conservativa; espaço em branco corresponde a ausência de identidade entre os resíduos. 87
- 23 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para crise máxima (classe 6) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student. *p<0,05 e ***p<0,001 comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 95
- 24 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a duração da crise máxima (classe 6) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 07 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 11 e 18). *p<0,05 e ***p<0,001 comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 96

- 25 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 07, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 11). **p<0,01 em comparação ao grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 96
- 26 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 11, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07). **p<0,01 e ***p<0,001 comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 99
- 27 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a duração da crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 11, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07). ***p<0,001 e ****p<0,0001 comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 100
- 28 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07, 11 e 18). O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP:

- Diazepam (4mg/kg de animal). 100
- 29 Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a latência para crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na tabela 11. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 105
- 30 Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a duração da crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos (doses de 0,3, 3,0 e 6,0), ou o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's, para dados não paramétricos (dose de 1,5). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparados com o grupo LCRa. ++ $p < 0,01$ comparado com a dose imediatamente anterior. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. 105
- 31 Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos (doses de 0,3 e 6,0), ou o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's, para dados não paramétricos (doses de 1,5 e 3,0). * $p < 0,05$ comparado com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: liquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 106
- 32 Curva do efeito de três doses do peptídeo communis 19 (em log) sobre o percentual de proteção contra a crise máxima induzida pela Pilocarpina. Para o cálculo da DE50 foi feita uma regressão não-linear sigmoide. 108
- 33 Registro eletroencefalográfico representativo da atividade elétrica basal de camundongos, onde se observa ausência de atividade elétrica com

- alta frequência e amplitude. 112
- 34 Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise epiléptica generalizada em camundongos, utilizando o indutor químico Pilocarpina, onde se observa atividade elétrica de alta frequência e amplitude, além da sincronia nos disparos elétricos dos dois canais de registros. 113
- 35 Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 µg/animal, sobre a latência para crise eletroencefalográfica generalizada no ensaio de indução aguda de crises epilépticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 114
- 36 Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 µg/animal, sobre a duração das crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epilépticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 114
- 37 Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 µg/animal, sobre a quantidade de crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epilépticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 114
- 38 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de exploração no ensaio de Campo Aberto (Open Field). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. **p<0,01 comparado com o grupo LCRa. +++p<0,001 e ++++p<0,0001 comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido 115

- cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 119
- 39 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de imobilidade no ensaio de Campo Aberto (Open Field). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado com o grupo LCRa. +++ $p < 0,001$ e ++++ $p < 0,0001$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 119
- 40 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de elevação no ensaio de Campo Aberto (Open Field). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo LCRa. + $p < 0,05$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 120
- 41 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de autolimpeza no ensaio de Campo Aberto (Open Field). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 120
- 42 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre a quantidade de linhas cruzadas no ensaio de Campo Aberto (Open Field). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 121
- 43 Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre latência para a queda no ensaio de Rotarod. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LCRa, e ++++ $p < 0,0001$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto

por 7-8 animais. LCRA: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP:
Diazepam (4mg/kg de animal).

LISTA DE TABELAS

- 1 Compostos isolados a partir da peçonha de vespas e suas principais atividades biológicas relacionadas. Modificada a partir de Monteiro et al., 2009 (79) e Lee et al., 2016 (80). 39
- 2 Avaliação das crises epilépticas induzidas por Pentilenotetrazol considerando-se as classes atribuídas ao índice de Racine (1972) (123), modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009) (124). 59
- 3 Avaliação das crises epilépticas induzidas por Pilocarpina considerando-se as classes atribuídas ao índice de Racine (1972) (123), modificado a partir de Shibley e Smith (2002) (125). 60
- 4 Medições utilizadas, a partir do ponto do Bregma, para a implantação dos seis eletrodos necessários à captação dos sinais eletroencefalográficos apresentados pelos animais. 63
- 5 Definições dos comportamentos avaliados no ensaio do Campo Aberto, modificados a partir de Speller e Westby, 1996 (126). 65
- 6 Massas moleculares, em Daltons, obtidas após espectrometria de massas das frações peptídicas isoladas a partir da peçonha de *Chartergellus communis*. 76
- 7 Massas moleculares, em daltons, e sequência primária dos peptídeos isolados a partir da peçonha obtida de *Chartergellus communis*. 86
- 8 Classes de moléculas com as quais os peptídeos isolados a partir da peçonha de *Chartergellus communis* apresentam similaridades. 88
- 9 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 6), taxa de sobrevivência e média das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epilépticas utilizando o composto pentilenotetrazol. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido

- cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 97
- 10 Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 5), taxa de sobrevivência e média das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 101
- 11 Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 5), taxa de sobrevivência e mediana das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal). 107
- 12 Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 µg/animal, sobre o percentual de proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. 115
- 13 Efeito do peptídeo communis 19, nas doses de 3,0 e 30 µg/animal, sobre a quantidade de animais que falharam em permanecer na barra cilíndrica do ensaio de Rotarod. *p<0,05 em relação ao grupo LCRa e +p<0,05 em relação ao grupo DZP. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. LCRa: líquido cefalorraquidiano. 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AP	Medida ântero-posterior
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DE₁₀₀	Dose efetiva que produz 100% do efeito máximo
DE₅₀	Dose efetiva que produz 50% do efeito máximo
DT₅₀	Dose tóxica para 50% dos indivíduos experimentais
DV	Medida dorso-ventral
DZP	Diazepam
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
FAEs	Fármacos antiepilépticos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
i.c.v.	Via de administração intracerebroventricular
ILAE	<i>Internacional League Against Epilepsy</i>
i.p.	Via de administração intraperitoneal
MALDI TOF/TOF	<i>Matriz-assisted laser desorption ionization time of flight</i>
ML	Medida meso-lateral
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
PILO	Pilocarpina
PTZ	Pentilenotetrazol
SIAB	Sistema de Informação de Atenção Básica
SNC	Sistema Nervoso Central
SE	<i>Status epilepticus</i>
TFA	Ácido trifluoroacético

LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviatura
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M
Piroglutamato	Pyr	

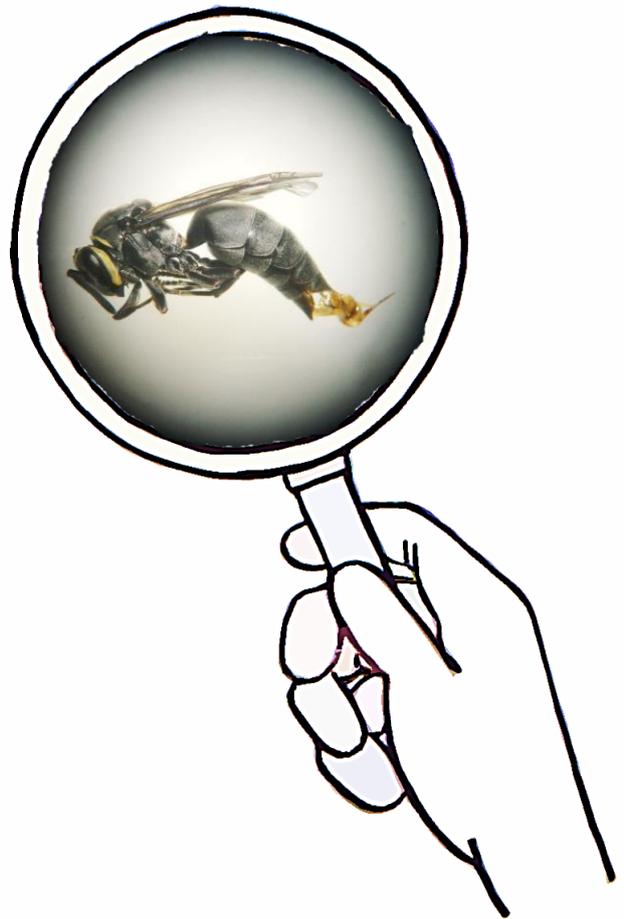
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	EPILEPSIA: ASPECTOS GERAIS E FISIOPATOLÓGICOS	24
1.2	FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS NO AUXÍLIO AO CONTROLE DAS MANIFESTAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS DA EPILEPSIA	28
1.3	UTILIDADE DOS MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i> À FARMACOTERAPIA DA EPILEPSIA	31
1.4	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PRODUTOS NATURAIS	34
1.5	PEÇONHA DE VESPAS: UMA ABUNDANTE FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS	37
1.6	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DESSA PESQUISA CIENTÍFICA	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	PARTE I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS PRESENTES NA PEÇONHA	48
3.1.1	Obtenção de vespas da espécie <i>Chartergellus communis</i>	48
3.1.2	Extração e processamento inicial da peçonha oriunda de vespas sociais da espécie <i>Chartergellus communis</i>	49
3.1.3	Isolamento de frações peptídicas provenientes da peçonha de <i>Chartergellus communis</i>	50
3.1.4	Sequenciamento e identificação de peptídeos procedentes da peçonha de <i>Chartergellus communis</i>	51
3.1.5	Peptídeos sintéticos utilizados para avaliação do potencial antiepiléptico e perfil neurofarmacológico	52

3.2	PARTE II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO	53
3.2.1	Solubilização dos peptídeos sintéticos	53
3.2.2	Sujeitos experimentais	53
3.2.3	Procedimento neurocirúrgico para implantação de uma cânula-guia	54
3.2.4	Ensaio da atividade antiepiléptica utilizando modelos agudos para indução de crises	56
3.2.5	Análise da atividade elétrica cerebral por Vídeo-eletroencefalografia	60
3.2.5.1	Procedimento neurocirúrgico para implantação dos eletrodos necessários à análise vídeo-eletroencefalográfica	60
3.2.5.2	Obtenção e análise dos registros vídeo-eletroencefalográficos	63
3.2.6	Estudo do perfil neurofarmacológico	64
3.2.7	Aspectos éticos	67
3.2.8	Análises estatísticas	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	PARTE I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS PRESENTES NA PEÇONHA	70
4.1.1	Coleta, extração e processamento inicial da peçonha proveniente de vespas sociais da espécie <i>Chartergellus communis</i>	71
4.1.2	Frações peptídicas isoladas a partir da peçonha de <i>Chartergellus communis</i>	72
4.1.3	Peptídeos sequenciados e identificados a partir da peçonha de <i>Chartergellus communis</i>	75
4.1.4	Peptídeos sintéticos para avaliação do potencial antiepiléptico e perfil neurofarmacológico	92
4.2	PARTE II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO	93
4.2.1	Atividade antiepiléptica utilizando modelos agudos para	94

	indução de crises	
4.2.2	Atividade elétrica cerebral por Vídeo-eletroencefalografia	109
4.2.3	Perfil neurofarmacológico	116
5	CONCLUSÕES	126
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	ANEXOS	147

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA: ASPECTOS GERAIS E FISIOPATOLÓGICOS

A Epilepsia é uma doença que assola a humanidade há milênios. Os primeiros relatos de alguns dos sinais que viriam a ser associados posteriormente a quadros epiléticos datam de 2000 anos a.C, e foram feitos na antiga Mesopotâmia (correspondente hoje à região do Iraque). Naquela ocasião, o autor do manuscrito descreveu as seguintes características de um determinado paciente: “seu pescoço vira à esquerda, as mãos e os pés são tensos e os olhos bem abertos, e de sua boca flui uma espuma sem que tenha qualquer consciência”. Até então, imaginava-se a associação com causas sobrenaturais, principalmente aquelas relacionadas com punições divinas (1,2).

Atualmente, os conhecimentos acerca dessa condição neuropatológica estão bem mais consolidados e, muito ao contrário das origens místicas conjecturadas outrora, conceitualmente, a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE do inglês *International League Against Epilepsy*) a define como um “distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição duradoura para geração de crises epiléticas e por todas as suas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais”. Logo, as crises epiléticas são caracterizadas como “uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas desencadeados por uma atividade neuronal excessiva ou sincrônica do cérebro” (3). No que diz respeito ao diagnóstico clínico, após ampla discussão, a ILAE estabeleceu três condições: (a) ocorrência de, pelo menos, duas crises epiléticas não provocadas (ou reflexas) em um intervalo de 24 horas; (b) a ocorrência de pelo menos duas crises não provocadas dentro do período de 10 anos, uma vez que a manifestação da primeira crise epilética já aumenta o risco para crises recorrentes em cerca de 60%; (c) diagnóstico de uma síndrome epilética (4). Um ponto relevante que deve ser destacado é que os termos Epilepsia e crise epilética não são sinônimos, apesar de estarem relacionados. Dizemos que a Epilepsia está presente quando há um quadro de crises epiléticas recorrentes e espontâneas, ou seja, se um indivíduo apresenta

uma única crise epiléptica isolada não necessariamente ele é portador de Epilepsia, pois esse evento pode nunca mais voltar a manifestar-se. Já se fala em epileptogênese quando se tem o desenvolvimento de um estado epiléptico, onde o cérebro normal passa por reorganizações de seus circuitos que o levam ao aparecimento de crises espontâneas e persistentes (5). Além disso, o termo convulsão está em desuso na prática clínica e científica por recomendações da ILAE e da Sociedade Brasileira de Neurofisiologia Clínica, devido a sua associação com um único tipo de efeito comportamental da hiperestimulação sincrônica cerebral, conhecido como crises generalizadas com manifestações clônica e/ou tônicas, além de ter um significado pejorativo.

Em nível molecular, atualmente, sabe-se que a Epilepsia pode ser causada por múltiplos mecanismos, que, de um modo geral, envolvem o desequilíbrio entre as atividades inibitórias e excitatórias cerebrais. Nesse caso, dois neurotransmissores estão associados diretamente: o ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), e o glutamato, precípua molécula envolvida com a neurotransmissão excitatória neuronal. Se por um lado o glutamato atua em neurônios estimulando a transmissão sináptica, o GABA exerce efeito oposto, contrabalançando possíveis hiperexcitabilidades neuronais. Assim, quadros epilépticos podem ser gerados com a disfunção das vias que conduzem à inibição de descargas elétricas ou com a promoção dos mecanismos facilitadores de excitação (6,7). Nesse sentido, a geração de descargas epilépticas também pode estar relacionada com alterações em canais iônicos de sódio, potássio, cálcio e cloreto voltagem-dependentes, tais como mudanças em suas expressões, polimorfismos ou mutações, uma vez que essas estruturas proteicas transmembranares estão intimamente envolvidas com a transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (8,9). Além disso, também se postula a participação de processos inflamatórios, respostas imunes adaptativas e envolvimento de componentes genéticos na fisiopatologia de diversos tipos de Epilepsias (10,11).

Com relação aos aspectos etiológicos, tradicionalmente as crises epilépticas são categorizadas como idiopáticas, sintomáticas e criptogênicas, porém atualmente existe uma recomendação para substituir tais termos pelas denominações genética, estrutural/metabólica e desconhecida, respectivamente (12). Quando de origem

genética, como o próprio nome indica, podem ser identificadas alterações na expressão de determinados genes, o que irá sugerir a participação de mecanismos específicos envolvidos na geração das crises (13). Como um dos exemplos tem-se mutações nas subunidades do gene SCN1A, o qual está relacionado com canais de sódio. Caso a Epilepsia seja resultado de uma condição patológica primária, a qual irá diretamente influenciar no aumento do risco de desenvolvimento de crises epiléticas recorrentes, então se diz que está associada a uma origem estrutural/metabólica, onde, como exemplo, tem-se a associação entre a Epilepsia e condições neuropatológicas, tais como tumores cerebrais, acidente vascular encefálico e infecções do SNC (13). Já uma etiologia classificada como desconhecida dispensa maiores explicações acerca de seu significado.

No que se refere aos tipos de crises epiléticas, a depender do sítio de início das descargas elétricas anormais, classicamente, há uma subdivisão em eventos de natureza focal (ou parcial) e generalizada, e, recentemente, a ILAE recomendou a inclusão da terminologia “desconhecida” (14). Aquelas categorizadas como generalizadas estão associadas a cerca de 40% dos tipos de Epilepsias, e nesse caso há envolvimento de ambos os hemisférios cerebrais no disparo das descargas elétricas epileptiformes, sendo caracterizadas por sua capacidade de causar prejuízos de consciência, na grande maioria dos casos, e também manifestações motoras bilaterais (15). Já quando do tipo focal, as quais correspondem à maioria das desordens epiléticas conhecidas, as crises epiléticas têm origem em uma determinada região cerebral e podem ou não espalhar-se para focos adjacentes, passando a receber a denominação “focal para tônico-clônica bilateral” caso ocorra propagação para o hemisfério contralateral (12,16). Nesse tipo de crise epilética, o local onde a disfunção inicia-se irá determinar a manifestação clínica a ser evidenciada, onde, por exemplo, movimentos de batida dos lábios e mastigações são característicos de perturbações no lobo temporal anterior, alucinações visuais com flashes de luz são associadas com comprometimentos do lobo occipital, e postura tônica bilateral está relacionada com distúrbios focais do córtex motor suplementar e lobo frontal (15,17). Dentre os tipos de crises focais, o nível de consciência do indivíduo também pode ser levado em consideração, aqui se referindo à consciência durante uma crise e não a consciência relacionada com a ocorrência de uma crise (16). O termo “desconhecida” abrange padrões convulsivos

que apresentam características insuficientes e/ou divergentes para serem classificados como focais ou generalizados (16). Os principais tipos de crises focais e generalizadas estão simplificados na Figura 1.

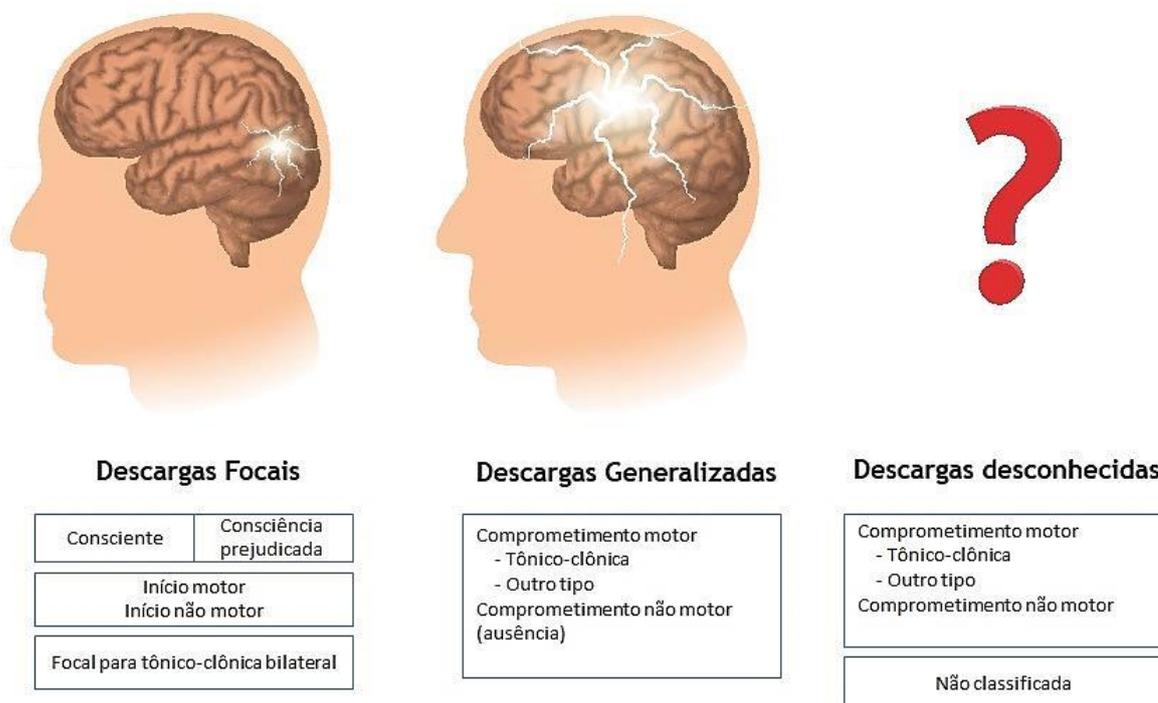


Figura 1: Representação esquemática padrão dos tipos de crises epiléticas, segundo a classificação da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE). Modificada a partir de Fisher et al., 2017 (16).

Quando analisamos os dados epidemiológicos associados com a Epilepsia, nos deparamos com valores bastante relevantes do ponto de vista da saúde pública. A sua prevalência é de 5-8 casos a cada 1.000 habitantes em países desenvolvidos, e de cerca de 10 casos a cada 1.000 habitantes em países em desenvolvimento, e, em ambas as regiões econômicas, apresenta incidência maior no primeiro ano de vida, retornando a aumentar após os 60 anos de idade (7,18,19). Esses dados fazem com que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Epilepsia seja considerada uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo, afetando cerca de 50 milhões de pessoas, o que corresponde a aproximadamente 1% da população mundial (20). Destas, cerca de 80% vivem em países de baixa e

média renda. No Brasil, segundo os últimos dados levantados pelo Sistema de Informação de Atenção Básica (SIAB) do Ministério da Saúde, até o ano de 2013 a prevalência era de 228 casos a cada 100 mil habitantes (21).

Levando-se em consideração tanto a perspectiva epidemiológica, quanto o fato de que portadores dessa neuropatologia muitas vezes sofrem devido a discriminações, estigma social e o estresse de conviver com uma doença crônica que pode levar à perda de autonomia para o desenvolvimento de atividades diárias (22), percebe-se que, no que tange às doenças de cunho neurológico, a Epilepsia merece especial atenção por parte da comunidade científica. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que levam às desordens epiléticas terem avançado consideravelmente ao longo dos anos, muitos pontos importantes em relação à fisiopatologia de determinados tipos de crises epiléticas ainda estão incompletos ou pouco entendidos.

1.2 FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS NO AUXÍLIO AO CONTROLE DAS MANIFESTAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS DA EPILEPSIA

Os danos a que os portadores de Epilepsia estão submetidos nas áreas sociais e psicológicas muitas vezes podem ser até mais nocivos à sua qualidade de vida do que as próprias crises epiléticas (23,24). Hoje em dia esses pacientes contam com uma gama de opções terapêuticas disponíveis, as quais incluem principalmente a utilização de fármacos antiepilepticos (FAEs) e a intervenção cirúrgica, esta última quando possível.

Um FAE deve ser capaz de prover proteção contra crises epiléticas e, quando ideal, não provocar efeitos adversos nas funções normais do SNC. Porém, os extensivos efeitos indesejáveis que algumas dessas medicações são capazes de provocar, como ataxia, sonolência e tontura, são os grandes desafios da adesão à farmacoterapia (12). Apesar de existir mais de 20 FAEs disponíveis para o tratamento de desordens epiléticas, todos representam apenas medidas sintomáticas, ou seja, auxiliam na erradicação das crises sem prover esperança de cura completa ou garantir um impedimento à progressão da doença (25,26). Com

base nessa falta de cura, a ILAE preconiza que aqueles pacientes que apresentavam Epilepsia e estão a mais de 10 anos sem crises são considerados com Epilepsia resolvida, mas não são reconhecidamente curados.

A intervenção farmacológica na Epilepsia teve início em 1897 com a introdução do brometo de potássio (27). Hoje em dia, seu uso como terapia de escolha se tornou obsoleto, principalmente devido aos seus consideráveis efeitos adversos, passando a ser apontado apenas como uma opção potencialmente útil como fármaco de terceira escolha para o tratamento de Epilepsia em crianças (28). Posteriormente, uma descoberta acidental fez com que o fenobarbital, um fármaco previamente utilizado como hipnótico e sedativo, tivesse suas propriedades antiepiléticas identificadas, de modo a permanecer até hoje como uma das opções terapêuticas mais utilizadas (29). Os dois fármacos citados anteriormente, juntamente com outros, tais como Fenitoína, Primidona, Carbamazepina, Ácido Valpróico e os Benzodiazepínicos, constituem a chamada primeira geração de FAEs, os quais tinham uso limitado devido a seus mecanismos de ação, benefícios oferecidos e efeitos indesejáveis relacionados (30,31). A necessidade por fármacos mais eficazes e melhor tolerados fez com que os avanços no desenvolvimento clínico levassem à formulação da segunda geração de FAEs, onde Vigabatrina, Felbamato, Gabapentina e Topiramato são alguns exemplos das novas opções terapêuticas introduzidas naquela época. Apesar de consideráveis avanços nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, esses fármacos ainda são dotados de relevantes desvantagens no que tange aos seus efeitos adversos, como indução de hepatotoxicidade (Felbamato), nefrolitíase (Topiramato) e ganho de peso (Vigabatrina) (32). Atualmente, a farmacoterapia antiepilética conta também com os fármacos de terceira geração, tais como Lacosamida, Retigabina e Rufinamida, os quais foram desenvolvidos baseados nos avanços do entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que conduzem à hiperexcitabilidade neuronal e epileptogênese, passando a fornecer novas alternativas terapêuticas de relevante utilidade, principalmente aos pacientes portadores de crises epiléticas refratárias (33).

Em termos farmacodinâmicos, os FAEs podem proporcionar a melhora do quadro patológico através da interação com múltiplos alvos moleculares, os quais incluem principalmente: (a) aumento da inibição mediada por GABA através da ação

especialmente sobre os receptores do tipo GABA_A, transportadores para GABA do tipo GAT1 ou na enzima GABA transaminase; (b) redução da excitação sináptica mediada por receptores ionotrópicos de glutamato; (c) modulação de canais iônicos voltagem-dependentes, tais como canais para sódio, potássio e cálcio; e (d) modulação direta dos componentes envolvidos com a liberação vesicular sináptica (34). A Figura 2 demonstra, de forma simplificada, o local de ação de alguns dos fármacos comercialmente disponíveis.

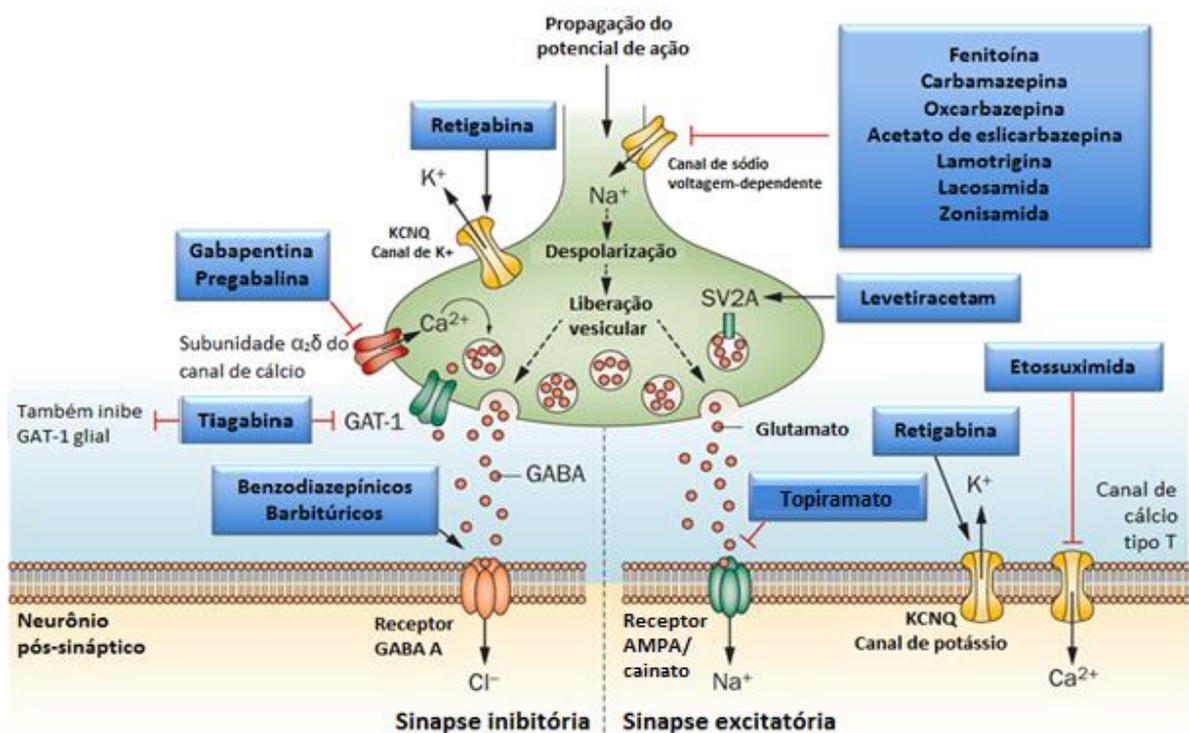


Figura 2: Representação esquemática de alguns fármacos antiepiléticos comercialmente disponíveis e seus principais alvos terapêuticos. Modificado a partir de Loscher & Schmidt, 2012 (35).

Quanto se chega à decisão pela adoção da farmacoterapia, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração, tais como: sexo, idade, a etiologia e tipo das crises, seu risco de recorrência, tolerabilidade e efeitos adversos associados (31). Normalmente, o tratamento farmacológico se inicia com a utilização de monoterapia e em baixas doses, a qual será ajustada lentamente até se alcançar

a dose máxima tolerada (12). Caso o primeiro fármaco falhe devido, por exemplo, à ineficácia ou baixa adesão por parte do paciente, então um segundo FAE é adicionado à terapia, e assim sucessivamente. Muitas vezes busca-se evitar a politerapia, uma vez que terapias combinadas, além de elevar os custos do tratamento, tendem a comprometer a tolerância aos efeitos adversos (5,36).

Apesar de, atualmente, a terapia medicamentosa abranger um amplo espectro caracterizado por atuar em diversificados mecanismos de ação, ela não é efetiva para todos os pacientes, sendo capaz de controlar as crises em aproximadamente 70% dos casos quando a escolha dos fármacos é bem conduzida (7,20,37). Deste modo, cerca de 30% dos pacientes não alcançam o controle de suas crises adequadamente e, além dos problemas associados à tolerabilidade dos fármacos antiepilépticos, outro relevante infortúnio clínico que contribui para isso é a ocorrência de farmacorresistência (27). Diz-se que esse evento está presente quando as crises epilépticas são persistentes, mesmo após tentativas com pelo menos três FAEs em suas doses máximas toleradas (38). Diante dos empecilhos relatados acima, podemos observar que a terapia medicamentosa da Epilepsia apresenta-se como um campo ainda repleto de desafios a serem solucionados, que envolvem, principalmente, o desenvolvimento de novos fármacos que proporcionem uma melhor adesão aos regimes terapêuticos crônicos, e que sejam mais eficazes na atenuação das crises daqueles pacientes não atendidos pelas opções terapêuticas comercialmente disponíveis.

1.3 UTILIDADE DOS MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* À FARMACOTERAPIA DA EPILEPSIA

A ciência observacional e os achados ao acaso marcaram os primeiros anos de descoberta das terapias antiepilépticas, em uma época onde não havia ainda uma abordagem racional e direcionada ao desenvolvimento de fármacos (39). Felizmente, como o passar do tempo e emergentes necessidades, o processo de descoberta de novas farmacoterapias foi consideravelmente aperfeiçoado, principalmente com o desenvolvimento, por exemplo, de modelos *in vivo*

direcionados especificadamente para esse propósito. Assim, os modelos experimentais utilizando animais de laboratório têm dado suporte aos ensaios não-clínicos para a busca de novos FAEs há muitos anos, e um dos marcos dessa prática foi a descoberta das propriedades antiepilépticas da fenitoína, em 1936, através da experimentação utilizando gatos (40). Desde então, uma variedade de modelos *in vivo* úteis aos propósitos farmacoterapêuticos das desordens epilépticas tem sido desenvolvidos, aprimorados e implementados.

Atualmente, muitos dos modelos animais disponíveis são capazes de desempenhar funcionalidades que vão além da mera descoberta do potencial antiepiléptico de determinada molécula, uma vez que podem ser aplicados para finalidades variadas, tais como: caracterizar o espectro de atividade frente a diferentes tipos de crises, comparar as vantagens oferecidas pela nova ferramenta terapêutica em estudo frente aquelas apresentadas pelas opções de tratamento já clinicamente estabelecidas, prever possíveis efeitos adversos, avaliar se há alteração da eficácia do novo FAE quando utilizado de modo crônico, estimar as concentrações plasmáticas seguras e efetivas a serem aplicadas nos ensaios clínicos, dentre outras (41).

Quando se pretende realizar o *screening* inicial de um número variado de compostos é interessante que o modelo experimental seja de fácil execução, eficiente quanto ao tempo e custo empenhados e, acima de tudo, confiável para a predição de uma eficácia clínica (42). Diversificados tipos de Epilepsia ou crises epilépticas podem ser induzidos experimentalmente a partir de variados protocolos, a fim de abordar desordens tanto de modo agudo quanto de forma crônica, sendo capazes de reproduzir características eletroencefalográficas e comportamentais. Dentre algumas das principais metodologias aplicadas objetivando-se a triagem farmacológica de moléculas com potencial terapêutico sobre a Epilepsia têm-se os protocolos de estimulação elétrica e a utilização de agentes neuroquímicos (43). Nestes últimos, também referidos como modelos de indução química de crises epilépticas, são utilizados compostos como indutores das crises, os quais irão mimetizar os sinais patológicos da doença de acordo com o mecanismo de ação específico para cada agente. Como exemplo de protocolos nesse sentido, têm-se as estimulações utilizando os compostos químicos indutores Pentilenotetrazol (PTZ) e Pilocarpina (PILO).

Logo após os primeiros relatos de sua ação pró-epiléptica, o PTZ foi usado por muitos laboratórios como composto auxiliar à descoberta de novas moléculas úteis ao tratamento de Epilepsias (44). A sua utilização em modelos de crises úteis à triagem pré-clínica de novas moléculas com potencial antiepiléptico data da época de 1949, caracterizando-se, assim, como um dos primeiros protocolos experimentais desenvolvidos, e ainda sendo extensivamente utilizado nos dias atuais, como “padrão ouro” para a evidenciação inicial da atividade antiepiléptica (42,45). O PTZ é capaz de gerar crises generalizadas do tipo crises de ausência (pequeno mal) e do tipo com manifestações tônico e/ou clônicas, similares àquelas que acometem humanos (46). Postula-se que esse composto exerce sua atividade indutora de crises através do antagonismo não competitivo em receptores gabaérgicos do tipo A (receptores GABA_A), os quais estão associados a canais de cloreto (47). Nessa metodologia, diferentes vias para administração do indutor podem ser utilizadas, tendo a via subcutânea como a mais empregada. Relata-se que crises epilépticas do tipo generalizadas com manifestações tônico e/ou clônicas podem ser induzidas em ratos ou camundongos, de acordo com a dose administrada (geralmente entre 80 a 100 mg/kg para camundongos e 70 a 90 mg/kg para ratos) (48,49).

O modelo experimental utilizando o indutor Pilocarpina (PILO) foi primeiramente descrito no ano de 1983 por Turski e colaboradores (50), uma vez que foi observado que esse composto, quando administrado por via intraperitoneal, foi capaz de causar atividade epileptiforme em estruturas límbicas, seguidas por automatismos e convulsões límbicas motoras que evoluíram para o quadro de *status epilepticus* (SE) (51). O mecanismo de ação da PILO envolve a sua atuação sobre receptores colinérgicos muscarínicos, mais precisamente do tipo M1 (43,52). Atuando através desses receptores, alguns estudos *in vivo* revelaram que a PILO causa um desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória, além de induzir uma elevação dos níveis de glutamato em algumas regiões cerebrais, após o aparecimento das crises epilépticas (53,54). Desse modo, algumas evidências consideráveis apoiam a sugestão de que, apesar de iniciadas por um mecanismo que envolve receptores M1, as crises são mantidas pela ativação de receptores NMDA, os quais são um dos principais receptores do sistema glutamatérgico (54,55).

É importante salientar que, diante da heterogeneidade de mecanismos fisiopatológicos, origens e manifestações clínicas relacionadas com o desenvolvimento das desordens epiléticas, não existe um modelo único capaz de representar essa neuropatologia de um modo global (56), assim como também não é possível prever sobre o completo potencial terapêutico de um candidato farmacológico a partir da aplicação experimental de apenas um dos modelos animais disponíveis, já que estes apresentam diferenciados mecanismos para geração dos quadros epiléticos pretendidos (57).

1.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PRODUTOS NATURAIS

Um dos maiores patrimônios compartilhados por todo o nosso planeta é a sua imensa biodiversidade. Levantamentos apontam que, em todo o mundo, existem cerca de 7 milhões de espécies animais, aproximadamente 298 mil espécies de plantas, dentre outros milhares de organismos distintos em superfícies terrestres e marinhas (58). Diante de toda essa riqueza nativa o homem encontra um vasto leque de opções para uma prática exercida desde os primórdios da medicina: utilização de produtos extraídos da natureza para o tratamento das mais variadas patologias (59,60). Tal atividade data desde 2600 a.C., onde os primeiros registros foram feitos na Mesopotâmia e correspondem ao emprego de óleos provenientes de plantas para o tratamento de tosses, resfriados e inflamações (61,62).

Extratos preparados a partir de plantas, animais, microrganismos e minerais eram tidos como únicas fontes de medicamentos disponíveis para o tratamento das moléstias que acometiam o homem até antes do século XX, e acreditava-se que essas preparações eram possuidoras de efeitos misteriosos que, até então, desafiavam a racionalidade humana. Porém, no início do século XX, a teoria que relaciona a interação fármaco-receptor como sendo responsável pelo efeito biológico de compostos químicos revolucionou o mundo científico e os pensamentos acerca da utilização de fármacos e, a partir desse momento, chegou-se à compreensão de que compostos específicos presentes nos extratos eram os responsáveis pelos

efeitos terapêuticos observados, criando-se, assim, a necessidade de caracterizá-los melhor estruturalmente (63).

Nesse contexto, a etnofarmacologia e a medicina tradicional têm dado suporte à descoberta de novos fármacos baseados em produtos naturais, e estes já contribuíram com quase metade de todas as moléculas aprovadas para uso terapêutico ao longo das últimas décadas (64,65). Dados apontam que entre os anos de 2008 a 2013 foram aprovados para comercialização 25 fármacos relacionados a produtos naturais ou seus derivados, onde a maioria encontra-se concentrada nas áreas da terapêutica quimioterápica (66).

Diante desse fato, a seguinte indagação pode vir a emergir: O que torna os produtos naturais tão atrativos à síntese de novos fármacos? Um dos motivos-chaves que contribuem para esse sucesso é a sua grande diversidade estrutural e química (67). Esta é resultante da química combinatória da natureza, principalmente relacionada à ocorrência de pressões evolutivas, a qual é capaz de gerar estruturas estereoquimicamente complexas que se encontram em grande parte ausentes na síntese química convencional (60,63). Além do mais, a síntese de alguns compostos químicos por organismos vivos, aliada à similaridade estrutural dos seus alvos proteicos entre diversas espécies, faz com que muitos desses elementos sejam capazes de interagir com alvos moleculares com bastante potência e especificidade, e, assim, apresentem maiores probabilidades de exercer algum efeito biológico quando comparadas àquelas moléculas sintetizadas de modo aleatório (63,67).

É importante ressaltar que um dos principais objetivos de um estudo envolvendo produtos naturais com propósitos farmacológicos é utilizar uma estrutura molecular com potencial terapêutico como uma molécula protótipo para a síntese de um novo fármaco, ou seja, a síntese de um análogo com possíveis melhoramentos em variadas propriedades. Um dos primeiros passos envolvidos no estudo de um produto natural como fonte terapêutica é o processamento das amostras oriundas da fonte biológica de origem. Levando-se em consideração o fato de que produtos naturais são capazes de disponibilizar um considerável arsenal molecular útil à realização de diversificadas triagens farmacológicas, então o correto isolamento e elucidação estrutural dessas moléculas representam etapas críticas e de fundamental importância. Houve um momento em que esses procedimentos analíticos eram vistos como sérios entraves, uma vez que a sua relevante demanda

por tempo e custo de execução era incompatível com os anseios da indústria farmacêutica. Porém, os avanços tecnológicos e o advento de novas técnicas, cada vez mais automatizadas, revolucionaram a descoberta de novos fármacos a partir de fontes da natureza. Hoje em dia, a utilização de técnicas analíticas combinadas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência como meio para separação e a ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massas como métodos de identificação, permitem o trabalho com extratos brutos de modo a se acelerar o acesso a variados compostos purificados, otimizando-se também o conhecimento relacionado com suas informações estruturais (68,69).

Quando tratamos das classes de moléculas oriundas dessas fontes naturais, com considerável aplicação à pesquisa e desenvolvimento na área farmacêutica, devemos levar em consideração o grande espaço que os compostos caracterizados como peptídeos vêm ganhando desde o final do século XX (70). Algumas características fazem dos peptídeos candidatos farmacológicos bastante promissores, tais como: tamanho pequeno quando em comparação com outras moléculas; possibilidade de redução dos efeitos adversos e aumento da potência farmacológica devido ao seu alto grau de especificidade para um determinado alvo *in vivo*; ampla gama de alvos terapêuticos possíveis; baixa acumulação em tecidos, dentre outras (71). Por outro lado, algumas barreiras ao desenvolvimento farmacológico dessas moléculas também podem ser encontradas devido à possível presença de algumas características comprometedoras, tais como reduzida estabilidade metabólica, capacidade de permeação em membranas biológicas e biodisponibilidade (70).

Valendo-se dos benefícios propiciados e contornando racionalmente os entraves que porventura estivessem presentes, alguns fármacos de notória utilidade clínica foram desenvolvidos com base na estrutura de peptídeos. Dentre um dos exemplos clássicos tem-se o anti-hipertensivo Captopril, formulado a partir de um peptídeo originalmente extraído da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, por volta de 1970 (72). Como exemplos mais recentes têm-se a Exenatida (Byetta®), útil ao tratamento do diabetes tipo 2 e que foi desenvolvido tendo-se como referência um peptídeo encontrado na saliva de um lagarto, o monstro de Gila (73), e também a Ziconotida (Prialt®), que corresponde ao primeiro fármaco

derivado de fonte marinha, mais precisamente do caracol *Conus magus*, indicado para a terapêutica da dor crônica severa (74).

Não surpreende o fato de que, até o momento, apenas uma pequena parte do vasto universo molecular disponível na natureza foi explorada com a finalidade de se determinar suas atividades biológicas (75). O nosso país representa uma fonte de enorme potencial para o estudo de produtos naturais, uma vez que possui uma das maiores biodiversidades do mundo, abrigando cerca de 10 a 20% de todas as espécies vivas conhecidas mundialmente, o que representa, aproximadamente, dois milhões de espécies compreendidas entre plantas, animais e microrganismos (76). Toda essa surpreendente diversidade biológica encontra-se distribuída em uma imensa área com características climáticas e geográficas bastante variadas, formada por biomas admiráveis, tais como a floresta Amazônica, a Mata Atlântica, o sertão da Caatinga e a região de savana conhecida como Cerrado. Desse modo, o território brasileiro aparece como um dos campos mais ricos para a busca e desenvolvimento de fármacos baseados em produtos naturais, e, para isto, muitos esforços tem sido dispensados por parte da comunidade científica.

1.5 PEÇONHA DE VESPAS: UMA ABUNDANTE FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Dentre a grande variedade de seres vivos englobados no reino animal, àqueles pertencentes à classe Insecta formam um dos maiores e mais diversificados grupos de organismos, compreendendo aproximadamente 80% de todas as espécies animais, onde em torno de 950.000 já foram descritas (77,78). Muitos desses seres vivos são capazes de produzir compostos químicos capazes de exercer diversificadas funções, que vão desde a sua utilização como sinais para manter a comunicação com outros organismos até sua aplicação como mecanismo de defesa contra predadores. Uma característica interessante refere-se ao fato de que muitos insetos produzem uma variedade de toxinas, cujas respostas fisiológicas induzidas são capazes de exercer efeitos análogos relevantes em patologias

humanas, e, desse modo, surgem como fonte de novos compostos com aplicação medicinal (78).

Desde alguns anos, a peçonha produzida por insetos pertencentes à ordem Himenóptera, na qual estão compreendidas vespas, abelhas e formigas, vêm despertando cada vez mais atenção da comunidade científica mundial, com crescente destaque no que se refere à identificação de uma variedade de compostos biologicamente ativos. Estes incluem proteínas de alto peso molecular, como enzimas e alérgenos, aminas, pequenos peptídeos, dentre outras moléculas (79). Dentro dessa ordem, apesar da peçonha produzida por abelhas constituir-se como a mais amplamente caracterizada tanto química quanto funcionalmente, nota-se que há uma ascensão dos conhecimentos relacionados com a constituição e efeitos biológicos da peçonha produzida por vespas, atualmente com informações bem mais aprofundadas.

Vespas produzem uma peçonha que apresenta bastante diversidade molecular em sua composição, caracterizando-se como fontes potencialmente relevantes para a disponibilização de novos compostos biologicamente ativos com aplicação farmacológica e terapêutica. Dentre alguns dos principais integrantes encontrados em suas peçonhas destacam-se as proteínas, englobando moléculas alergênicas e enzimas, pequenos peptídeos com funções variadas, incluindo, por exemplo, as atividades a nível neurológico e antimicrobiano, e os componentes com baixa massa molecular, tais como aminas bioativas e aminoácidos (80). Tais compostos são alguns dos responsáveis por muitas das manifestações clínicas observadas após a picada de vespas. Estas manifestações podem incluir reações locais devido ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos cutâneos, como dor e edema, anafilaxia e subsequente choque anafilático e, em casos de acidentes mais graves envolvendo a injeção de altas doses de peçonha, podem ocorrer reações tóxicas sistêmicas desencadeantes de hemólise, rabdomiólise, insuficiência renal aguda, hepatotoxicidade, dentre outras (79,81,82). A Tabela 1 relaciona alguns dos componentes presentes em peçonhas de vespas e suas principais atividades evidenciadas sobre sistemas biológicos.

Tabela 1 - Compostos isolados a partir da peçonha de vespas e suas principais atividades biológicas relacionadas. Modificada a partir de Monteiro et al., 2009 (79) e Lee et al., 2016 (80).

Componentes	Principais efeitos evidenciados	Referência
Enzimas (Hialuronidase, Fosfolipases A1 e A2)	Atividade alergênica; Aumento da permeabilidade endotelial; Ação inflamatória; Atividade hemolítica; Indução de agregação plaquetária e formação de trombos	(83–89).
Peptídeos degranuladores de mastócitos	Inflamação alérgica; Atividade antimicrobiana	(90–95).
Neurotoxinas	Bloqueio da transmissão sináptica associada a receptores nicotínicos de acetilcolina e receptores ionotrópicos de glutamato; Inativação de canais de sódio; Inibição pré-sináptica da neurotransmissão colinérgica; Efeito antinociceptivo; Efeitos comportamentais e anticonvulsivantes	(96–106).
Cininas	Hiperalgisia	(107–109).
Peptídeos quimiotáticos	Atividade inflamatória; Efeito antimicrobiano	(110–113).
Proteínas interferentes da hemostasia	Inibição da agregação plaquetária; Atividade fibrinolítica	(114,115).
Peptídeos ainda sem classe definida	Hiperalgisia Formação de edema Atividade hemolítica	(116)

A vespa *Chartergellus communis* (Figura 3) foi descrita por Richards (1978) (117), e está compreendida em um dos gêneros de vespas sociais neotropicais menos abundantes (118). As colônias formadas pelas vespas do gênero *Chartergellus* são relativamente pequenas quando comparadas com aquelas de outras vespas sociais, uma vez que existem outros gêneros, como o *Agelaiia*, por exemplo, que normalmente formam ninhos constituídos por milhares de espécimes (119,120). Quanto a sua distribuição, observou-se que, no Brasil, elas podem ser encontradas principalmente desde o Mato Grosso até o Norte de São Paulo, predominantemente habitando em vegetações classificadas como cerrado *stricto sensu* e cerradão (117,121). Um estudo recente também apontou a nova ocorrência dessa espécie de vespa no bioma da caatinga, mais precisamente na região do estado do Ceará (122).

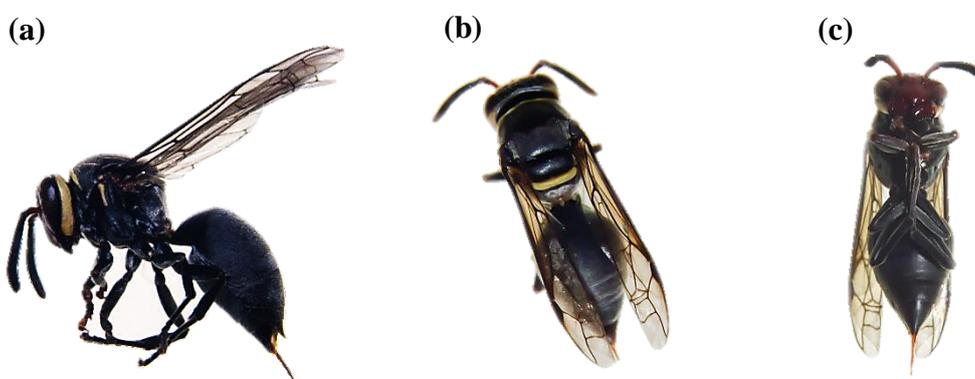


Figura 3: Fotografia da vespa social *Chartergellus communis* nas vistas lateral (a), dorsal (b) e ventral (c). Foto: Leandro Campos; Janeiro de 2016.

Até o momento, a grande maioria dos estudos científicos envolvendo vespas da espécie *Chartergellus communis* concentra-se principalmente na determinação de suas características essencialmente biológicas, tais como: análises morfofisiológicas, observações de comportamento social e verificações da diferenciação entre castas. Quando analisamos a peçonha produzida pelas vespas dessa espécie, nos deparamos com um campo de estudo ainda muito pouco

explorado. Até então, existe apenas um trabalho científico publicado na literatura, de autoria do nosso grupo de pesquisa, que traz informações iniciais sobre a sua composição e/ou caracterização química e estrutural, assim como também revela alguns efeitos biológicos de componentes isolados dessa peçonha (116).

1.6 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DESSA PESQUISA CIENTÍFICA

Como relatado anteriormente, aproximadamente 30% dos pacientes epiléticos ainda padecem devido a condições intratáveis, as quais estão relacionadas principalmente a determinados tipos de crises refratárias e ocorrência de farmacoresistência. Além do mais, a tolerabilidade dos FAEs é comprometida, uma vez que, em geral, são capazes de causar extensivos efeitos adversos, que variam em frequência e gravidade. Levando-se em consideração as necessidades dos pacientes não atendidos pelas opções farmacoterapêuticas comercialmente disponíveis, e os inevitáveis efeitos indesejados associados aos tratamentos farmacológicos existentes, percebe-se que há uma crescente necessidade de desenvolver novos FAEs. Nesse sentido, a natureza pode vir a ser uma preciosa aliada através do fornecimento de novos compostos químicos potencialmente neuroativos.

Nessa perspectiva, particularmente em neurociência, toxinas naturais têm apresentado um papel importante no desenvolvimento de ferramentas farmacológicas, apresentando alta afinidade e seletividade sobre mecanismos neuronais (102,123–125). Estudos com peçonhas de vespas sociais despertam atenção especial, principalmente no que diz respeito à possibilidade de descoberta de novas moléculas potencialmente úteis para o desenho racional de compostos a serem usados na farmacoterapia de variadas neuropatologias. À primeira vista pode parecer um tanto quanto curioso o fato de peçonhas caracteristicamente causadoras de efeitos deletérios sobre o organismo, como, por exemplo, a geração de processos inflamatórios, serem também providas de propriedades potencialmente terapêuticas. Isto se deve fundamentalmente devido a pressões evolutivas que tornaram essas peçonhas essenciais para propósitos de primordial importância aos

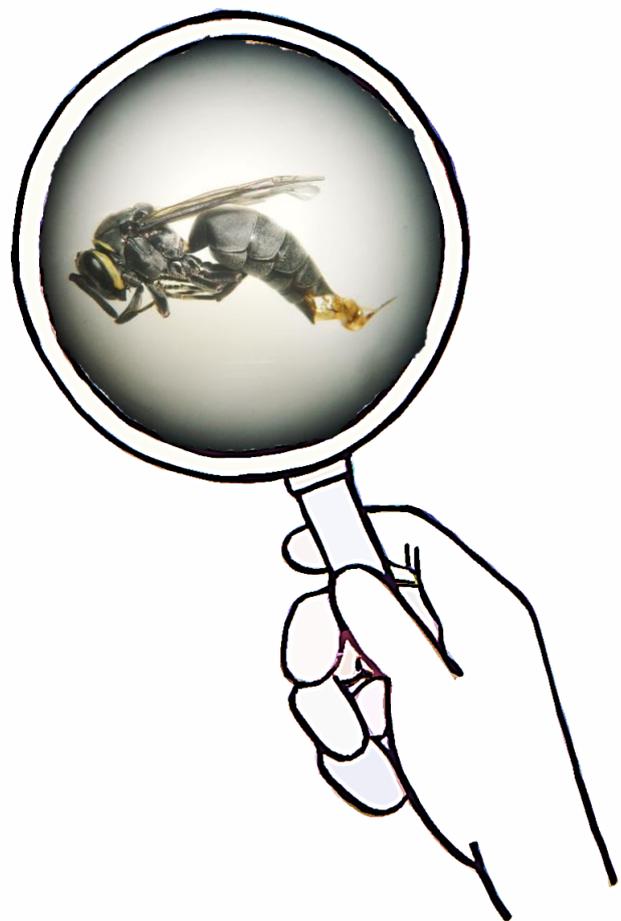
organismos que a produzem: a garantia de sobrevivência, incluindo tanto a fuga de predadores quanto a busca por alimento. No âmbito da atividade no SNC, moléculas produzidas por variadas espécies de artrópodes podem atuar em circuitos neuronais excitatórios ou inibitórios de insetos e mamíferos, com o principal intuito de causar paralisia de seus predadores e/ou presas. A partir dessa observação, então surgiu a hipótese de que esses compostos, isoladamente, poderiam ter utilidade à terapêutica de condições patológicas que envolvem a modulação da atividade neuronal.

Nos últimos anos, uma variedade de compostos neuroativos provenientes da peçonha produzida por vespas foram identificados, isolados e sintetizados (126), e muitos deles demonstraram utilidade considerável como alternativas farmacológicas às principais patologias que acometem o SNC, como na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Epilepsia (106). No contexto da Epilepsia, diversos trabalhos tem demonstrado que compostos isolados da peçonha de vespas são capazes de interagir com estruturas neurais responsáveis pelo controle de crises epiléticas, tais como atuação em canais iônicos, receptores ou na interferência à liberação de neurotransmissores (105,127–129). Alguns dos principais exemplos incluem: a atividade antiepilética em modelos animais e a capacidade para inibição da ligação do GABA e do L-glu em ensaios utilizando membranas de córtex cerebral de ratos, ambas demonstradas pela peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis* (130); a capacidade para o bloqueio *in vivo* de crises epiléticas quimicamente induzidas pelos agentes convulsivantes bicuculina, picrotoxina e ácido kaínico exibida pela peçonha desnaturada da vespa social *Polybia occidentalis* (103); o isolamento de um composto antiepilético proveniente da peçonha da vespa *Polybia paulista*, o peptídeo inédito Ppnp7 (131).

Diante dos exemplos apresentados acima, percebe-se que peçonhas oriundas de vespas sociais sobressaem como fontes altamente promissoras no que diz respeito à busca por substâncias biologicamente ativas e com prováveis potenciais terapêuticos sobre a Epilepsia. Desse modo, e levando-se em consideração que a aplicação de conhecimentos etnofarmacológicos e quimiotaxonômicos pode conduzir ao aumento da probabilidade de sucesso através da busca por compostos biologicamente ativos em espécies intimamente relacionadas entre si (132), então existe uma possibilidade significativa de que a

peçonha da vespa social *Chartergellus communis* também presente em sua constituição alguma molécula útil ao manejo clínico das crises epiléticas.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar e avaliar o efeito antiepiléptico de peptídeos provenientes da peçonha da vespa *Chartergellus communis*, a fim de obterem-se moléculas que auxiliem no desenvolvimento de fármacos úteis à terapêutica da epilepsia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Coletar exemplares da vespa social *Chartergellus communis* na região de Formosa-GO;
- ✓ Extrair a peçonha de vespas sociais da espécie *Chartergellus communis* e obter de compostos com baixas massas moleculares;
- ✓ Separar frações peptídicas provenientes da peçonha de *Chartergellus communis*, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Realizar o sequenciamento e identificação de peptídeos, por meio de espectrometria de massas MALDI TOF/TOF e degradação automática de Edman;
- ✓ Estudar a atividade antiepiléptica de quatro peptídeos sintéticos idênticos aos isolados da peçonha da vespa *Chartergellus communis*, por meio de modelos de indução aguda de crises epiléticas utilizando os agentes químicos indutores Pentilenotetrazol (PTZ) e Pilocarpina (PILO);

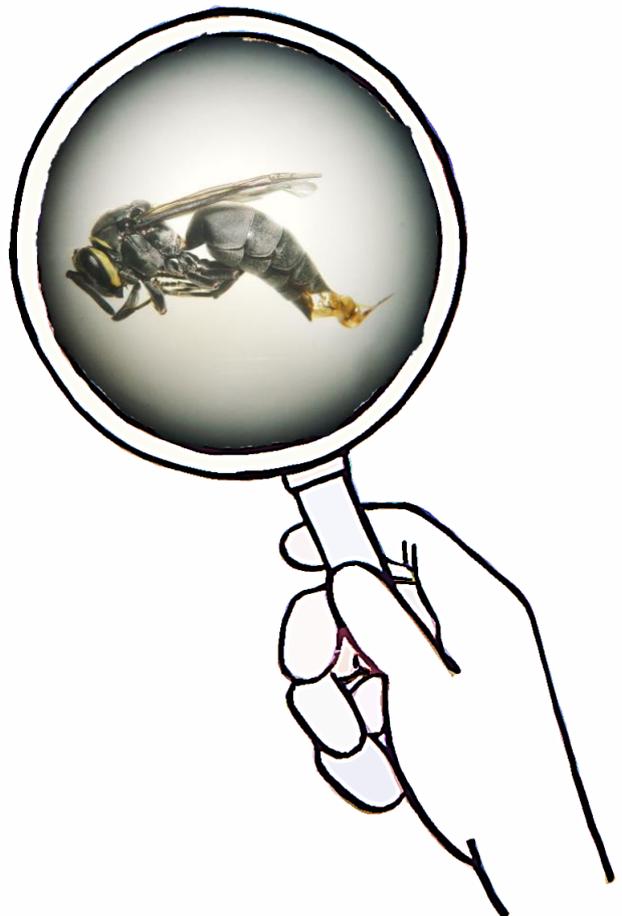
- ✓ Verificar os registros vídeo-eletroencefalográficos relacionados aos efeitos do peptídeo com melhor ação sobre os modelos de indução aguda de crises epiléticas propostos;

- ✓ Determinar o perfil neurofarmacológico do peptídeo que apresentou melhor ação nos ensaios de indução aguda de crises epiléticas, a partir de análises da atividade geral espontânea, alteração da coordenação motora e verificação do índice terapêutico.

Material

e

Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARTE I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS PRESENTES NA PEÇONHA

3.1.1 Obtenção de vespas da espécie *Chartergellus communis*

Vespas sociais pertencentes à espécie *Chartergellus communis* foram coletadas no Parque Municipal do Itiquira, localizado na cidade de Formosa – GO (coordenadas geográficas: 15°22'4"S/47°27'20"O). O procedimento de coleta consistiu na retirada manual de cada ninho, utilizando-se sacos plásticos para a sua acomodação. Após a coleta, esses ninhos foram transportados para o Laboratório de Neurofarmacologia – UnB, acondicionados em isopor contendo gelo, para posterior eutanásia das vespas contidas em seu interior, utilizando-se congelamento a - 20°C.

Durante a realização da coleta foram utilizados equipamentos e acessórios para proteção individual (macacão de apicultor, luvas, calçado fechado, repelente), para prevenir possíveis acidentes relacionados principalmente às picadas de vespas.

Espécimes exemplares dos ninhos coletados foram enviadas ao Departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista, onde foram gentilmente identificados pelo Prof. Dr. Fernando B. Noll, e encontram-se depositadas na coleção de Hymenopteros da referida universidade.

Todos os procedimentos de coleta, acesso e remessa do material genético objeto de estudo dessa pesquisa foram feitos com o amparo das seguintes autorizações/licenças: autorização para acesso e remessa de componente do patrimônio genético expedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Anexo A), autorização de coleta emitida pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Formosa (Anexo B), autorização da Secretaria de Turismo para acesso ao local de coleta (Anexo C), licenças para coleta expedidas

pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Anexos D e E).

3.1.2 Extração e processamento inicial da peçonha oriunda de vespas sociais da espécie *Chartergellus communis*

As glândulas e reservatórios contendo a peçonha foram extraídos manualmente das vespas fêmeas, com auxílio de pinças, e conforme a exemplificação demonstrada na Figura 4.

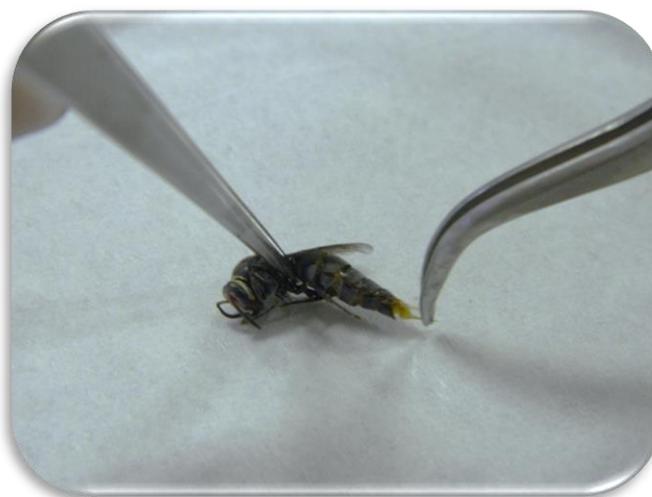


Figura 4: Processo de extração manual das glândulas e reservatórios de peçonha utilizando pinças. Foto: Luana Cristina; Fevereiro de 2016.

Posteriormente, todo o material obtido foi acondicionado em tubos plásticos e estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a realização do processamento inicial para obtenção dos compostos com baixas massas moleculares. Este consistiu em procedimentos de ultrafiltração, utilizando filtro para centrifugação (Microcon[®], Millipore, Alemanha) de até 10.000Da. Para tanto, previamente, todo o material extraído das vespas foi

homogeneizado em água deionizada e acetonitrila (razão de 1:1, v/v), macerado e centrifugado (3024 xg por 10 min). Em seguida, o sobrenadante formado foi transferido para um filtro e submetido ao procedimento de ultrafiltração em centrífuga refrigerada (12096 xg; a 4 °C; 30 min). Após a ultrafiltração, todo o conteúdo filtrado foi submetido ao processo de secagem a vácuo (SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific®, EUA) tendo, posteriormente, seu peso seco determinado em balança analítica. Após a quantificação, o material resultante foi acondicionado em temperatura de -80 °C, até o preparo necessário para a separação dos seus constituintes.

3.1.3 Isolamento de frações peptídicas provenientes da peçonha de *Chartergellus communis*

Para a separação das frações peptídicas utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa (Shimadzu®, Japão). Nessa etapa, o material contendo compostos com baixas massas moleculares foi ressuspendido em água deionizada contendo 5% de acetonitrila.

No processo de fracionamento foi utilizada uma coluna do tipo semi-preparativa (C18 Luna, 10 µm, 250 x 10 mm, Phenomenex®, Torrance, EUA). O solvente A consistiu em água deionizada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v), e como solvente B foi utilizada acetonitrila com 0,1% de TFA (v/v). Para eluição empregou-se um gradiente isocrático de 5% de B durante os 20 primeiros minutos, e um gradiente de 5 a 60% de B durante os próximos 40 min, com fluxo de 1,5 mL/min durante toda a corrida. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm e o tempo total de corrida foi de 100 min. Cada fração eluída foi coletada de forma manual para, posteriormente, ser submetida à secagem a vácuo e quantificação em balança analítica.

Processos de recromatografias foram realizados para purificação daquelas frações peptídicas de interesse que não se apresentavam com alto grau de pureza após a primeira etapa cromatográfica. Para tanto, utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa (C18 Synergi 4µm, Fusion-RP, 250 x 4,6 mm, Phenomenex®, Torrance,

EUA). O material para essa análise foi ressuspendido em água deionizada contendo 10% de acetonitrila. Os solventes A e B e a absorbância para monitoramento foram os mesmos descritos anteriormente, já o fluxo foi de 1 mL/min durante toda a corrida. Utilizaram-se protocolos experimentais específicos para cada fração peptídica recromatografada, de acordo com as características de eluição (tempo de retenção e gradiente da solução B) observadas após a cromatografia inicial. Deste modo, foram utilizados protocolos que tiveram uma variação do gradiente de B em uma faixa de 21 a 52%.

3.1.4 Sequenciamento e identificação de peptídeos procedentes da peçonha de *Chartergellus communis*

As frações cromatográficas e os peptídeos isolados da peçonha de *C. communis* foram submetidos à técnica de espectrometria de massas utilizando MALDI TOF/TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*) Autoflex speed (Bruker Daltonics[®], Alemanha), para a inspeção de massas moleculares (MS), identificação das suas respectivas sequências primárias de aminoácidos (sequenciamento *de novo*) (MS/MS), assim como também para verificações do grau de pureza de cada fração peptídica.

Os espectros de massas foram obtidos a partir da utilização de dois modos distintos de operação: o modo refletivo positivo, através do qual se determinou as massas moleculares das amostras analisadas, e o modo LIFT, o qual permitiu obterem-se os espectros úteis ao sequenciamento *de novo*. As análises foram precedidas de procedimentos de calibração utilizando-se a mistura *Protein Calibration Standard IV* (Bruker Daltonics[®], Alemanha). Quanto à faixa de detecção, foi utilizada uma razão massa/carga (m/z) de 100 a 10.000 Da. As amostras submetidas a esse ensaio foram ressuspendidas em água deionizada e homogeneizadas com uma matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (*Sigma-Aldrich*[®], EUA). Essa mistura foi aplicada, em duplicata, a uma placa MTP AnchorChip 384 (Bruker[®], Alemanha) e, após secagem e consequente cristalização, as amostras seguiram para as devidas inspeções. Para obtenção dos dados

propostos nessa análise foram utilizados os seguintes softwares: FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics[®], Alemanha), necessário para aquisição dos espectros de massa, e FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics[®], Alemanha), para interpretação e sequenciamento *de novo*.

Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como um meio complementar à etapa de sequenciamento dos peptídeos. Para tanto, utilizou-se um sequenciador de proteínas PPSQ-31A (Shimadzu Instrumentos Científicos[®], Columbia, EUA). Esta análise foi feita pelo Dr. Fernando Zamudio, em colaboração com o laboratório coordenado pelo Dr. Lourival D. Possani (Instituto de Biotecnologia, Universidade Nacional Autônoma do México, Morelos, México).

Após a obtenção das sequências peptídicas de interesse, foram feitas buscas por similaridades com peptídeos anteriormente isolados da peçonha de Himenópteros. Para isso, utilizaram-se bancos de dados adequados, os quais corresponderam ao Uniprot (disponível em <http://www.uniprot.org/>) e BLASTP (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Uma vez encontradas similaridades, realizou-se o alinhamento das sequências de peptídeos utilizando-se o software Clustal Omega (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.1.5 Peptídeos sintéticos utilizados para avaliação do potencial antiepiléptico e perfil neurofarmacológico

De posse do conhecimento sobre a composição química de alguns peptídeos presentes na peçonha da vespa *Chartergellus communis*, foram escolhidas quatro sequências primárias para serem sintetizadas. O processo sintético foi feito pela empresa brasileira AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda[®].

3.2 PARTE II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILÉPTICO E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO

3.2.1 Solubilização dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos utilizados para a realização dos ensaios *in vivo* foram solubilizados em líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa) (NaCl 119mM; NaHCO₃ 26mM; KCl 2,5mM; NaH₂PO₄ 1mM; MgCl₂ 1,3mM; C₆H₁₂O₆ 10mM), imediatamente antes de cada procedimento experimental.

3.2.2 Sujeitos experimentais

Foram utilizados camundongos *Mus Musculus* (Swiss) machos, pesando entre 20 e 30g, adquiridos junto ao biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Os animais foram acondicionados em caixas de plástico apropriadas ao uso em experimentação (medidas de 40,5 x 31,7 x 17,3 cm; máximo de 20 animais por caixa) e mantidos em condições controladas no que diz respeito ao ciclo claro/escuro (12/12 horas), temperatura (25 °C) e umidade (55%). Durante todo o período experimental, foram oferecidas água e alimentação *ad libitum*. Cada um dos grupos experimentais que constituiu os ensaios biológicos propostos a seguir continham 5-8 animais, nos experimentos de indução aguda de crises epiléticas e avaliação do perfil neurofarmacológico, e 3-4 animais para o estudo da atividade elétrica cerebral por vídeo-eletroencefalografia. Ao todo, foram utilizados 170 animais na realização de todas as análises *in vivo* que fizeram parte desse estudo.

3.2.3 Procedimento neurocirúrgico para implantação de uma cânula-guia

Uma vez que a administração do material objeto de estudo foi feita por via intracerebroventricular (i.c.v.) (Figura 5), para todos os ensaios *in vivo* propostos, houve a necessidade da realização prévia de uma neurocirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia na região do ventrículo lateral cerebral direito dos animais, conforme demonstrado na Figura 6. As cânulas mediam 10 mm e foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (BD 0,70 x 25 mm 22G).

O passo inicial consistiu na anestesia do animal utilizando-se os fármacos comerciais Ketamina (75 mg/kg, intraperitoneal – i.p.) (Dopalen, Ceva Saúde Animal[®], Brasil) e Xilasina (15 mg/kg, i.p.) (Anasedan, Ceva Saúde Animal[®], Brasil). Enquanto o animal encontrava-se profundamente anestesiado (Plano III do estágio III de anestesia) (133), ele foi inserido em um estereotáxico (Insight Equipamentos[®], Brasil) e o procedimento teve início. O primeiro passo cirúrgico foi a realização de assepsia na superfície da cabeça do animal utilizando-se iodopovidona a 10% (PVPI tópico, Vic Pharma[®], Brasil). Após essa etapa, foi feita anestesia local através da injeção de cloridrato de lidocaína com hemitartrato de norepinefrina (subcutâneo – sc) (Lidostesim, Dentsply[®], EUA), para posterior exposição de seu crânio e realização das medidas estereotáxicas necessárias ao posicionamento da cânula na região cerebral pretendida. Tendo-se como referência um atlas de coordenadas estereotáxicas (134), as medições foram feitas a partir do ponto do Bregma (AP: -0,2 mm / ML: -1,0 mm / DV: -2,3 mm). Em posição contralateral à da cânula foi implantado um parafuso para equilibrar o seu peso. Esse parafuso também serviu para garantir uma melhor fixação da resina acrílica (Artigos Odontológicos Clássico[®], Brasil), a qual foi adicionada para imobilizar a cânula inserida no cérebro do animal. Um fio de aço inoxidável foi colocado no interior da cânula para evitar possíveis obstruções. Por último, foi administrada, de modo tópico, uma pomada contendo sulfato de neomicina e bacitracina (Medley[®], Brasil), a fim de prevenir possíveis infecções locais e auxiliar na cicatrização. Somente após 5 a 7 dias de recuperação os animais foram submetidos às análises comportamentais propostas. Não foram utilizados fármacos analgésicos ou anti-inflamatórios no período pós-cirúrgico,

considerando que essas medicações podem vir a interferir nos resultados relacionados à ação dos compostos em estudo.

Ao final de cada bioensaio todos os animais utilizados nas experimentações foram submetidos à eutanásia, utilizando uma overdose com um fármaco anestésico geral (THIOPENTAX[®], Cristália, Brasil), para verificação da correta posição da cânula-guia através da utilização do corante azul de metileno (via i.c.v.). Os cérebros foram extraídos da caixa craniana e acondicionados em uma matriz de acrílico para camundongos (Insight Equipamentos[®], Brasil). Foram realizados cortes seguindo as marcações da matriz, de modo a verificar o local de inserção da cânula-guia e a marcação dos ventrículos laterais em azul, conforme demonstrado na Figura 6. Em caso de correta posição da cânula, o corante difunde-se por toda a região dos ventrículos (direito e esquerdo).

(a)



(b)



Figura 5: Um dos passos envolvidos na implantação da cânula-guia na região do ventrículo lateral cerebral direito dos animais (a) e o procedimento de administração por via intracerebroventricular utilizando uma bomba de infusão (b). Foto: Kamila Soares, fevereiro de 2018.

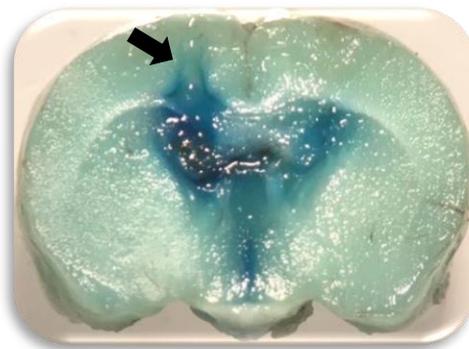


Figura 6: Fatia do cérebro de camundongo *Mus Musculus* (Swiss), no plano coronal, demonstrando o local de incisão da cânula-guia (seta preta), e a difusão do corante azul de metileno pela área dos ventrículos laterais. Foto: Kamila Soares, fevereiro de 2018.

3.2.4 Ensaio da atividade antiepiléptica utilizando modelos agudos para indução de crises

Para verificar o potencial antiepiléptico dos peptídeos sob análise foram utilizados os modelos *in vivo* de indução química aguda de crises epilépticas pela administração de dois indutores químicos diferentes, Pentilenotetrazol (PTZ) e Pilocarpina (PILO). Ambos os compostos são capazes de gerar diferentes tipos de crises epilépticas, via mecanismos moleculares também distintos. Uma vez que analisamos a ação de peptídeos isolados de *C. communis* sobre crises epilépticas induzidas quimicamente, então os animais foram pré-tratados com os compostos a serem estudados, e, para ambos os modelos, os peptídeos foram testados inicialmente na dose de 3,0 µg/animal, em 1 µL de LCRa. Aquele peptídeo que apresentou um efeito antiepiléptico mais pronunciado também foi testado nas doses de 0,3, 1,5 e 6,0 µg/animal. Tais doses foram escolhidas com base na literatura disponível, por padronização laboratorial e de acordo com ensaios anteriores, no próprio laboratório, envolvendo a perspectiva antiepiléptica e utilização de peptídeos provenientes de vespas sociais (201–203). A administração dos compostos sob análise foi realizada com auxílio de uma bomba para infusão (BI-2008, AVS Projetos[®], Brasil) ajustada para infundir 1,2 µL/min, acoplada a uma agulha de

infusão medindo 10,5 mm de comprimento. Os comportamentos apresentados pelos animais foram filmados por 30 minutos (1800s), de acordo com o delineamento experimental para cada um dos modelos, conforme descrito a seguir.

Para o modelo de PTZ, conforme o esquema demonstrado pela Figura 7, 15 minutos após o pré-tratamento inicial dos animais com cada peptídeo e/ou dose pretendida, foi administrado o agente indutor de crises epilépticas (95 mg/kg, s.c.) (*Sigma-Aldrich*[®], EUA), o qual é capaz de provocar crises generalizadas em 100% dos camundongos. Logo em seguida, os animais foram posicionados em uma arena circular de acrílico e o período de filmagem teve início.

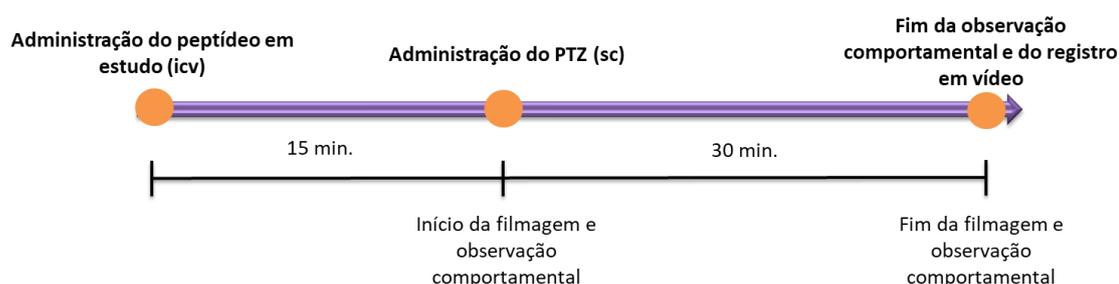


Figura 7: Esquema do delineamento experimental utilizado para indução de crises epilépticas através da administração do composto químico Pentilenotetrazol (PTZ).

No modelo utilizando a PILO, 15 minutos antes de cada pré-tratamento, e com o objetivo de se minimizar os efeitos colinérgicos periféricos causados por esse indutor de crises, os animais receberam Butilbrometo de Escopolamina (Boehringer Ingelheim[®], Alemanha) na dose de 2 mg/kg diluído em salina (150 mM de NaCl), por via ip, em todos os grupos experimentais. O agente indutor de crises (250 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich[®], Alemanha) foi administrado 15 minutos após o pré-tratamento com os peptídeos. Posteriormente, os animais foram posicionados na arena destinada para filmagem dos seus comportamentos. Esse delineamento experimental pode ser melhor evidenciado na Figura 8.



Figura 8: Esquema do delineamento experimental utilizado para indução de crises epilépticas através da administração do composto químico Pilocarpina (PILO).

Além daqueles grupos experimentais formados pela avaliação dos peptídeos, também foram feitos grupos controle para ambos os modelos de crises induzidas, os quais são os seguintes: grupo controle negativo (denominado grupo LCRa), onde os animais receberam pré-tratamento com o veículo utilizado para solubilizar os peptídeos (1 μ L de LCRa, i.c.v.) e, posteriormente, foram induzidas as crises epilépticas pela injeção de PTZ ou PILO; grupo controle positivo (denominado grupo DZP), no qual o pré-tratamento consistiu na administração do antiepiléptico Diazepam (DZP) (4 mg/kg de animal, i.p.) (Compaz[®], Cristália, Brasil), e o indutor de crises foi injetado após 30 minutos.

Ao final dessa etapa experimental, todos os registros gerados foram analisados individualmente. A avaliação das crises epilépticas foi feita utilizando-se o índice de Racine (1972) (135), onde para análise da indução por PTZ foi utilizada a classificação modificada por Lüttjohann e colaboradores (2009) (136) (Tabela 2), e para a análise do modelo induzido por PILO foi utilizada a classificação modificada a partir de Shibley e Smith (2002) (137) (Tabela 3). Os parâmetros avaliados foram: percentual de proteção contra a crise máxima (classe 6 para PTZ e classe 5 para PILO), latência para início da crise máxima (s), duração da crise máxima (s), latência para a morte (em segundos), taxa de sobrevivência (em %) e mediana das classes de crises, segundo os índices. Com relação à latência para início da crise máxima e morte, quando o animal não apresentou esse tipo de crise ou não morreu foi

contabilizado o tempo total de análise, ou seja, a latência para aquele animal foi considerada máxima (1800s) para esses dois parâmetros. Já quanto ao parâmetro de duração da crise máxima, para aqueles animais que morreram antes do término da análise comportamental foi realizado um ajuste do tempo de duração da crise máxima, correlacionando-se o tempo em crise máxima enquanto o animal estava vivo com o tempo total de análise proposto. A dose efetiva 50% (DE₅₀ - dose capaz de causar determinado efeito terapêutico em 50% dos animais) foi calculada utilizando-se os valores obtidos quanto ao percentual de proteção contra a crise máxima, segundo as escalas detalhadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Avaliação das crises epiléticas induzidas por Pentilenotetrazol considerando-se as classes atribuídas ao índice de Racine (1972) (135), modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009) (136).

Classes	Sinais apresentados
1	Imobilidade e/ou redução comportamental súbita.
2	Movimentos faciais com focinho ou com focinho e olhos.
3	Movimentos do pescoço.
4	Crises clônicas na posição sentada.
5	Crises clônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada e/ou crises tônicas.
6	Crises tônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada de lado e/ou saltos violentos.

Tabela 3 - Avaliação das crises epiléticas induzidas por Pilocarpina considerando-se as classes atribuídas ao índice de Racine (1972) (135), modificado a partir de Shibley e Smith (2002) (137).

Classes	Sinais apresentados
1 e 2	Mioclonia de cabeça, enrijecimento da cauda, tremores, freezing.
3	Crises tônico-clônicas pouco intensas marcadas por mioclônias unilaterais dos membros.
4	Crises mioclônicas bilaterais dos membros.
5	Crises mioclônicas bilaterais dos membros acompanhada de perda transitória do controle postural (Crise generalizada).

3.2.5 Análise da atividade elétrica cerebral por Vídeo-eletroencefalografia

3.2.5.1 Procedimento neurocirúrgico para implantação dos eletrodos necessários à análise vídeo-eletroencefalográfica

Apenas aquele peptídeo que apresentou o efeito antiepilético mais pronunciado sobre algum dos modelos *in vivo* descritos anteriormente foi submetido a essa análise, a fim de se verificar a ação sobre os registros eletroencefalográficos (EEG) gerados.

Nessa etapa, o procedimento inicial consistiu na implantação da cânula-guia necessária à administração dos peptídeos, conforme descrito anteriormente. Após, foram realizadas as medições necessárias à implantação de seis eletrodos responsáveis pela captação da atividade elétrica, todos posicionados no córtex do animal, e, para fazer referência aos pontos da montagem do Sistema Internacional 10-20 de eletroencefalografia em humanos, foram alocados em áreas cerebrais correspondentes às regiões frontal, parietal e occipital do encéfalo (Figura 9b). Os eletrodos eram formados por parafusos acoplados a fios condutores (8403, Pinnacle Technology[®], EUA) (Figura 9a). Foram inseridos dois eletrodos em cada uma dessas regiões, um em cada hemisfério cerebral, de modo que a distância entre eles

obedeceu as medições descritas na Tabela 4, a partir do ponto do Bregma (134). Os eletrodos dispostos na região frontal ficaram posicionados no córtex motor primário, onde aquele presente no hemisfério esquerdo é o eletrodo de referência (*Shared/EEG Common*), enquanto que aquele localizado no hemisfério direito é o eletrodo terra (AGND), responsável pela minimização de fatores externos interferentes como o sinal ruído e a movimentação do animal. Os eletrodos fixados na área parietal ficaram posicionados no córtex somatossensorial primário (canal EEG 1). Já os eletrodos occipitais foram dispostos na região correspondente ao córtex visual primário (Canal EEG 2). Após a fixação de todos os eletrodos ao encéfalo, então foi necessário fazer a sua interligação a um dispositivo eletrônico (8415-SM, Pinnacle Technology[®], EUA) (Figura 9c), o qual serviu como conector entre os eletrodos encefálicos e o sistema de monitoramento de vídeo-eletroencefalografia. Por último, o conjunto formado por eletrodos mais conector foi fixado à superfície craniana do animal pela utilização de resina acrílica (Artigos Odontológicos Clássico[®], Brasil) (Figura 9c), e foi administrada, de modo tópico, uma pomada contendo sulfato de neomicina e bacitracina (Medley[®], Brasil), a fim de prevenir possíveis infecções locais e auxiliar na cicatrização. Após o procedimento cirúrgico, os animais ficaram em período de recuperação e somente foram submetidos à análise vídeo-eletroencefalográfica após 5 a 7 dias.

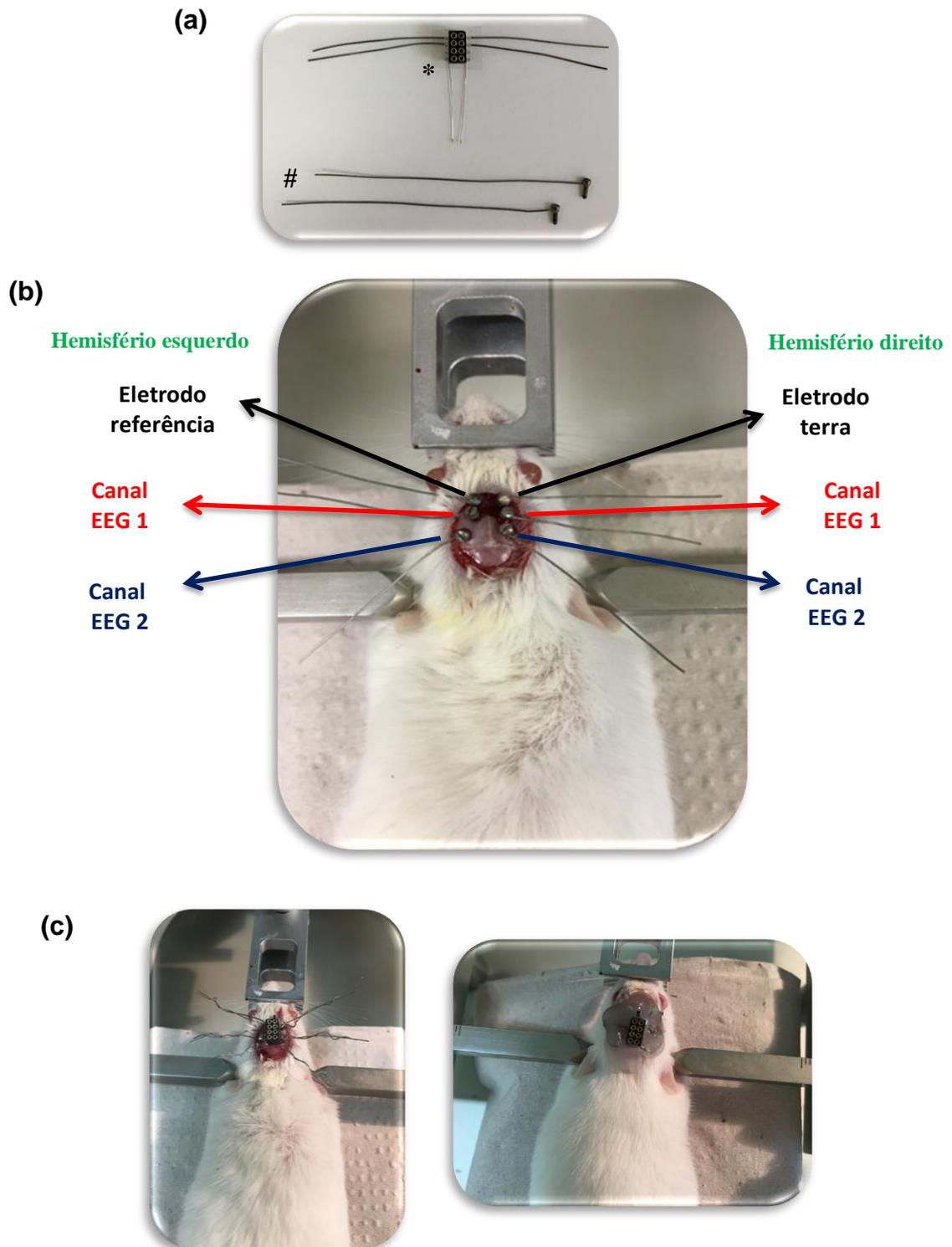


Figura 9: Em (a) são demonstrados o dispositivo eletrônico conector (*) e os eletrodos a serem implantados no córtex cerebral (#). Em (b) observa-se o esquema ilustrativo da posição dos seis eletrodos implantados no encéfalo do animal, necessários para aquisição dos registros eletroencefalográficos. Em (c) é demonstrado o dispositivo eletrônico conectado aos eletrodos (finalização do procedimento cirúrgico). Fotos: Kamila Soares, fevereiro de 2018.

Tabela 4 - Medições utilizadas, a partir do ponto do Bregma, para a implantação dos seis eletrodos necessários à captação dos sinais eletroencefalográficos apresentados pelos animais.

	Mesolateral	Anteroposterior
Eletrodos terra e referência	$\pm 1,5$ mm	+ 1 mm
Canal EEG 1	± 2 mm	- 1 mm
Canal EEG 2	± 3 mm	- 3 mm

3.2.5.2 Obtenção e análise dos registros vídeo-eletroencefalográficos

Esse procedimento experimental foi realizado utilizando-se um sistema padronizado para monitoramento de vídeo-eletroencefalografia (Pinnacle Technology[®], EUA).

Inicialmente, os eletrodos implantados no encéfalo do animal foram devidamente acoplados ao sistema de monitoramento, via conexão com o dispositivo eletrônico citado anteriormente. Após, os registros dos sinais elétricos tiveram início, onde, primeiramente, foi feita a captação da atividade elétrica basal do animal (linha basal) por 30 minutos. Posteriormente, iniciaram-se as análises do perfil elétrico cerebral associado ao ensaio em curso. Deste modo, o tratamento dos animais, tanto com o peptídeo sob análise, na dose que apresentou uma melhor efetividade nos modelos agudos, quanto com o indutor de crises, seguiu o mesmo delineamento experimental já descrito para cada modelo de indução química relatado acima (Seção 3.2.4). Assim como também foram feitos grupos controles nos mesmos moldes daqueles descritos para os ensaios de indução aguda de crises epiléticas. Os registros de EEG foram monitorados continuamente durante o período de duas horas após a indução química de crises epiléticas nos animais, e foram feitos tomando-se a diferença de potencial entre dois eletrodos, para cada canal do eletroencefalograma.

Ao final do período experimental, todos os registros de vídeo-eletroencefalografia foram avaliados utilizando-se o software Sirenia Pro versão 1.8.0 (Pinnacle Technology[®], EUA). Para análise dos dados gerados nessa etapa experimental foram utilizados apenas os 30 minutos iniciais de registro, após a aplicação do indutor de crises. Os parâmetros avaliados em relação às crises eletroencefalográficas generalizadas foram: latência para início (s); tempo total (duração) (s); quantidade de crises; percentual de proteção contra esse tipo de crise.

3.2.6 Estudo do perfil neurofarmacológico

Essa análise teve como objetivo determinar os efeitos adversos relacionados à ação daquele peptídeo que apresentou melhor atividade sobre os ensaios de indução aguda de crises epilépticas. Para tanto, foram utilizadas nesta etapa duas doses: aquela mais efetiva sobre os ensaios de indução aguda de crises e também outra 10 vezes superior, esta a fim de tentar-se prever um índice terapêutico. Foram avaliadas as alterações na atividade geral espontânea e na perda da coordenação motora (ataxia).

Para a determinação da atividade geral espontânea foi utilizado o ensaio de campo aberto (*Open Field*). Inicialmente, houve a administração do composto em estudo, via i.c.v., e após 15 minutos os animais foram posicionados no centro de uma arena circular de acrílico (60 centímetros de diâmetro, 50 centímetros de altura), a qual apresenta uma divisão interna em 12 quadrantes (Figura 11). A partir desse momento todos os animais foram filmados por 20 minutos, sendo os primeiros 5 minutos descartados da análise, uma vez que corresponderam ao período de adaptação ao ambiente. Para avaliação, foi contabilizado o tempo total gasto pelos animais, individualmente, na prática dos comportamentos de exploração, imobilidade, autolimpeza e elevação, segundo as definições apresentadas na Tabela 5 (modificadas a partir de Speller e Westby, 1996) (138). Além do mais, também foi observada a quantidade de linhas cruzadas totalmente pelo animal como complemento à avaliação do comportamento exploratório. Todos os vídeos gerados foram avaliados utilizando-se o software Any-Maze (Stoelting[®], EUA).

Tabela 5 - Definições dos comportamentos avaliados no ensaio do Campo Aberto, modificados a partir de Speller e Westby, 1996 (138).

Comportamento	Aspectos observados
Imobilidade	Ausência de movimentos.
Exploratório	Manter-se ativo. Cheirar ou caminhar pela arena.
Autolimpeza	Limpar focinho, patas anteriores ou posteriores, genitais, cauda, cabeça, dorso, ventre.
Elevação	Permanecer equilibrado nas duas patas posteriores, apoiado ou não nas paredes da arena.



Figura 10: Arena circular de acrílico que foi utilizada no ensaio de Campo Aberto, para a determinação da atividade geral espontânea. Foto: Kamila Soares, março de 2018.

As alterações relacionadas com a disfunção motora (ataxia) foram verificadas através do ensaio utilizando o equipamento Rotarod (Insight Equipamentos[®], Brasil) (Figura 12). Essa experimentação consistiu em submeter os animais a movimentos giratórios constantes sob um suporte que apresenta as seguintes características: barra cilíndrica com 5cm de diâmetro e velocidade de giro de 20 rotações por

minuto. Três dias antes do ensaio propriamente dito, foram realizadas apenas sessões de treinamento com todos os animais, para que eles pudessem aprender a permanecer na barra cilíndrica (3 seções de 5 min cada, por dia). No dia do ensaio, previamente, foi realizado um pré-teste com todos os animais anteriormente treinados, e somente aqueles que conseguiram permanecer durante 5 min na barra giratória estavam aptos a participar da experimentação. Esta consistiu na administração, via i.c.v., do peptídeo sob estudo, e subsequente avaliação dos parâmetros necessários após 15, 40, 60, 80 e 120 minutos de tratamento. Para cada um desses intervalos de tempo foram realizadas sessões de teste de 5 min. Os parâmetros registrados foram: quantidade de animais que falharam em permanecer na barra cilíndrica e latência para a queda (s). Para aqueles animais que não caíram em cada uma das etapas de avaliação foi considerado o valor máximo de latência para a queda (300s). O número de camundongos que falharam em permanecer no aparelho foi usado para calcular a dose na qual 50% dos animais apresentam descoordenação motora (DT_{50}). Este valor, juntamente com aquele de DE_{50} , foi utilizado para o cálculo do índice terapêutico (margem de segurança de um fármaco – relação entre a dose necessária para produzir um efeito indesejado e aquela que produz o efeito terapêutico esperado).

Para ambos os modelos experimentais relatados acima, foram feitos grupos controles nos mesmos moldes daqueles descritos para os ensaios de indução aguda de crises epiléticas (Seção 3.2.4).



Figura 11: Equipamento Rotarod (Insight Equipamentos[®], Brasil) que foi utilizado para avaliação da coordenação motora. Foto: Kamila Soares, março de 2018.

3.2.7 Aspectos Éticos

A manipulação dos animais experimentais seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008). Este projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal da UnB (CEUA/UnB), sendo foi aprovado e homologado sob os números de protocolos UnBDoc 45810/2009 e 144410/2014 (Anexo J).

3.2.8 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism[®] 7.0 (San Diego, EUA). Para valores estatisticamente significantes foi considerado o valor de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas concernentes aos efeitos dos peptídeos avaliados sobre os modelos de epilepsia

foram realizadas em comparação ao grupo LCRa (controle negativo). Já para os ensaios posteriores (ensaio eletroencefalográfico e estudo do perfil neurofarmacológico) foram feitas análises estatísticas comparando-se todos os grupos experimentais.

Primeiramente, foi feita uma análise para verificar se os dados apresentam uma distribuição normal. Caso estivessem enquadrados dentro das premissas para avaliação paramétrica, foi utilizado o teste ANOVA de uma via (*one-way* ANOVA) ou o teste t de Student. Este foi utilizado para verificar a significância dos tempos de latência e de duração dos parâmetros propostos relacionados com os ensaios de indução aguda de crises epiléticas, quando foi comparada a ação de cada peptídeo, isoladamente, em relação ao grupo controle negativo (LCRa). O teste ANOVA de uma via foi empregado para verificação da significância dos parâmetros associados ao ensaio eletroencefalográfico, assim como também quanto aos tempos totais gastos pelos animais nos bioensaios de avaliação da atividade geral espontânea, e efeito relacionado às diferentes doses testadas no ensaio de indução aguda de crises. Em caso de significância, os testes ANOVA de uma via foram seguidos pelo pós-teste de Tukey. Para aqueles grupos que não apresentaram uma distribuição normal, foi feita uma avaliação não-paramétrica, utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's, ou o teste de Mann Whitney. Já a análise estatística da latência para a queda no ensaio de Rotarod foi feita pela utilização do teste *Two-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Na verificação do percentual de proteção contra crises máximas/generalizadas e taxa de sobrevivência, referentes aos ensaios de vídeo-eletroencefalografia e aos modelos de crises epiléticas quimicamente induzidas, assim como também na análise de significância quanto à quantidade de animais que falharam em permanecer na barra cilíndrica do ensaio de Rotarod, foi utilizado o teste exato de Fisher. A significância com relação à mediana das classes foi verificada com o teste Mann Whitney.

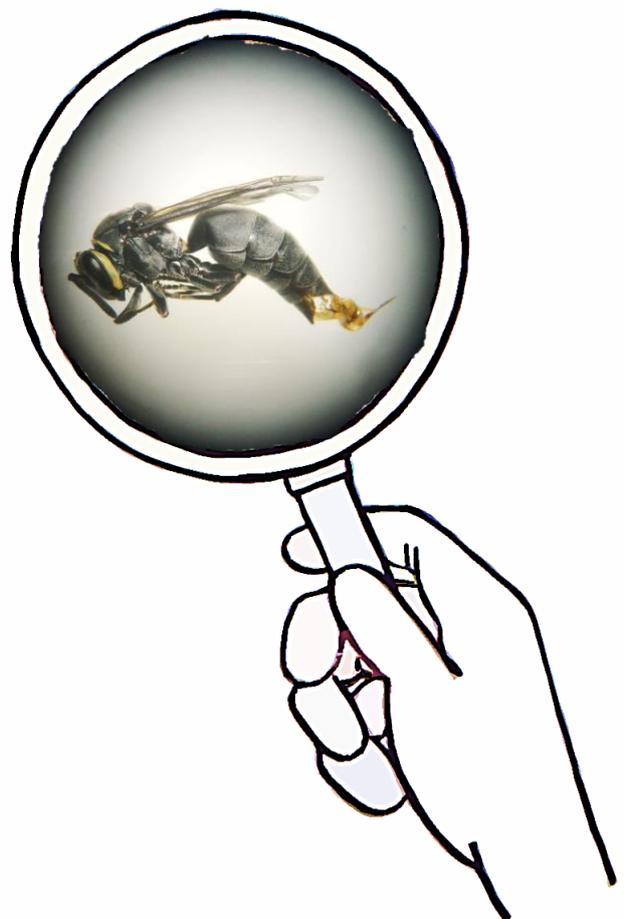
Na determinação da DE_{50} foi utilizada a análise não linear sigmoide. O índice terapêutico foi calculado pela razão da DT_{50} pela DE_{50} .

Todos os valores de significância obtidos após a execução dos testes estatísticos necessários às análises propostas encontram-se dispostos no anexo G.

Resultados

e

Discussão



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARTE I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS PRESENTES NA PEÇONHA

Em muitos estudos observados na literatura um dos primeiros passos envolvidos na descoberta de uma nova ferramenta terapêutica, oriunda de produtos naturais, é a evidenciação de seu efeito biológico, mesmo antes de se saber o que de fato é aquele composto, ou seja, antes de conhecê-lo estruturalmente (103,130,139). Este conhecimento, então, viria a ser obtido em etapas subsequentes. Sob alguns aspectos, essa estratégia pode ser considerada vantajosa, uma vez que a busca pela identidade estrutural já é direcionada para algo que se sabe ser, na prática, efetivo para atuar em determinado alvo molecular. Por outro lado, o início de uma busca científica por candidatos farmacológicos envolvendo primeiramente a observação de seu efeito terapêutico também pode trazer desvantagens e, quando tratamos de compostos derivados de peçonhas animais, uma delas é a necessidade da utilização de grandes quantidades de material, principalmente se, inicialmente, são feitos ensaios biológicos *in vivo*. Esse fato, em alguns casos, pode tornar-se um considerável empecilho à pesquisa, uma vez que pode demandar uma coleta pronunciada dos espécimes/materiais animais necessários, o que pode vir a impactar negativamente a sua biodiversidade e, além disso, o estudo pode envolver espécies difíceis de serem encontradas rotineiramente, o que pode prejudicar o andamento das experimentações (140).

Diante dos obstáculos relatados acima, e com o intuito de tentar evitá-los, decidiu-se por readequar o delineamento experimental para uma metodologia que nos conduzisse aos ensaios biológicos já com posse do conhecimento sobre aquilo que estaríamos testando, ou seja, com a convicção da sua caracterização estrutural. Ademais, uma das vantagens dessa forma de condução refere-se ao fato de que a quantidade de material requerida de início é consideravelmente pequena e, uma vez constatada a presença do efeito biológico buscado, os problemas relacionados à escassez ou ausência de material para dar continuidade ao estudo estariam consideravelmente reduzidos ou, de certo modo, eliminados. Uma vez que com

domínio da constituição estrutural do composto ativo a sua síntese química passa a ser uma alternativa bastante viável. Outro ponto chave é que, através dessa abordagem, a busca por uma ferramenta farmacológica pode ser feita de modo mais racional, no sentido de que o conhecimento das características estruturais do candidato terapêutico pode conduzir à sua utilização no tratamento de determinada patologia. Desse modo, o processo de *screening* farmacológico pode poupar preciosos elementos, tais como o tempo gasto e os recursos dispensados.

4.1.1 Coleta, extração e processamento inicial da peçonha proveniente de vespas sociais da espécie *Chartergellus communis*

Foram feitas duas coletas no Parque Municipal do Itiquira, nos meses de Maio de 2014 e Abril de 2015, onde se obteve um total de dois ninhos (Figuras 13a e 13b).

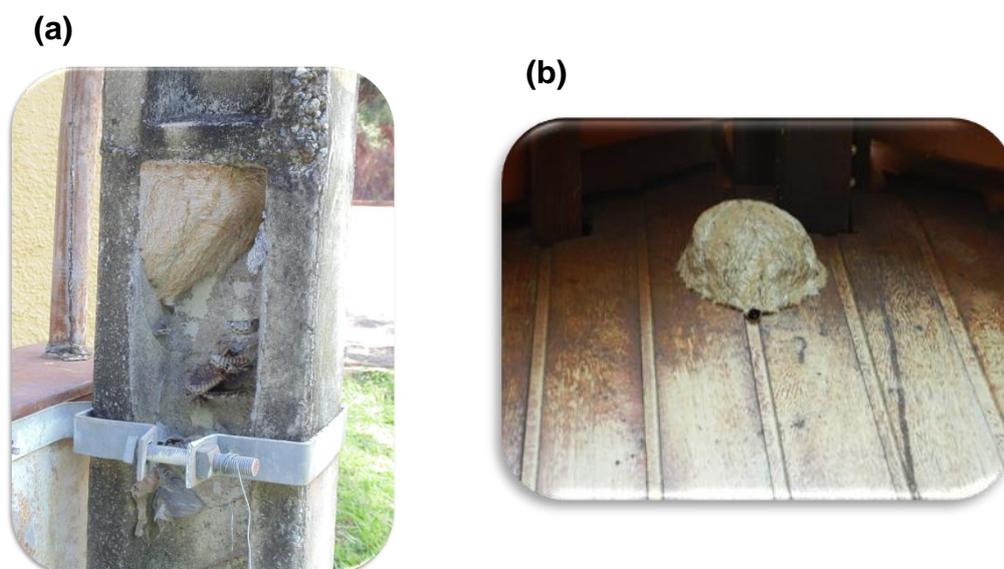


Figura 12: Ninhos da vespa social *Chartergellus communis*, coletados no Parque Municipal do Itiquira, em Formosa – GO. (a) Ninho aderido a um poste de iluminação localizado no interior do parque. Foto: Flávia Maria; Maio, 2014. (b) Ninho aderido a uma estrutura de madeira localizada na entrada do parque. Foto: Kamila Soares; Abril, 2015.

Ao todo foram extraídas 371 glândulas e reservatórios de peçonha. Ao término do processamento inicial desse material obteve-se aproximadamente 67 mg de peçonha liofilizada e constituída apenas por compostos com baixas massas moleculares. A opção pelo trabalho com moléculas de massa reduzida, ou seja, que nesta pesquisa apresentam até 10.000 Da, deve-se ao conhecimento prévio de que compostos com elevadas massas moleculares podem estar associados a efeitos neurotóxicos em alguns ensaios experimentais. Como um dos exemplos dessa constatação tem-se os resultados obtidos por Cunha e colaboradores (2005) (130) em sua pesquisa científica com a peçonha da vespa *Polybia ignobilis*. Neste estudo foi evidenciado que a peçonha bruta demonstrou ser neurotóxica quando administrada por via i.c.v., enquanto que a peçonha desnaturada, e ausente de componentes macromoleculares, foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos observados outrora sobre o SNC, apresentando atividade antiepiléptica sobre alguns modelos *in vivo* de indução de crises epilépticas. Desse modo, os autores sugeriram que a neurotoxicidade verificada poderia estar relacionada com compostos de alta massa molecular, tais como enzimas, tendo-se em vista também que a atividade proteolítica, potencialmente danosa a estruturas proteicas cerebrais, é um dos efeitos geralmente descritos em peçonhas de algumas espécies de vespas (141,142).

4.1.2 Frações peptídicas isoladas a partir da peçonha de *Chartergellus communis*

Quando falamos em peçonhas animais, mais precisamente naquelas oriundas de vertebrados e invertebrados, nos referimos a compostos constituídos por uma mistura de variados elementos orgânicos, tais como alcalóides, acilpoliaminas e, em sua maioria, proteínas e peptídeos (143). Sendo assim, toda essa heterogeneidade constitucional requer técnicas analíticas que permitam revelar precisamente a complexidade de seus componentes. Nesse sentido, o isolamento de novas moléculas biologicamente ativas a partir de peçonhas, e suas consequentes identificações, tem sido bastante beneficiado com os recentes avanços das técnicas

de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas nos últimos 20 anos (67,144).

Até pouco tempo atrás, a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) era uma das principais técnicas utilizadas para análise da constituição de peçonhas, porém hoje se sabe que esse método demonstrou ser limitado devido a sua incapacidade em expressar a total complexidade das amostras analisadas, principalmente quanto ao seu conteúdo proteico (145). O advento e aperfeiçoamento das técnicas cromatográficas, principalmente da CLAE em fase reversa, conseguiu contornar esse problema, uma vez que pela sua utilização tornou-se possível a separação de um maior número de moléculas presentes nas amostras de peçonhas, permitindo, assim, uma melhor resolução experimental (146).

Com os cerca de 67 mg de amostra seca obtidos nas etapas iniciais de processamento da peçonha, foram executadas 22 cromatografias, utilizando-se, em média, 3,0 mg de peçonha em cada processo cromatográfico.

A Figura 14 corresponde a um perfil cromatográfico representativo da peçonha ultrafiltrada de *C. communis*. Levando-se em consideração o conhecimento prévio de que, em perfis cromatográficos de peçonhas de vespas, as primeiras frações que eluem são, normalmente, constituídas por neurotransmissores e aminas biogênicas, então todos aqueles compostos que eluíram até cerca de 20 minutos não foram utilizados nessa busca de novos compostos peptídicos, e estão agrupados e identificados no referido cromatograma pela letra A. Desse modo, todos os outros compostos que eluíram após 20 minutos de corrida foram relacionados em 19 frações peptídicas, classificadas como communis 1 a communis 19, conforme evidenciado pelo perfil cromatográfico apresentado na Figura 14.

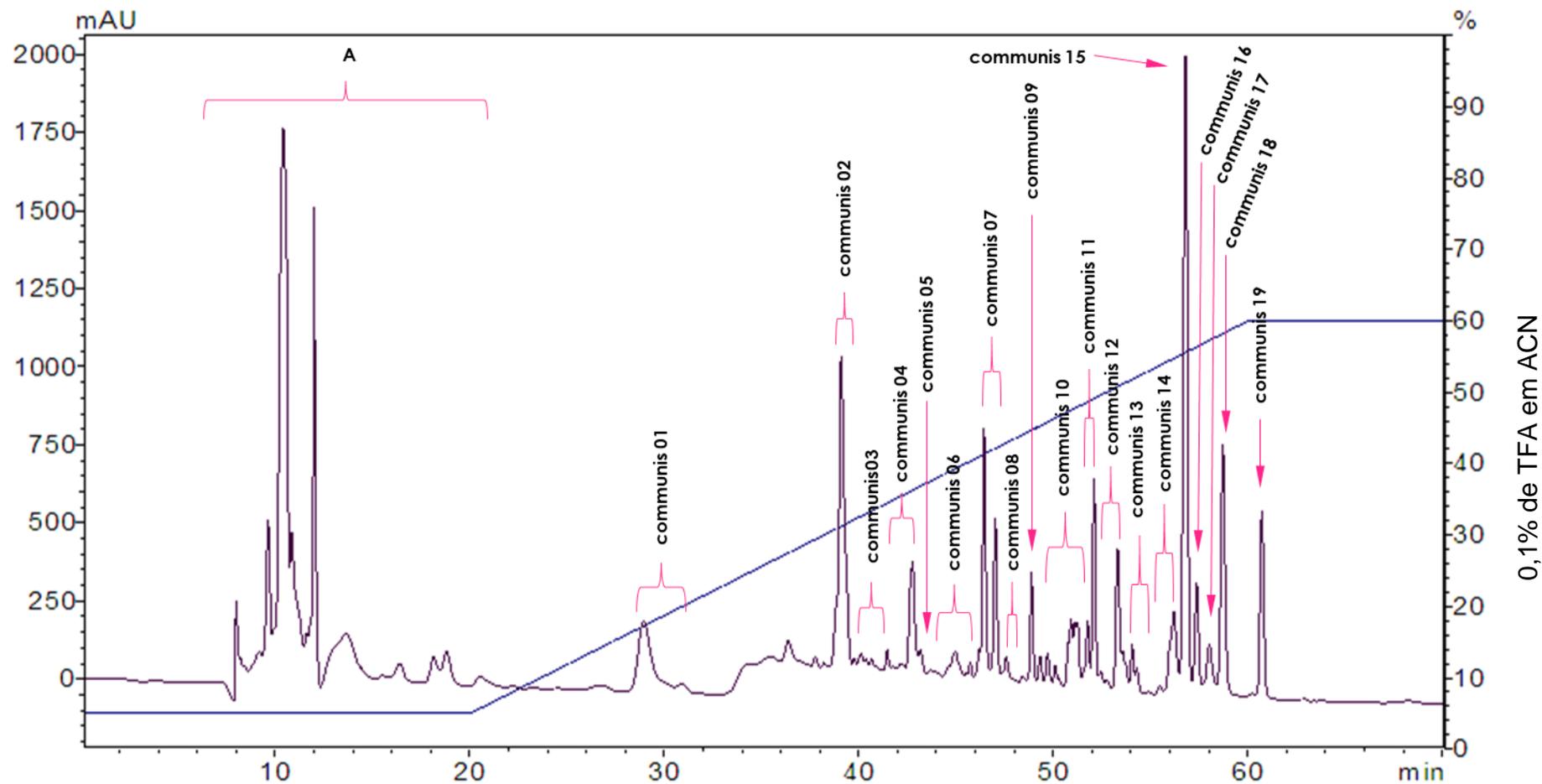


Figura 13: Cromatograma da peçonha ultrafiltrada de *C. communis* utilizando uma coluna semi-preparativa C18 Phenomenex. Peçonha reconstituída em água e acetonitrila a 5%. (A) corresponde às frações que não serão analisadas nesse estudo. Communis 01 a communis 19 correspondem às frações que tiveram suas massas moleculares analisadas por espectrometria de massas.

4.1.3 Peptídeos sequenciados e identificados a partir da peçonha de *Chartergellus communis*

Apesar de bastante vantajosa no que diz respeito ao fracionamento de compostos, a CLAE não permite que se conheçam as informações referentes às massas moleculares das amostras fracionadas, assim como também não fornece dados relacionados com sua caracterização química.

Para tanto, a espectrometria de massas surgiu como uma importante aliada no sentido de complementar a elucidação dos compostos presentes em peçonhas, trazendo grandes benefícios à toxinologia. A partir do aperfeiçoamento e aplicação das suas diferentes técnicas, as pesquisas com peçonhas animais puderam ser beneficiadas com o acesso a uma gama valiosa de informações, que vão desde a simples determinação das massas moleculares de componentes intactos, até a definição da sequência primária completa de peptídeos (147). Em relação ao completo sequenciamento dos aminoácidos presentes em um composto peptídico, embora atualmente a espectrometria de massas forneça dados bastante robustos, a degradação de Edman ainda continua sendo uma técnica complementar de grande utilidade, apesar de ser um método mais antigo e que requer uma completa purificação da amostra (148,149).

Todas as 19 frações tiveram suas massas e respectivos graus de pureza detectados pela técnica de espectrometria de massas (MS). Esta análise demonstrou que as frações peptídicas apresentavam massas moleculares que variavam entre 879 a 5430 Da, aproximadamente, conforme dados expostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Massas moleculares, em Daltons, obtidas após espectrometria de massas das frações peptídicas isoladas a partir da peçonha de *Chartergellus communis*.

Fração peptídica	Massas moleculares (Da)
communis 01	1737,9; 1923
communis 02	1093,3
communis 03	1425,7; 1434,6; 1652,9
communis 04	1118; 1425; 2367; 2562; 5028; 5430
communis 05	983; 1018,02; 1425,42; 1867,85; 2367,24
communis 06	1028,11; 1418,56; 1643,70; 2043,87
communis 07	1287; 1330,86; 1493
communis 08	1075,10; 1203,28; 1331,42; 1882,71; 2151,86
communis 09	1129; 1160,21; 1175,23; 1337,37
communis 10	918,83; 1175,19; 1443,07; 1525,44; 2125,75; 2961,31
communis 11	1340,9*; 1403,42; 2758; 2963
communis 12	1120,17; 1696,65
communis 13	879; 1724,81
communis 14	1809,74; 1970,82
communis 15	1808,2
communis 16	1837,3
communis 17	1198,86; 1808,74
communis 18	1836,3
communis 19	912; 1137; 1212; 1226; 1239,9; 2421

Uma vez que estamos à procura de compostos potencialmente úteis ao tratamento da Epilepsia, e levando-se em consideração o fato de que tal composto, preferencialmente e dentre outros fatores, deve possuir um tamanho reduzido para

que apresente uma maior probabilidade em conseguir ultrapassar a barreira hematoencefálica, então se decidiu dar continuidade aos passos seguintes dessa pesquisa (sequenciamento, identificação e ensaios biológicos) com aqueles peptídeos que apresentavam menores massas. Além desse critério, o grau de abundância dos peptídeos presentes na peçonha também foi outro quesito levado em consideração para a escolha daquelas moléculas que, a princípio, prosseguiriam às próximas etapas experimentais.

Desse modo, o sequenciamento por MS/MS e a degradação automática de Edman foram feitos com seis frações peptídicas: communis 07, communis 11, communis 15, communis 16, communis 18 e communis 19. Para realizar essa etapa, procedimentos de recromatografias tiveram que ser executados previamente, a fim de se obter os peptídeos totalmente isolados e com alto grau de pureza. Os dados resultantes desses procedimentos, juntamente com a confirmação do grau de pureza das amostras, encontram-se dispostos nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Após, foi possível realizar a devida determinação de suas sequências primárias de aminoácidos, estando os espectros resultantes expostos nas Figuras 17 a 22, e as análises da degradação automática de Edman elencadas nos anexos H a M. As sequências obtidas estão listadas na Tabela 7.

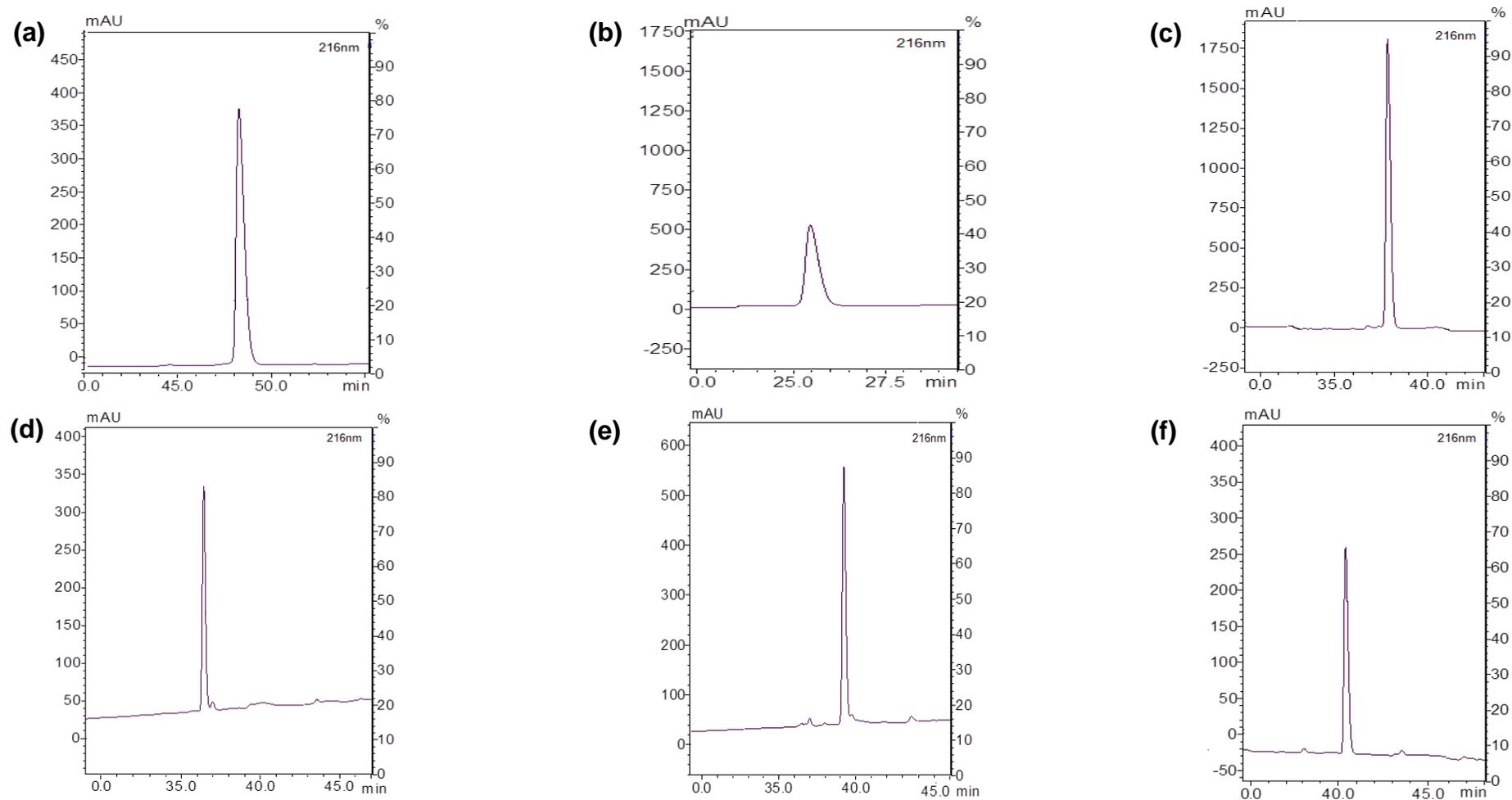


Figura 14: Cromatogramas obtidos após os procedimentos de recromatografias para purificação dos peptídeos de interesse. Foi utilizada uma coluna analítica C18 Phenomenex. (a) communis 07, eluição em 21,5% do solvente B. (b) communis 11, eluição em 32% do solvente B. (c) communis 15, eluição em 47,5% do solvente B. (d) communis 16, eluição em 46,2 % do solvente B. (e) communis 18, eluição em 49% do solvente B. (f) communis 19, eluição 50,2% do solvente B.

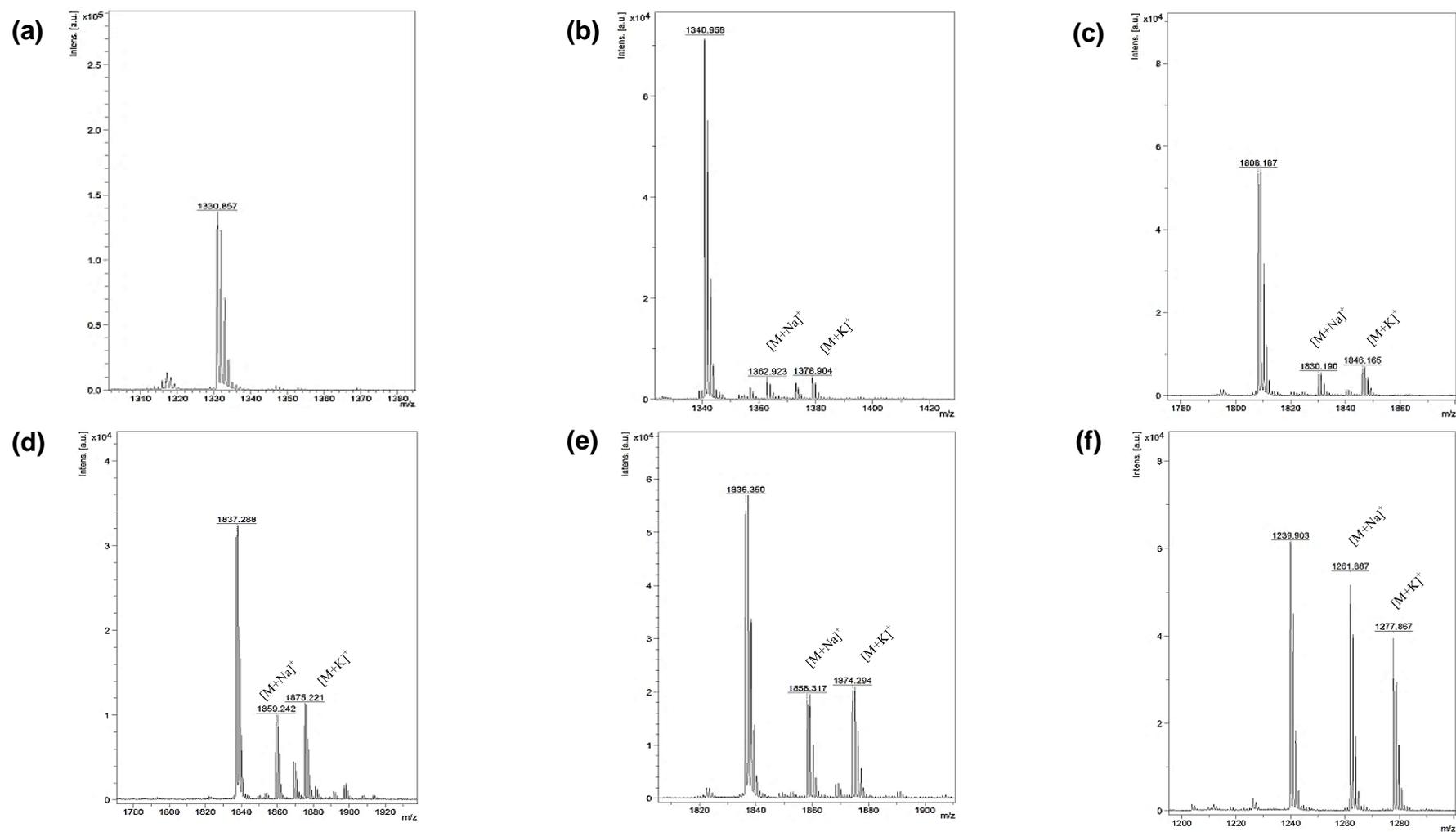


Figura 15: Espectros de massa dos peptídeos de interesse obtidos por MALDI TOF/TOF, demonstrando o grau de pureza das amostras $[M+H]^+$. (a) communis 07. (b) communis 11. (c) communis 15. (d) communis 16. (e) communis 18. (f) communis 19.

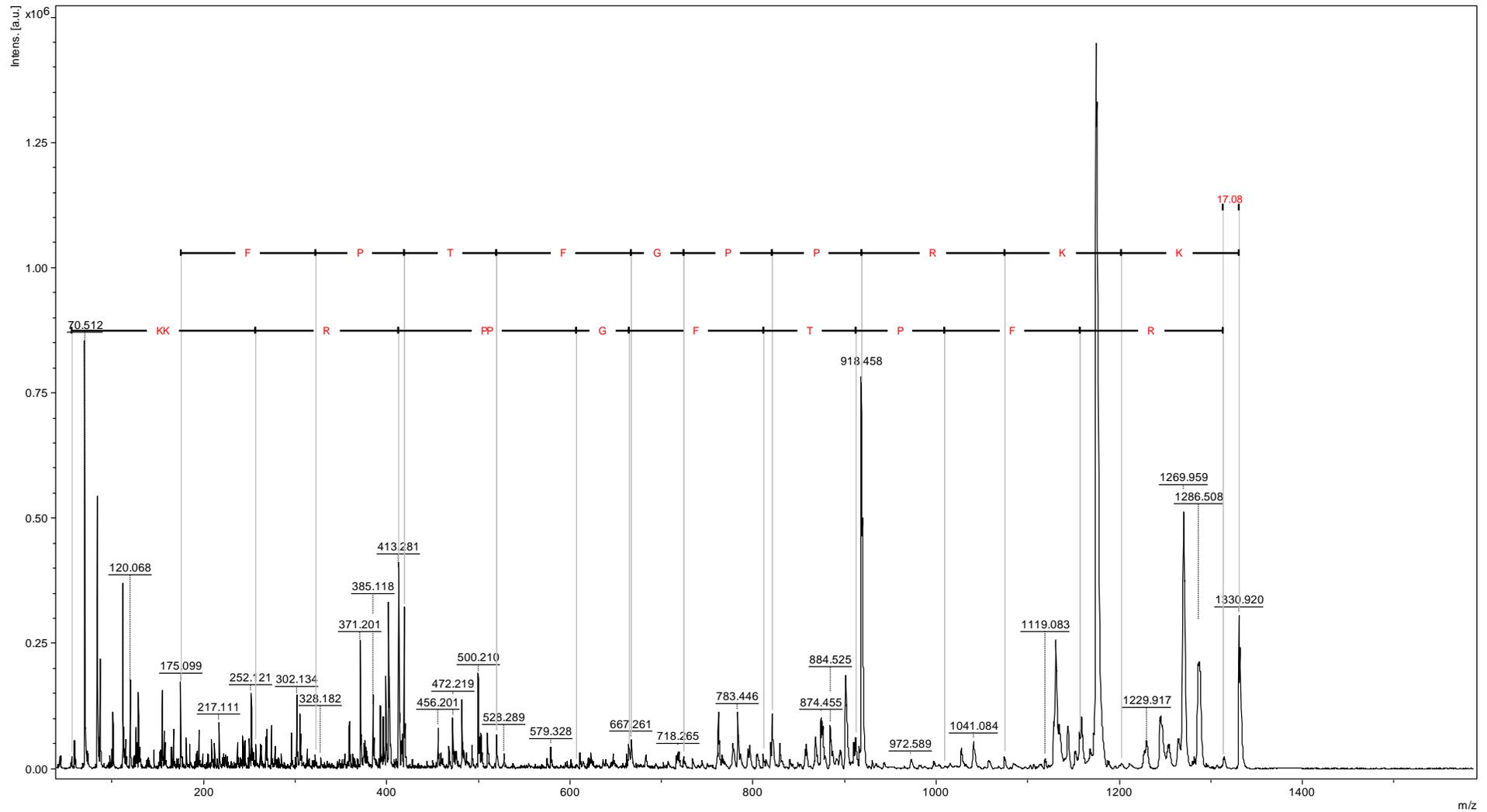


Figura 16: Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 07. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como meio complementar à etapa de sequenciamento.

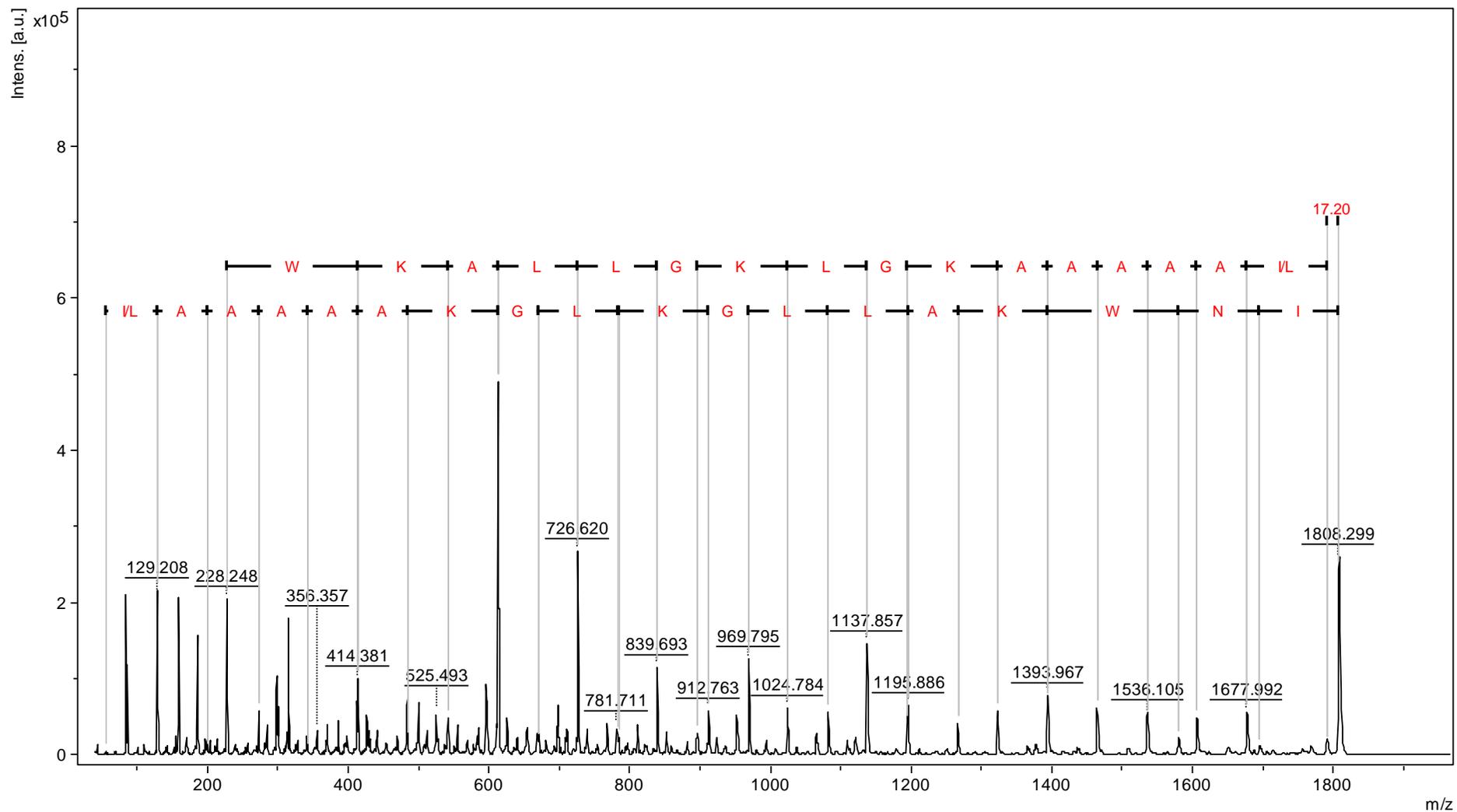


Figura 18: Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 15. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como meio complementar à etapa de sequenciamento.

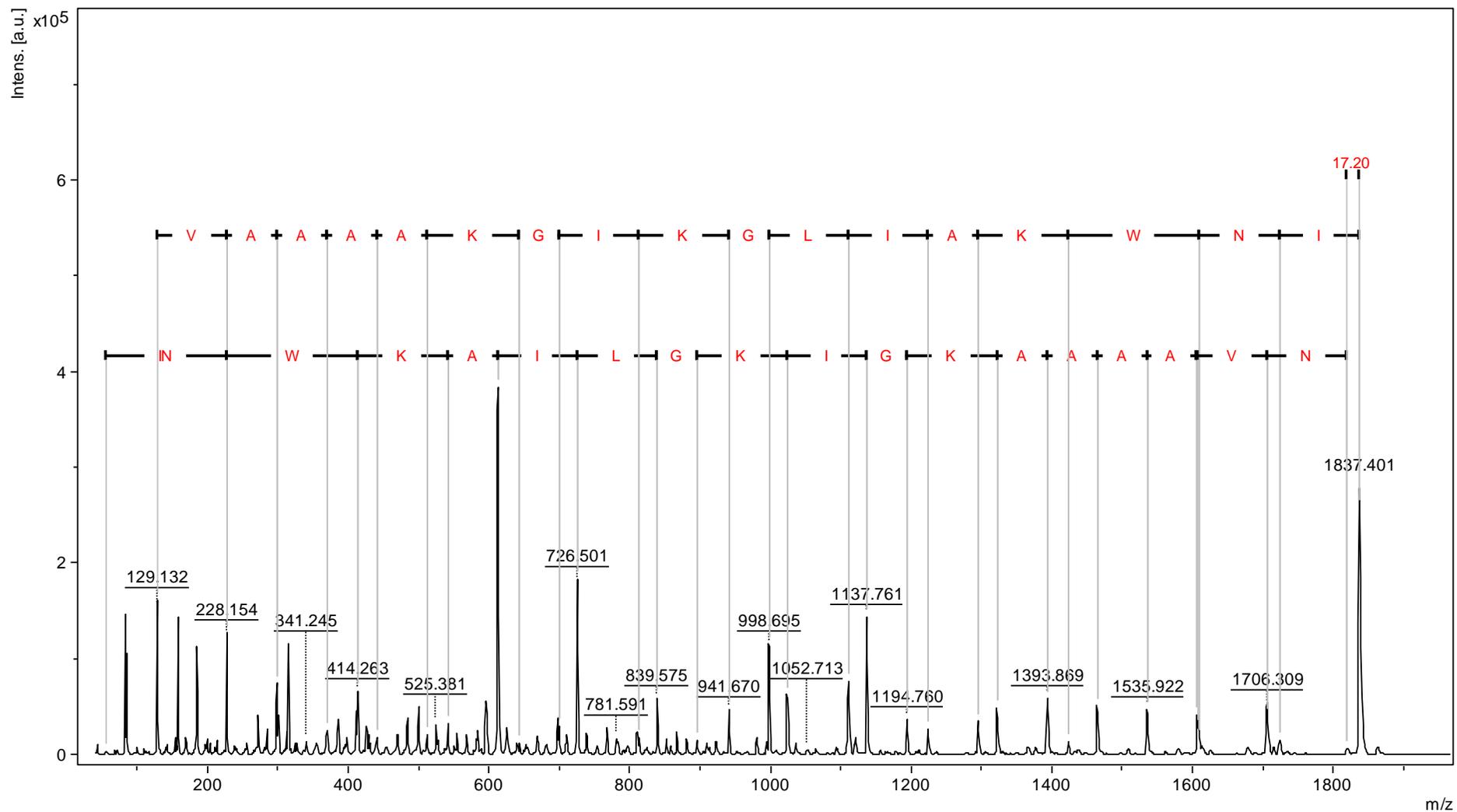


Figura 19: Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 16. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como meio complementar à etapa de sequenciamento.

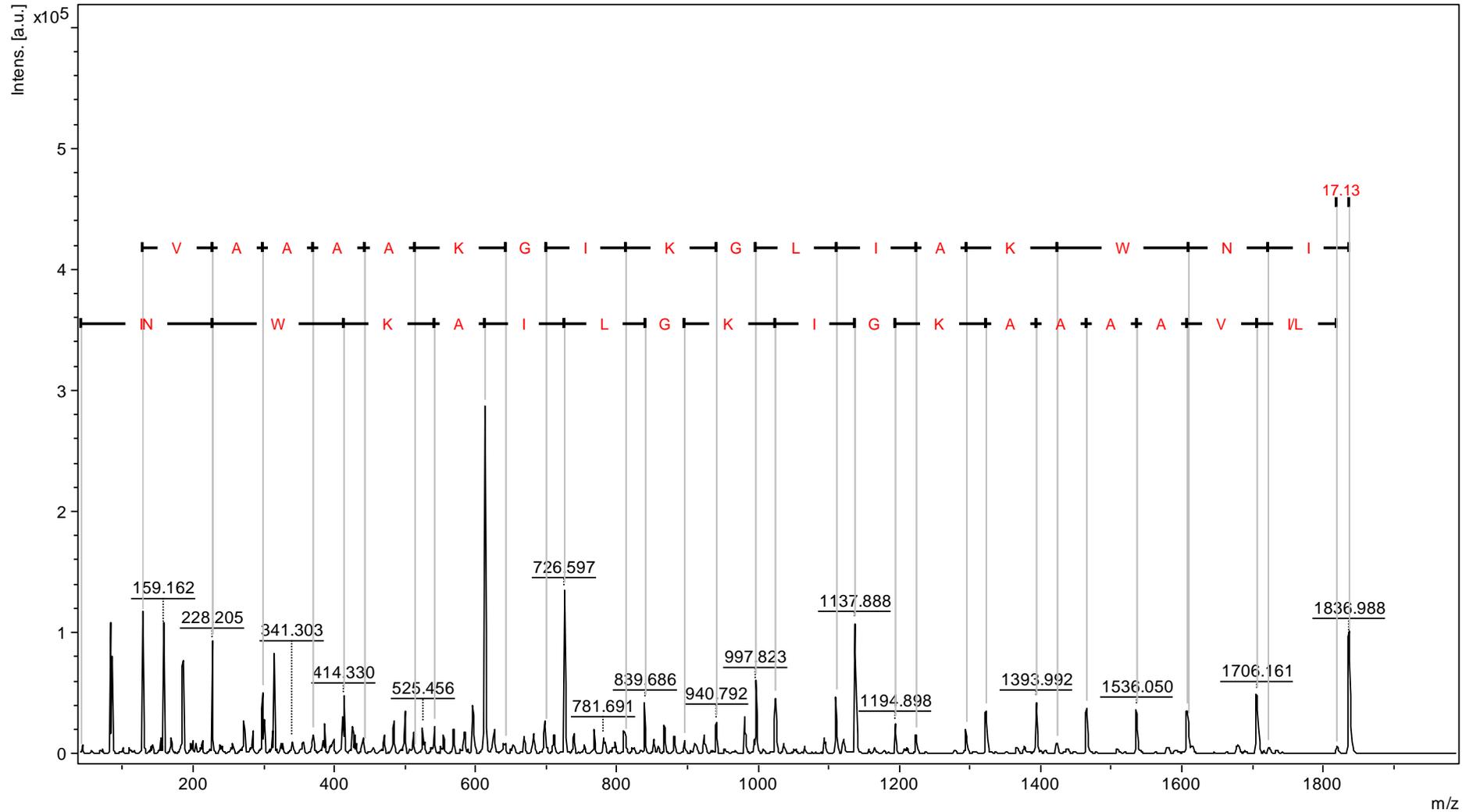


Figura 20: Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 18. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como meio complementar à etapa de sequenciamento.

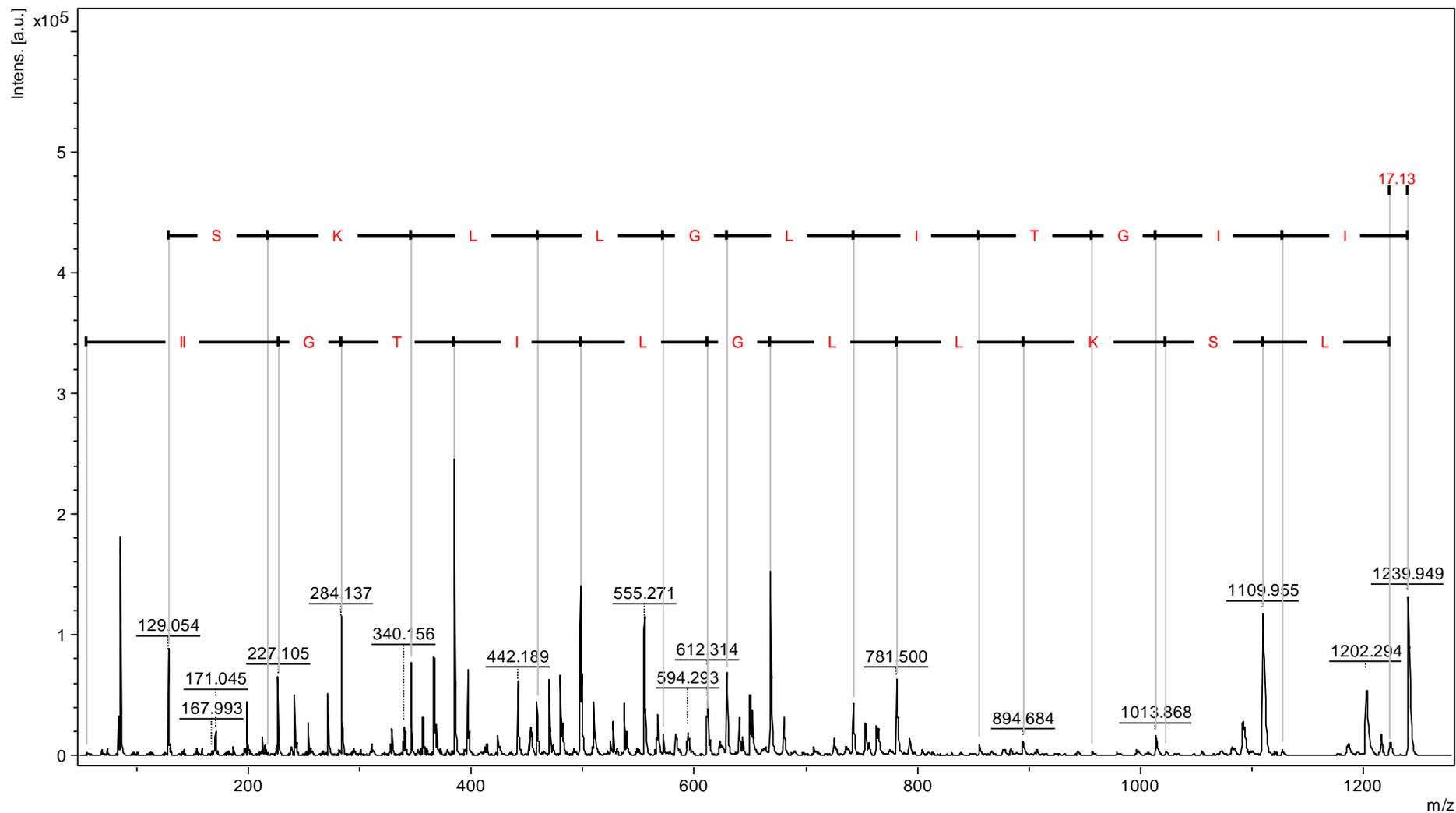


Figura 21: Sequenciamento *de novo* obtido do peptídeo communis 19. Realizado por MALDI TOF/TOF no modo LIFT. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de degradação automática de Edman como meio complementar à etapa de sequenciamento.

Tabela 7 - Massas moleculares, em daltons, e sequências primárias dos peptídeos isolados a partir da peçonha obtida de *Chartergellus communis*.

Peptídeos	[M+H] ⁺ (Da)	Sequências de aminoácidos
communis 07	1330,8	KKRPPGFTPFR - NH ₂
communis 11	1340,9	INWKAILGKIGK – OH
communis 15	1808,2	INWKALLGKLGKAAAAAI/L - NH ₂
communis 16	1837,3	INWKAILGKIGKAAA AVN - NH ₂
communis 18	1836,3	INWKAILGKIGKAAA AVI/L - NH ₂
communis 19	1239,9	IIGTILGLLKSL – NH ₂

De posse das sequências primárias de aminoácidos dos peptídeos de interesse, então foram feitas buscas por similaridades em bancos de dados adequados. Os resultados referentes a essa análise estão expostos nos alinhamentos apresentados na Figura 23, e a tabela 8 descreve em quais classes de moléculas encontram-se categorizados aqueles compostos que apresentaram similaridades com os peptídeos identificados a partir da peçonha de *C. communis*.

(a)

			AA	%Id
communis 07	-----KKRPPGFTPFR-	Chartergellus communis	11	
sp P0DM71 Protopolybiacinina-2	DKNKKPIWM--AGFPGFTPIR--	Protopolybia exigua	19	55
sp P57672 Vespulacinina-1	----TATRRRRGRPPGFSPFR--	Vespula maculifrons	17	73
sp Q7M3T3 Vespacinina-M	-----GRPPGFSPFRID	Vespa mandarinia	12	73
sp Q7M3T2 Vespacinina-X	-----ARPPGFSPFRIV	Vespa simillima xanthoptera	12	73
sp P0DM70 Protopolybiacinina-1	DKNKKPIRVGRRPPGFTPFR--	Protopolybia exigua	21	82
sp P42717 Vespacinina	-----QZKRPPGFSPFRK-	Parapolybia indica	13	82
sp P12797 Megascoliacinina	-----RPPGFTPFRKA	Megascolia flavifrons	11	82
sp P83659 Cifocinina	-----DTRPPGFTPFR--	Cyphononyx dorsalis	11	82
sp P85873 Vespa cinina PMM1	-----KRRPPGFTPFR--	Polistes major	11	91

***.*:*

(b)

			AA	%Id
communis 11	INWKAILGKIGK-	Chartergellus communis	12	
sp P69035 Mastoparano-2	INWKAIIEAAKQAL	Protopolybia exigua	14	50
sp P0C1Q5 Mastoparano	INWKALLDAAKKVL	Protonectarina sylveirae	14	58
sp P0C1Q6 Mastoparano-A	IKWKAILDAVKKVL	Vespa analis	14	58

*:***:: :

(c)

			AA	%Id
communis 15	INWKALLGKLGKAAAAAL	Chartergellus communis	18	
sp P42716 Mastoparano	INWKKMAATALKMI----	Parapolybia indica	14	28
sp P69436 Agelaia-Mastoparano	INWLKLGKAIIDAL----	Agelaia pallipes	14	28
sp P69036 Mastoparano-3	INWLKLGKAVIDAL----	Protopolybia exigua	14	33
sp P0C1Q5 Mastoparano	INWKALLDAAKKVL----	Protonectarina sylveirae	14	44

*** : .

(d)

			AA	%Id
communis 16	INWKAILGKIGKAAAAVN	Chartergellus communis	18	
sp P69035 Mastoparano-2	INWKAIIEAAKQAL----	Protopolybia exigua	14	39
sp P0C1Q5 Mastoparano	INWKALLDAAKKVL----	Protonectarina sylveirae	14	39
sp P0C1Q6 Mastoparano-A	IKWKAILDAVKKVL----	Vespa analis	14	39

*:***:: ..

(e)

			AA	%Id
communis 18	INWKAILGKIGKAAAAVI/L	Chartergellus communis	18	
sp P69035 Mastoparano-2	INWKAIIEAAKQAL----	Protopolybia exigua	14	39
sp P0C1Q5 Mastoparano	INWKALLDAAKKVL----	Protonectarina sylveirae	14	39
sp P0C1Q6 Mastoparano-A	IKWKAILDAVKKVL----	Vespa analis	14	39

*:***:: ..

(f)

			AA	%Id
communis 19	IIGTILGLLKSL	Chartergellus communis	12	
sp P69437 Agelaia-CP	ILGTILGLLKGL	Agelaia pallipes	12	83
sp P0C1R0 Polybia-CP	ILGTILGLLKSL	Polybia paulista	12	92

*:*****.*

Figura 22 - Alinhamento das sequências primárias dos peptídeos isolados a partir da peçonha da vespa social *Chartergellus communis* com aquelas anteriormente descritas na peçonha de outros Himenópteros. (AA) corresponde à quantidade de aminoácidos. (%Id) corresponde ao percentual de identidade do peptídeo correspondente isolado de *Chartergellus communis* em relação a outros peptídeos anteriormente descritos. (*) resíduo igual; (:) modificação conservativa; (.) modificação semi-conservativa; espaço em branco corresponde a ausência de identidade entre os resíduos.

Tabela 8 – Classes de moléculas com as quais os peptídeos isolados a partir da peçonha de *Chartergellus communis* apresentam similaridades.

Peptídeos	Classes com similaridades
communis 07	Cininas
communis 11	Mastoparanos
communis 15	Mastoparanos
communis 16	Mastoparanos
communis 18	Mastoparanos
communis 19	Quimiotáticos

De acordo com essa verificação, foi constatado que os seis peptídeos isolados da peçonha de *C. communis* apresentam similaridades com alguns peptídeos anteriormente isolados da peçonha de outras vespas. Porém, todos são compostos inéditos, uma vez que, de acordo com os bancos de dados consultados, nenhum apresenta semelhança total com aqueles isolados na presente pesquisa científica. Os peptídeos que apresentam algum grau de similaridade com aqueles que são objeto de estudo desta pesquisa estão categorizados em famílias de compostos cujos efeitos biológicos são amplamente relatados na literatura, conforme discutido a seguir.

A sequência de aminoácidos do peptídeo communis 07 apresenta entre 55 a 91% de identidade com alguns peptídeos classificados como cininas, estando a maior semelhança relacionada à molécula denominada Vespa cinina PMM1, isolada da peçonha da vespa social *Polistes major* (Figura 23a e Tabela 8). O termo “cinina” é utilizado para a designação da classe de polipeptídeos que apresentam ação farmacológica sobre o músculo liso e são capazes de produzir alterações na pressão arterial, podendo ter sua produção e/ou liberação em vasos sanguíneos ou tecidos (150). Como exemplo de moléculas representantes dessa classe têm-se a bradiginina e seus análogos.

A bradiginina foi primeiramente descrita em 1949 por Rocha e Silva e colaboradores, e sabe-se que ela desempenha importantes funções no organismo, envolvidas principalmente com os controles de processos inflamatórios, da pressão

arterial e das funções renais e cardíacas (151,152). Alguns estudos apontam novas funções para esse composto e seus análogos sobre o SNC, tais como promoção da neurogênese, neuroproteção e efeito ansiolítico (153,154). Em nível celular, os efeitos da bradicinina são mediados por dois tipos de receptores, designados como receptores de cinina do tipo B1 e do tipo B2. Os receptores do tipo B1 têm baixa expressão em estados saudáveis do organismo, porém são superexpressos durante processos inflamatórios, infecciosos ou quando há lesões, e ligam-se com mais afinidade aos metabólitos da bradicinina (155,156). Já os receptores do tipo B2 são constitutivamente expressos em várias regiões do organismo, como, por exemplo, no sistema nervoso (157), apresentando alta afinidade para ligação com a própria bradicinina. Estudos relatam que agonistas dos receptores B1 causam hiperexcitabilidade neuronal em modelos de Epilepsia (158,159). Por outro lado, a estimulação de receptores B2 por bradicinina é capaz de promover neuroproteção frente à excitotoxicidade causada pelo NMDA, um agonista de receptores glutamatérgicos (160). O efeito neuroprotetor da bradicinina também foi evidenciado quando culturas de neurônios da retina foram expostas ao agente neurotóxico glutamato, atividade que também está relacionada à ação sob receptores B2 (161). Esses dados sugerem que agonistas dos receptores B2 de cininas podem vir a ser considerados como ferramentas terapêuticas de utilidade ao tratamento de doenças neurológicas onde ocorrem eventos de excitotoxicidade, como no caso da Epilepsia.

Segundo registros da literatura, e conforme demonstrado brevemente na Figura 23, as cininas são amplamente encontradas em peçonhas de vespas (162,163). Levando-se em consideração a sequência primária de aminoácidos da bradicinina, a qual é RPPGFSPFR, e aquela pertencente ao peptídeo communis 07 (Tabela 7), pode-se sugerir que há uma possibilidade de que esse peptídeo presente na peçonha de *C. communis* seja um análogo da bradicinina, diferindo da mesma apenas no que se refere a dois resíduos adicionais de lisina em sua extremidade amino terminal.

Os peptídeos communis 11, communis 15, communis 16 e communis 18 têm sequências de aminoácidos semelhantes àquelas de compostos classificados como mastoparanos (Tabela 8), onde os maiores valores de similaridade estão relacionados com a molécula denominada Mastoparano, isolada a partir da peçonha da vespa *Protonectarina sylveirae* (Figuras 23b, 23c, 23d e 23e). Os mastoparanos

são um dos principais componentes detectados nas peçonhas de vespas, e foram primeiramente evidenciados na espécie *Vespula lewisii* (164). Eles constituem uma família de pequenos peptídeos que apresentam, em média, 14 resíduos de aminoácidos, sendo algumas de suas características fundamentais a presença de dois a quatro resíduos de lisina e uma amidação em sua região C-terminal (165). Levando-se em consideração apenas as características estruturais, poderíamos sugerir que existe uma possibilidade de que esses peptídeos isolados de *C. communis* sejam classificados como mastoparanos.

Outro importante fator que poderá determinar a correta classificação desses quatro peptídeos como pertencentes à família dos mastoparanos será a sua identidade no que diz respeito aos efeitos biológicos retratados por compostos dessa classe. Com relação a isso, relatos da literatura indicam que dentre alguns dos efeitos biológicos dos mastoparanos estão: a atividade antimicrobiana, ação hemolítica, capacidade de liberação de histamina a partir de mastócitos, citotoxicidade para células tumorais e capacidade de penetração em membranas biológicas (166–168). Este último efeito o classificam como peptídeos penetrantes em células, do inglês *cell-penetrating peptides*, e tem sido vista como uma característica bastante atrativa ao auxílio da dispensação de fármacos ao cérebro. Considerando-se que esse órgão apresenta uma barreira de permeabilidade bastante seletiva, a barreira hematoencefálica, a qual atua principalmente protegendo o ambiente intracerebral contra agentes estranhos e potencialmente nocivos, então a associação de compostos capazes de transpor esse obstáculo com aqueles terapeuticamente úteis ao tratamento de desordens neurológicas passou a ser considerada como um artifício, não invasivo, à entrega de fármacos ao SNC (169). Uma aplicação prática dessa utilidade foi a formulação de um composto quimérico constituído pela associação entre a galanina, um neuropeptídeo, e um mastoparano, dando origem à molécula denominada transportan (170). Em virtude da galanina apresentar efeitos benéficos para algumas patologias que acometem o SNC, então essa fusão é vista como um recurso bastante conveniente ao tratamento de desordens neurológicas (106). Com relação a algumas das atividades biológicas dos peptídeos identificados, o nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um trabalho demonstrando que o peptídeo communis 18 apresenta potente ação hemolítica e hiperalgésica, enquanto que o peptídeo communis 11 demonstrou ser

edematogênico e desprovido de efeito hemolítico (116). Esse foi o primeiro relato científico publicado que demonstra a constituição e alguns dos efeitos biológicos de peptídeos isolados a partir da peçonha de *C. communis*.

No que se refere ao peptídeo communis 19, foram observadas semelhanças significativas com compostos pertencentes à classe dos quimiotáticos, segundo a Figura 23f e Tabela 8. A maior identidade estrutural (92%) correlaciona-se com a molécula denominada Polybia-CP, isolada a partir da peçonha da vespa *Polybia paulista*. Deste modo, há uma grande possibilidade de que esse peptídeo encontrado na peçonha de *C. communis* seja também um composto dessa classe.

Tem sido amplamente descrito na literatura que peptídeos classificados como quimiotáticos apresentam como efeitos biológicos, em geral, a capacidade de quimiotaxia para macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, já as atividades relacionadas à capacidade de degranulação de mastócitos, efeito antimicrobiano e ação hemolítica não são comuns a todos os compostos (92,172). Até o momento pouco se sabe a respeito de efeitos neurobiológicos de peptídeos quimiotáticos. Em relação a isso, existe apenas um trabalho que relata o efeito antinociceptivo do peptídeo Protonectina oriundo da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*, o qual é idêntico ao peptídeo denominado Agelaia-CP presente nos alinhamentos demonstrados na Figura 23 (f) (98). Com relação a algum dos efeitos biológicos do peptídeo communis 19, nós observamos que ele apresenta efeito hemolítico em uma taxa de cerca de 20 a 90% quando testado em concentrações que variam de 8 a 500 μ M (dados não publicados).

Diante das semelhanças estruturais relatadas acima entre os peptídeos isolados no presente estudo com aqueles já descritos em pesquisas anteriores, e considerando-se os efeitos biológicos já descritos para as classes de compostos nas quais esses peptídeos estão categorizados, vale ressaltar que, ainda, não se pode afirmar que os peptídeos isolados de *C. communis* irão, de fato, apresentar as mesmas atividades. Apesar das possibilidades nesse sentido serem relevantes, apenas a realização de ensaios biológicos específicos poderá levar a uma melhor conclusão, já que mínimas alterações estruturais em um composto podem conduzir, muitas vezes, a diferenças consideráveis em sua atividade sobre sistemas biológicos.

Outro ponto importante a ser destacado é que, até a realização desse estudo, nenhum dos peptídeos estruturalmente semelhantes aqueles já isolados de *C. communis* foi testado na perspectiva do tratamento da Epilepsia, ou seja, não há relatos da sua ação sobre modelos de crises epilépticas quimicamente induzidas. E apesar dessa pesquisa ser direcionada à busca por novas ferramentas terapêuticas potencialmente úteis à farmacoterapia da Epilepsia, vale ressaltar também que os dados gerados poderão dar subsídio ao desenvolvimento biotecnológico de moléculas farmacologicamente úteis ao tratamento de outras patologias, através do fornecimento de novos compostos químicos convenientes ao desenho molecular de fármacos.

4.1.4 Peptídeos sintéticos para avaliação do potencial antiepiléptico e perfil neurofarmacológico

Após a obtenção das massas moleculares e sequencias de seis peptídeos, decidiu-se por realizar a síntese de quatro deles para que fossem utilizados nos ensaios *in vivo*. Foram escolhidos os peptídeos communis 07, communis 11, communis 18 e communis 19. Para escolha foram levados em consideração os critérios de massa molecular e diferenças constitucionais entre as sequencias. Ou seja, communis 07, 11 e 19 por serem totalmente diferentes entre si e apresentarem as menores massas moleculares. Já communis 18, o qual é bastante parecido com communis 15 e 16, foi escolhido devido ao fato de apresentar parte da sua sequencia igual aquela de communis 11. Nesse caso, para verificar se a diferença constitucional poderia conduzir à alguma variação de efeito biológico. Ademais, apesar de não ter sido possível solucionar a ambiguidade do último resíduo presente no N-terminal de communis 18, optou-se por sintetizá-lo com o aminoácido leucina em virtude de ser o resíduo mais presente naquelas sequencias peptídicas similares demonstradas na Figura 23 (e). Como citado anteriormente, a síntese foi feita por uma empresa terceirizada e os laudos das análises geradas nesse processo encontram-se disponíveis nos anexos N a Q.

4.2 PARTE II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPILEPTICO E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO

Muitas das novas terapias úteis às desordens epiléticas que surgiram ao longo dos últimos 80 anos tiveram como base científica o uso de modelos animais (39). Estudos com animais são em essência comparativos, e levando-se em consideração que a epilepsia apresenta-se como uma disfunção cerebral de origens e manifestações multifatoriais, uma abordagem comparativa pode ser útil na evidenciação e/ou diferenciação de aspectos relacionados com a epileptogênese difundidos em animais e considerados clinicamente importantes em humanos (56,173).

Os modelos *in vivo* podem ser executados como modelos apenas de convulsão ou como modelos de epilepsia. Nesse sentido, é importante salientar que, apesar de aparentemente semelhantes, essas duas terminações apresentam diferenças marcantes, onde dentre uma delas está o fato de que para modelos apenas de convulsão, embora considerados como excelentes artifícios para o *screening* de novos FAEs, não necessariamente há condução para um quadro crônico de epilepsia (43). Ou seja, o termo epilepsia é muito mais abrangente, estando o evento convulsivo inserido como uma de suas manifestações. Há também a subdivisão em modelos dos tipos agudo e crônico. Quando ditos agudos, são capazes de provocar quadros convulsivos em cérebros considerados normais, enquanto que modelos crônicos de epilepsia resultam em alterações funcionais e patológicas mais duradouras nas redes neuronais (174).

No estudo ora em discussão, as moléculas sintéticas idênticas àquelas encontradas na peçonha de *C. communis* foram testadas em modelos de epilepsia induzidos de modo agudo, e utilizando-se compostos químicos. A escolha de tal metodologia de pesquisa deve-se, em grande parte, aos seguintes fatos: tratar-se de uma análise inicial das moléculas em estudo, já que nunca foram testadas antes quanto a esse aspecto; envolver a utilização de modelos confiáveis para a predição da ocorrência e/ou ausência de efeitos sobre as características analisadas; relativa facilidade de execução dos ensaios comportamentais propostos, uma vez que são

desenhos experimentais bem estabelecidos na literatura para a finalidade a que se destinam, assim como também se encontram padronizados em nosso laboratório de pesquisa; viabilidade para triagem de uma considerável quantidade de compostos dentro do espaço de tempo disponível para execução do projeto proposto, quando comparados com os modelos crônicos, os quais requerem maior tempo e experiência para execução.

4.2.1 Atividade antiepiléptica utilizando modelos agudos para indução de crises

A escolha dos dois indutores químicos utilizados perpassou por questões atinentes ao delineamento científico clássico/convencional de busca por novas moléculas com potencial antiepiléptico e também pelas diferenças associadas tanto a nível molecular quanto com os padrões de crises geradas por esses compostos. Deste modo, optou-se por executar os ensaios utilizando-se um modelo rotineiramente utilizado na triagem pré-clínica (PTZ), e também outro modelo associado com Epilepsias refratárias (PILO), conforme discutido a seguir.

Um dos primeiros compostos utilizados em modelos animais como adjuvantes na descoberta de novos fármacos antiepilépticos foi o PTZ, que em meado do século XX foi útil na demonstração dos efeitos terapêuticos da Trimetadiona, introduzida no uso clínico por volta de 1946 e indicada para tratamento de crises de ausência (175). Posteriormente, também foi de grande utilidade para a identificação de outros importantes fármacos, como é o caso daqueles pertencentes à classe das succinimidas, tais como Fensuximida e Etossuximida (176). As crises induzidas por PTZ podem ser bloqueadas principalmente por compostos que atuam em receptores do tipo GABA_A, como é o caso dos Benzodiazepínicos e do Fenobarbital (177). Em geral, composto com ação sobre o modelo de PTZ costumam ser clinicamente úteis contra crises de ausência (178). O modelo de crises induzidas pelo PTZ, juntamente com o modelo de eletrochoque máximo, estão entre os tipos de ensaios mais utilizados, sendo inclusive considerados protocolos padrão para a avaliação pré-clínica do efeito antiepiléptico de moléculas sob investigação (136,179).

Fatores tais como a intensidade do estímulo, a dose e a via de administração podem influenciar no tipo e severidade da crise causada por PTZ. Sendo assim, considerando-se o postulado pela literatura de que uma dose de 85 mg/kg, quando administrada de modo subcutâneo em camundongos, é capaz de induzir crises do tipo generalizadas com manifestações tônico e/ou clônicas em 97% dos animais (180), então decidiu-se por utilizar a dose padronizada em nosso laboratório de 95 mg/kg, a qual se mostrou efetiva em causar esse tipo de crise pretendida em 100% dos animais (Tabela 8).

Na análise do efeito dos quatro peptídeos sintéticos sobre o modelo de crises induzidas por PTZ, foi verificado que apenas o peptídeo communis 19 apresentou efeitos significativos em alguns dos parâmetros avaliados, quando comparado com os dados gerados pelo grupo LCRa. Ou seja, communis 19 foi capaz de aumentar a latência para início da crise máxima [$t=2,27$; $p=0,040$] (Figura 23) e reduzir a duração desse tipo de crise [$t=2,31$; $p=0,038$] (Figura 24). Os parâmetros de latência de morte, percentual de proteção contra a crise máxima, taxa de sobrevivência e mediana das classes de crises não sofreram alterações estatisticamente relevantes por nenhum dos tratamentos (Figura 25 e Tabela 9).

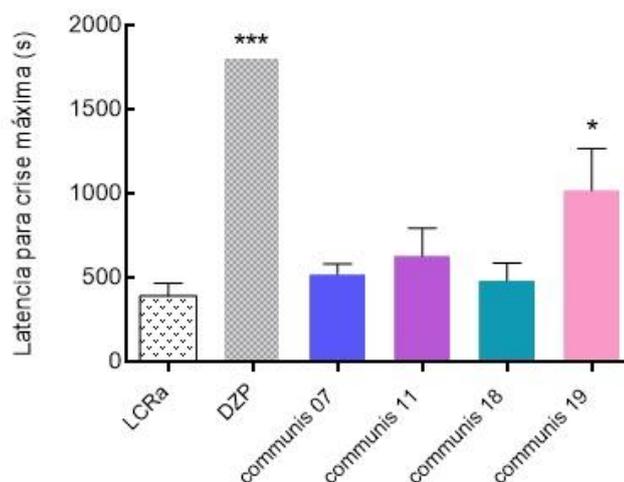


Figura 23: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para crise máxima (classe 6) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student. * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

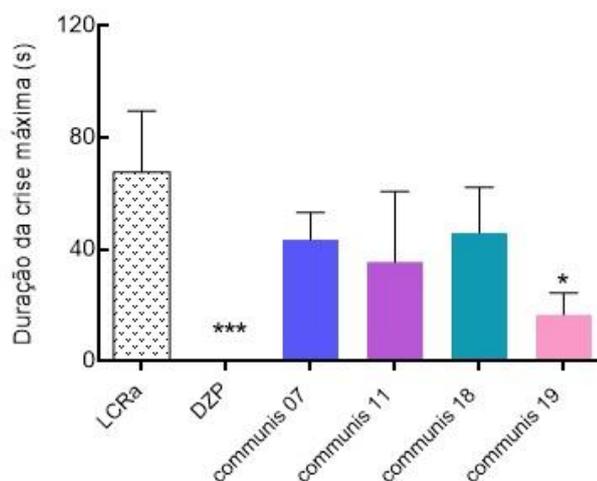


Figura 24: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a duração da crise máxima (classe 6) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 07 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 11 e 18). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

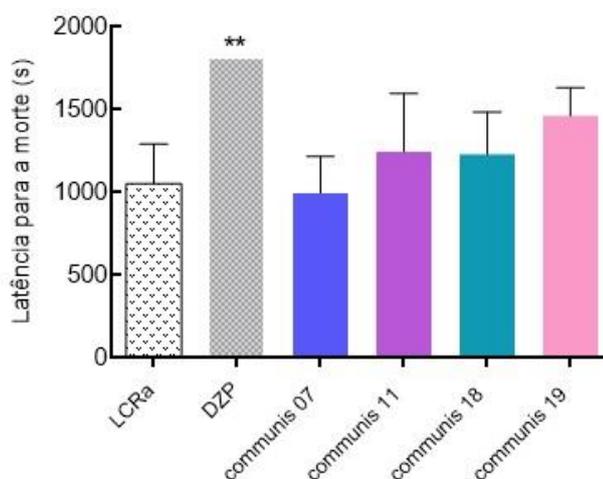


Figura 25: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 07, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 11). ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 9. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tabela 9: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 6), taxa de sobrevivência e média das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pentilenotetrazol. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tratamentos	n	Proteção contra crise máxima (%)	Taxa de sobrevivência (%)	Mediana das classes de crises
DZP	8	100***	100**	1***
LCRa	7	0	28 (2)	6
communis 07	5	0	20 (1)	6
communis 11	5	0	60 (3)	6
communis 18	5	0	40 (2)	6
communis 19	8	37,5 (3)	62,5 (5)	6

Apesar de não demonstrar efeito significativo, o resultado concernente ao percentual de proteção contra a crise máxima quando houve o pré-tratamento com communis 19 (aumento em 37,5%, em relação ao grupo LCRa) pode ser considerado interessante. Principalmente se ponderarmos que a dose de PTZ utilizada é capaz de causar crise máxima em 100% dos sujeitos experimentais. Este dado, juntamente com aquele de latência e duração para a crise máxima, pode indicar possível ação promissora de communis 19 sobre as crises induzidas por PTZ. Sendo assim, analisando-se essas informações isoladamente, poderíamos sugerir que communis 19 provavelmente atuaria por uma via que envolve a participação de receptores GABA_A, os quais estão associados a canais de cloreto.

O modelo de crises epiléticas quimicamente induzidas através da utilização de Pilocarpina é um dos mais empregados para a mimetização de Epilepsia do Lobo Temporal (ELT). Esse tipo de epilepsia, além de ser um dos mais graves e comuns, é considerado de difícil tratamento farmacológico, uma vez que está associada a altos índices de farmacoresistência em adultos (51,181). Tal modelo proporciona o

desenvolvimento do chamado status epilepticus (SE) e de convulsões recorrentes e espontâneas. No SE há perda da consciência plena, em um período convulsivo que tem duração de pelo menos 30 minutos e geralmente progride através de dois estágios (182). Nesse caso, crises generalizadas do tipo tônico-clônicas marcam o primeiro estágio, enquanto que descargas elétricas cerebrais anormais, somadas a sinais comportamentais mais brandos, caracterizam o segundo estágio (183). Após a indução das crises, aqueles animais que sobrevivem ao SE provocado por altas doses de PILO tendem a entrar em um período latente, que pode durar entre 4 dias a 6 semanas, no qual há normalização dos registros eletroencefalográficos e comportamentais. Após esse intervalo, o animal poderá desenvolver um estado epilético crônico, caracterizado pelo aparecimento de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (184). O padrão de crises geradas a partir da aplicação desse modelo é o melhor caracterizado e mais adequado para o estudo de farmacorresistência (185), visto que muitas vezes as crises somente são responsivas aos FAEs em doses elevadas e parcialmente tóxicas, ainda restando muitos animais farmacorresistentes a doses toleráveis dos fármacos disponíveis (181,186,187).

Quando tratamos sobre o mecanismo de ação envolvido, a partir da observação de que camundongos *knockout* de receptores muscarínicos do tipo M1 não desenvolveram convulsões induzidas por PILO, então foi proposto que a ativação desse tipo de receptores está envolvida na geração do quadro de SE (188). Em relação a este quadro, apesar de ter seu início devido à ação sobre o sistema colinérgico, postula-se que a atividade epilética espontânea, a perda neuronal e as alterações histopatológicas sejam resultantes da liberação de glutamato induzida pelo ambiente anormal instaurado (189,190).

Turski e colaboradores (1984) (191), em sua pesquisa pioneira sobre o uso da PILO em modelo animal para a Epilepsia, relataram que a utilização de uma faixa de dose compreendida entre 200 a 350 mg/kg em camundongos é capaz de gerar um quadro convulsivo progressivo, que varia em relação à gravidade e letalidade de um modo dose dependente. Uma vez que a administração sistêmica (ip) de altas doses desse indutor químico está normalmente associada com elevados índices de mortalidade e/ou pequena porcentagem de animais que desenvolvem o SE ou sobrevivem a essa condição (137,192), então foi necessária a utilização de uma

dose de PILO que fosse capaz de gerar crises máximas em todos os animais utilizados, mas garantisse uma taxa de sobrevivência satisfatória às análises comportamentais previstas nesse estudo. Desse modo, após padronização prévia à execução desta pesquisa, foi definida a dose de PILO de 250 mg/kg de animal para todos os ensaios realizados no laboratório, a qual é capaz de gerar crises máximas em 100% dos animais, garantindo uma taxa de sobrevivência que gira em torno de 60%, conforme demonstrado na Tabela 10.

Quando os quatro peptídeos sintéticos foram submetidos ao ensaio agudo de crises epiléticas induzidas por PILO, foi verificado que apenas os peptídeos communis 11 e communis 19 apresentaram efeitos significativamente relevantes no que diz respeito à ação sobre a latência e duração das crises máximas. Como pode ser observado nas Figuras 26 e 27, communis 11 causou uma elevação na latência para início da crise máxima [$t=3,44$; $p=0,005$] e redução na duração da crise máxima [$t=7,76$; $p<0,0001$]. Communis 19 também foi capaz de aumentar a latência para a crise máxima [$t=4,53$; $p=0,0005$] (Figura 26) e diminuir o tempo em que o animal permaneceu nesse tipo de crise [$t= 5,81$; $p<0,0001$] (Figura 27). Já a latência para a morte não sofreu alteração com nenhum dos tratamentos (Figura 28).

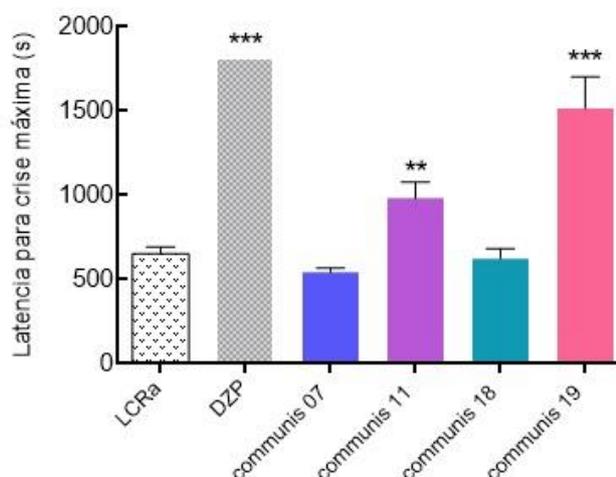


Figura 26: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 µg/animal, sobre a latência para crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 11, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07). ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

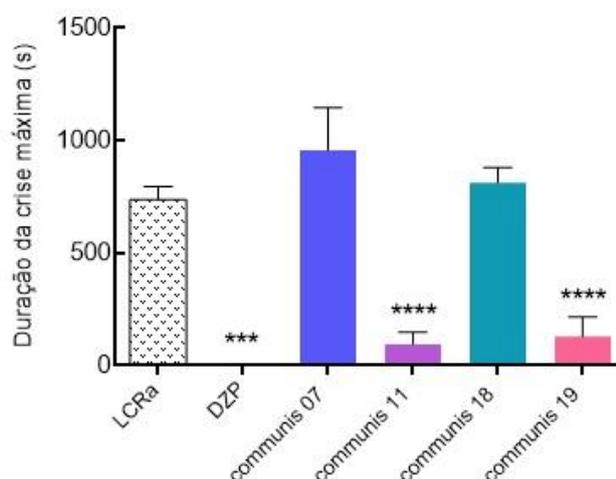


Figura 27: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a duração da crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 11, 18 e 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07). *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

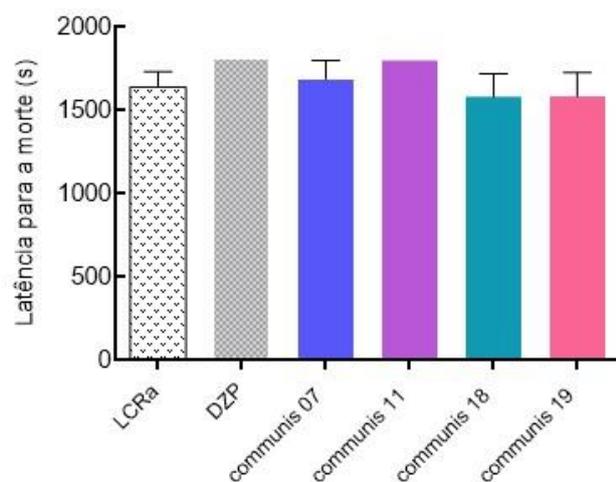


Figura 28: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para dados paramétricos (communis 19) e o teste Mann Whitney para os dados não paramétricos (communis 07, 11 e 18). O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 10. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Ao analisarmos os dados referentes ao percentual de proteção contra a crise máxima, constantes na Tabela 9, podemos verificar que apenas o peptídeo communis 19 foi capaz de evitar a ocorrência desse tipo de crise provocada pela PILO, em um índice correspondente a 75% dos sujeitos experimentais avaliados em relação ao grupo controle LCRa [$p=0,007$]. Já a taxa de sobrevivência foi o único parâmetro em que os quatro peptídeos apresentaram ação, porém sem significância estatística. A análise da mediana das classes de crises também revelou que apenas communis 19 exerceu proteção, uma vez que reduziu o valor desse parâmetro em relação ao grupo controle negativo [$U=8,0$; $p=0,007$] (Tabela 10). Neste caso, inclusive, apresentando valor de mediana menor do que aquele do grupo DZP.

Tabela 10: Efeito dos quatro peptídeos sintéticos, nas doses de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 5), taxa de sobrevivência e média das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. $**p<0,01$ e $***p<0,001$ em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tratamentos	n	Proteção contra crise máxima (%)	Taxa de sobrevivência (%)	Mediana das classes de crises
DZP	8	100 ^{***}	100	4 ^{***}
LCRa	8	0	62,5 (5)	5
communis 07	6	0	83,3 (5)	5
communis 11	6	0	100	5
communis 18	6	0	66,7 (4)	5
communis 19	8	75 (6) ^{**}	75 (6)	3 ^{**}

Diante do exposto, apesar de communis 11 ter apresentado alguns efeitos protetores importantes, mais uma vez communis 19 foi o que apresentou melhores resultados, sobretudo por ter sido capaz de proteger 75% dos animais contra a crise

máxima. Se explorarmos particularmente apenas os resultados relacionados com esse modelo em questão, poderíamos sugerir que nesse caso *communis* 19 estaria atuando farmacologicamente a partir de um mecanismo onde há envolvimento dos receptores M1 colinérgicos e/ou da via glutamatérgica.

Observando-se o panorama de resultados demonstrados com relação aos efeitos de *communis* 19 em ambos os modelos testados, poderíamos pensar, a princípio, em duas formas de atuação distintas: (1) através dos mecanismos de ação específicos de cada modelo avaliado, ou seja, atuação em sítios/receptores múltiplos, como já citado na demonstração de cada resultado individualmente; (2) por meio de um mecanismo farmacodinâmico em comum para os dois casos.

A atuação de FAEs por múltiplos mecanismos não é um achado incomum. O Topiramato, por exemplo, é capaz de exercer seus diversificados efeitos terapêuticos a partir da ação em 6 diferentes sítios: bloqueio de canais de sódio e cálcio, ativação de canais de potássio, antagonismo de receptores de glutamato, proteção via GABA, inibição da enzima anidrase carbônica (193). Quando tratamos de peçonhas oriundas de vespas, alguns estudos prévios também descreveram que moléculas presentes nelas são capazes de exercer efeito antiepiléptico sobre variados modelos de indução química de crises. Em 2005, Cunha e colaboradores constataram que a peçonha desnaturada de *Polybia ignobilis* bloqueia crises induzidas tanto por ácido kaínico quanto por picrotoxina, um agonista glutamatérgico e um antagonista não competitivo de GABA_A, respectivamente (130). Nesse mesmo sentido, tem-se o efeito antiepiléptico da peçonha desnaturada de *Polybia occidentalis* sobre os modelos utilizando os mesmos indutores citados no estudo anterior (103). Apesar de em ambos os casos estar se tratando de peçonhas desnaturadas, ou seja, não se referem a compostos isolados, existe a possibilidade do efeito observado ser provocado pela mesma classe de moléculas.

Já como sugestão para uma via de atuação com um mecanismo em comum tem-se a interferência sobre canais de cálcio voltagem-dependentes. Íons Ca²⁺ são providos de importantes funções no processo de controle da excitabilidade neuronal, e uma dessas interferências, por exemplo, é a atuação do Ca²⁺ como elemento importante no processo de liberação de neurotransmissores a partir do terminal pré-sináptico. Anormalidades na regulação intracelular desses íons e/ou de seus canais estão relacionadas com hiperexcitabilidade neuronal e atividade epiléptica, existindo

várias indicações de que o cálcio desempenha efeitos sobre a epileptogênese (194,195). De acordo com o que foi comentado outrora, apesar do principal mecanismo associado ao PTZ ser o antagonismo não competitivo sobre receptores GABA_A, moléculas atuando como bloqueadoras de canais de cálcio podem suprimir a geração do quadro epiléptico. Este é o caso do mecanismo de atuação do fármaco antiepilético Etossuximida, o qual se demonstrou efetivo contra crises causadas por PTZ, tendo como principal mecanismo de ação o bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes que estão localizados em neurônios talâmicos (196,197). Quando falamos do mecanismo envolvido com a PILO, alguns estudos também relatam que se pode pensar em uma atuação envolvendo esses canais. Como exemplo tem-se a comprovação de que o Nimodipino, um fármaco bloqueador de canais de cálcio indicado principalmente para o tratamento de deficiências neurológicas isquêmicas, apresenta atividade antiepilética contra crises induzidas por PILO (198,199). Apesar de toda a fundamentação científica apresentada acima quanto aos possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados, as atuações através de algumas das vias propostas são apenas hipóteses que necessitam ser averiguadas posteriormente.

Uma vez que, tem-se como metas de uma terapia com FAEs a interrupção dos quadros de crises, a atenuação na morbidade e/ou mortalidade relacionadas e o progresso na qualidade de vida do indivíduo portador da condição neuropatológica envolvida, então se pode perceber que, dentre os quatro peptídeos testados, communis 19 foi o composto que apresentou melhor desempenho. Pode-se pontuar os seguintes motivos primordiais para tal afirmação: a supressão do quadro de crises máximas em 75% no modelo de PILO; o aumento da latência para crise máxima e redução da duração desse tipo de crise, em ambos os modelos testados. Além disso, os resultados mais pronunciados ocorreram no ensaio onde as crises foram induzidas quimicamente pelo uso da PILO.

Em um cenário totalmente favorável à busca de uma nova molécula potencialmente antiepilética, poderíamos esperar a completa interrupção do quadro de crises, ou seja, que nenhum animal exibisse manifestações comportamentais de alguma das classes elencadas nas tabelas 2 e 3, ou pelo menos desenvolvessem comportamentos associados às classes menores/iniciais. Porém, como pode ser observado pelo efeito do grupo DZP no modelo de PILO, até mesmo esse FAE

clássico evitou apenas a ocorrência da crise máxima, não suprimindo o aparecimento de manifestações das classes 1 a 4. A esse respeito, há relatos de que as convulsões induzidas por Pilocarpina, em roedores, são fracamente controladas por FAEs (200), o que reforça ainda mais a consideração de que se trata de um modelo de farmacoresistência. Então, com o intuito de tentar suprimir a ocorrência de crise máxima em 100% dos animais, assim como também para expandir os conhecimentos acerca da ocorrência de relação entre dose e resposta desse peptídeo sobre o modelo de PILO, avaliamos o efeito de communis 19 em três outras doses (0,3, 1,5 e 6,0 µg/animal).

Quando tratamos da latência para ocorrência da crise máxima (Figura 29), as doses de 1,5 µg/animal [$F_{(2,20)}= 28,42$; $p<0,01$] e de 3,0 µg/animal [$F_{(2,21)}=29,51$; $p<0,01$] apresentaram diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle negativo, aumentando o tempo para o início desse quadro convulsivo. Já a dose de 6,0 µg/animal, mesmo não significativa, exibiu um comportamento contrário quanto a esse parâmetro em relação às duas doses precedentes, uma vez que reduziu a latência para a crise máxima. Com relação a variável de duração da crise máxima, tanto a dose de 1,5 µg/animal [$K=18,50$; $p<0,05$] quanto a dose de 3,0 µg/animal foram capazes de reduzir o tempo em que animal permaneceu nessa condição, enquanto que com a dose de 6,0 µg/animal o animal voltou a apresentar um tempo de duração de crise semelhante aquele demonstrado pelo efeito da menor dose testada, 0,3 µg/animal (Figura 30). Na comparação entre as doses foi verificado que apenas houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 0,3 e 1,5 µg/animal [$p<0,01$], e entre as doses de 3,0 e 6,0 µg/animal [$p<0,01$], ambas relacionadas à duração para a crise máxima (Figura 30). Nesse caso, as doses com efeito de diminuição da duração de crise máxima foram as de 1,5 e 3,0 µg/animal (Figura 30). A latência para a morte apenas sofreu alteração quando houve o tratamento com a dose de 6,0 µg/animal [$F_{(2,21)} = 9,09$; $p<0,05$], fazendo com que os animais morressem mais rápido em comparação com aqueles do grupo controle negativo (Figura 31).

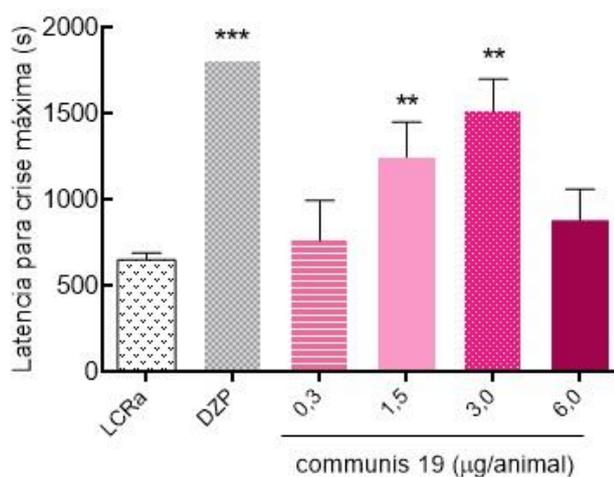


Figura 29: Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a latência para crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

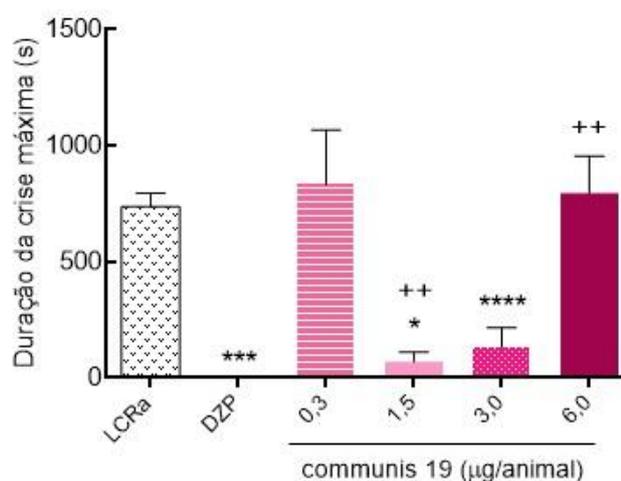


Figura 30: Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a duração da crise máxima (classe 5) no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos (doses de 0,3, 3,0 e 6,0), ou o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's, para dados não paramétricos (dose de 1,5). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparados com o grupo LCRa. ++ $p < 0,01$ comparado com a dose imediatamente anterior. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11.

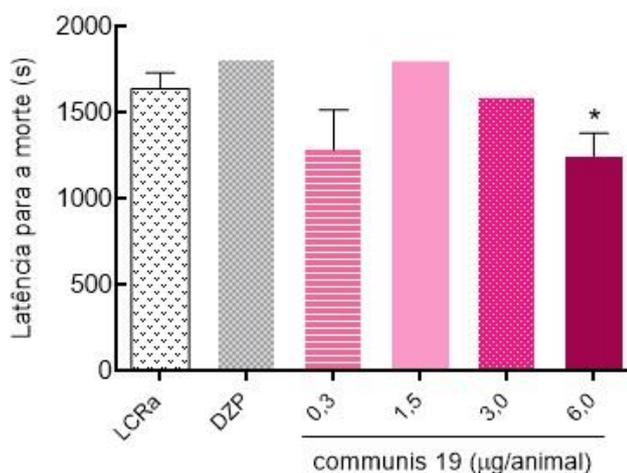


Figura 31: Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre a latência para a morte no ensaio de indução aguda de crises epilépticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos (doses de 0,3 e 6,0), ou o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's, para dados não paramétricos (doses de 1,5 e 3,0). * $p < 0,05$ comparado com o grupo LCRa. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

A observação dos dados referentes ao percentual de proteção contra a crise máxima, taxa de sobrevivência e mediana das classes de crises (Tabela 11) evidencia um desempenho semelhante aquele observado com a latência para crise máxima. Ou seja, o aumento da dose faz com que se observem melhoras sucessivas nesses parâmetros, com exceção da mediana das classes de crises e taxa de sobrevivência para a dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, porém a dose de 6,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$ exerce um efeito contrário àquele verificado pelas doses precedentes. Em termos de significância estatística, apenas a dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$ foi a que apresentou relevância, aumentando o percentual de proteção [$p=0,007$] e reduzindo a mediana das classes de crises [$U=8,0$; $p=0,007$] (Tabela 11).

Tabela 11: Efeito do peptídeo communis 19, em quatro doses diferentes, sobre o percentual de proteção contra a crise máxima (classe 5), taxa de sobrevivência e mediana das classes de crises, no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, para o percentual de proteção e taxa de sobrevivência, e o teste de Mann Whitney para a mediana das classes de crises. **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao grupo LCRa. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tratamentos	n	Proteção contra crise máxima (%)	Taxa de sobrevivência (%)	Mediana das classes de crises
DZP	8	100***	100	4***
LCRa	8	0	62,5 (5)	5
communis 19 0,3µg/animal	6	16,7 (1)	50 (3)	5
communis 19 1,5µg/animal	7	42,9 (3)	100	5
communis 19 3,0µg/animal	8	75 (6)**	75 (6)	3**
communis 19 6,0µg/animal	8	12,5 (1)	25 (2)	5

Conforme evidenciado nas Figuras 29 e 30, e também na Tabela 11, percebe-se que há relação entre a dose utilizada e a resposta gerada. Mesmo assim, ainda não foi possível chegar-se a uma dose que apresentasse efeito máximo para todos os parâmetros, a exceção da dose de 1,5 µg/animal, a qual foi a única capaz de alcançar o ápice de resposta em relação à taxa de sobrevivência. Todavia, pode-se constatar que, em relação ao desempenho, os efeitos de communis 19 sobre a maioria dos aspectos analisados em relação as crise epiléticas induzidas por PILO podem ser expressos por uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido.

De uma forma resumida, em uma curva dose-resposta em “U” invertido podem ser observados três diferentes estágios: no primeiro, onde se utilizam doses menores, está presente um efeito fraco; no segundo atinge-se o efeito máximo possível a partir do uso de uma dose intermediária; já no último estágio verifica-se a perda gradual da efetividade com o aumento progressivo da dose, até o desaparecimento por completo da atividade terapêutica. A descrição desse tipo de curva é justamente o que se evidencia, por exemplo, no gráfico gerado a partir da ação sobre a latência para a crise máxima (Figura 29).

Curvas dose-resposta com esse modelo são de difícil elucidação experimental possivelmente por constituir-se como um fenômeno multifatorial (204). Particularmente em neurofarmacologia esse tipo de comportamento farmacológico não é incomum, já sendo inclusive relatada a sua ocorrência com FAEs. Sabe-se, por exemplo, que o Diazepam, em ensaios *in vivo* com ratos, exerce efeito neuroprotetor quando administrado a uma dose de 10 mg/kg, porém quando utilizado em alta dose (20 mg/kg) este fármaco falhou na prevenção de danos hipocampais causados por isquemia transitória (205,206). Imagina-se que esse efeito relacionado ao Diazepam seja devido a ocorrência de dessensibilização dos receptores, causada provavelmente por uma ativação excessiva dos mesmos, o que levaria ao aparecimento dos efeitos neurotóxicos (207). Além do mais, a curva dose-resposta em “U” invertido também já foi percebida com compostos que atuam sobre receptores colinérgicos (208), tal como provavelmente está acontecendo com o peptídeo Communis 19 quando atua sobre o modelo envolvendo a PILO.

A partir da verificação do efeito de communis 19 sobre as diferentes doses avaliadas, foi possível determinar o valor de DE_{50} em relação à proteção contra a crise máxima, o qual corresponde a 1,49 $\mu\text{g}/\text{animal}$ [IC=0,594 a 3,741] (Figura 32). Para obtenção desse índice, e conseqüente geração da curva representada na Figura 32, foi necessário excluir o dado referente à dose de 6,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, uma vez que ele corresponde a uma atividade contrária à aquisição do dado pretendido.

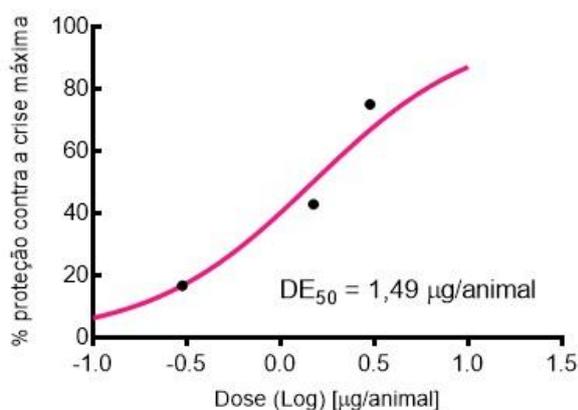


Figura 32: Curva do efeito de três doses do peptídeo communis 19 (em log) sobre o percentual de proteção contra a crise máxima induzida pela pilocarpina. Para o cálculo da DE_{50} foi feita uma regressão não-linear sigmoide.

Ponderando-se todos os resultados gerados até agora em relação à ação dos peptídeos sobre modelos agudos de indução química de crises epiléticas, apesar de termos verificado ação mais promissora do peptídeo communis 19, o real potencial deste e dos outros três peptídeos ainda não está esgotado. É preciso ter-se em mente que um modelo animal no âmbito da Epilepsia é apenas uma pequena representação de um sistema bastante complexo. Existem ainda outros modelos animais onde esses compostos podem ser avaliados, com a aplicação de diversificados mecanismos de ação e tipos de crises. Assim como também o espectro de ação de communis 19 sobre os modelos testados, principalmente quanto ao de PILO cujos resultados são melhores, pode ainda não estar totalmente estabelecido. Nesse sentido, trabalhando-se com o modelo de PILO sob delineamentos experimentais mais rebuscados, pode ser possível avaliar esse composto em outras perspectivas como, por exemplo: (a) efeitos observados no período latente das crises podem caracterizar moléculas capazes de prevenir epileptogênese e/ou contra déficits comportamentais de longo prazo induzidos pelas crises; (b) ação na fase crônica pode indicar compostos eficazes ao tratamento de crises generalizadas recorrentes e espontâneas (209).

Com relação ao fato de communis 19 não ter alcançado 100% de efetividade quanto a supressão do quadro convulsivo máximo, ainda existe a possibilidade de que se alcance esse ápice de efetividade quando submetido aos testes em modelos crônicos, assim como também modificações estruturais podem tornar esse peptídeo mais eficiente.

4.2.2 Atividade elétrica cerebral por Vídeo-eletroencefalografia

Um dos procedimentos diagnósticos fundamentais para o diagnóstico Epilepsia é a eletroencefalografia (EEG), principalmente porque essa técnica é capaz de responder algumas perguntas essenciais relacionadas a essa patologia, tais como (210,211): O paciente tem Epilepsia?; Onde se encontra a zona de origem da Epilepsia (zona epileptogênica)?; Qual a efetividade da terapia?

Nas experimentações *in vivo* envolvendo atividade antiepiléptica, os registros de EEG podem muitas vezes apresentar-se como meios mais precisos na evidenciação de crises do que a observação comportamental (212). Principalmente porque a partir da observação da atividade elétrica cerebral é possível detectar mais precisamente anormalidades difíceis de serem percebidas apenas pela verificação comportamental direta, como, por exemplo, eventos epilépticos que não são convulsivos. Sendo assim, considerando a possibilidade desse obstáculo para evidenciação de alguns tipos de alterações, pode-se dividir a análise das crises nos tipos comportamentais e eletroencefalográficas.

Em geral, as crises induzidas por PILO são acompanhadas por anormalidades eletroencefalográficas que se correlacionam bem com a sequencia de alterações comportamentais, além de serem dependentes da dose e do tempo (50). É comum observar que a partir do momento em que as manifestações comportamentais se tornam mais severas há o desenvolvimento de crises eletroencefalográficas caracterizadas pela presença de picos de alta voltagem e rápida atividade ou frequência, provavelmente devido à ativação do sistema colinérgico muscarínico (213,214).

A fim de tentar dar mais robustez aos conhecimentos produzidos em relação à atividade de *communis* 19 sobre o modelo de crises induzidas por PILO, então foi verificado se o nível de proteção comportamental poderia também estar presente em relação às crises eletroencefalográficas. Para tanto, esse ensaio foi conduzido utilizando-se a dose de 3,0 µg/animal, aquela com melhores resultados até o momento. Para a apreciação dos parâmetros de análise do EEG (latência, duração, quantidade de crises e percentual de proteção) foi considerada a ocorrência de descargas elétricas epileptiformes sincronicamente manifestadas nos dois canais de registro (EEG 1 e EEG 2), caracterizadas pela atividade elétrica sustentada de alta frequência e alta amplitude. Abaixo estão expostas as representações de alguns dos padrões de atividades elétricas cerebrais obtidas nessa pesquisa, correspondentes ao que foi considerado para atividade basal/normal (Figura 33) e para atividade elétrica epileptiforme representativa de crise generalizada (Figura 34). Outra consideração relevante é quanto ao n experimental utilizado. Por tratar-se de um experimento que envolve um alto custo financeiro para aquisição de material

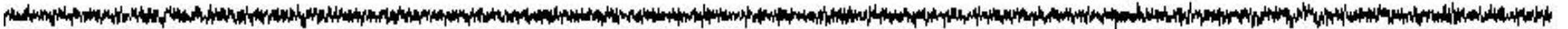
importado, e até mesmo pela dificuldade dessa importação, ainda não foi possível aumentar a quantidade de animais utilizados nessa avaliação.

A apreciação dos resultados alusivos ao pré-tratamento dos animais com o peptídeo communis 19 revelou que essa molécula não foi capaz de causar melhora significativamente relevante em nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 35, 36 e 37 e Tabela 12). Porém, apesar dessa ausência de relevância estatística, provavelmente devido ao reduzido n experimental, verificamos que há melhoras em alguns parâmetros. Nesse sentido, podemos citar: aparente prolongamento do tempo que o animal leva para revelar o primeiro episódio de crise generalizada [$K=1,723$; $p=0,4505$] (Figura 35), redução da quantidade de crises [$K=4,548$; $p=0,1152$] (Figura 37) e proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas em 50% [$p=0,4286$] (Tabela 12). Outro dado relevante a ser observado é que até o DZP não foi capaz de inibir a ocorrência de crises eletroencefalográficas generalizadas em todos os animais, neste caso apresentando um percentual de proteção de 66,7% (Tabela 12).

EEG 1



EEG 2



100 μ V
1 min

Figura 33: Registro eletroencefalográfico representativo da atividade elétrica basal de camundongos, onde se observa ausência de atividade elétrica com alta frequência e amplitude.

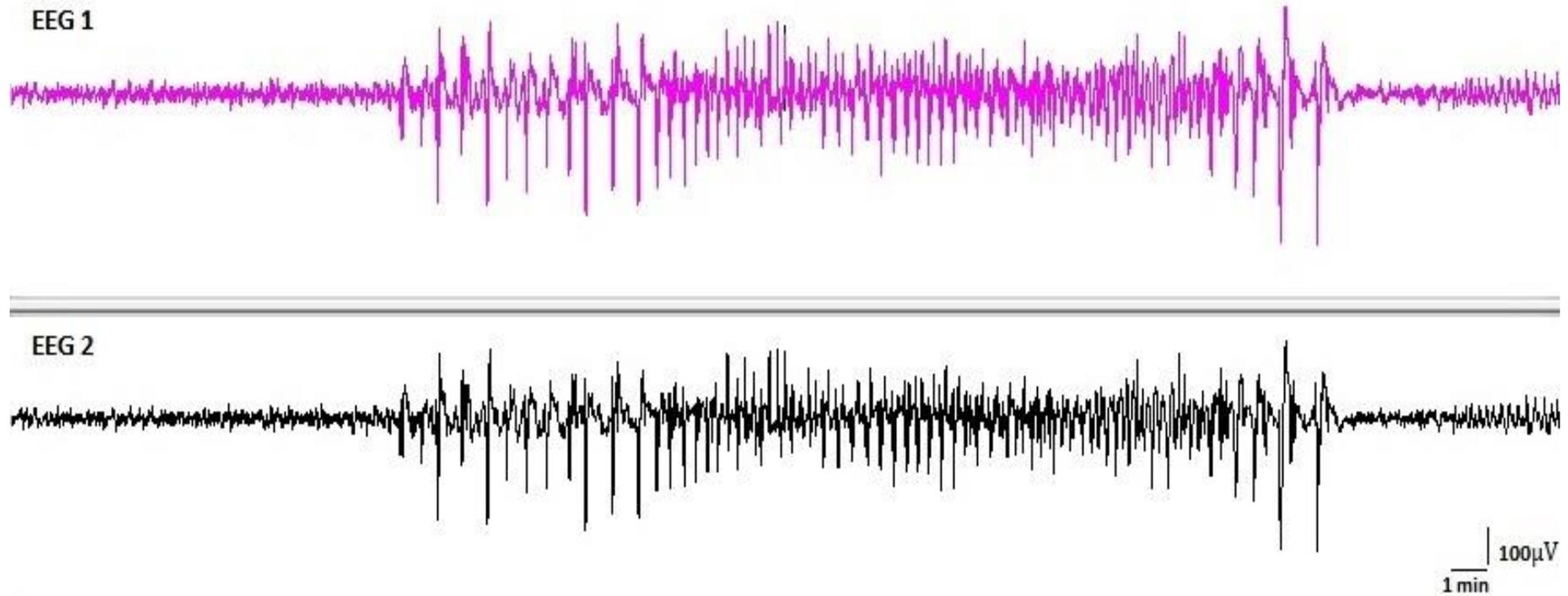


Figura 34: Registro eletroencefalográfico representativo de uma crise epiléptica generalizada em camundongos, utilizando o indutor químico Pilocarpina, onde se observa atividade elétrica de alta frequência e amplitude, além da sincronia nos disparos elétricos dos dois canais de registros.

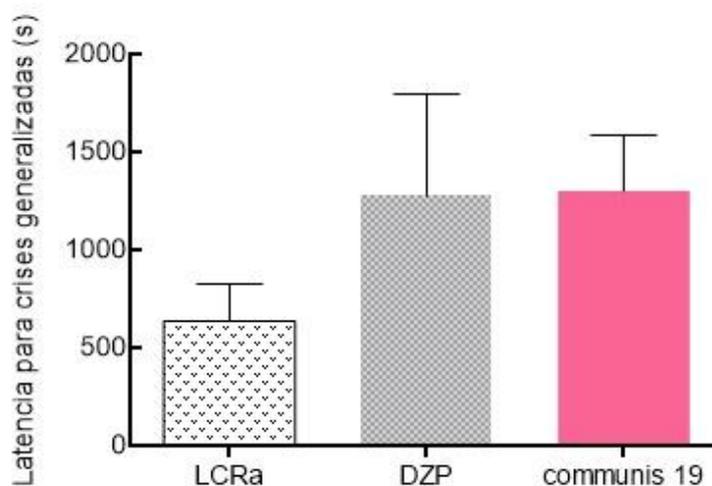


Figura 35: Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a latência para crise eletroencefalográfica generalizada no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

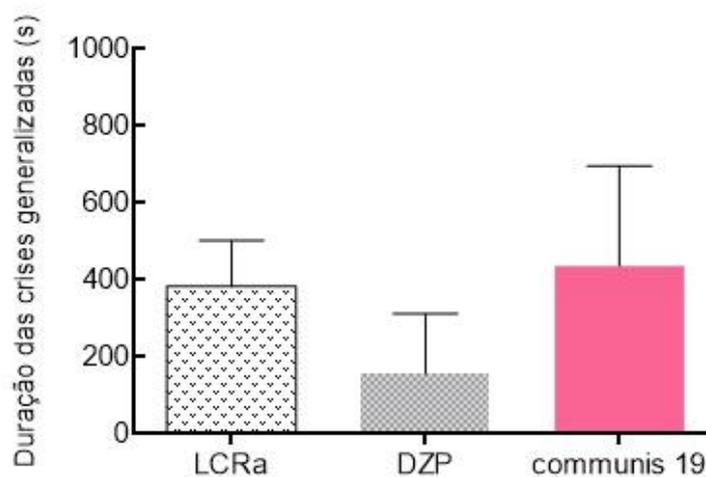


Figura 36: Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a duração das crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

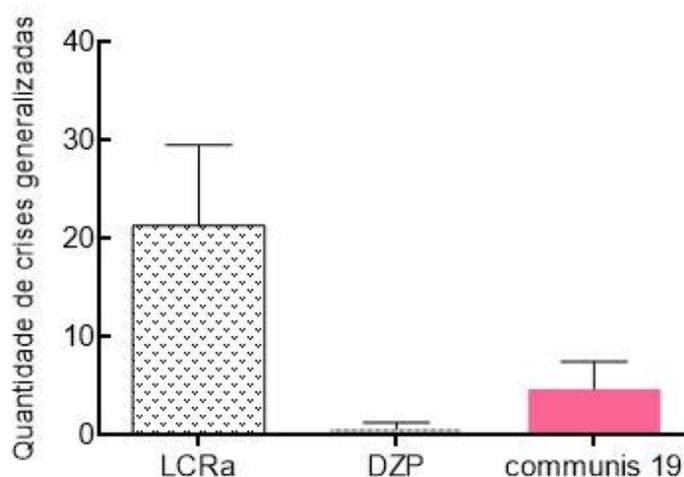


Figura 37: Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre a quantidade de crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. O n de cada grupo experimental pode ser verificado na Tabela 11. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tabela 12: Efeito do peptídeo communis 19, na dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$, sobre o percentual de proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas no ensaio de indução aguda de crises epiléticas utilizando o composto pilocarpina. Os dados contidos dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tratamentos	n	Proteção contra crise generalizada eletoenc. (%)
LCRa	3	0
DZP	3	66,7 (2)
communis 19	4	50 (2)

Comparando-se os resultados obtidos nas avaliações comportamentais e eletroencefalográficas, pode-se perceber que há certo grau de correspondência entre eles no que diz respeito à latência e ao percentual de proteção para o

aparecimento do quadro epiléptico máximo/generalizado, quando os animais passaram por pré-tratamento com a dose de 3,0 µg/animal. Ou seja, esses dois parâmetros sofreram melhoras importantes. No ensaio comportamental, para aqueles animais que apresentaram crises máximas, tem-se o tempo médio de 1516 segundos (EPM = ±186,2) para ocorrência do primeiro evento, enquanto que a análise de EEG revelou que o quadro de crises generalizadas teve início, em média, com 1305 segundos (EPM = ± 286,1). Já o percentual de proteção na observação comportamental foi de 75% (Tabela 10), enquanto que o mesmo parâmetro verificado após ensaio eletroencefalográfico correspondeu a 50% (Tabela 12).

Desse modo, os resultados demonstrados na análise eletroencefalográfica reforçam aqueles já verificados pela observação comportamental, fornecendo, assim, maior credibilidade quanto ao potencial de *communis* 19 contra crises epiléticas quimicamente induzidas por Pilocarpina.

4.2.3 Perfil neurofarmacológico

No início da busca por novos FAEs havia uma menor atenção no que se refere à segurança e tolerabilidade, uma vez que o manejo das crises era visto como meta primordial das terapias em desenvolvimento. Porém, hoje existe um controle regulatório muito mais atuante em relação a esses importantes quesitos, o que foi em grande parte impulsionado devido à tragédia da Talidomida no início dos anos 60 (39). Um dos maiores vilões do processo de adesão à farmacoterapia antiepiléptica é a extensa quantidade de efeitos adversos que esses medicamentos são capazes de causar.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, efeito adverso a um medicamento pode ser definido como “resposta nociva e não intencional gerada após o uso de medicamentos em doses que normalmente são usadas para profilaxia, diagnóstico, terapia de doenças, ou para a modificação de uma função biológica” (215). Muitos dos novos FAEs que surgiram, além de terem menor eficácia em comparação com alguns dos medicamentos clássicos disponíveis, também não apresentam consideráveis avanços em relação aos efeitos adversos. Tais ocorrências

desagradáveis, além de acarretarem na descontinuação do tratamento em aproximadamente 25% dos pacientes, apresentam-se como fonte considerável de incapacidade, morbidade e mortalidade (216–218).

Os efeitos indesejáveis causados por esses fármacos podem manifestar-se em categorias associadas com o SNC, alterações médicas gerais ou com o aparecimento de complicações adversas de modo tardio (219). Dentre as manifestações relacionadas com o SNC estão os déficits cognitivos (reduções nos níveis de atenção, capacidade executiva, memória, velocidade de processamento, inteligência e habilidade com a linguagem), comprometimentos psiquiátricos (ansiedade, depressão, irritabilidade) e alterações motoras ou discinesias (ataxia, sedação). As alterações médicas gerais, embora em alguns casos raras, podem levar ao aparecimento de sérios problemas, tais como: anemia aplásica, comprometimentos visuais, insuficiência hepática e reações de hipersensibilidade. Já as complicações tardias são insidiosas porque se manifestam através do aumento gradual ao longo do tempo, como o ganho de peso por exemplo.

Levando em consideração que a determinação do regime terapêutico antiepiléptico perpassa por questões relacionadas tanto com a verificação de eficácia clínica quanto com a avaliação da tolerabilidade associada, por conseguinte decidiu-se avaliar o grau de toxicidade relacionado com a dose mais efetiva de *communis* 19 (3,0 µg/animal), e também com uma dose 10 vezes superior (30 µg/animal), esta com o propósito de se conhecer melhor aspectos relacionados ao seu índice terapêutico. Para tanto, foram utilizados testes para investigação das alterações comportamentais e motoras, conforme melhor descrito a seguir.

Um dos testes utilizados foi o ensaio de Campo Aberto, do inglês *Open Field*, o qual foi originalmente descrito por Hall em 1934 como uma prova útil ao estudo da emotividade em roedores, através de um procedimento no qual o animal é submetido a um ambiente desconhecido onde a fuga é impedida pelas paredes circundantes (220). Esse é um experimento muito utilizado para avaliar os efeitos de moléculas sobre a atividade geral espontânea, como, por exemplo, comportamentos relacionados com a exploração e ansiedade (221). Camundongos habitualmente demonstram o comportamento de medo em locais abertos e com estímulos desconhecidos, em virtude de serem animais normalmente caracterizados como presas nas interações biológicas, além do mais são animais que naturalmente

apresentam muita agilidade motora e altas taxas de locomoção (222). O comportamento de elevação, por exemplo, pode ser considerado como uma atitude exploratória gerada pela novidade em relação ao ambiente desconhecido (223).

O teste de Rotarod é amplamente utilizado para o *screening* da toxicidade de moléculas com potencial terapêutico sobre Epilepsia, permitindo o rastreamento de dificuldades neurológicas agudas em termos de coordenação motora e equilíbrio (48). Nessa experimentação, a inabilidade do animal em manter-se equilibrado em uma barra giratória, durante determinado período observacional, é utilizada como uma indicação confiável de deficiência motora (224). Além do mais, as alterações passíveis de detecção são bem correlacionadas com a ataxia relatada em humanos, e, desse modo, fornecem uma predição satisfatória daquilo que pode ser esperado na prática terapêutica (225,226).

Seguindo a mesma linha de raciocínio quanto aos grupos controles utilizados na avaliação da atividade antiepiléptica, foram observados os comportamentos relacionados aos parâmetros de avaliação propostos tanto em animais submetidos aos tratamentos com o veículo de solubilização do peptídeo communis 19 (LCRa – grupo controle negativo), a fim de considerar como nível basal de estresse, ansiedade ou locomoção, quanto a animais submetidos a intervenção terapêutica com um fármaco antiepiléptico, o Diazepam, classicamente conhecido por causar sedação e ataxia, dentre outros efeitos adversos.

Como esperado, no ensaio do Campo Aberto foi verificado que o DZP provoca comportamentos associados com a sedação, tais como redução da exploração e elevação, e aumento do tempo em imobilidade (Figuras 38, 39 e 40), em comparação com o grupo controle negativo. Quando comparamos os efeitos dos peptídeos nas duas doses testadas, pudemos observar que as alterações estatisticamente significantes apenas ocorreram em relação ao grupo DZP. Neste caso, as duas doses causaram aumento tanto do tempo em exploração [$F_{(2,18)} = 11,80$ e $p=0,0005$ para a dose de $3,0 \mu\text{g}/\text{animal}$; $F_{(2,18)} = 18,88$ e $p<0,0001$ para a dose de $30 \mu\text{g}/\text{animal}$] (Figura 38) quanto do tempo em elevação [$F_{(2,18)} = 7,15$ e $p=0,005$ para a dose de $3,0 \mu\text{g}/\text{animal}$; $F_{(2,18)} = 7,05$ e $p=0,006$ para a dose de $30 \mu\text{g}/\text{animal}$] (Figura 40), e diminuição do comportamento de imobilidade [$F_{(2,18)} = 12,23$ e $p=0,0004$ para a dose de $3,0 \mu\text{g}/\text{animal}$; $F_{(2,18)} = 18,09$ e $p<0,0001$] (Figura 39). O parâmetro de linhas cruzadas sofreu alteração apenas quanto ao grupo tratado com

a dose de 3,0 $\mu\text{g}/\text{animal}$ [$F_{(2,17)}= 3,74$ e $p=0,045$], neste caso aumentado a quantidade em relação ao grupo DZP (Figura 43). O parâmetro de autolimpeza foi o único que não sofreu alteração com nenhum dos tratamentos analisados (Figura 41).

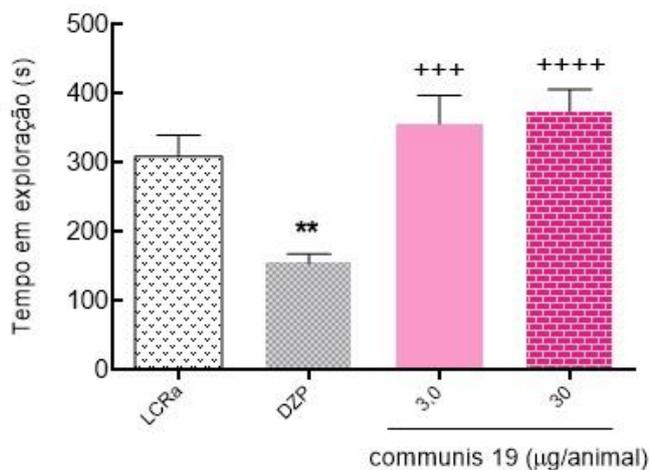


Figura 38: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de exploração no ensaio de Campo Aberto (*Open Field*). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p<0,01$ comparado com o grupo LCRa. +++ $p<0,001$ e ++++ $p<0,0001$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

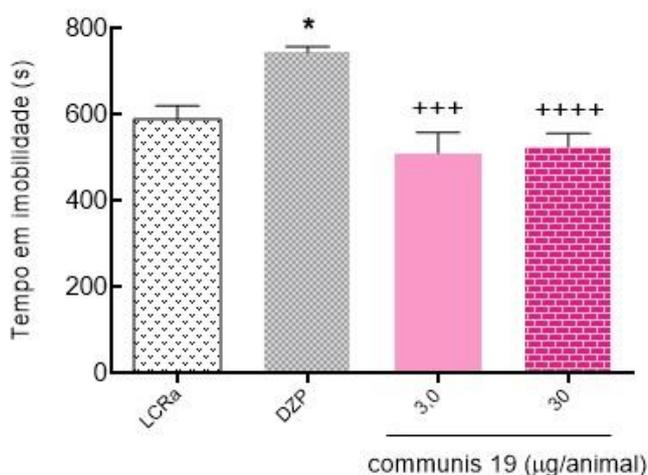


Figura 39: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de imobilidade no ensaio de Campo Aberto (*Open Field*). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p<0,05$ comparado com o grupo LCRa. +++ $p<0,001$ e ++++ $p<0,0001$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

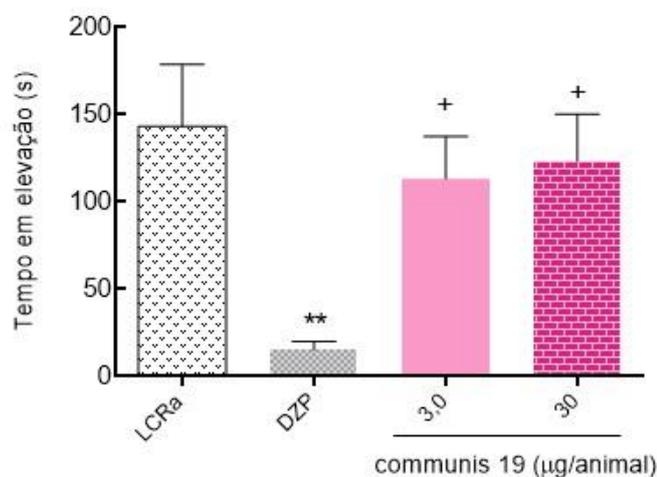


Figura 40: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de elevação no ensaio de Campo Aberto (*Open Field*). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo LCRa. + $p < 0,05$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

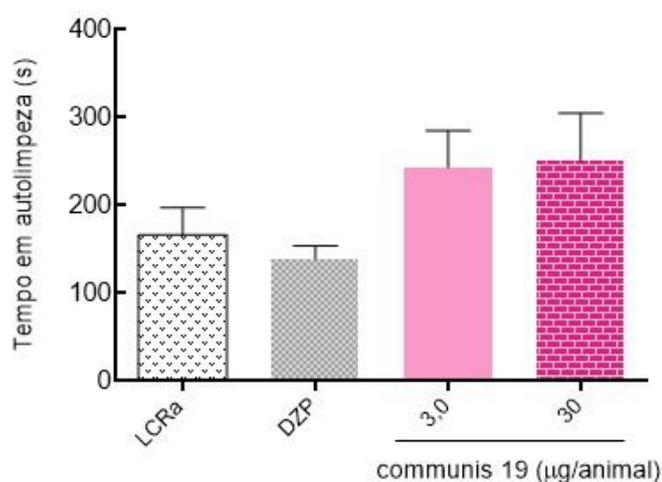


Figura 41: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre o comportamento de autolimpeza no ensaio de Campo Aberto (*Open Field*). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

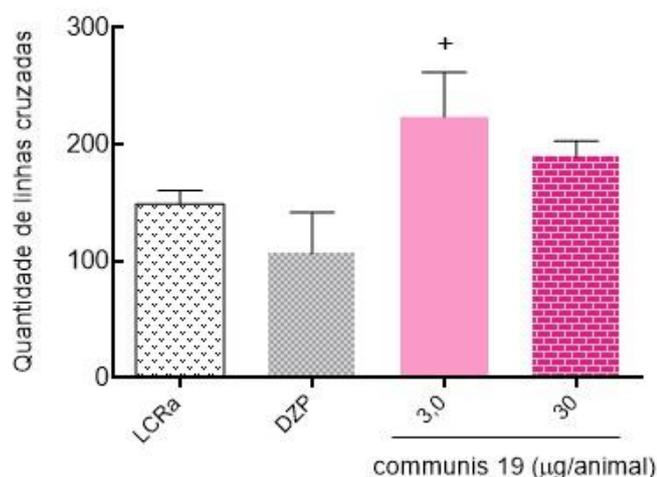


Figura 42: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre a quantidade de linhas cruzadas no ensaio de Campo Aberto (*Open Field*). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Pela apreciação dos resultados obtidos no ensaio de Campo Aberto, foi verificado que o peptídeo communis 19, mesmo em uma dose 10 vezes maior do que aquela com boa efetividade sobre o ensaio antiepiléptico com PILO, não apresentou alterações nos parâmetros de atividade geral espontânea investigados. Sabendo-se que a sedação/sonolência é um efeito marcante de alguns fármacos antiepilépticos, tais como o DZP, então pode-se considerar que o peptídeo communis 19 apresenta vantagem relevante em relação a esse quesito.

Na avaliação da coordenação motora através ensaio de Rotarod, em relação à quantidade de animais que falharam em permanecer na barra cilíndrica (Tabela 13), pode-se constatar que 87,5% [$p < 0,05$] dos animais apresentaram ataxia quando tratados com o DZP, corroborando com o fato de que este efeito adverso clássico está realmente associado ao uso de tal FAE. Em contrapartida, communis 19, nas duas doses testadas, não causou alteração significativa nessa variável em relação ao grupo LCRa, apresentando melhor desempenho em relação ao grupo DZP [$p < 0,05$], já que reduziu para 25% e 28,5% o quantitativo de animais que falharam após tratamento com as doses de 3,0 e 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectivamente.

Tabela 13: Efeito do peptídeo communis 19, nas doses de 3,0 e 30 µg/animal, sobre a quantidade de animais que falharam em permanecer na barra cilíndrica do ensaio de Rotarod. * $p < 0,05$ em relação ao grupo LCRa e ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo DZP. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Tratamentos	n	Quantidade que falhou
LCRa	8	1 (12,5%)
DZP	8	7 (87,5%)*
communis 19 3,0 µg/animal	8	2 (25%)+
communis 19 30 µg/animal	7	2(28,5%)+

Quando tratamos sobre a latência para a queda dos animais, foi verificado que há diferença significativa com relação à interação [$F_{(15,135)} = 6,21$; $p < 0,0001$] e ao tempo [$F_{(5, 135)} = 5,15$; $p = 0,0002$], mas não com relação aos tratamentos [$F_{(3, 27)} = 2,23$; $p = 0,107$] (Figura 43). Foi constatado que para ambos os tratamentos com as duas doses do peptídeo communis 19 não houve alterações significativas na latência para a queda, quando compara àquela apresentada pelos animais do grupo controle negativo LCRa. Além do mais, verificamos que o DZP foi capaz de causar significativa redução na latência para a queda em duas janelas temporais tomadas para avaliação: aos 15 [$p < 0,0001$] e aos 40 minutos [$p < 0,05$]. Outra observação relevante corresponde ao fato de que, no tempo de 15 minutos, o tratamento com communis 19 em ambas as doses apresentou maior latência para a queda do que o tratamento com DZP [$p < 0,0001$].

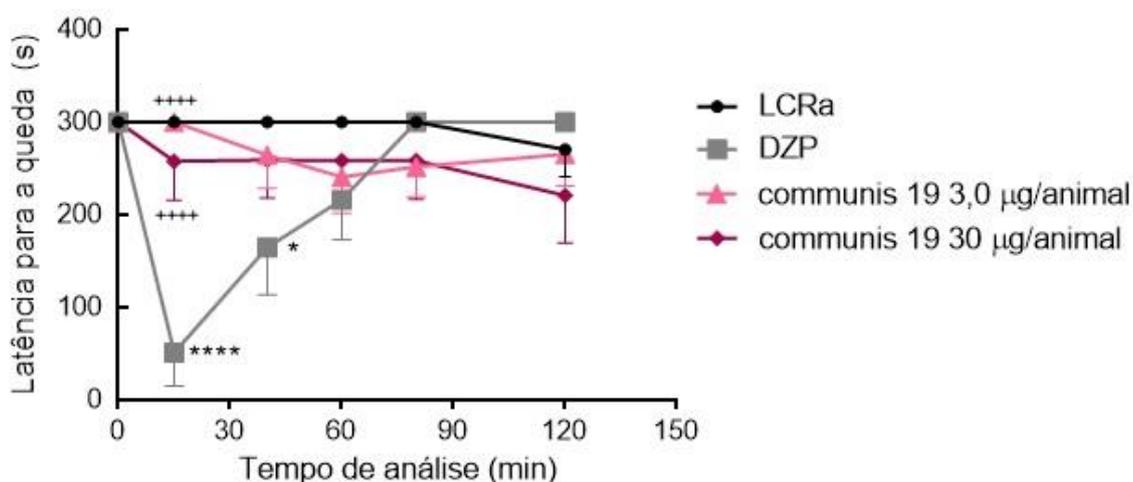


Figura 43: Efeito do peptídeo communis 19, em duas doses diferentes, sobre latência para a queda no ensaio de Rotarod. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*Two-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LCRa, e ++++ $p < 0,0001$ comparado com o grupo DZP. Cada grupo experimental foi composto por 7-8 animais. LCRa: líquido cefalorraquidiano artificial. DZP: Diazepam (4mg/kg de animal).

Conforme pode ser observado pelos resultados anteriormente descritos, o peptídeo communis 19, mesmo em uma dose 10 vezes maior do que aquela dose terapêutica encontrada nesse estudo, não foi capaz de provocar os efeitos adversos que estão normalmente associados ao uso de FAEs, tais como sedação e ataxia. Alguns desses efeitos indesejáveis, inclusive, já foram relatados anteriormente para outros compostos anticonvulsivantes originalmente extraídos da peçonha de vespas sociais. Mortari e colaboradores (103) demonstraram que compostos com baixas massas moleculares presentes na peçonha desnaturada de *Polybia occidentalis*, apesar de exercerem efeitos benéficos sobre uma variedade de modelos de Epilepsia, prejudicam alguns comportamentos associados à atividade geral espontânea de ratos, sem interferir na coordenação motora. A peçonha desnaturada de *Polybia ignobilis*, quando testada em ratos (0,2 mg/animal; i.c.v.), foi capaz de comprometer aspectos relacionados com a atividade geral espontânea (exploração e imobilidade), apesar de ser efetiva contra convulsões induzidas de modo agudo pelo uso de bicuculina, picrotoxina e ácido kaínico (130). Por outro lado, na literatura também podem ser encontrados relatos da ausência desse tipo de efeito adverso

após ensaios com moléculas potencialmente antiepilépticas. Como exemplo tem-se o estudo de Couto e colaboradores (131), onde foi verificado que compostos com baixas massas moleculares presentes na peçonha de *Polybia paulista* não causam efeitos indesejados na atividade geral espontânea de ratos, semelhante ao que foi demonstrado pela ação de *communis* 19.

Uma vez que, segundo o ensaio de Rotarod, *communis* 19 não apresentou efeitos tóxicos significativos em nenhuma das doses testadas, conseqüentemente não atingindo 50% de toxicidade, então não foi possível calcular-se o valor exato de DT_{50} . Porém, podemos inferir que ela é maior do que 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$.

Quando tratamos sobre o índice terapêutico de fármacos utilizados no tratamento de transtornos epilépticos tem-se normalmente um valor pequeno/estrito, não sendo rara a ocorrência de toxicidade, sobretudo com aqueles pertencentes às primeiras gerações que foram desenvolvidas (227,228). Quanto ao índice terapêutico do peptídeo *communis* 19, através do cálculo utilizando-se a razão entre DT_{50} (maior do que 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$) e DE_{50} (1,49 $\mu\text{g}/\text{animal}$), chegou-se a um valor que deve ser superior a 20,13. Ou seja, para o estudo em curso, a dose necessária para exercer efeitos tóxicos é no mínimo 20 vezes maior do que aquela que exerceu os melhores resultados terapêuticos. Deste modo, percebemos que *communis* 19 apresentou uma janela terapêutica segura nos ensaios realizados com os camundongos.

Analisando-se o conjunto de dados gerados até o momento sobre os efeitos do peptídeo *communis* 19 em modelos de Epilepsia, podemos destacar que temos em mãos uma molécula potencialmente promissora à terapêutica de crises epilépticas refratárias/farmacorresistentes, uma vez que demonstramos a sua efetividade na atenuação de crises máximas induzidas por PILO de modo agudo, e com pequena propensão a causar efeitos indesejáveis associados à descoordenação motora e sedação. Particularmente para medicamentos direcionados ao tratamento de transtornos relacionados com o SNC, apesar de serem grandes os investimentos, a taxa global de sucesso com o desenvolvimento clínico permanece baixa, chegando a ser inferior a 10% (229,230). Uma das explicações para esse fato pode ser a falha na pesquisa não-clínica. Apesar do estudo ora em discussão tratar-se de uma constatação inicial e ainda pequena frente

a gama de análises que ainda devem ser executadas, ele já fornece consideráveis subsídios para futuros delineamentos experimentais e buscas melhor orientadas.

Conclusões



5 CONCLUSÕES

- ✓ Foram identificados seis peptídeos inéditos a partir da peçonha de *Chartergellus communis*.
- ✓ As sequências primárias de aminoácidos desses seis peptídeos apresentam semelhanças com peptídeos isolados anteriormente da peçonha de algumas espécies de vespas.
- ✓ O peptídeo communis 07 apresenta similaridades com moléculas pertencentes à classe das cininas.
- ✓ As sequências primárias dos aminoácidos que compõem os peptídeos communis 11, communis 15, communis 16 e communis 18 são similares àquelas encontradas em peptídeos classificados como mastoparanos.
- ✓ O peptídeo communis 19 apresenta identidade com peptídeos classificados como quimiotáticos.
- ✓ No modelo onde as crises foram induzidas por PTZ, o peptídeo communis 19 foi o único a causar melhoras em alguns dos parâmetros avaliados (aumento da latência e redução da duração de crises máximas).
- ✓ Quando os peptídeos sintéticos foram testados no modelo em que as crises foram induzidas por pilocarpina, apenas tiveram ação os peptídeos communis 11 e communis 19. Ambos aumentaram a latência e diminuíram a duração de crises máximas. Já o percentual de proteção e a mediana das crises sofreram alterações benéficas por ação de communis 19.
- ✓ Na avaliação de quatro diferentes doses de communis 19 (0,3, 1,5, 3,0 e 6,0 µg/animal) sobre o modelo utilizando a pilocarpina, foi verificado que as doses de 1,5 e 3,0 apresentaram efeitos benéficos na latência e duração das crises máximas. Quanto aos outros parâmetros, apenas a dose de 3,0 µg/animal

continuou sendo estatisticamente significativa (percentual de proteção contra a crise máxima e mediana das classes de crises). Já a dose de 6,0 µg/animal demonstrou ser deletéria em relação a alguns parâmetros.

- ✓ A DE₅₀ estimada para o peptídeo communis 19 corresponde a 1,49 µg/animal.
- ✓ No ensaio por Vídeo-eletroencefalografia, apesar da ausência de significância estatística, o peptídeo communis 19 (3,0 µg/animal) apresentou efeitos benéficos quanto à latência e quantidade de crises eletroencefalográficas generalizadas induzidas por pilocarpina.
- ✓ O peptídeo communis 19 (3,0 e 30 µg/animal) não causou alterações na atividade geral espontânea de camundongos submetidos ao ensaio de Campo Aberto.
- ✓ No experimento de Rotarod, foi verificado que o peptídeo communis 19 (3,0 e 30 µg/animal) não causa prejuízos quanto à coordenação motora dos animais.
- ✓ A DT₅₀ para o peptídeo communis 19 corresponde a um valor superior a 30 µg/animal.
- ✓ O peptídeo communis 19 apresenta um valor de índice terapêutico maior do que 20,13.
- ✓ Em conclusão, a peçonha de *Chartergellus communis* apresenta em sua composição um peptídeo potencialmente útil à terapêutica das crises epiléticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav*; 2010;17(1):103–8.
2. Ali R, Connolly ID, Feroze AH, Awad AJ, Choudhri OA, Grant GA. Epilepsy: A Disruptive Force in History. *World Neurosurg*; 2016;90:685–90.
3. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4):470–2.
4. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
5. Schachter SC. Currently available antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics*. 2007;4(1):4–11.
6. Scharfman HE. The Neurobiology of Epilepsy: A Brief Introduction. *Curr. neurol. neurosci. rep.* 2007;7(4):348-354.
7. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: New advances. *Lancet*. 2015;385(9971):884–98.
8. Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep*. 2013;65(4):787–801.
9. Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci*. 2015;18(3):367–72.
10. Vezzani A, Bartfai T, Bianchi M, Rossetti C, French J. Therapeutic potential of new antiinflammatory drugs. *Epilepsia*. 2011;52(SUPPL. 8):67–9.
11. Granata T, Cross H, Theodore W, Avanzini G. Immune-mediated epilepsies. *Epilepsia*. 2011;52(SUPPL. 3):5–11.
12. Reddy DS. Clinical pharmacology of antiepileptic drugs. *Clin Neuropharmacol*. 2014;7(1):2305–19.
13. Berg AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*. 2011;52(6):1058–62.
14. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for

- Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.
15. Elger CE, Schmidt D. Modern management of epilepsy: A practical approach. *Epilepsy Behav*. 2008;12(4):501–39.
 16. Fisher RS, Cross JH, Souza CD, French JA, Haut SR, Higurashi N, et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017;58(4):531–42.
 17. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Peltola J, Roulet E, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy : Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):522–30.
 18. Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(SUPPL. 7):2–26.
 19. Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia*. 2010;51(5):883–90.
 20. OMS. Epilepsya [Internet]. Fact sheets. 2018. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/> [Acesso em 10 de abril de 2018].
 21. Ministério da Saúde. Epilepsia no Brasil [Internet]. Sistema de Informação de Atenção Básica do Ministério da Saúde (SIAB). 2013. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?siab/cnv/SIABSB.R.DEF> [Acesso em 10 de abril de 2018].
 22. Quintas R, Raggi A, Giovannetti AM, Pagani M, Sabariego C, Cieza A, et al. Psychosocial difficulties in people with epilepsy: A systematic review of literature from 2005 until 2010. *Epilepsy Behav.*; 2012;25(1):60–7.
 23. Chong J, Drake K, Atkinson PB, Ouellette E, Labiner DM. Social and family characteristics of Hispanics with epilepsy. *Seizure-European Journal of Epilepsy*; 2012;21(1):12–6.
 24. Saxena S, Li S. Defeating epilepsy: A global public health commitment. *Epilepsia Open*. 2017;2(2):153–5.
 25. McNamara, Huang, Leonard. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Science Signaling*. 2006;2006(356):re12.
 26. Perucca E, Tomson T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol*; 2011;10(5):446–56.
 27. Das N, Dhanawat M, Shrivastava SK. An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discov Ther*. 2012;6(4):178–93.

28. Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting JS, Ernst JP. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *Journal of child neurology*. 2007;414–8.
29. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*; 2010;19(10):650–5.
30. Perucca E. An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 2005;46(SUPPL. 4):31–7.
31. Podell M. Antiepileptic drug therapy and monitoring. *Topics in companion med*; 2013;28(2):59–66.
32. Perucca E. The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;42(5):531–43.
33. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: Mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Reports*. 2009;61(2):197–216.
34. Rogawski MA, Löscher W, Rho JM. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;(1):a022780.
35. Löscher W, Schmidt D. Epilepsy: perampanel-new promise for refractory epilepsy? *Nat Rev Neurol*.; 2012;8(12):661–2.
36. French JA, Pedley TA. Initial management of epilepsy. *N Engl J Med*. 2008;359(2):166–76.
37. Potschka H. Pharmacological treatment strategies: Mechanisms of antiepileptic drugs. *Epileptology*; 2013;1(1):31–7.
38. Sisodiya S. Mechanisms of drug resistance in epilepsy. *The treatment of epilepsy*. 2005;5:307–11.
39. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res*.; 2017;42(7):1873–88.
40. Meldrum BS., Rogawski MA. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. *Neurotherapeutics*. 2007;4(1):18–61.
41. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*; 2011;20(5):359–68.
42. Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*; 2013;12(10):757–76.

43. KandrataVICIUS L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy : use and limitations. *Neuropsychiatr. dis. treat.* 2014;10:1693–705.
44. F H. Pentamethylentetrazol (Cardiazol). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1926;116(1):100–9.
45. Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2010;9(1):68–82.
46. Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Márquez S, Verónica Custodio ML, Paz C. In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2010;10(4):298–309.
47. Erkeç O, Arihan O. Pentylenetetrazol Kindling Epilepsy Model. *J Turkish Epilepsi Soc.* 2015;21(1):6–12.
48. Löscher W, Dagmar H, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy Res.* 1991;8:171–89.
49. Jagannatha LS. Animal Models for Pre-Clinical Antiepileptic Drug Research. *Sci Technol Dev.* 2015;34(2):82–5.
50. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9(3):315–35.
51. Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods.* 2016;260:45–52.
52. De Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia.* 2002;43(SUPPL. 5):37–9.
53. Priel MR, Albuquerque EX. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. *Epilepsia.* 2002;43(SUPPL. 5):40–6.
54. Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: Characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol.* 1997;121(6):1171–9.
55. Nagao T, Alonso A, Avoli M. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience.* 1996;72(2):399–

- 408.
56. Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat Neurosci.* 2015;18(3):339–43.
 57. Smith M, Wilcox KS, White HS. Discovery of antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics.* 2007;4(1):12–7.
 58. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 2011;9(8):1–8.
 59. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(3):206.
 60. da Silva Cândida V, Rodrigues CM. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. *Chem Biol Technol Agric.* 2014;1(1):1–14.
 61. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2005;77(1):7–24.
 62. Dias DA., Urban S, Roessner U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites.* 2012;2(2):303–36.
 63. Lahlou M. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm.* 2013;4(3A):17–31.
 64. Patwardhan B, Mashelkar RA. Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? *Drug Discov Today.* 2009;14(15–16):804–11.
 65. Kong DX, Li XJ, Zhang HY. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. *Drug Discov Today.* 2009;14(3–4):115–9.
 66. Butler MS, Robertson A a B, Cooper M a. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep;* 2014;31:1612–61.
 67. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2008;13(19–20):894–901.
 68. Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J Nat Prod.* 2004;67(12):2141–53.
 69. Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 2007;15(6):279–89.
 70. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem Biol Drug Des.* 2013;81(1):136–47.
 71. Dietrich U, Dürr R, Koch J. Peptides as drugs: from screening to application.

- Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(5):501–12.
72. Smith CG, Vane JR. The discovery of captopril: reply. *The FASEB journal.* 2003;17(8):788–9.
 73. Furman BL. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon*; 2012;59(4):464–71.
 74. Schmidtko A, Lötsch J, Freynhagen R, Geisslinger G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet*; 2010;375(9725):1569–77.
 75. Berkov S, Mutafova B, Christen P. Molecular biodiversity and recent analytical developments: A marriage of convenience. *Biotechnol Adv.*; 2014;32(6):1102–10.
 76. Bolzani V da S, Valli M, Pivatto M, Viegas C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure Appl Chem.*; 2012;84(9):1837–46.
 77. Berenbaum MR, Eisner T. Bugs' Bugs. *Science.* 2008;322:52–3.
 78. Dossey AT. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2010;27(12):1737–57.
 79. Monteiro MC, Romão PRT, Soares AM. Pharmacological perspectives of wasp venom. *Protein Pept Lett.* 2009;16(8):944–52.
 80. Lee SH, Baek JH, Yoon KA. Differential Properties of Venom Peptides and Proteins in Solitary vs. Social Hunting Wasps. *Toxins.* 2016;8(32):1–29.
 81. Sakhuja V, Bhalla A, Pereira B, Kapoor M, Bhusnurmath S, Chugh K. Acute Renal Failure following Multiple Hornet Stings. *J Chem Inf Model.* 1988;49:319–21.
 82. Chao SC, Lee YY. Acute rhabdomyolysis and intravascular hemolysis following extensive wasp stings. *Int J Dermatol.* 1999;38(2):135–7.
 83. King TP, Kochoumian L, Joslyn A. Wasp venom proteins: Phospholipase A1 and B. *Arch Biochem Biophys.* 1984;230(1):1–12.
 84. Hoffman DR. Allergens in hymenoptera venom XV: The immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;75(5):611–3.
 85. Nget-Hong T, Gnanajothy P. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp.* 1992;103(2):299–302.
 86. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123(2):99–106.

87. Abe T, Sugita M, Fujikura T, Hiyoshi J, Akasu M. Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases: The purification, characterization and inhibitory properties by biscochlorine alkaloids. *Toxicon*. 2000;38(12):1803–16.
88. Costa H, Palma MS. Agelotoxin: A phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera-Vespidae). *Toxicon*. 2000;38(10):1367–79.
89. Yang H, Xu X, Ma D, Zhang K, Lai R. A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon*. 2008;51(2):289–96.
90. Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2001;1550(1):70–80.
91. Dos Santos Cabrera MP, De Souza BM, Fontana R, Konno K, Palma MS, De Azevedo WF, et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: A new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Pept Res*. 2004;64(3):95–103.
92. Mendes MA, Monson de Souza B, Delazari dos Santos L, Palma MS. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18:636–42.
93. Mendes MA, De Souza BM, Palma MS. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon*. 2005;45(1):101–6.
94. Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Fontana R, Rangel M, et al. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides*. 2006;27(11):2624–31.
95. de Souza BM, da Silva AVR, Resende VMF, Arcuri HA, dos Santos Cabrera MP, Ruggiero Neto J, et al. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2009;30(8):1387–95.
96. Abe T, Kawai N, Niwa A. Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, mandaratoxin, from hornet (*Vespa mandarinia*). *Biochemistry*. 1982;21(7):1693–7.
97. De Oliveira L, Cunha AOS, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, et al. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal

- pathways. *Brain Res.* 2005;1031(1):74–81.
98. Galante P. Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da Protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. 2013.
 99. Konno K, Hisada M, Itagaki Y, Naoki H, Kawai N, Miwa A, et al. Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(3):612–6.
 100. Konno K, Miwa A, Takayama H, Hisada M, Itagaki Y, Naoki H, Yasuhara T, Kawai N. Pompilidotoxin (α -PMTX), a novel neurotoxin from the venom of a solitary wasp, facilitates transmission in the crustacean neuromuscular synapse. *Neurosci Lett.* 1997;238(3):99–102.
 101. Monge-Fuentes V, Gomes FMM, Campos GAA, Silva J de C, Biolchi AM, Dos Anjos LC, et al. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*; 2015;21:31.
 102. Mortari MR, Cunha AOS, Ferreira LB, dos Santos WF. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 2007;114(2):171–83.
 103. Mortari MR, Siqueira Cunha AO, De Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, et al. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(5):289–95.
 104. Piek T, Hue B, Lind A, Mantel P, Van Marle J, Visser JH. The venom of *Ampulex compressa*-effects on behaviour and synaptic transmission of cockroaches. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp.* 1989;92(2):175–83.
 105. Pizzo AB, Beleboni RO, Fontana ACK, Ribeiro AM, Miranda A, Coutinho-Netto J, et al. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18(2):61–8.
 106. Silva J, Monge-Fuentes V, Gomes F, Lopes K, dos Anjos L, Campos G, et al. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins.* 2015;7(8):3179–209.
 107. Konno K, Palma MS, Hitara IY, Juliano MA, Juliano L, Yasuhara T. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon.* 2002;40:309–12.
 108. Mendes MA, Palma MS. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Peptides.* 2006;27(11):2632–9.

109. Cerovsky V, Pohl J, Yang Z, Alam N, Attygalle A. Identification of three novel peptides isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polistes major major*. *J Pept Sci*. 2007;13:445–50.
110. Xu X, Li J, Lu Q, Yang H, Zhang Y, Lai R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. *Toxicon*. 2006;47(2):249–53.
111. Yu H, Yang H, Ma D, Lv Y, Liu T, Zhang K, et al. Vespidae chemotactic peptide precursor from the wasp, *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon*. 2007;50(3):377–82.
112. Yang X, Wang Y, Lee WH, Zhang Y. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon*; 2013;74:151–7.
113. Dias NB, de Souza BM, Gomes PC, Brigatte P, Palma MS. Peptidome profiling of venom from the social wasp *Polybia paulista*. *Toxicon*; 2015;107:290–303.
114. Han J, You D, Xu X, Han W, Lu Y, Lai R, et al. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 2008;51(5):914–22.
115. Liu Z, Chen S, Zhou Y, Xie C, Zhu B, Zhu H, et al. Deciphering the Venomic Transcriptome of Killer-Wasp *Vespa velutina*. *Sci Rep*. 2015;5:9454.
116. Lopes KS, Campos GAA, Camargo LC, de Souza ACB, Ibituruna BV, Magalhães ACM, Rocha LF, Garcia AB, et al. Characterization of two peptides isolated from the venom of social wasp *Chartergellus communis* (Hymenoptera: Vespidae): Influence of multiple alanine residues and C-terminal amidation on biological effects. *Peptides*; 2017;95:84–93.
117. Richards O. The social wasps of the Americas excluding the Vespinae. In: London British Museum (Natural History). 1978. p. 580.
118. Jeanne R. The swarm-founding Polistinae. 1991;191–231.
119. Zucchi R, Sakagami SFSF, Noll FB, Mechi MR, Mateus S, Baio M V, et al. *Agelaia vicina*, a Swarm-Founding Polistine with the Largest Colony Size among Wasps and Bees (Hymenoptera: Vespidae) Published by: New York Entomological Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/25010148> Your use of the JSTOR archive indicate. New York. 1995;103(2):129–37.
120. Chavarría-Pizarro L, West-Eberhard MJ. The behavior and natural history of *Chartergellus*, a little-known genus of neotropical social wasps (Vespidae Polistinae Epiponini). *Ethol Ecol Evol*. 2010;22(4):317–43.

121. Felippotti GT. Composição de enxames de vespas sociais Neotropicais (Hymenoptera : Vespidae : Polistinae : Epiponini) e suas implicações com a evolução do comportamento social Composição de enxames de vespas sociais Neotropicais. Tese Doutorado - Fac Filos Ciências e Let Univ São Paulo, Ribeirão Preto. 2010;216.
122. Somavilla A, Oliveira ML, Rafael JA. Social wasps (Vespidae: Polistinae) from two national parks of the caatinga biome, in Brazil. *Sociobiology*. 2017;64(3):334–8.
123. Belebony RDO, Pizzo AB, Fontana ACK, Carolino RDOG, Coutinho-Netto J, Dos Santos WF. Spider and wasp neurotoxins: Pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol*. 2004;493(1–3):1–17.
124. Mellor IR, Usherwood PNR. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. *Toxicon*. 2004;43(5):493–508.
125. Wang C, Chi C. Conus Peptides — A Rich Pharmaceutical Treasure The Biology of Cone Snails Classification and Nomenclature of Conus Peptides. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2004;36(11):713–23.
126. Mortari MR, Siqueira Cunha AO. New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods. In: An Integr View Mol Recognit Toxicology - From Anal Proced to Biomed Appl. InTech. 2013;91–117.
127. Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Yasuhara T, Nakata Y, et al. Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins. *Neurosci Lett*. 2000;285(1):29–32.
128. Pizzo a B, Fontana a C, Coutinho-Netto J, dos Santos WF. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(2):88–94.
129. Yokota H, Tsubokawa H, Miyawaki T, Konno K, Nakayama H, Masuzawa T, et al. Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. *Neurosci Res*. 2001;41(4):365–71.
130. Cunha AOS, Mortari MR, Oliveira L, Gomes Carolino RO, Coutinho-Netto J, Ferreira Dos Santos W. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2005;141(1):50–7.
131. Couto LL do, dos Anjos LC, Araujo M de AF, Mourão CA, Schwartz CA, Ferreira LB, et al. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacogn Mag*.

- 2012;8(32):292–9.
132. Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov Today*. 1998;3(5):232–8.
 133. Hyslop S. Anestesia, analgesia e eutanásia na experimentação animal. II Workshop Uniararas de Princípios Éticos para Experimentação em Humanos/Animais. 2013. p. 1–73. Disponível em: [https://www.famema.br/ensino/pos-lato/docceua/CEUA/BIBLIOGRAFIA/Material Eventos/Anestesia, Analgesia e Eutan%25C3%25A1sia na Experimenta%25C3%25A7%25C3%25A3o Animal.pdf](https://www.famema.br/ensino/pos-lato/docceua/CEUA/BIBLIOGRAFIA/Material%20Eventos/Anestesia,%20Analgesia%20e%20Eutan%C3%A1sia%20na%20Experimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal.pdf)
 134. Paxinos G, Franklin K. The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press; 2001.
 135. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32(3):281–94.
 136. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav*.; 2009;98(5):579–86.
 137. Shibley H, Smith BN. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Res*. 2002;49(2):109–20.
 138. Speller JM, Westby GW. Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei. *Exp Brain Res*. 1996;110(3):425–34.
 139. Lopes KS, Rios ERV, De Carvalho Lima CN, Linhares MI, Torres AFC, Havt A, et al. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. *Neurochem Int*. 2013;63(3).
 140. Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheneval O, Stöcklin M, et al. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*. 2006;47(6):676–87.
 141. Ho CL, Chen WC, Lin YL. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon*. 1998;36(4):609–17.
 142. Oliveira MR, Palma MS. Polybitoxins: A group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon*. 1998;36(1):189–99.
 143. Cunha RB. Peptidomic Analysis of Animal Venoms. In An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology-From Analytical Procedures to

- Biomedical Applications. *InTech*. 2013;3–22.
144. Sarker SD. Two decades of Phytochemical Analysis: From new isolation and characterisation techniques for plant secondary metabolites to advanced metabolomics studies. *Phytochem Anal*. 2010;21(1):1.
 145. Roda A, Gioacchini AM, Seraglia R, Montagnani M, Baraldini M, Pedrazzini S, et al. A Comparison of the Analytical Performance of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Electrospray and Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry in the Study of the Protein Extract from Bothrops jararaca Snake Ven. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1997;11(12):1297–302.
 146. Escoubas P, Quinton L, Nicholson G. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2008;43:279–95.
 147. Bougis PE. Automated Mass Fingerprinting of Venoms in Nanogram Range: Review of Technology. *Toxinology*. 2014;1–10.
 148. Escoubas P, Sollod B, King GF. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*. 2006;47(6):650–63.
 149. Heimbeck IGR. Desenvolvimento de metodologias para identificação de proteínas e metabólitos durante o desenvolvimento de frutos de café (*Coffea arabica* L.). [dissertação]. Lavras (MG): 2011.
 150. Silva, MRE. Kinins: bradykinin, angiotensin, substance P. In: *Invertebrate Hormones: Tissue Hormones*. 2013. p. 64–104.
 151. Rocha e Silva M, Beraldo W, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Dialogues Cardiovasc Med*. 2001;6(4):258.
 152. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, et al. New topics in bradykinin research. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(11):1397–406.
 153. Negraes PD, Trujillo CA, Pillat MM, Teng YD, Ulrich H. Roles of Kinins in the Nervous System. *Cell Transplant*. 2015;24:613–23.
 154. dos Anjos LC, Gomes FMM, do Couto LL, Mourão CA, Moreira KG, Silva LP, et al. Anxiolytic activity and evaluation of potentially adverse effects of a bradykinin-related peptide isolated from a social wasp venom. *Life Sci*; 2016;149:153–9.
 155. Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*. 1995;30(1):1–26.

156. Perosa S, Arganaraz G, Goto E, Costa L, Konno A, Varella P, et al. An oscillatory interference model of grid cell firing. *Hippocampus*. 2007;17:26–32.
157. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1–3):161–76.
158. Bregola G, Varani K, Gessi S, Beani L, Bianchi C, Borea PA, et al. Changes in hippocampal and cortical B1 bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy. *Neuroscience*. 1999;92(3):1043–9.
159. Mazzuferi M, Binaschi A, Rodi D, Mantovani S, Simonato M. Induction of B1 bradykinin receptors in the kindled hippocampus increases extracellular glutamate levels: A microdialysis study. *Neuroscience*. 2005;135(3):979–86.
160. Martins AH, Alves JM, Perez D, Carrasco M, Torres-Rivera W, Eterović VA, et al. Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists. *PLoS One*. 2012;7(2).
161. Yasuyoshi H, Kashii S, Zhang S, Nishida A, Yamauchi T, Honda Y, et al. Protective effect of bradykinin against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2273–8.
162. Picolo G, Hisada M, Moura AB, Machado MFM, Sciani JM, Conceicao IM, et al. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(3):478–86.
163. Mortari MR, Cunha AOS, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP, et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr 6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *Br J Pharmacol*. 2007;151(6):860–9.
164. Xu X, Yang H, Yu H, Li J, Lai R. The mastoparanogen from wasp. *Peptides*. 2006;27(12):3053–7.
165. Da Silva AVR, De Souza BM, Dos Santos Cabrera MP, Dias NB, Gomes PC, Neto JR, et al. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta.*; 2014;1838(10):2357–68.
166. Dos Santos Cabrera MP, Alvares DS, Leite NB, Monson De Souza B, Palma MS, Riske KA, et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: Lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir*. 2011;27(17):10805–13.
167. Leite NB, Da Costa LC, Dos Santos Alvares D, Dos Santos Cabrera MP, De Souza BM, Palma MS, et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids*. 2011;40(1):91–100.

168. Moreno M, Giralt E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*. 2015;7(4):1126–50.
169. Tajés M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, Bosch-Morató M, Guivernau B, Eraso-Pichot A, et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol*. 2014;31(5):152–67.
170. Lindberg S, Copolovici DM, Langel U. Therapeutic delivery opportunities, obstacles and applications for cell-penetrating peptides. *Ther Deliv*. 2011;2(1):71–82.
171. Lopes KS, Campos GAA, Camargo LC, de Souza ACB, Ibituruna BV, Magalhães ACM, et al. Characterization of two peptides isolated from the venom of social wasp *Chartergellus communis* (Hymenoptera: Vespidae): Influence of multiple alanine residues and C-terminal amidation on biological effects. *Peptides*. 2017;95.
172. Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, César LMM, Almeida RNA, et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2005;26(11):2157–64.
173. Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. *Bmj*. 2014;348(feb28 2):g254–g254.
174. Lidster K, Jefferys JG, Blümcke I, Crunelli V, Flecknell P, Frenguelli BG, et al. Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *J Neurosci Methods*; 2016;260:2–25.
175. Everett GM, Richards RK. Comparative anticonvulsive action of 3, 5, 5-trimethyloxazolidine-2, 4-dione (Tridione), Dilantin and phenobarbital. *J Pharmacol Exp Ther*. 1944;81(4):402–7.
176. Chen G, Portman R, Ensor CR, Bratton AC. The anticonvulsant activity of α -phenyl succinimides. *J Pharmacol Exp Ther*. 1951;103(1):54–61.
177. White HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 1997;38(Suppl. 1):9–17.
178. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM, Yaksh TL, Sharbrough FW. Suppression of Pentylenetetrazole Seizures by Oral Administration of a Dihydropyridine Ca²⁺ Antagonist. *Epilepsia*. 1987;28(4):409–14.
179. Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*. 1988;2(3):145–81.

180. White HS, Johnson M, Wolf HH, Kupferberg HJ. The early identification of anticonvulsant activity: role of the maximal electroshock and subcutaneous pentylenetetrazol seizure models. *Ital J Neurol Sci.* 1995;16(1–2):73–7.
181. Löscher W. The Search for New Screening Models of Pharmacoresistant Epilepsy: Is Induction of Acute Seizures in Epileptic Rodents a Suitable Approach? *Neurochem Res.* 2017;42(7):1926–38.
182. Scott RC. Prolonged Epileptic Seizures : What are the effects of prolonged seizures in the brain ? *Epileptic Disord.* 2014;16(October):6–11.
183. Cherian A, Thomas S V. Status epilepticus. *Ann Indian Acad Neurol.* 2009;12(3):140.
184. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. *Epilepsia.* 1991;32(6):778–82.
185. Stables JP, Bertram E, Dudek FE, Holmes G, Mathern G, Pitkanen A, et al. Therapy Discovery for Pharmacoresistant Epilepsy and for Disease-modifying Therapeutics: Summary of the NIH/NINDS/AES Models II Workshop. *Epilepsia.* 2003;44(12):1472–8.
186. Glien M, Brandt C, Potschka H, Löscher W. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2002;43(4):350–7.
187. Bankstahl M, Bankstahl JP, Löscher W. Inter-individual variation in the anticonvulsant effect of phenobarbital in the pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.*; 2012;234(1):70–84.
188. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(24):13311–6.
189. Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Löscher W. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: Low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res.* 2001;46(2):111–9.
190. Goodman JH. Experimental models of status epilepticus. 1998: 95-125.
191. Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res.* 1984;321(2):237–53.

192. Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, et al. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol*. 2003;182(1):21–34.
193. White HS, Smith MD, Wilcox KS. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Int Rev Neurobiol*. 2007;81(6):85–110.
194. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Voltage-activated calcium channels: Targets of antiepileptic drug therapy? *Epilepsia*. 1997;38(9):959–65.
195. McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, McKeever PE, et al. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1991;29(5):529–41.
196. Gomora JC, Daud AN, Weiergräber M, Perez-Reyes E. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol*. 2001;60(5):1121–32.
197. Betting LE GC. Tratamento das Epilepsias Generalizadas Idiopáticas. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2008;14(2):20–4.
198. Nascimento VS, D’Alva MS, Oliveira AA, Freitas RM, Vasconcelos SMM, Sousa FCF, et al. Antioxidant effect of nimodipine in young rats after pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;82(1):11–6.
199. Marinho MMF, De Bruin VMS, De Sousa FCF, Aguiar LM V, De Pinho RSN, Viana GSB. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. *Neurosci Lett*. 1997;235(1–2):13–6.
200. Chakir A, Fabene PF, Ouazzani R, Bentivoglio M. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain Res Bull*. 2006;71(1–3):127–38.
201. do Couto LL. Atividade anticonvulsivante do Ppnp7, um neuropeptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista*. Universidade de Brasília; 2012.
202. Silva JC e. Atividade antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina e de um análogo: estudo eletroencefalográfico e potencial alvo farmacológico. Universidade de Brasília; 2013.
203. Gomes FMM. Avaliação antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina no modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal induzido por pilocarpina em camundongos. Universidade de Brasília; 2016.
204. Baldi E, Bucherelli C. The Inverted “U-Shaped” Dose-Effect Relationships in Learning and Memory: Modulation of Arousal and Consolidation. *Nonlinearity*

- Biol Toxicol Med.* 2005;3(1):9–21.
205. Schwartz-Bloom RD, Sah R. γ -Aminobutyric acidA neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2001;77(2):353–71.
 206. Milani H, Lepri ER, Giordani F, Favero-Filho LA. Magnesium chloride alone or in combination with diazepam fails to prevent hippocampal damage following transient forebrain ischemia. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(10):1285–93.
 207. Muir JK, Lobner D, Monyer H, Choi DW. GABA(A) receptor activation attenuates excitotoxicity but exacerbates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1211–8.
 208. Flood JF, Landry DW, Murray E, Jarvik. Cholinergic receptor interactions and their effects on long-term memory processing. *Brain Res.* 1981;215:177–85.
 209. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavaleiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* 2002;50(1–2):93–103.
 210. Noachtar S, Rémi J. The role of EEG in epilepsy: A critical review. *Epilepsy Behav.*; 2009;15(1):22–33.
 211. Engel JJ. A practical guide for routine EEG studies in epilepsy. *Journal of clinical neurophysiology.* 1984:109–42.
 212. Tieng QM, Anbazhagan A, Chen M, Reutens DC. Mouse epileptic seizure detection with multiple EEG features and simple thresholding technique. *J Neural Eng*; 2017;14(6):aa8069.
 213. Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature.* 1998;394(6689):186–9.
 214. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*; 2008;172(2):143–57.
 215. World Health Organization. Internacional drugmonitoring: the role of national centres. Report of a WHO Meeting. 1972:1–25.
 216. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med.* 2000;342(5):314–9.
 217. Perucca P, Carter J, Vahle V, Gilliam FG. Adverse antiepileptic drug effects: Toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy. *Neurology.* 2009;72(14):1223–9.
 218. Perucca P, Gilliam FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol.* 2012;11(9):792–802.
 219. J.A. C, S. M, J. W, Mattson RH. Adverse effects of antiepileptic drugs: A brief

- overview of important issues. *Expert Rev Neurother*. 2010;10(6):885–91.
220. Hall CS. Emotional Behavior in the Rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934;18(3):385–403.
221. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1–3):3–33.
222. Russell PA. Fear-evoking stimuli. In: In W Sluckin (Ed), Fear in animals and man (pp 86–124) Princeton, NJ: Van Nostrand Reinhold Co Ltd. 1979.
223. van Abeelen J.H.F. Rearing responses and locomotor activity in mice: single locus control. *Behav Biol*. 1977;19(3):401–4.
224. Sankar R, Holmes GL. Mechanisms of Action for the Commonly Used Antiepileptic Drugs: Relevance to Antiepileptic Drug-Associated Neurobehavioral Adverse Effects. *J Child Neurol*. 2004;19(1S):S6–14.
225. Leppik IE. AED doses: from animals to humans. *Antiepileptic Drug Dev Adv Neurol*. 1998;76:89–93.
226. Luszczki JJ, Andres MM, Czuczwar P, Cioczek-Czuczwar A, Wojcik-Cwikla J, Ratnaraj N, et al. Levetiracetam selectively potentiates the acute neurotoxic effects of topiramate and carbamazepine in the rotarod test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15(6):609–16.
227. Levy G. What are narrow therapeutic index drugs? *Clin Pharmacol Ther*. 1998;63(5):501–5.
228. Katzung BG. Farmacologia Básica e Clínica. nona. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2005:991.
229. Denayer T, Stöhrn T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons Transl Med*; 2014;2(1):5–11.
230. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotech*. 2014;32(1):40–51.

ANEXOS

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 19 de Novembro de 2013</p> <p>Raquel de Andrade Lima Coelho Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010476/2013-0 Validade: 19/11/2013 a 01/08/2018 Instituição: UNIVERSIDADE DE BRASILIA CNPJ: 000.381.740/0001-43 Pesquisador: Márcia Renata Mortari CPF: 828.885.151-72 RG: 1507428 - SSP / DF</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 8904338536066393 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE NINHOS DE VESPAS NO MUNICÍPIO DE FORMOSA – GO, EXPEDIDA PELA SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE.



PREFEITURA DE
Formosa
Construindo uma vida melhor

**ESTADO DE GOIÁS
PREFEITURA MUNICIPAL DE FORMOSA
SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE**

AUTORIZAÇÃO

A Prefeitura Municipal de Formosa por sua Secretaria Municipal de Meio Ambiente, no interesse público de fomentar o conhecimento científico, por este instrumento e na forma da Lei, AUTORIZA a Doutora Márcia Renata Mortari, professora da UNB – Universidade de Brasília e auxiliares sob sua responsabilidade, a EFETUAR A COLETA de ninhos de vespas no município de Formosa – GO, especialmente no Parque Municipal da Mata da Bica e Parque Municipal do Itiquira para uso de cunho científico.

A autorizada compromete – se a causar o mínimo de perturbações possíveis ao Meio Ambiente durante a execução da coleta do material objeto, bem como disponibilizar a esta secretaria cópia do resultado final da pesquisa científica.

Formosa-GO, 22 de abril de 2014.

Eng° Florestal Luiz Antônio Laner
Secretário Municipal de Meio Ambiente

ANEXO C – AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO AO PARQUE MUNICIPAL DO ITIQUIRA, EXPEDIDO PELA SECRETARIA DE TURISMO DA CIDADE DE FORMOSA - GO



**ESTADO DE GOIÁS
PREFEITURA MUNICIPAL DE FORMOSA**

Ofício. Nº 145/2014

Formosa, 10 de Abril de 2014

À Senhora
Dra. Márcia Renata Mortari
Professora Coordenadora do Laboratório de Neurofarmacologia
Brasília -DF

Ref.: Resposta ao Ofício 02/2014.

Prezada Doutora,

Venho por meio deste autorizar o acesso da equipe de pesquisas da UnB para adentrar o Parque Municipal do Itiquira, pelo período que durar os estudos científicos.

Atenciosamente,

Rosana Sales Araújo
Secretária de Turismo de Formosa-GO

ANEXO D – LICENÇA PARA COLETA NÚMERO 21723-2, EXPEDIDA PELO INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21723-2	Data da Emissão: 03/06/2013 15:01	Data para Revalidação*: 03/07/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcia Renata Mortari	CPF: 828.885.151-72
Título do Projeto: Identificação de peptídeos anticonvulsivantes e ansiolíticos dos venenos de vespas sociais do Cerrado brasileiro.	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta dos espécimens	10/2009	10/2014
2	Separação e isolamento dos componentes ativos	01/2010	01/2011
3	Bioensaios	03/2010	10/2012

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Alberto Schwartz	colaborador	918.647.478-20	5696136 ssp sp-SP	Brasileira
2	Luzitano Brandão Ferreira	colaborador	428.872.751-00	1032200 SSP-DF	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRASÍLIA	DF	Brasília e cidades satélites	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 86498433



Página 1/3

ANEXO E – LICENÇA PARA COLETA NÚMERO 21723-3, EXPEDIDA PELO INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21723-3	Data da Emissão: 03/06/2014 16:56	Data para Revalidação*: 03/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcia Renata Mortari	CPF: 828.885.151-72
Título do Projeto: Identificação de peptídeos anticonvulsivantes e ansiolíticos dos venenos de vespas sociais do Cerrado brasileiro.	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	CNPJ: 00.038.174/0001-43

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta dos espécimens	10/2009	10/2014
2	Separação e isolamento dos componentes ativos	01/2010	01/2011
3	Bioensaios	03/2010	10/2012

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Carlos Alberto Schwartz	colaborador	918.647.478-20	5696136 ssp sp-SP	Brasileira
2	Luzitano Brandão Ferreira	colaborador	428.872.751-00	1032200 SSP-DF	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRASILIA	DF	Brasília e cidades satélites	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 24743491



ANEXO F - DECLARAÇÕES DE APROVAÇÃO DA PESQUISA CIENTÍFICA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



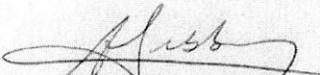
Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 28 de junho de 2010

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTICONVULSIVANTES E ANSIOLÍTICOS DOS VENENOS DE VESPAS SOCIAIS DO CERRADO BRASILEIRO**", UnBDOC nº 45.810/2009, sob responsabilidade do Profa. Dra. Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA





Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

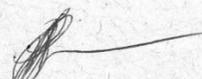
Brasília, 16 de dezembro de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIÉPILEPTICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DA VESPA SOCIAL CHARTERGELLUS COMMUNIS (RICHARDS, 1978)**", UnBDoC n.º 144410/2014, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 160. A presente aprovação é válida pelo período de 01/01/2015 a 07/12/2018.




MsC. MV. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Vice Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO G – VALORES DE SIGNIFICÂNCIA DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS

Tratamentos	Ensaio de indução aguda de crises epiléticas		
	PTZ	PILO	
communis 07	LCM	t=1,241; p=0,2431	U=9,00; p=0,1243
	DCM	t=0,8765; p=0,4013	U=11,00; p=0,1079
	LM	t=0,1609; p=0,8753	U=20,50; p=0,6503
	%PM	p=1,0	p=1,0
	TS	p=1,0	p=0,5804
	MC	U=15,00; p>0,99	U=24,00; p>0,99
communis 11	LCM	t=1,439; p=0,1807	t=3,440; p=0,0049
	DCM	U=10,50; p=0,5606	t=7,755; p<0,0001
	LM	U=14,00; p=0,6212	U=15,00; p=0,2088
	%PM	p=1,0	p=1,0
	TS	p=0,5581	p=0,2088
	MC	U=15,00; p>0,99	U=24,00; p>0,99
communis 18	LCM	t=0,7274; p=0,4837	t=0,400; p=0,6961
	DCM	U=8,00; p=0,5667	t=0,8513; p=0,4113
	LM	t=0,4988; p=0,6287	U=23,00; p=0,9161
	%PM	p=1,0	p=1,0
	TS	p=1,0	p=1,0
	MC	U=15,00; p>0,99	U=24,00; p>0,99
communis 19	LCM	t=2,274; p=0,0406	t=4,533; p=0,0005
	DCM	t=2,313; p=0,0378	t=5,814; p<0,0001
	LM	t=1,428; p=0,1768	t=0,3211; p=0,7528
	%PM	p=0,200	p=0,0070
	TS	p=0,3147	p=1,0
	MC	U=15,00; p=0,2088	U=8,00; p=0,007

OBS: Os valores de significância foram obtidos pela comparação entre os grupos tratados e o grupo LCRa. LCM: latência para a crise máxima. DCM: duração das crises máximas. LM: latência de morte. %PM: percentual de proteção contra a crise máxima. TS: taxa de sobrevivência. MC: mediana das classes de crises. Os testes estatísticos utilizados para LCM, DCM e LM foram: teste t de Student, para dados paramétricos, e o teste Mann Whitney, para os dados não paramétricos. Para o %PM e TS utilizou-se o teste exato de Fisher, e para a MC o teste de Mann Whitney.

Ensaio de indução aguda de crises epilépticas pelo uso de PILO	
Communis 19 (doses)	
0,3 µg/animal	LCM $F_{(2,19)}= 33,83; p<0,0001$
	DCM $F_{(2,19)}= 15,91; p<0,0001$
	LM $F_{(2,19)}= 4,143; p=0,0321$
	%PM $p=0,4286$
	TS $p=1,0$
	MC $U=20,00; p=0,4286$
1,5 µg/animal	LCM $F_{(2,20)}= 28,42; p<0,0001$
	DCM $K=18,50; p<0,05$
	LM $K= 6,152; p=0,0461$
	%PM $p=0,0769$
	TS $p=0,2$
	MC $U=16,00; p=0,0769$
3,0 µg/animal	LCM $F_{(2,21)}= 29,51; p<0,0001$
	DCM $F_{(2,21)}= 42,53; p<0,0001$
	LM $K= 3,063; p=0,2162$
	%PM $p=0,0070$
	TS $p=1,0$
	MC $U=8,00; p=0,0070$
6,0 µg/animal	LCM $F_{(2,21)}= 32,79; p<0,0001$
	DCM $F_{(2,21)}= 20,17; p<0,0001$
	LM $F_{(2,21)}= 9,086; p<0,05$
	%PM $p=1,0$
	TS $p=0,3147$
	MC $U=28,00; p>0,99$
Ensaio de Vídeo-EEG	
communis 19 3,0 µg/animal	LCEG $K=1,723; p=0,4505$
	DCEG $K=1,142; p=0,6038$
	QCEG $K=4,548; p=0,1152$
	%PCEG $p=0,4286$

OBS: Os valores de significância foram obtidos pela comparação entre os grupos tratados com o peptídeo, LCRa e DZP. LCM: latência para a crise máxima. DCM: duração das crises máximas. LM: latência de morte. %PM: percentual de proteção contra a crise máxima. TS: taxa de sobrevivência. MC: mediana das classes de crises. LCEG: latência para crises eletroencefalográficas generalizadas. DCEG: duração de crises eletroencefalográficas generalizadas. QCEG: quantidade de crises eletroencefalográficas generalizadas. %PCEG: percentual de proteção contra crises eletroencefalográficas generalizadas. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos, ou o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's, para dados não paramétricos.

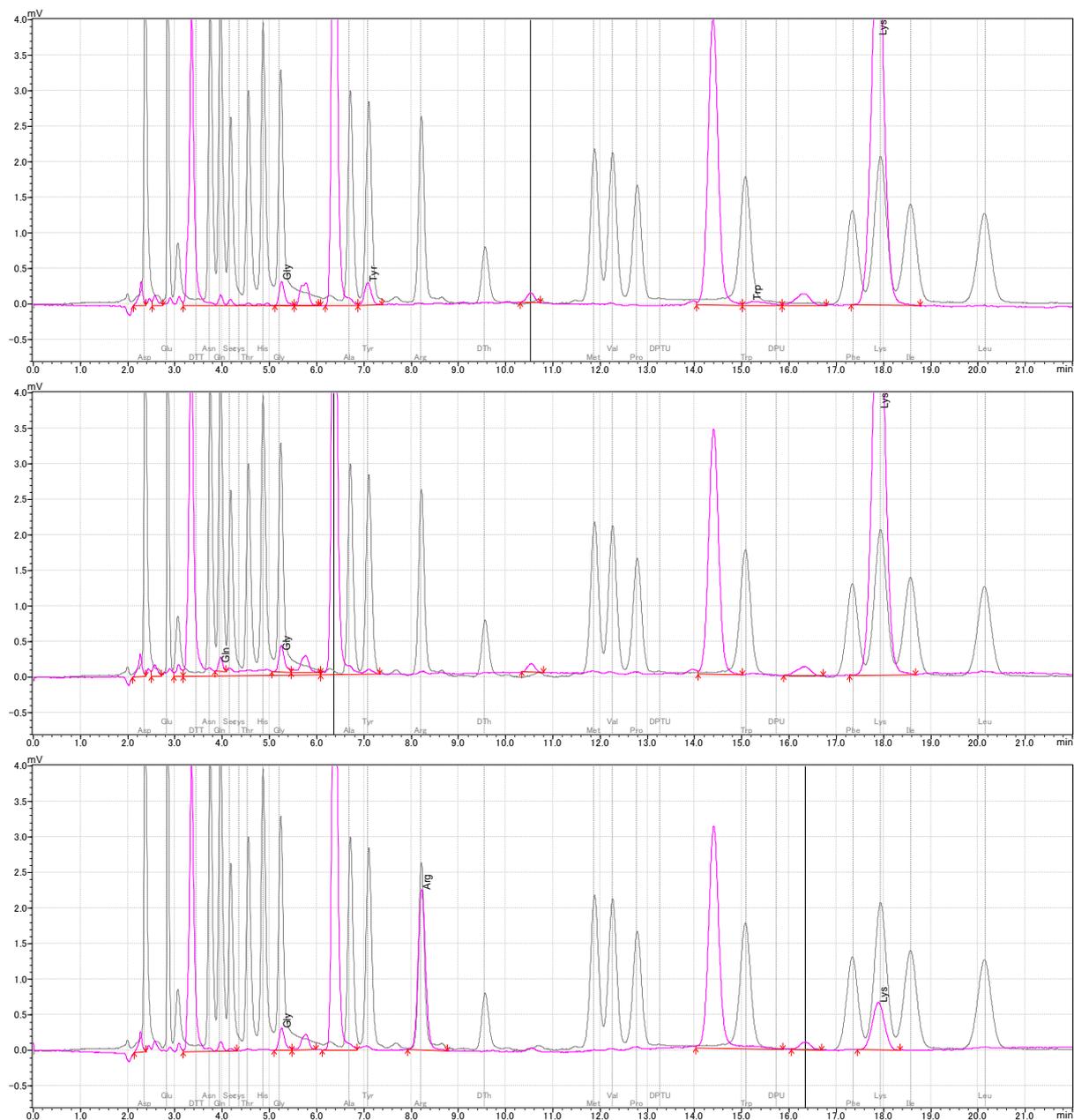
Ensaio de Campo Aberto		
Exploração	3,0 µg/animal	$F_{(2,18)}=11,80$; $p=0,0005$
	30 µg/animal	$F_{(2,18)}=18,08$; $p<0,0001$
Imobilidade	3,0 µg/animal	$F_{(2,18)}=12,23$; $p=0,0004$
	30 µg/animal	$F_{(2,18)}=18,09$; $p<0,0001$
Autolimpeza	3,0 µg/animal	$F_{(2,18)}=2,978$; $p=0,0763$
	30 µg/animal	$F_{(2,18)}=2,501$; $p=0,1101$
Elevação	3,0 µg/animal	$F_{(2,18)}=7,147$; $p=0,0052$
	30 µg/animal	$F_{(2,18)}=7,052$; $p=0,0055$
Linhas cruzadas	3,0 µg/animal	$F_{(2,17)}=3,743$; $p=0,0450$
	30 µg/animal	$K=5,200$; $p=0,0690$

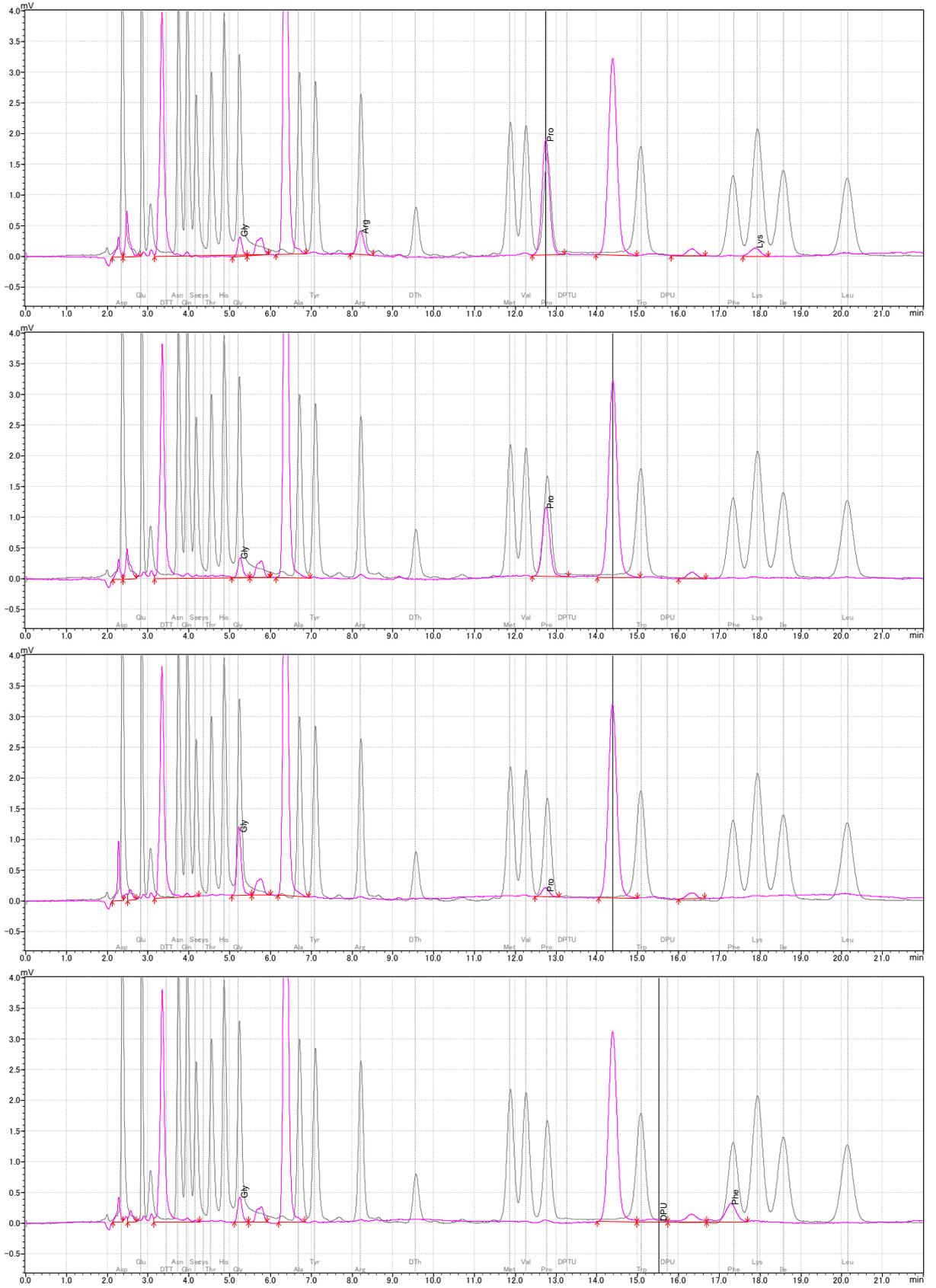
OBS: Os valores de significância foram obtidos pela comparação entre os grupos tratados com o peptídeo, LCRA e DZP. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

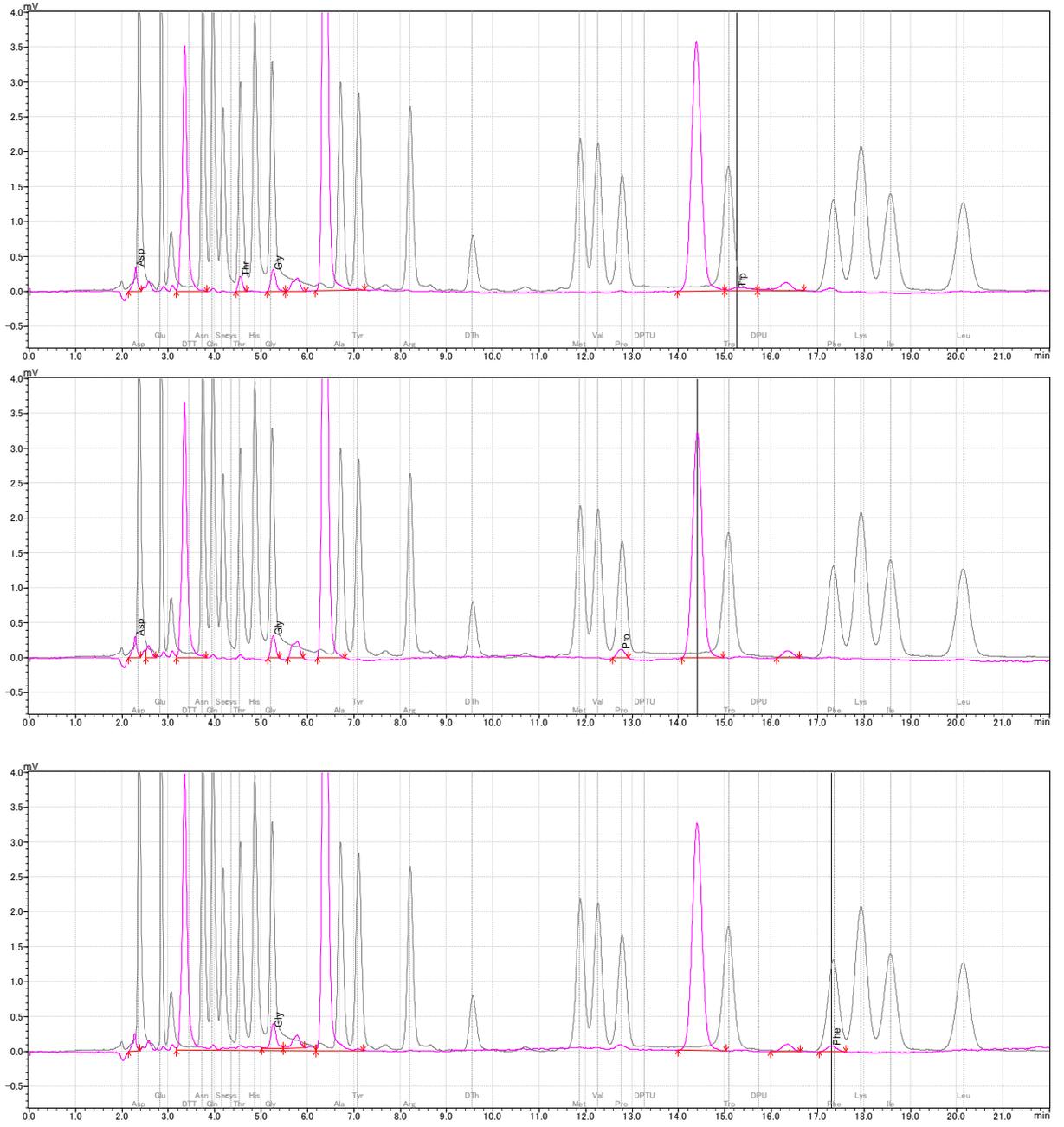
Ensaio de Rotarod		
Latência para a queda	Interação	$F_{(15,135)}=6,205$; $p<0,0001$
	Tempo	$F_{(5,135)}=5,152$; $p=0,0002$
	Tratamento	$F_{(3,27)}= 2,233$; $p=0,1072$
Quantidade que falharam em permanecer na barra cilíndrica	DZP x LCRA	$p=0,010$
	3,0 µg/animal x LCRA	$p=1,00$
	30 µg/animal x LCRA	$p=0,5692$
	3,0 µg/animal x DZP	$p=0,0406$
	30 µg/animal x DZP	$p=0,0406$

OBS: As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os testes exato de Fisher e a análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

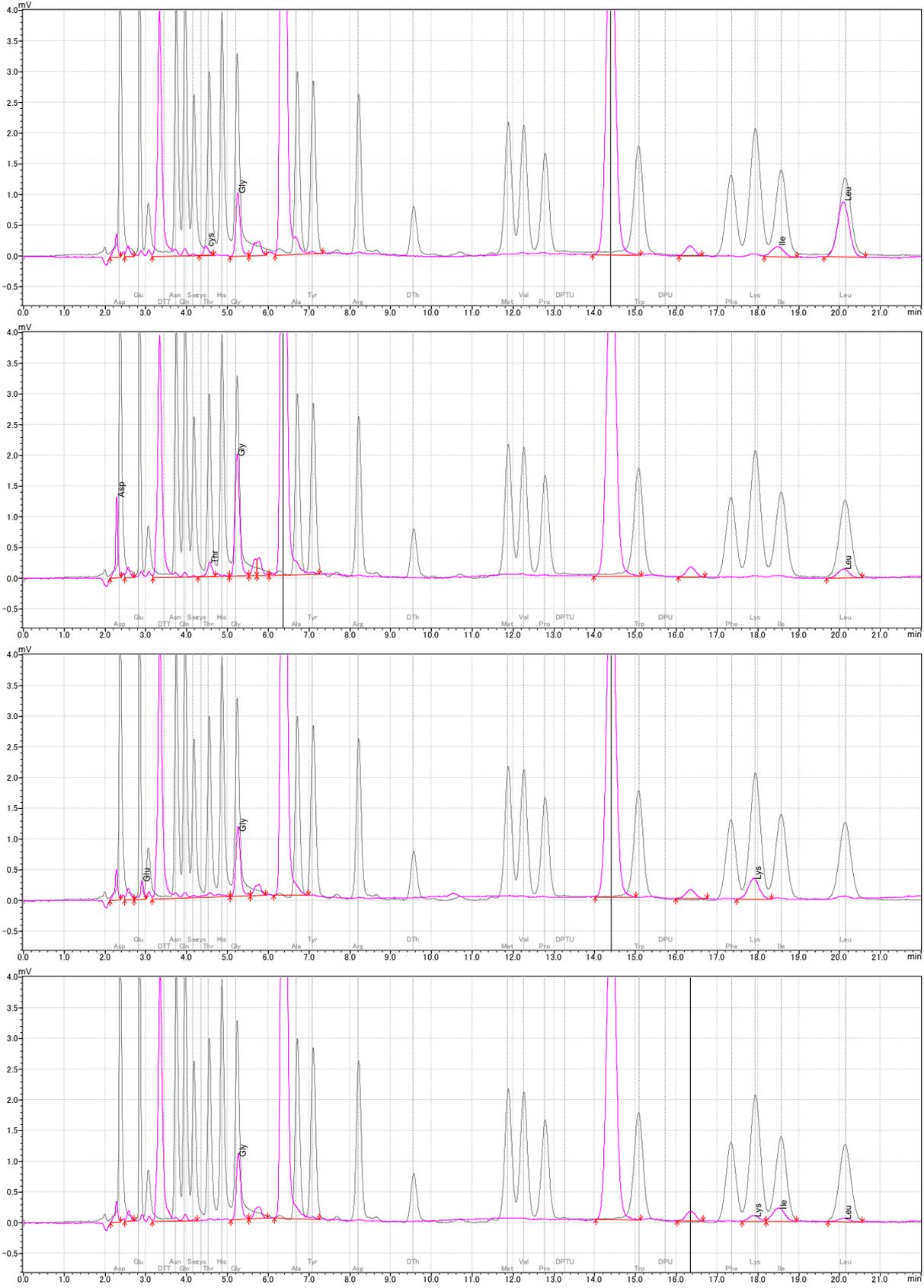
ANEXO H – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDO COMMUNIS 07

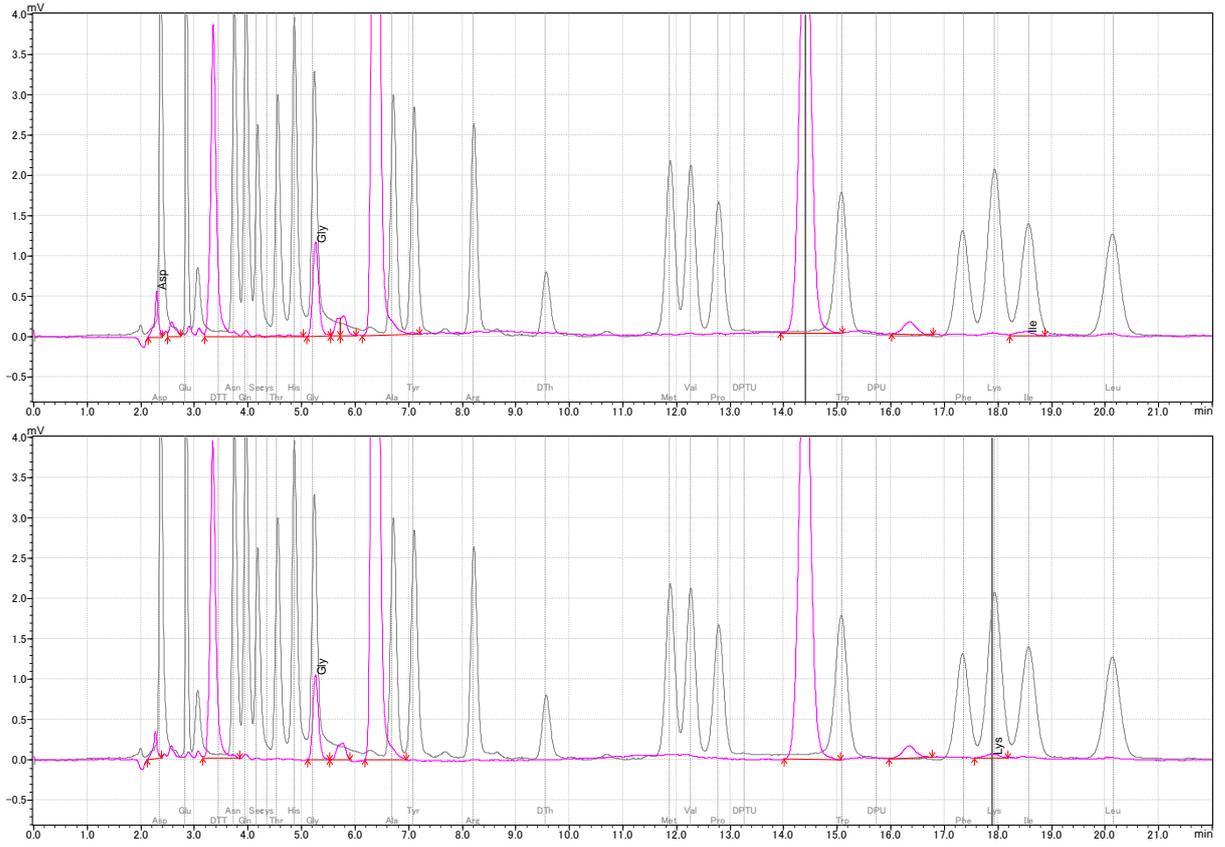




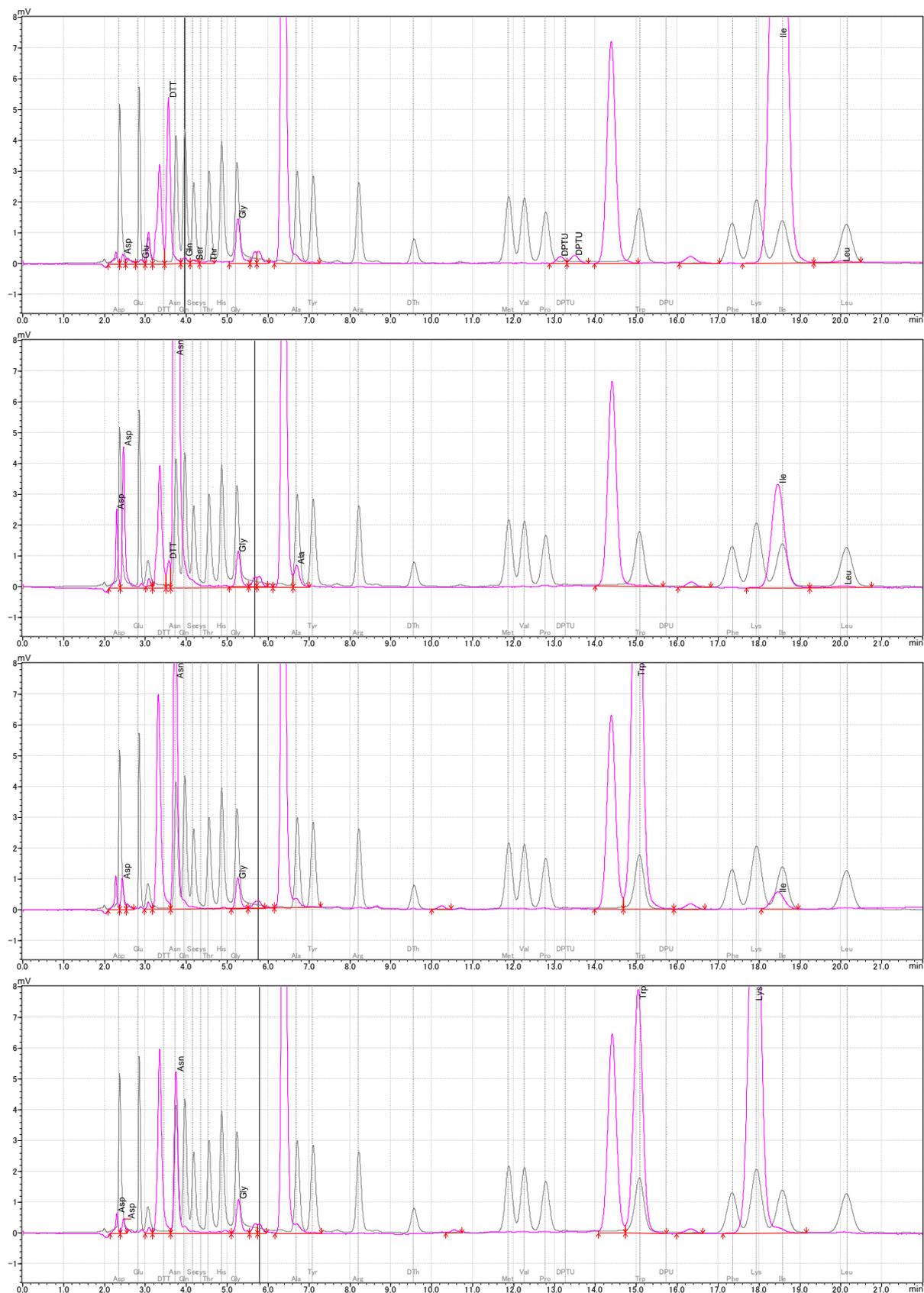


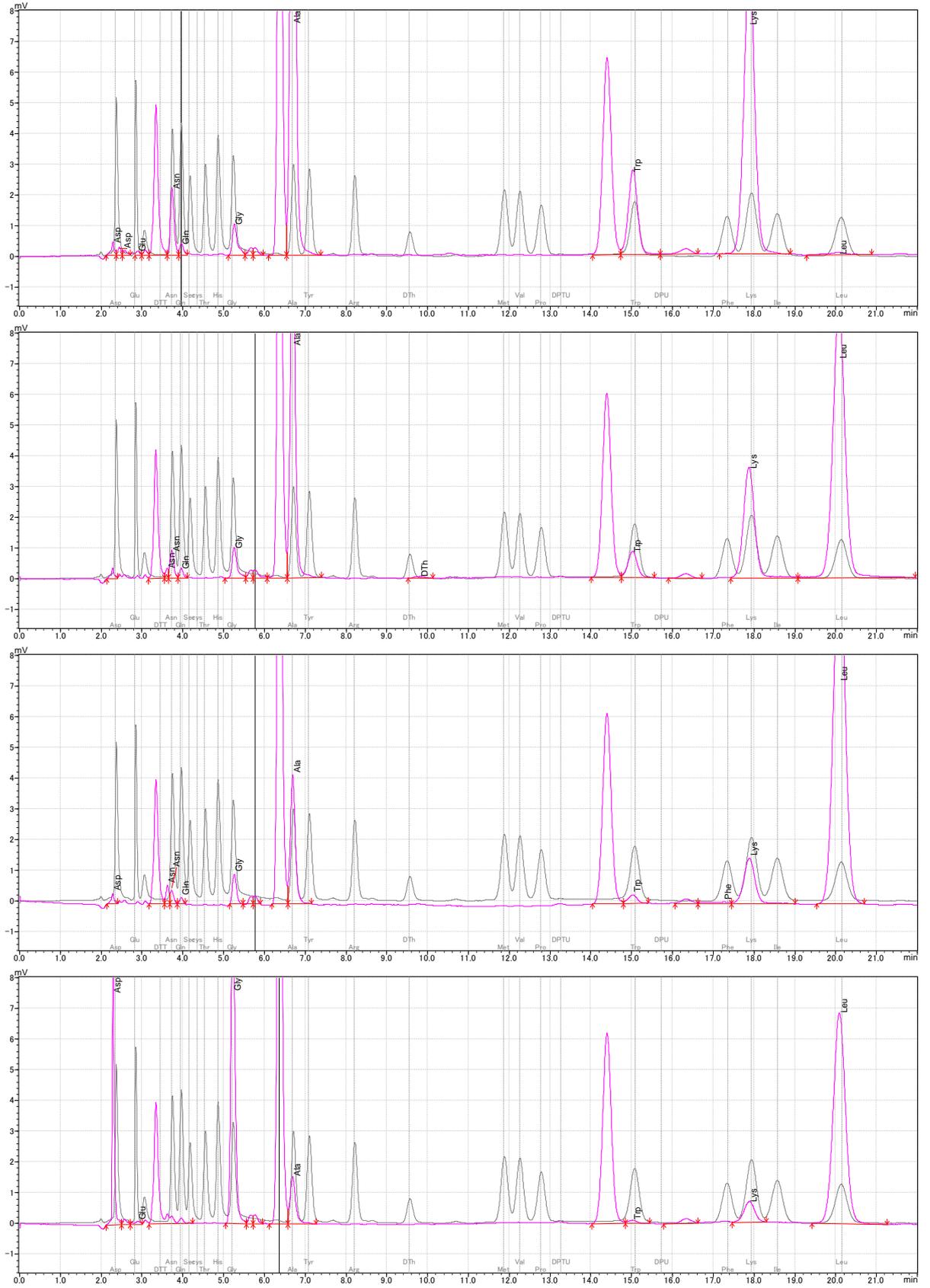
ANEXO I – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDEO COMMUNIS 11

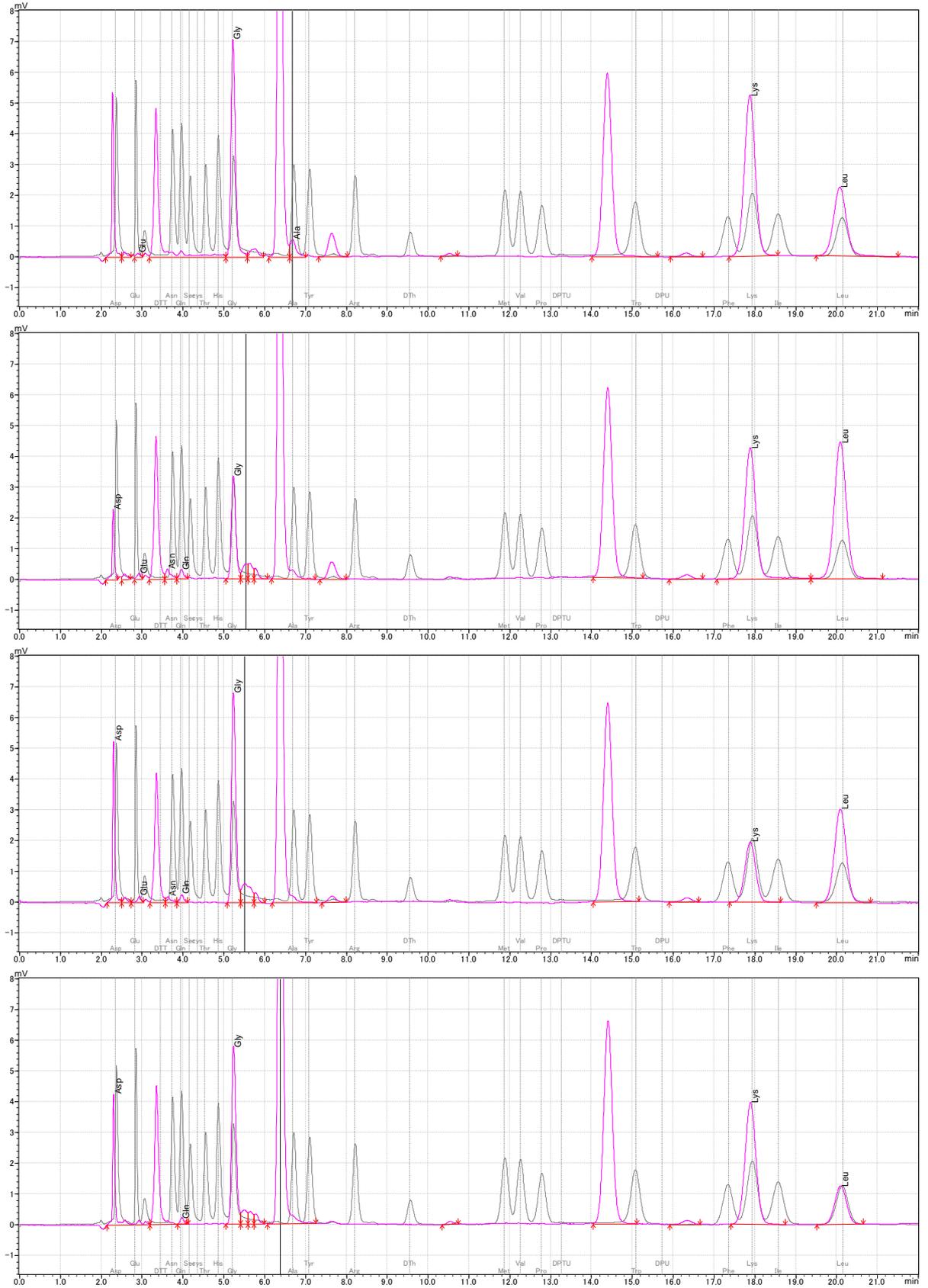


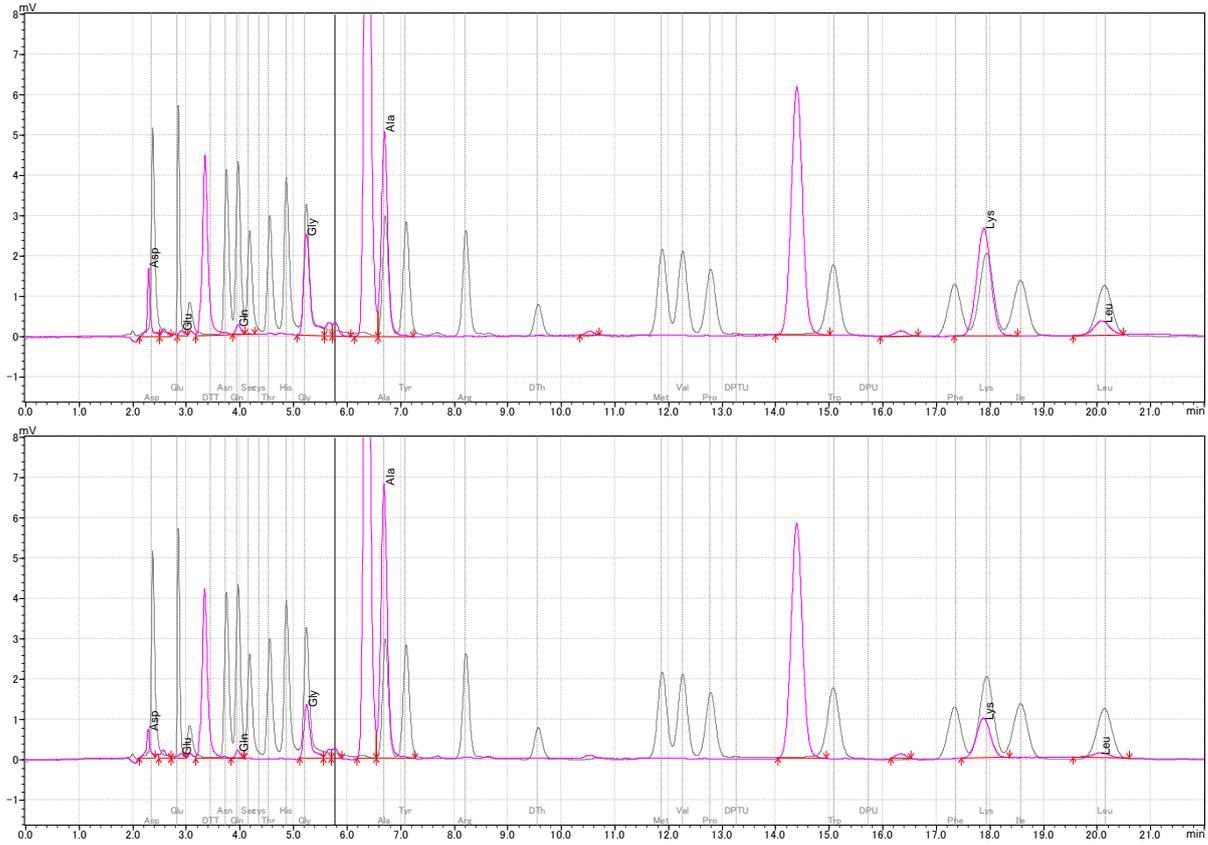


ANEXO J – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDEO COMMUNIS 15

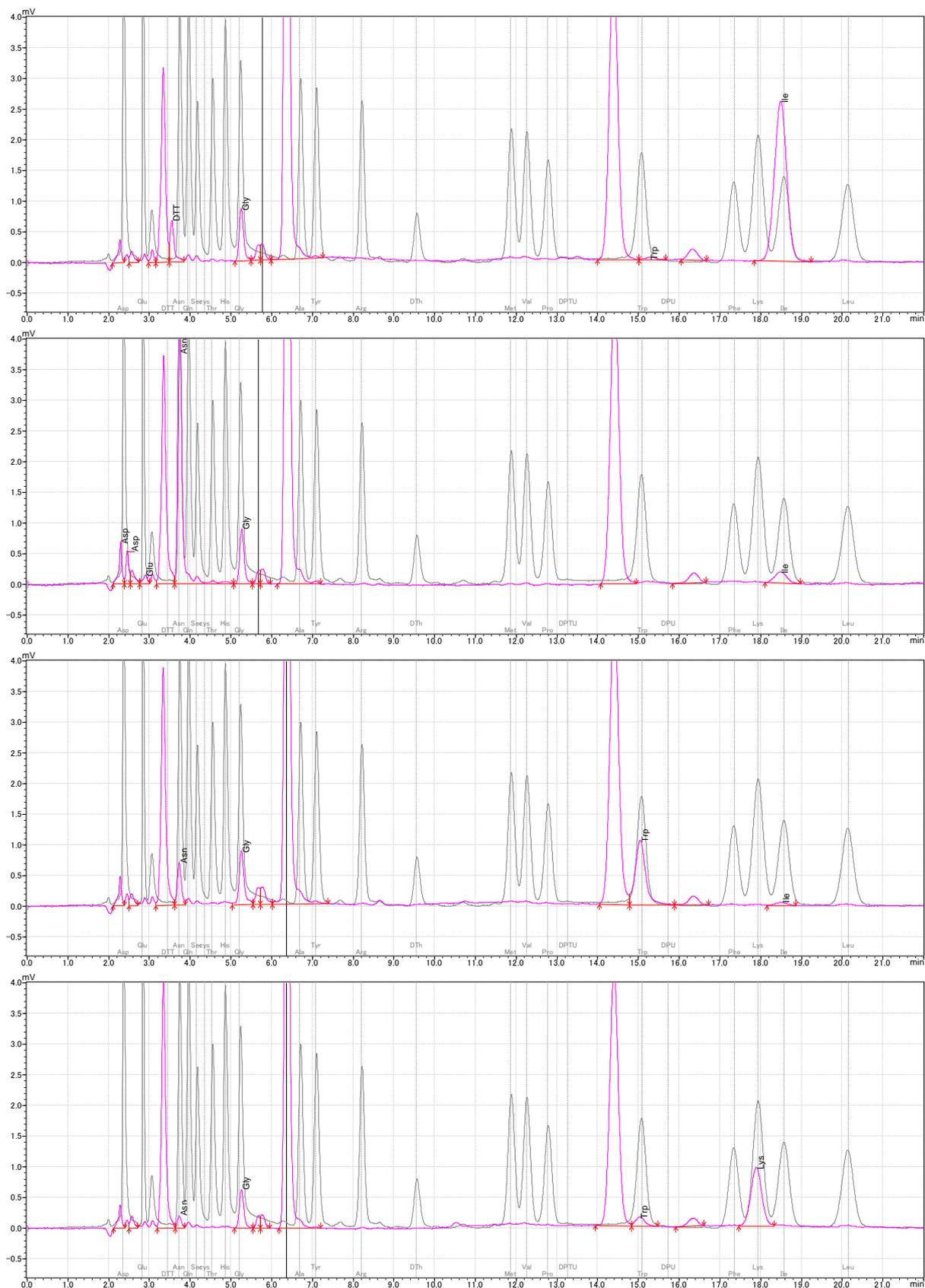


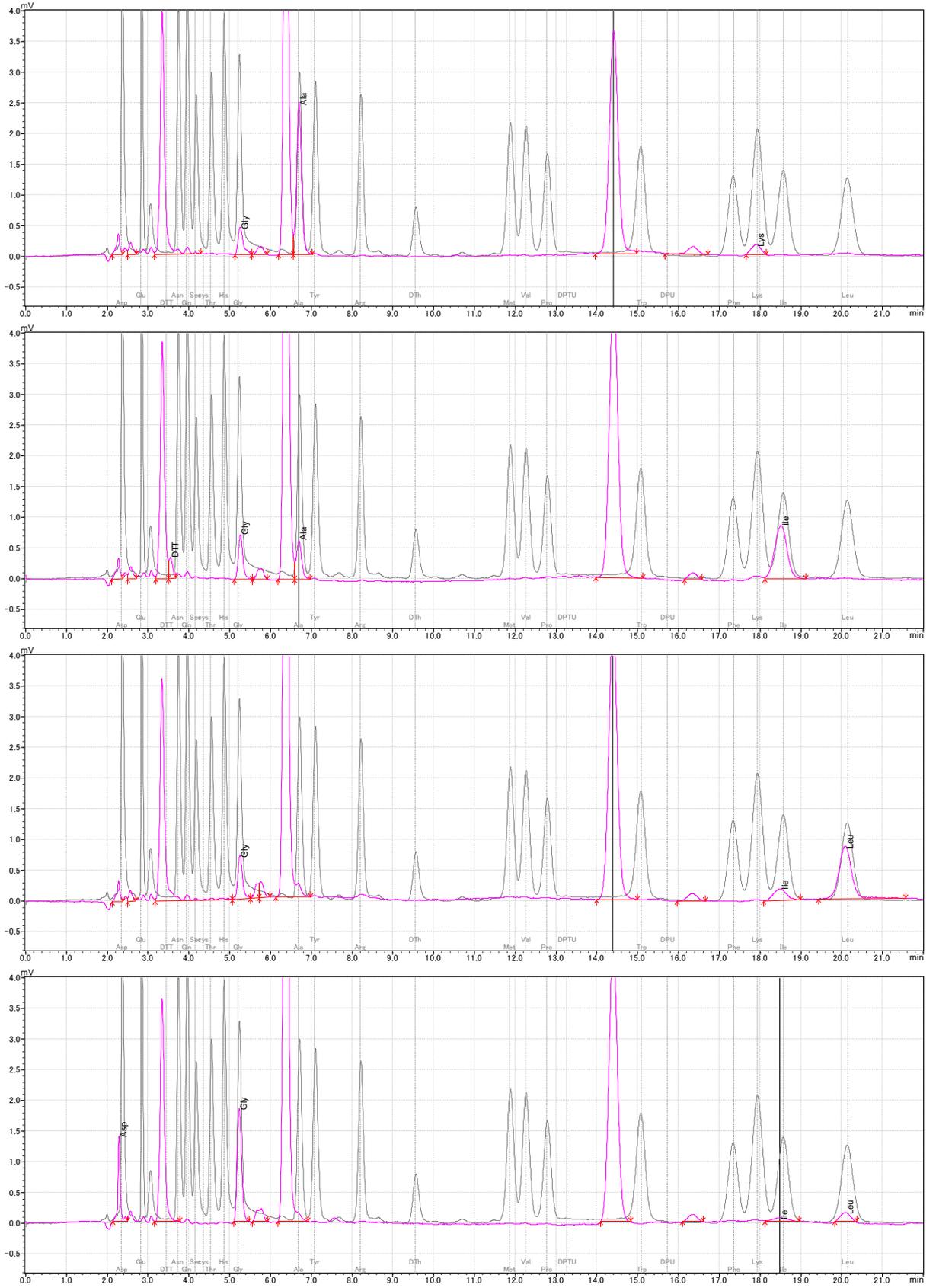


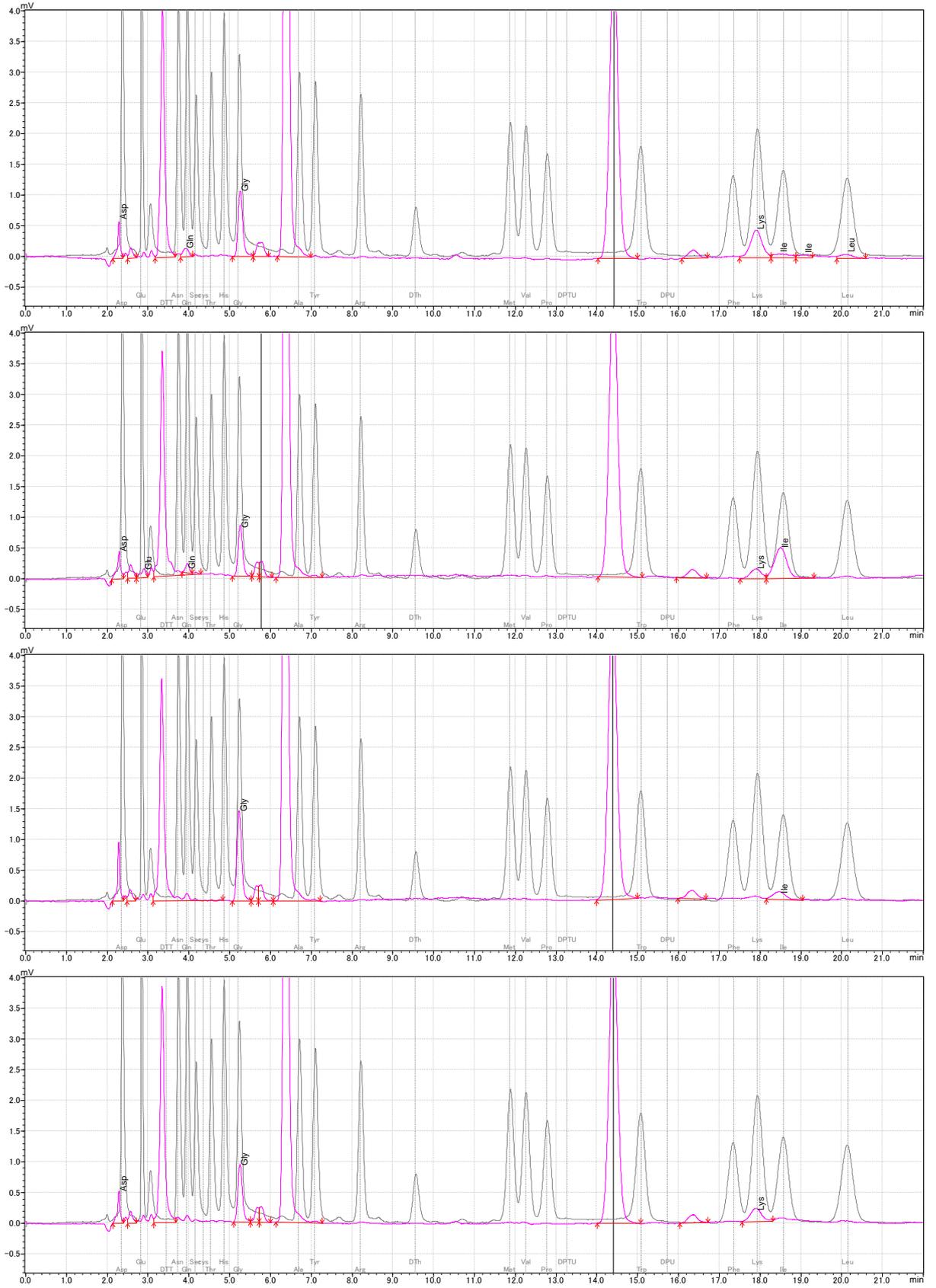


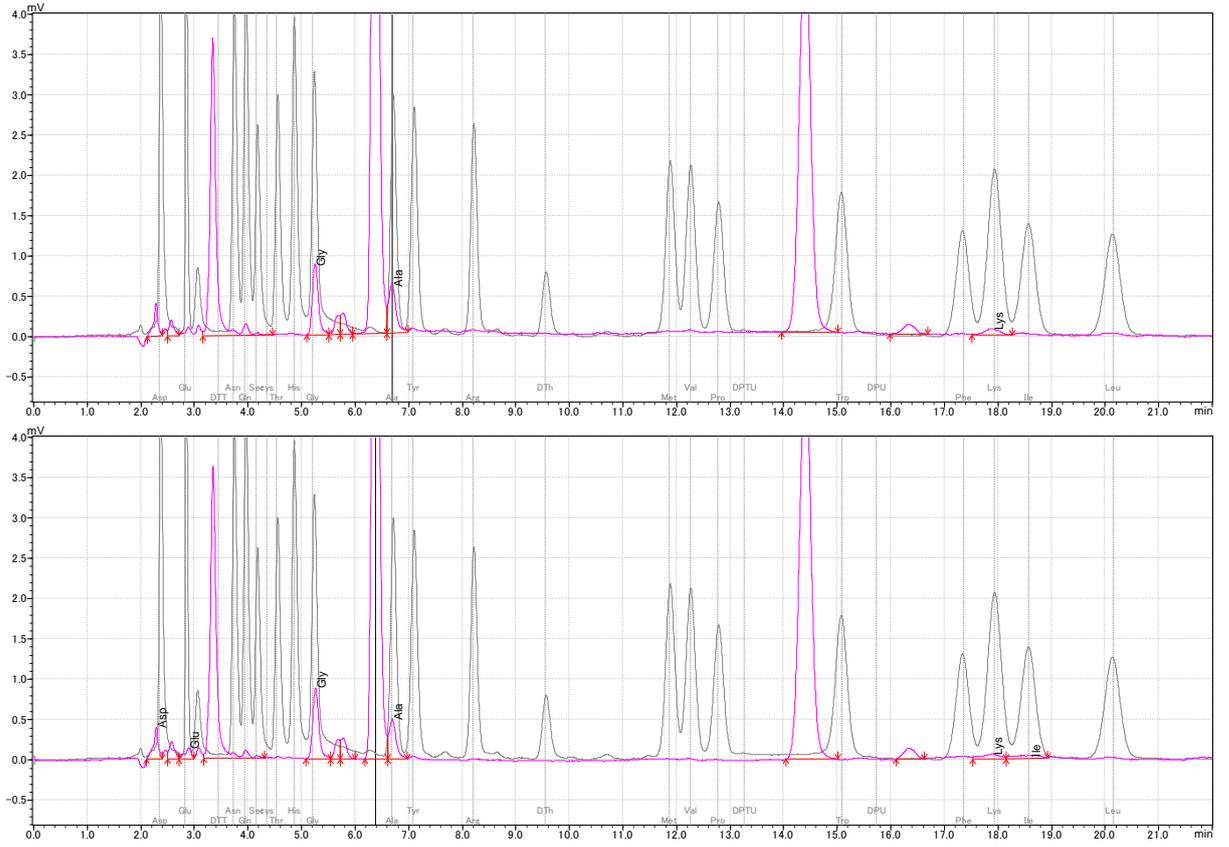


ANEXO K – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDEO COMMUNIS 16

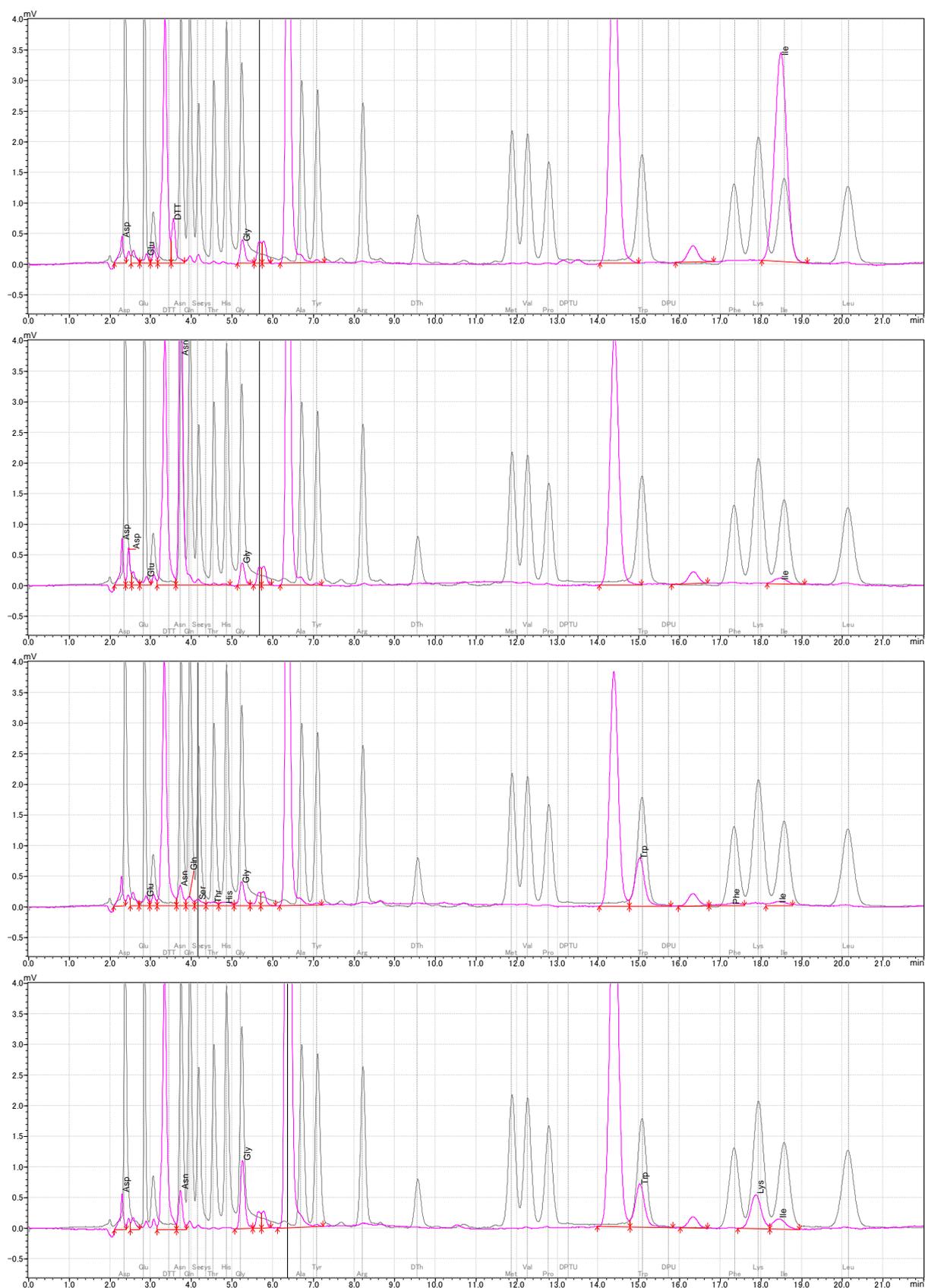


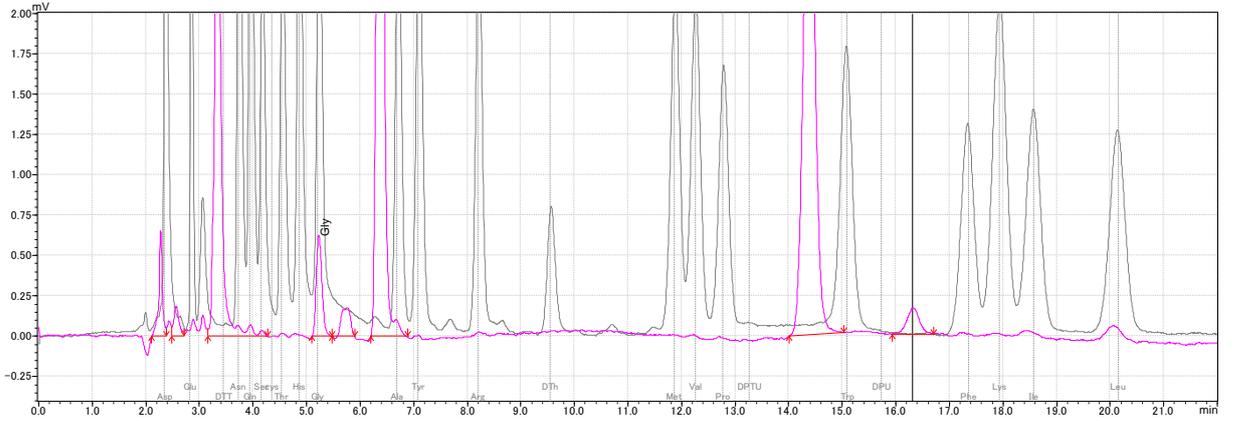
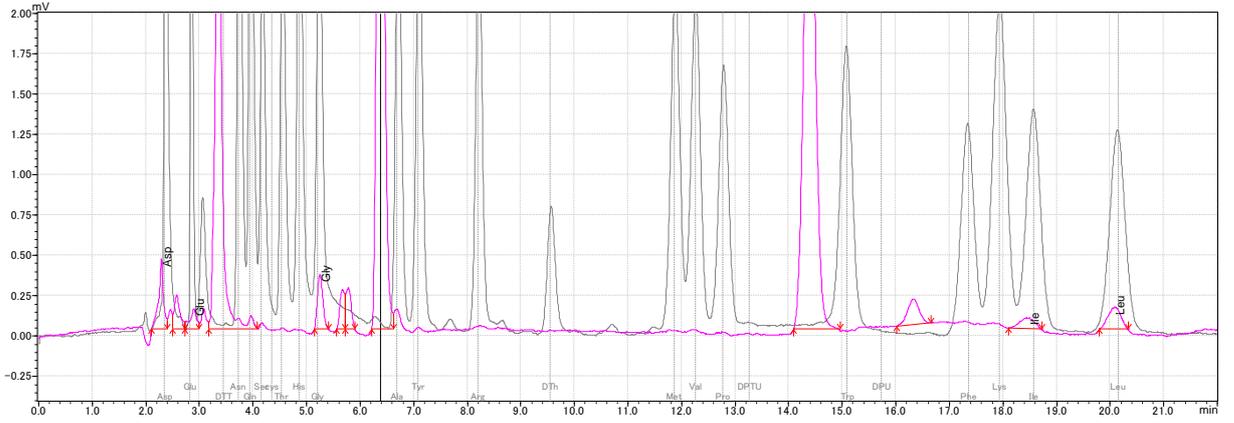
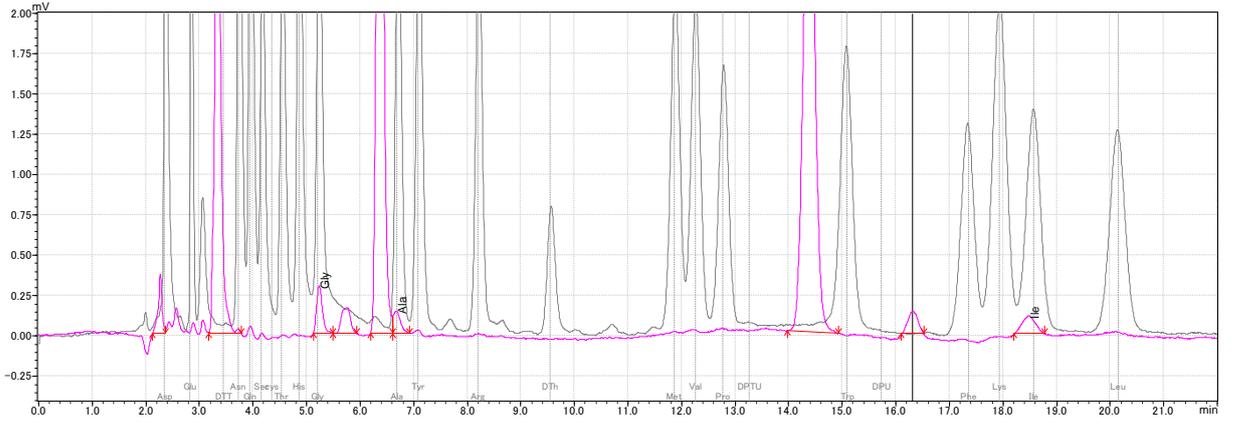
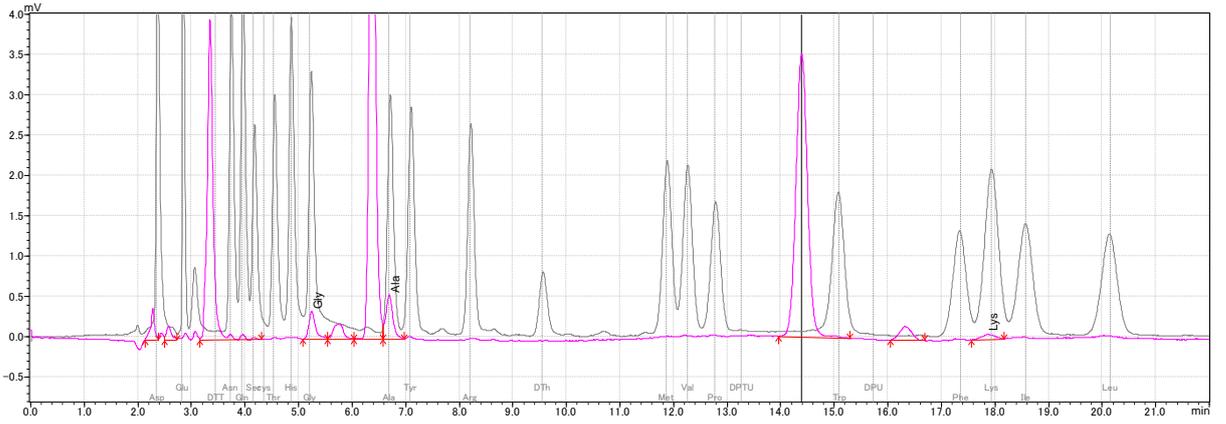


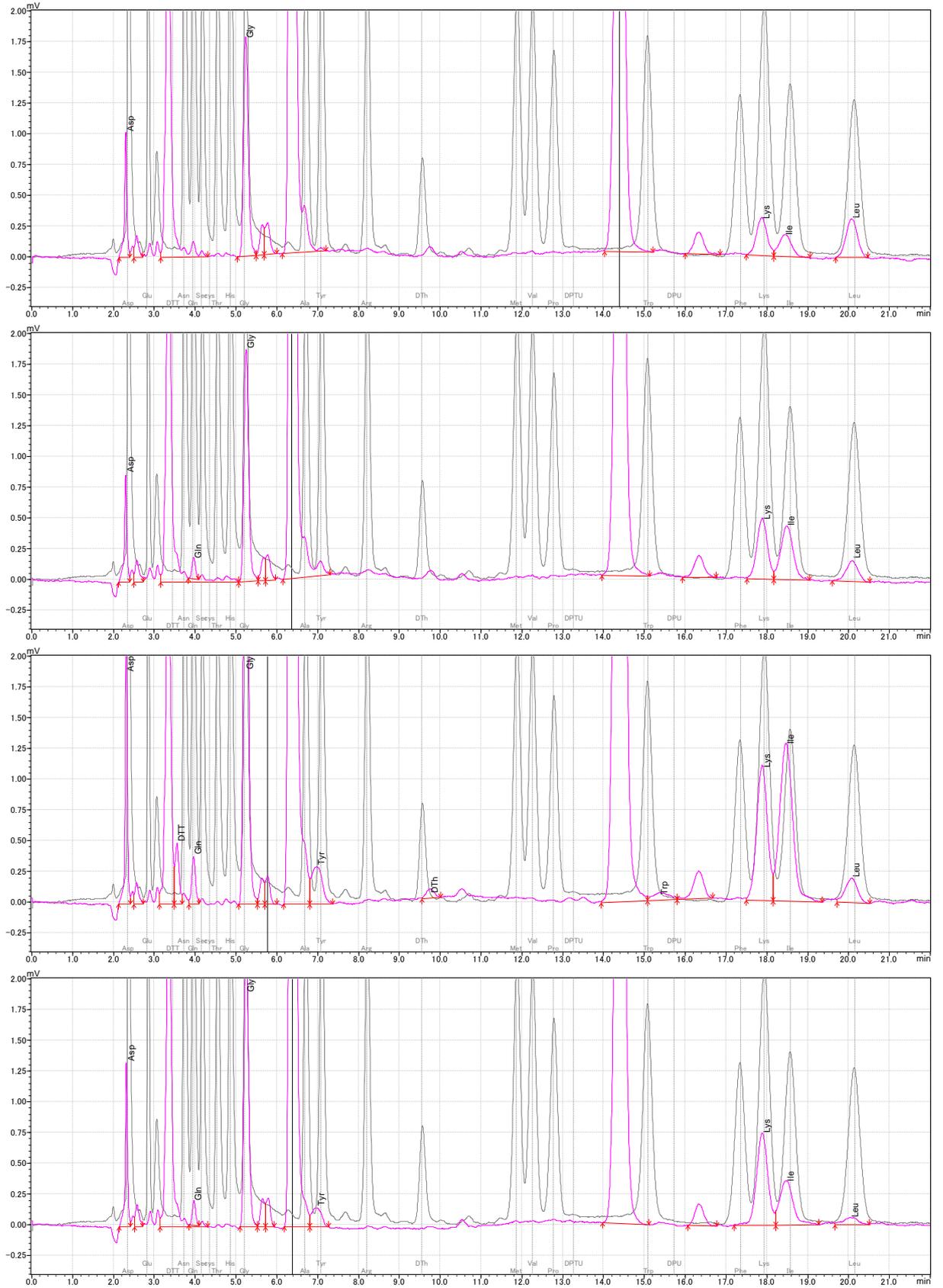


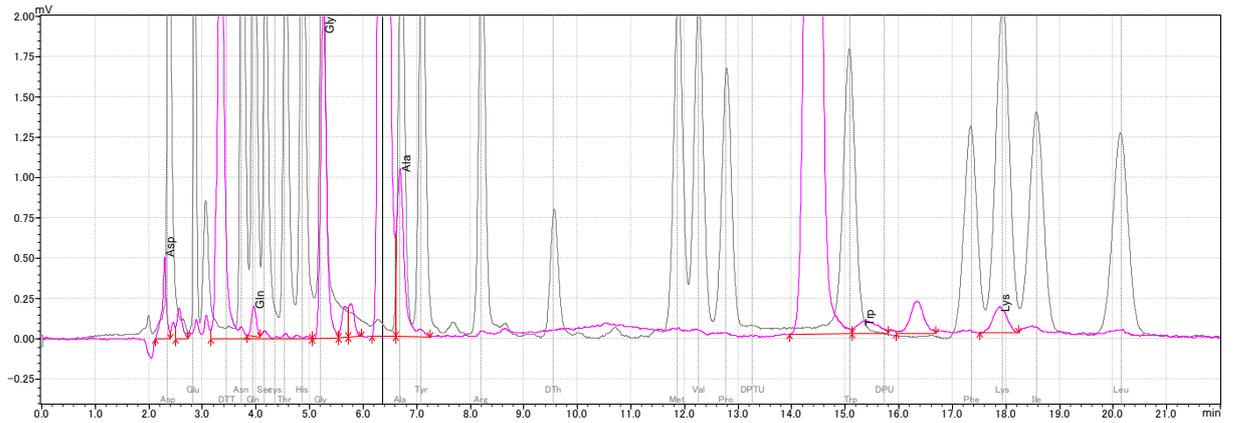
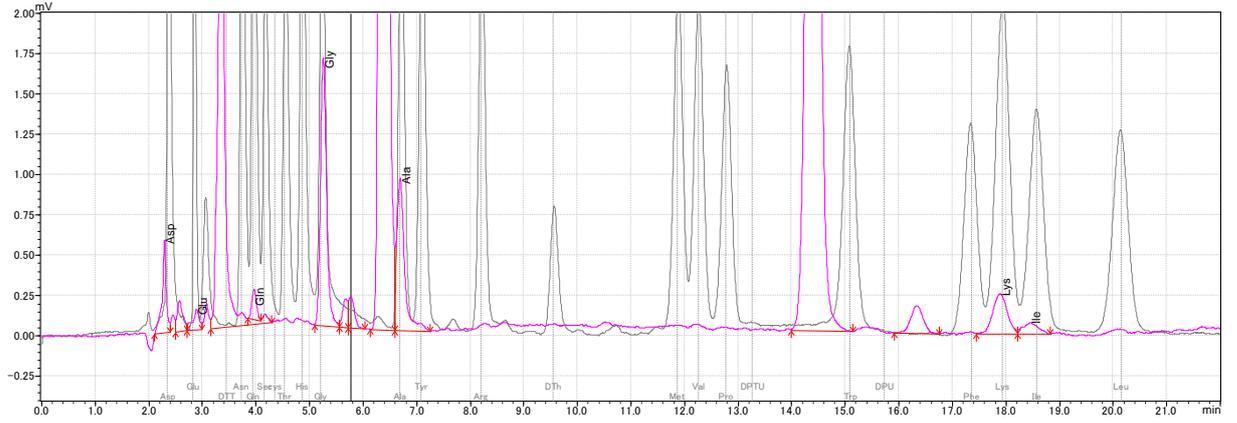
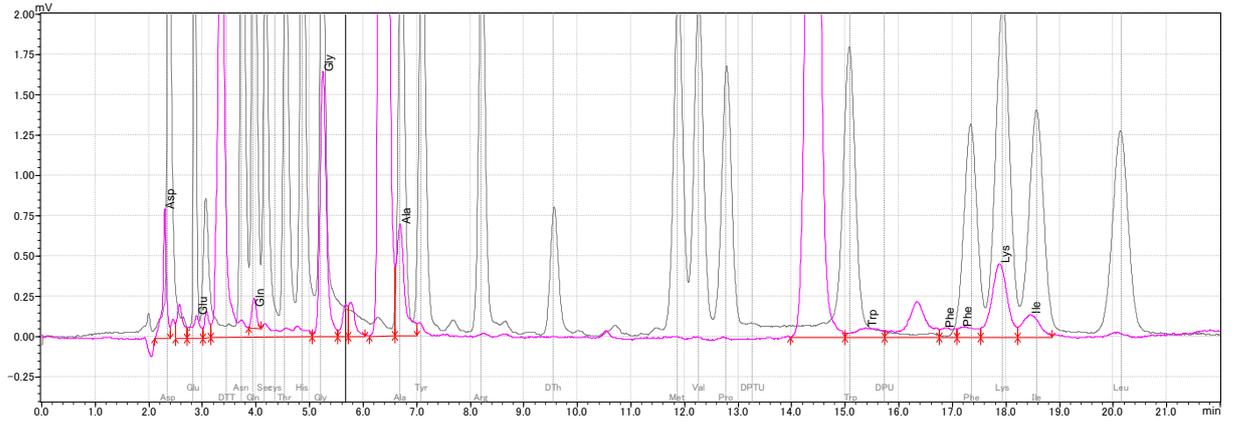


ANEXO L – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDEO COMMUNIS 18

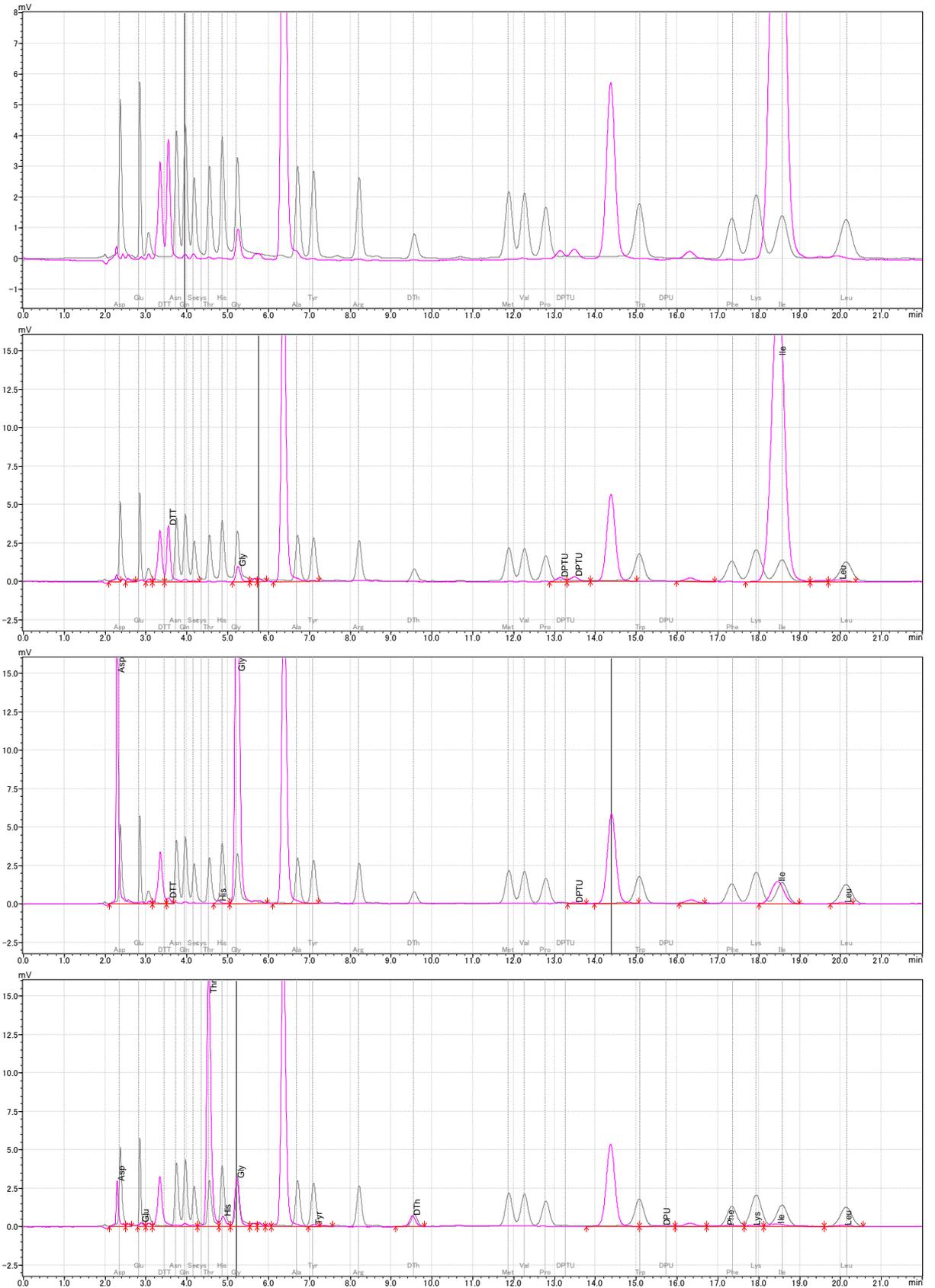


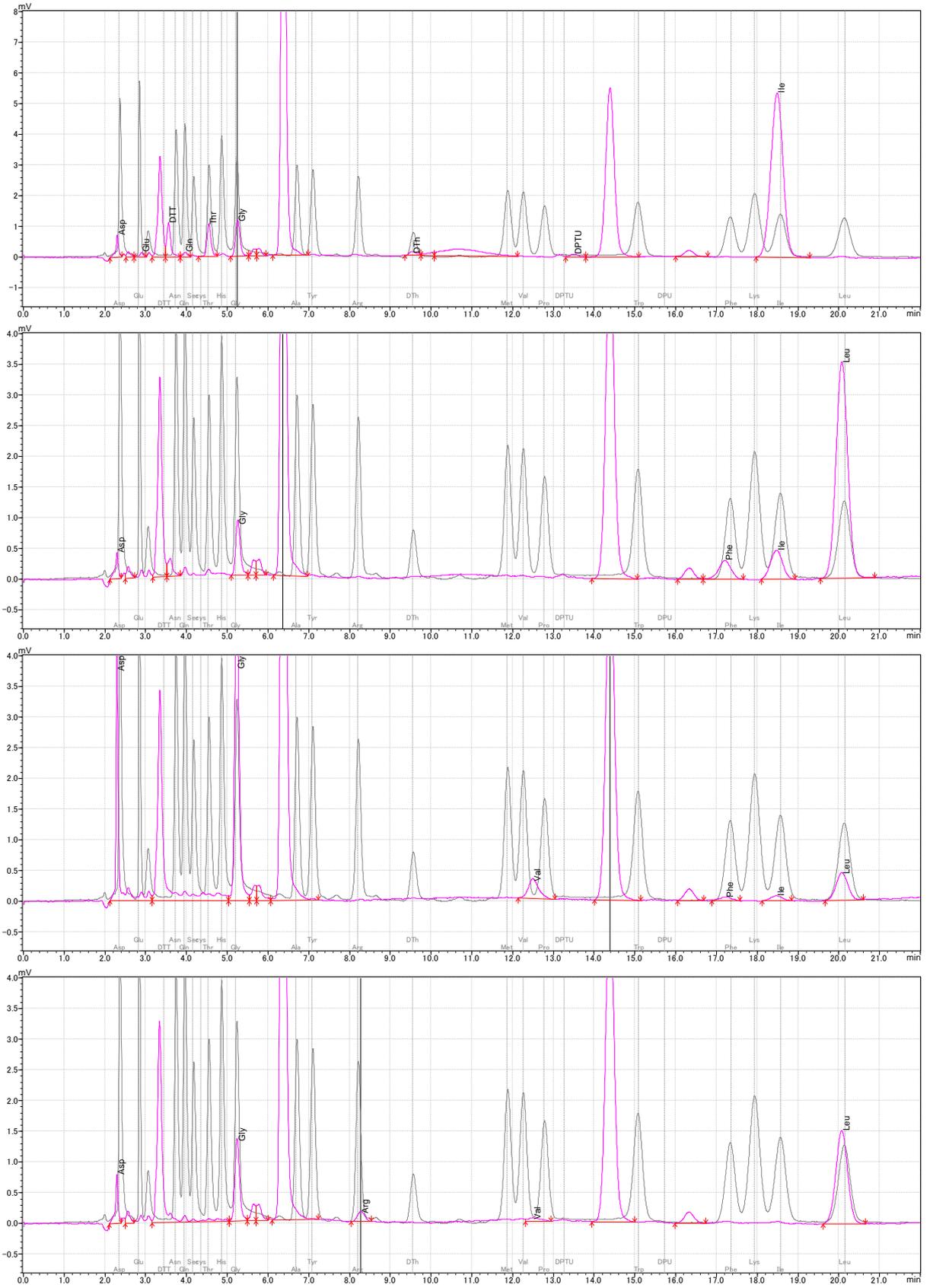


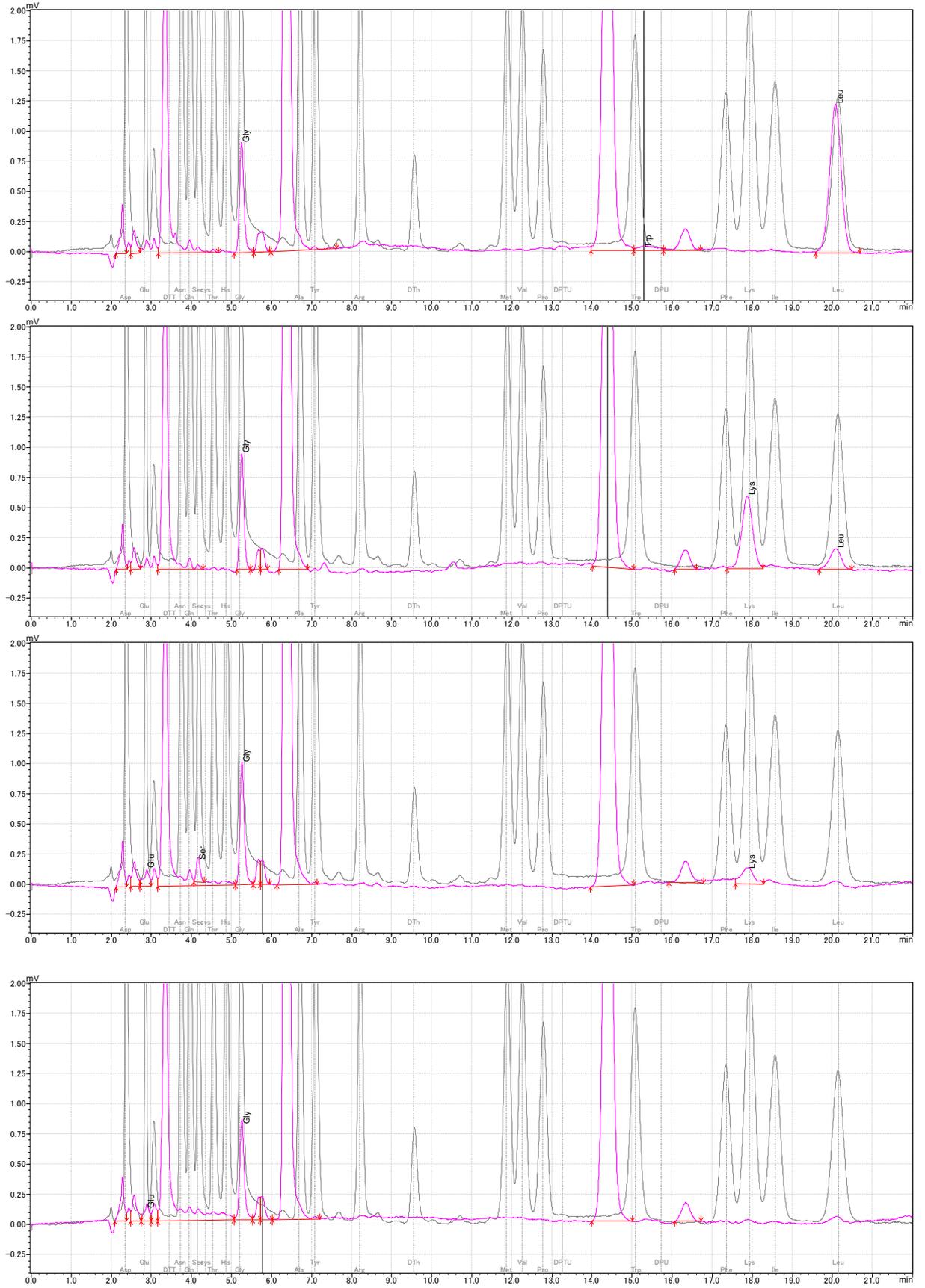




ANEXO M – DADOS OBTIDOS APÓS O PROCEDIMENTO DE DEGRADAÇÃO AUTOMÁTICA DE EDMAM PARA O PEPTIDEO COMMUNIS 19







ANEXO N – LAUDO DA ANÁLISE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO COMMUNIS 07 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



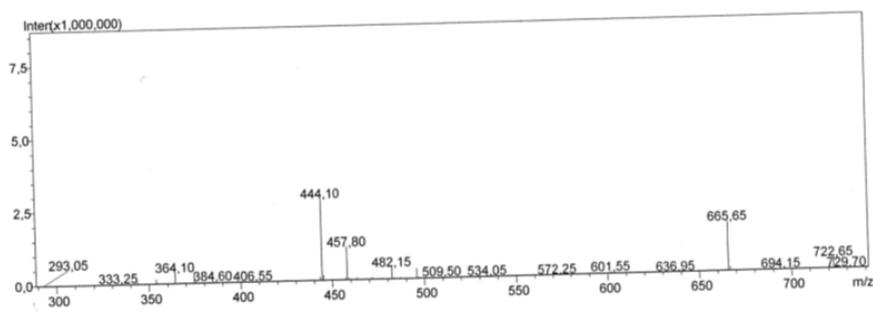
Análise por Espectrometria de Massas

KKRPPGFTPFR-NH₂ (Lote 16072)

Model: LCMS-2020
RF Gain: 5000
RF Offset: 5100
Mainrod Bias: +5,0 V
Conversion Dynode: +10,0 kV
Detector: -1,10 kV
PG: 0,0e+000 Pa
IG: 0,0e+000 Pa
DL Temp.: 150 C

Entrance Lens: +20,0 V
Interface: ESI
Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min
Drying Gas Flow: 15,00 L/min
Interface Bias: -3,50 kV
Interface Bias: -3,50 kV
Interface Current: 0,0 uA
Heat Block Temp.: 150 C

M = 1329,6
M+H = 1330,6
M+2H = 665,8
M+3H = 444,2
M+4H = 333,4



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152622

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179
www.aminotech.net.br; e-mail: vendas@aminotech.net.br

ANEXO O – LAUDO DA ANÁLISE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO COMMUNIS 11 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



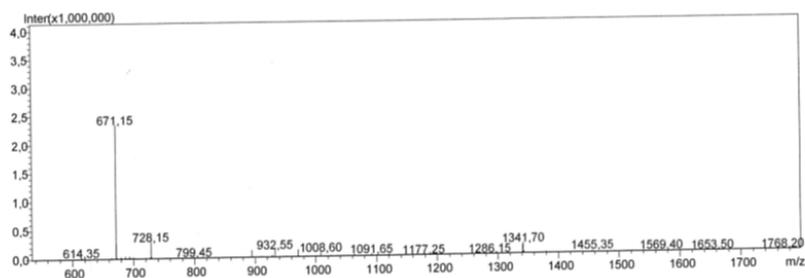
Análise por Espectrometria de Massas

INWKAILGKIGK-OH (Lote 16073)

Model: LCMS-2020
RF Gain: 5000
RF Offset: 5100
Mainrod Bias: +5,0 V
Conversion Dynode: +10,0 kV
Detector: -1,10 kV
PG: 0,0e+000 Pa
IG: 0,0e+000 Pa
DL Temp.: 150 C

Entrance Lens: +20,0 V
Interface: ESI
Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min
Drying Gas Flow: 15,00 L/min
Interface Bias: -3,50 kV
Interface Bias: -3,50 kV
Interface Current: 0,0 uA
Heat Block Temp.: 150 C

M = 1340,6
M+H = 1341,6
M+2H= 671,3
M+3H=447,9
M+4H= 269,1



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152822

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179
www.aminotech.net.br; e-mail: vendas@aminotech.net.br

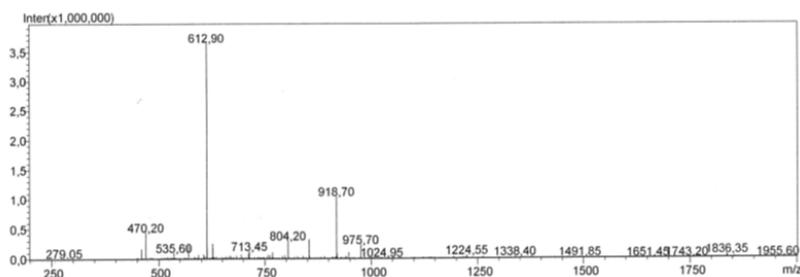
ANEXO P – LAUDO DA ANÁLISE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO COMMUNIS 18 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



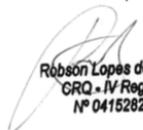
Análise por Espectrometria de Massas

INWKAILGKIGKAAAVAL-NH₂ (Lote 16074)

Model: LCMS-2020	Entrance Lens: +20,0 V	M = 1836,27
RF Gain: 5000	Interface: ESI	M+H = 1837,27
RF Offset: 5100	Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min	M+2H = 919,1
Mainrod Bias: +5,0 V	Drying Gas Flow: 15,00 L/min	M+3H = 613,1
Conversion Dynode: +10,0 kV	Interface Bias: -3,50 kV	M+4H = 460,1
Detector: -1,10 kV	Interface Bias: -3,50 kV	
PG: 0,0e+000 Pa	Interface Current: 0,0 uA	
IG: 0,0e+000 Pa	Heat Block Temp.: 150 C	
DL Temp.: 150 C		



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152822

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179
www.aminotech.net.br; e-mail: vendas@aminotech.net.br

ANEXO Q – LAUDO DA ANÁLISE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO COMMUNIS 19 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



Análise por Espectrometria de Massas

IIGTILGLLKSL-NH₂ (Lote 16075)

Model: LCMS-2020

RF Gain: 5000

RF Offset: 5100

Mainrod Bias: +5,0 V

Conversion Dynode: +10,0 kV

Detector: -1,10 kV

PG: 0,0e+000 Pa

IG: 0,0e+000 Pa

DL Temp.: 150 C

Entrance Lens: +20,0 V

Interface: ESI

Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min

Drying Gas Flow: 15,00 L/min

Interface Bias: -3,50 kV

Interface Bias: -3,50 kV

Interface Current: 0,0 uA

Heat Block Temp.: 150 C

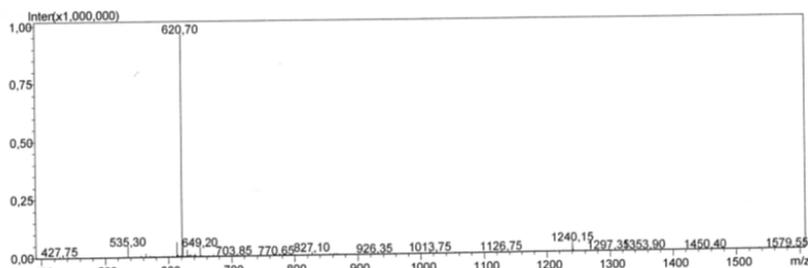
M = 1239,5

M+H = 1240,5

M+2H = 620,8

M+3H = 414,2

M+4H = 310,9



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152822

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

Av. Das Ameixeiras, 921- sala 2 - Diadema - São Paulo - SP CEP: 09940-400. Telefone: (11) 3798-8179
www.aminotech.net.br; e-mail: vendas@aminotech.net.br

ANEXO R – ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO

Toxins 2015, 7, 3179-3209; doi:10.3390/toxins7083179

OPEN ACCESS

toxins

ISSN 2072-6651

www.mdpi.com/journal/toxins

Review

Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools

Juliana Silva, Victoria Monge-Fuentes, Flávia Gomes, Kamila Lopes, Lilian dos Anjos, Gabriel Campos, Claudia Arenas, Andréia Biolchi, Jacqueline Gonçalves, Priscilla Galante, Leandro Campos and Márcia Mortari *

Neuropharmacology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil; E-Mails: ju.castroesilva@gmail.com (J.S.); victoriananobio@gmail.com (V.M.-F.); flavia.medeiros@hotmail.com (F.G.); kamila_farm@yahoo.com.br (K.L.); lilian.dosanjos@gmail.com (L.A.); gabriel_avohay@hotmail.com (G.C.); clauji55@gmail.com (C.A.); andreia.biolchi@gmail.com (A.B.); jacq.coimbra@gmail.com (J.G.); prigalante@yahoo.com.br (P.G.); leandro.ambrosio@gmail.com (L.C.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mmortari@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3123; Fax: +55-61-3107-2904.

Academic Editor: Sokcheon Pak

Received: 15 May 2015 / Accepted: 5 August 2015 / Published: 18 August 2015

Abstract: Neurodegenerative diseases are relentlessly progressive, severely impacting affected patients, families and society as a whole. Increased life expectancy has made these diseases more common worldwide. Unfortunately, available drugs have insufficient therapeutic effects on many subtypes of these intractable diseases, and adverse effects hamper continued treatment. Wasp and bee venoms and their components are potential means of managing or reducing these effects and provide new alternatives for the control of neurodegenerative diseases. These venoms and their components are well-known and irrefutable sources of neuroprotectors or neuromodulators. In this respect, the present study reviews our current understanding of the mechanisms of action and future prospects regarding the use of new drugs derived from wasp and bee venom in the treatment of major neurodegenerative disorders, including Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, Epilepsy, Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis.

REVIEW

Open Access



Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders

Victoria Monge-Fuentes, Flávia Maria Medeiros Gomes, Gabriel Avohay Alves Campos, Juliana de Castro Silva, Andréia Mayer Biolchi, Lilian Carneiro dos Anjos, Jacqueline Coimbra Gonçalves, Kamila Soares Lopes and Márcia Renata Mortari*

Abstract

The impact of neurological disorders in society is growing with alarming estimations for an incidence increase in the next decades. These disorders are generally chronic and can affect individuals early during productive life, imposing real limitations on the performance of their social roles. Patients can have their independence, autonomy, freedom, self-image, and self-confidence affected. In spite of their availability, drugs for the treatment of these disorders are commonly associated with side effects, which can vary in frequency and severity. Currently, no effective cure is known. Nowadays, the biopharmaceutical research community widely recognizes arthropod venoms as a rich source of bioactive compounds, providing a plethora of possibilities for the discovery of new neuroactive compounds, opening up novel and attractive opportunities in this field. Several identified molecules with a neuropharmacological profile can act in the central nervous system on different neuronal targets, rendering them useful tools for the study of neurological disorders. In this context, this review aims to describe the current main compounds extracted from arthropod venoms for the treatment of five major existing neurological disorders: stroke, Alzheimer's disease, epilepsy, Parkinson's disease, and pathological anxiety.

Introduction

Important ecological advantages are conferred to a diverse range of animals that evolved a finely tuned venom system adapted for predation, defense, and competitor deterrence purposes. From the evolutionary point of view, the prey-predator relationship applies constant selection pressure on toxin efficacy by demanding high specificity and potency for their molecular targets, primarily in the cardiovascular and nervous systems. These features are not commonly found in other natural or synthetic small molecules, making animal toxins extremely valuable as pharmacological tools [1, 2]. Nowadays, many major pharmaceutical companies develop venom-based drug discovery programs or use venom-derived molecules for target validation. Furthermore,

there are now several companies focusing on venom-derived therapeutics [2].

A series of venom-derived peptides and proteins are currently in preclinical development while some others are undergoing clinical trials for their applications in the treatment of cancer, chronic pain, congestive heart failure, epilepsy, myocardial infarction, stroke, and multiple sclerosis [1-3]. Six medications obtained from venom proteins and derivatives – namely captopril (Capoten®), eptifibatid (Integrilin®), tirofiban (Aggrastat®), bivalirudin (Angiomax®), ziconitid (Prialt®), and exenatid (Byetta®) – have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), targeting hypertension, acute coronary syndromes, coagulation during surgery, chronic pain, and type 2 diabetes [3]. Nevertheless, novel technologies (*i.e.*: proteomics approach) have become key components for bioprospecting, unveiling new molecular components in venoms that provide blueprints to treat a wider variety of disorders, such as neurological diseases [4].

* Correspondence: mmortari@unib.br
 Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiological Sciences,
 Institute of Biological Sciences, University of Brasília, DF, CEP 70.910-900,
 Brasília, Brazil





Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Characterization of two peptides isolated from the venom of social wasp *Chartergellus communis* (Hymenoptera: Vespidae): Influence of multiple alanine residues and C-terminal amidation on biological effects



Kamila Soares Lopes^a, Gabriel Avohay Alves Campos^a, Luana Cristina Camargo^a, Adolfo Carlos Barros de Souza^a, Beatriz Vasconcelos Ibituruna^a, Ana Carolina Martins Magalhães^a, Lucas Ferreira da Rocha^a, Alessa Bembom Garcia^a, Mosar Correa Rodrigues^a, Dagon Manoel Ribeiro^a, Michelle Cruz Costa^a, Manuel Humberto Mera López^a, Luciana Marangni Nolli^a, Fernando Zamudio-Zuniga^b, Lourival Domingos Possani^b, Elisabeth Ferroni Schwartz^a, Márcia Renata Mortari^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

^b Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Algisia
Edema
Hemolysis
Multiple alanine residues
Peptide
Wasp venom

ABSTRACT

Chartergellus communis is a wasp species endemic to the neotropical region and its venom constituents have never been described. In this study, two peptides from *C. communis* venom, denominated Communis and Communis-AAAA, were chemically and biologically characterized. In respect to the chemical characterization, the following amino acid sequences and molecular masses were identified:

Communis: Ile-Asn-Trp-Lys-Ala-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Gly-Lys-COOH (1340.9 Da)

Communis-AAAA: Ile-Asn-Trp-Lys-Ala-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Val-Xle-NH₂ (1836.3 Da).

Furthermore, their biological effects were compared, accounting for the differences in structural characteristics between the two peptides. To this end, three biological assays were performed in order to evaluate the hyperalgesic, edematogenic and hemolytic effects of these molecules. Communis-AAAA, unlike Communis, showed a potent hemolytic activity with EC₅₀ = 142.6 μM. Moreover, the highest dose of Communis-AAAA (2nmol/animal) induced hyperalgesia in mice. On the other hand, Communis (10nmol/animal) was able to induce edema but did not present hemolytic or hyperalgesic activity. Although both peptides have similarities in linear structures, we demonstrated the distinct biological effects of Communis and Communis-AAAA. This is the first study with *Chartergellus communis* venom, and both Communis and Communis-AAAA are unpublished peptides.

1. Introduction

The insects belonging to the Hymenoptera order are included in the families Apidae (bees), Vespidae (wasps, hornets and yellow jackets) and Formicidae (ants), and all of them are capable of producing and injecting their venoms using a inoculator apparatus [1,2].

Venoms from wasps are known to contain a cocktail of diversified compounds, which are able to cause a variety of biological manifestations in the human organism after stinging [3]. The main molecules that were identified are proteic compounds, such as allergens, enzymes and bioactive peptides, and other compounds with low molecular masses,

such as biogenic amines and amino acids.

These components have been linked directly and indirectly to several responses, such as failure of kidney and liver, myotoxicity, neurotoxicity and vasoactive properties, which may cause intravascular hemolysis, rhabdomyolysis and death [4,5].

In respect to peptides, the mastoparans are among the better characterized compounds in this venom. They were first described in the wasp *Vespa lewisii*, and the name refers to the first target description, mastocytes [6,7]. A remarkable feature of these molecules is their size, since they have an average of 14 amino acids, and the presence of residues of lysine [8]. They are able to exert many effects on biological

* Corresponding author. Present address: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, CEP: 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

E-mail addresses: mmortari@unb.br, mamortari@gmail.com (M.R. Mortari).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.012>

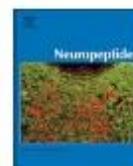
Received 10 May 2017; Received in revised form 7 July 2017; Accepted 21 July 2017
Available online 25 July 2017

0196-9781/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropeptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/npep

News and reviews

Peptides isolated from animal venom as a platform for new therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease



L.C. Camargo, G.A.A. Campos, P. Galante, A.M. Biolchi, J.C. Gonçalves, K.S. Lopes, M.R. Mortari*

Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease
Memory
Peptides
Venom
Neuroprotection
Treatment

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that deeply affects patients, their family and society. Although scientists have made intense efforts in seeking the cure for AD, no drug available today is able to stop AD progression. In this context, compounds isolated from animal venom are potentially successful drugs for neuroprotection, since they selectively bind to nervous system targets. In this review, we presented different studies using peptides isolated from animal venom for the treatment of AD. This is a growing field that will be very helpful in understanding and even curing neurodegenerative diseases, especially AD.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia among adults. Learning and memory impairments occur due to progressive synaptic loss, as well as neuronal death. Alois Alzheimer described neuritic plaques and neurofibrillary tangles in a post-mortem patient's brain for the first time in 1906. Since then, many studies have demonstrated that those protein aggregations are responsible for the neurodegeneration in AD (Goedert and Spillantini, 2006).

According to the latest World Alzheimer Report (2015), the world's elderly (over 60) population is increasing; therefore, the prevalence of chronic diseases, especially dementia, also accompanies this increase. Nowadays, 46.8 million (2015) people have dementia, and projections demonstrate that this population will increase 60% (74.7 million) and 181% (131.5 million) worldwide, from 2015 to 2030 and 2015–2050, respectively. In addition, the incidence of dementia increases through the years passed. At 60–64 years old, the incidence is 3 per 1000 people, increasing to 175 per 1000 in people over 95 years old (Prince et al., 2015).

The diagnosis of AD is only confirmed post-mortem, although some modern techniques like MRI, PET-scan of amyloid- β and PET-FDG can correlate the pathognomonic alterations with AD diagnosis. Three stages are considered in AD: Pre-clinical, Mild Cognitive Impairment (MCI) and Dementia stages. (Hyman et al., 2012).

The pre-clinical stage is characterized by the initial presence of neuritic plaques and neurofibrillary tangles but with a lack of clinical signs. This stage demonstrates that AD begins its development years

before the first symptoms. Therefore, the improvement of the techniques mentioned above is essential for detecting this stage (Blennow et al., 2015; Sperling et al., 2011). A recent study was able to correlate neuritic plaque load with cognition impairment in AD patients (Donohue et al., 2017). MCI is the first stage at which initial signs can be diagnosed, such as episodic memory lapses (Selkoe, 2003). This stage is very useful for the diagnosis of AD (Petersen, 2011; Petersen et al., 2009). The last stage is dementia, in which there is a progressive and inexorable cognition loss; also, there is non-cognitive loss, such as emotional alterations. The disease progresses with motor deficits until the patient is completely dependent and needs constant care. According to medical reports, since AD induces morbidity, including swallowing impairment, weight loss and the decrease of immune functions, the patient usually dies from respiratory dysfunction, especially bronchopneumonia due to infections (Brunnström and Englund, 2009). Also, in comparison with other conditions, elderly people with AD die earlier than elderly people without AD, so the disease causes death as well (Alzheimer's Association, 2014).

2. Animal venom peptides

Animal venoms are considered good candidates for new drug development in neurodegenerative diseases. Venom compounds were selected to be very specific to their targets through the time course of evolution (Monge-Fuentes et al., 2015; Silva et al., 2015). In this review, we consider some peptides isolated from animal venom, which could be potential drugs for AD (Barage and Sonawane, 2015),

* Corresponding author at: Laboratory of Neuropharmacology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília DF 70910-900, Brazil.

E-mail address: mmortari@unb.br (M.R. Mortari).

<https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.010>

Received 3 August 2017; Received in revised form 9 November 2017; Accepted 23 November 2017

Available online 28 November 2017

0143-4179/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.