



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LÍVIA CORREIA FERNANDES PAES

**EFEITO ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO
LS9 SOBRE MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

FORTALEZA
2017

LÍVIA CORREIA FERNANDES PAES

**EFEITO ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO
LS9 SOBRE MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação de Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P144e Paes, Livia Correia Fernandes.
Efeito anticonvulsivante e antioxidante do peptídeo sintético LS9 em modelo de
convulsão induzido pelo pentilenotetrazol / Livia Correia Fernandes Paes. – 2017.
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martina.

1. Dinoponera quadriceps. 2. Convulsão. 3. Pentilenotetrazol. 4. Astrócitos. I. Título.

CDD 615.1

LÍVIA CORREIA FERNANDES PAES

**EFEITO ANTICONVULSIVANTE E ANTIOXIDANTE DO PEPTÍDEO SINTÉTICO
LS9 SOBRE MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação de Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista
Universidade Federal do Ceará – UFC

“A persistência é o caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e iluminar meu caminho todos os dias da minha vida, ajudando a superar os obstáculos enfrentados nesta caminhada árdua e gratificante.

Aos meus pais, Miguel e Luzineide, que sempre acreditaram em mim e me deram o suporte necessário para a realização desse sonho, dando-me sempre força e coragem, ajudando a erguer a cabeça nas horas difíceis e comemorando comigo a cada vitória conquistada.

Ao meu marido Nícolas e filho Kaike, pelo apoio incondicional, pela paciência e companheirismo durante toda a caminhada e por compreender momentos de ausência.

Aos meus irmãos, Luma e Marcelo, pelo apoio e ajuda em todos os momentos em que precisei e aos constantes incentivos para a conquista do sucesso almejado.

Aos meus sogros, Simone e Nejúber, que torcem pelo meu sucesso e me incentivam para que eu possa realizar meus sonhos.

À professora Dra. Alice Costa Martins, pela orientação, confiança e paciência, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do LNDDT, em especial a Dânya Bandeira, Gabriela Moreira, Mariana Maciel e Tiago Sampaio, pela ajuda e ensinamentos diários ao longo desses anos.

À professora Dra. Marta Maria de França Fonteles, pelo suporte e confiança à nossa pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia. A ajuda de vocês foi de extrema importância na execução dessa pesquisa, em especial Mariana Lima Feitosa, Daniel Moreira e Tiago Valentim, muito obrigada.

Ao professor Dr. Gandhi Rádis Baptista, por gentilmente ter cedido a substância do estudo.

À banca examinadora, pelo aceite ao convite.

RESUMO

Compostos naturais tem sido utilizado como fontes de novas moléculas com atuação no sistema nervoso central. Recentemente nosso grupo de pesquisa observou a ação anticonvulsivante do veneno da formiga *Dinoponera quadriciceps* em modelo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ). Com o intuito de descobrir quais moléculas presentes no veneno são responsáveis pelo efeito mencionado, o peptídeo Dq-Fa, componente natural encontrado no veneno da formiga *Dinoponera quadriciceps*, foi sintetizado, intitulado de LS9, e utilizado no presente estudo em modelo de convulsão induzido por PTZ e sobre cultura de astrócitos *in vitro*. Camundongos Swiss machos (28-33g) foram pré-tratados com o LS9 (0,1; 0,2 ou 0,4 mg/kg, i.p., n= 6-8). Meia hora após o pré-tratamento foi induzida a convulsão em todos os animais através da administração de PTZ (80 mg/kg). Na análise comportamental, foram registrados os tempos para ocorrência da primeira convulsão e tempo de morte. Para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo foram utilizadas três áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) e mensurado os níveis de malondialdeído (MDA), o conteúdo de nitrito e nível de glutathiona reduzida (GSH). No ensaio *in vitro*, foi determinada a viabilidade celular de astrócitos corticais, após o tratamento com diferentes concentrações de LS9 ou LS9 + PTZ, durante 24 horas, pelo método do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H). Os dados foram analisados por ANOVA e Student-Newman-Keuls como pós-teste, para os ensaios *in vivo*, e ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, para as experimentações *in vitro*. Os resultados comportamentais encontrados mostraram que todas as concentrações analisadas do peptídeo foram capazes de aumentar a latência para a ocorrência da primeira convulsão, sendo que a concentração de 0,2mg/kg aumentou, significativamente, o período de latência de morte. Houve diminuição dos níveis de MDA no córtex pré-frontal (nas concentrações 0,1 e 0,2mg/kg), hipocampo (na concentração de 0,1mg/kg) e corpo estriado (em todas as concentrações analisadas). Todas as concentrações testadas foram capazes de diminuir, significativamente, a formação de nitrito no córtex pré-frontal. No hipocampo e no corpo estriado o efeito foi semelhante, porém não em todas as concentrações. Na concentração de 0,2mg/kg, houve aumento dos níveis de GSH no córtex pré-frontal, as concentrações de 0,1 e 0,2mg/kg promoveram aumento no corpo estriado e não houve alteração no hipocampo. No ensaio *in vitro*, os resultados mostram que esse peptídeo não foi capaz de diminuir a viabilidade de astrócitos corticais e não promoveu alteração da viabilidade celular quando associado com PTZ. Nossos achados demonstram que o peptídeo sintético LS9 promoveu efeito anticonvulsivante, diminuiu a produção de peroxidação lipídica e nitrito e aumentou GSH. Além disso, não foi capaz de alterar a viabilidade celular em cultura de astrócitos corticais *in vitro*, não demonstrando efeito tóxico nessa linhagem celular.

Palavras-chave: *Dinoponera quadriciceps*, convulsão, pentilenotetrazol, astrócitos.

ANTICONVULSIVANT AND ANTIOXIDANT EFFECT OF SYNTHETIC PEPTIDE LS9 ON PENTYLENETETRAZOLE INDUCED MODEL OF CONVULSION

Natural compounds have been used as sources of new molecules acting in the central nervous system. Recently our research group observed the anticonvulsant action of ant venom *Dinoponera quadriceps* in model of seizure induced by pentylenetetrazole (PTZ). In order to find out which molecules present in the venom are responsible for the mentioned effect, the peptide Dq-Fa, a natural component found in the venom of the *Dinoponera quadriceps* ant, was synthesized, titled LS9, and used in the present study in a model of convulsion induced by PTZ and on astrocyte culture *in vitro*. Male Swiss mice (28-33g) were pretreated with LS9 (0.1, 0.2 or 0.4 mg / kg, i.p., n = 6-8). Half an hour after pretreatment, seizure was induced in all animals by administration of PTZ (80 mg / kg). In the behavioral analysis, the times for the occurrence of the first seizure and time of death were recorded. To determine the parameters of oxidative stress, three cerebral areas (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) were used and malondialdehyde (MDA), nitrite content and reduced glutathione levels (GSH) were measured. In the *in vitro* assay, the cell viability of cortical astrocytes was determined after treatment with different concentrations of LS9 or LS9 + PTZ for 24 hours by the MTT method (3-(4,5-dimethyl-2-thiazole bromide)-2, 5-diphenyl-2-H). The data were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls as a post-test, for the *in vivo* tests, and ANOVA followed by the Bonferroni post-test, for the *in vitro* experiments. The behavioral results found showed that all the analyzed concentrations of the peptide were able to increase the latency for the first seizure, with a concentration of 0.2 mg / kg significantly increased the latency period of death. There was a decrease in MDA levels in the prefrontal cortex (0.1 and 0.2 mg / kg concentrations), hippocampus (0.1 mg / kg concentration) and striatum (in all concentrations analyzed). All concentrations tested were able to significantly decrease the formation of nitrite in the prefrontal cortex. In the hippocampus and striatum the effect was similar, but not at all concentrations. At concentrations of 0.2 mg / kg, there was an increase in GSH levels in the prefrontal cortex, concentrations of 0.1 and 0.2 mg / kg promoted an increase in the striatum and there was no change in the hippocampus. In the *in vitro* assay, the results show that this peptide was not able to decrease the viability of cortical astrocytes and did not promote alteration of cell viability when associated with PTZ. Our findings show that the synthetic peptide LS9 promoted anticonvulsant effect, decreased production of lipid peroxidation and nitrite and increased GSH. In addition, it was not able to alter cell viability in cortical astrocyte culture *in vitro*, demonstrating no toxic effect in this cell line.

Key words: *Dinoponera quadriceps*, seizure, pentylenetetrazole, astrocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
DAEs	Drogas antiepilépticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTNB	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GP	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
HCl	Ácido clorídrico
IC 50	Concentração necessária para matar 50% da população
ip	Intraperitoneal
K⁺	Potássio
LM	Latência para a morte
LPC	Latência para primeira convulsão
MDA	Malondealdeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzível
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
O₂	Oxigênio molecular
PBS	Tampão fosfato salino
PTZ	Pentilenotetrazol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da estrutura do receptor GABA _A	17
Figura 2	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo	20
Figura 3	Principais mecanismos de inativação de espécies reativas de oxigênio	22
Figura 4	Estrutura da sinapse tripartite: composta pelos neurônios pré e pós-sinápticos (em azul) e a célula astrocitária (em verde)	25
Figura 5	Formiga <i>Dinoponera quadriceps</i>	27
Figura 6	Proporção de transcritos de toxinas expressos na glândula de veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i>	28
Figura 7	Alinhamento do precursor codificado pelo contig TX06_DIQUA com peptídeos cuja sequência foi determinada pela análise proteômica	29
Figura 8	Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e MDA sob condições ácidas	37
Figura 9	Mecanismo de reação usado no método de Griess	37
Figura 10	Reação entre glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman)	38
Figura 11	Ensaio de redução do 3-(3,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio	39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre a latência para a primeira convulsão no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos **42**
- Gráfico 2** Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre latência para a morte no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos **43**
- Gráfico 3** Efeito do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol sobre o grau de peroxidação lipídica em camundongos **45**
- Gráfico 4** Efeito do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol sobre a formação de nitrito em camundongos **46**
- Gráfico 5** Níveis de glutathiona reduzida de camundongos tratados com peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol **47**
- Gráfico 6** Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações do peptídeo sintético LS9 **48**
- Gráfico 7** Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de LS9 em associação a IC 50 PTZ **49**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Homologia de sequências entre os peptídeos Dq-Fa, Dq-Ra e Dq- Pa, da *Dinoponera quadriceps*, com o peptídeo DA-1837, da *Dinoponera australis* **30**
- Tabela 2** Efeito do peptídeo sintético LS9 no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos **44**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epilepsia	15
1.1.1	Neurotransmissão e epilepsia	16
1.1.2	Modelo experimental de convulsão induzido por pentilenotetrazol	18
1.1.3	Áreas cerebrais selecionadas: Córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado	19
1.1.4	Radicais livres e o estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central	20
1.1.5	Sistema de defesa antioxidante	21
1.2	Astrócitos	23
1.3	Peptídeos de artrópodes: moléculas com potencial efeito biológico	25
1.3.1	Veneno de formigas	26
1.3.1.1	Toxinas presentes no veneno da formiga <i>Dinoponera quadriceps</i> e peptídeo sintético LS9	27
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Obtenção do peptídeo sintético LS9	35
4.2	Animais	35
4.7	Aspectos éticos	35
4.3	Drogas utilizadas	35
4.4	Modelo de convulsão induzido quimicamente <i>in vivo</i> e análises comportamentais	35
4.5	Avaliação dos parâmetros oxidativos de lesão neural	36
4.5.1	Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)	36
4.5.2	Determinação do Conteúdo de Nitrito	37
4.5.3	Determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH)	38
4.6	Análise da atividade do LS9 sobre astrócitos <i>in vitro</i>	38

4.6.1	Cultivo da linhagem celular utilizada	38
4.6.2	Determinação da viabilidade celular após tratamento com o LS9	39
4.8	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Ensaio <i>in vivo</i>	42
5.1.1	Determinação da atividade do LS9 sobre modelo de convulsão induzido quimicamente – ensaios comportamentais	42
5.1.2	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica após tratamento com peptídeo sintético LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ	44
5.1.3	Determinação dos níveis de nitrito após tratamento com peptídeo sintético LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ	45
5.1.4	Determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) após tratamento com peptídeo sintético LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ	46
5.2	Ensaio <i>in vitro</i>	47
5.2.1	Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre a viabilidade de astrócitos corticais	47
5.2.2	Efeito do peptídeo sintético LS9 associado com IC 50 PTZ sobre a viabilidade de astrócitos corticais	48
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS	58

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio crônico da atividade elétrica anormal no cérebro caracterizada por crises recorrentes não provocadas, levando a distúrbios de cognição, consciência, movimentos involuntários, manifestações psíquicas, sensoriais, autonômicas e de comportamento, podendo envolver diferentes áreas cerebrais (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011; FISHER *et al.* 2015; LOWENSTEIN, 2015; TAIWEA *et al.* 2016). No desenvolvimento de alguns tipos de crises, vê-se o evento conhecido como convulsão, que consiste em uma alteração do comportamento resultante da atividade hipersincrônica, excessiva e repetitiva de neurônios do córtex cerebral. (STEFAN *et al.*, 2009; RAO; LOWENSTEIN, 2015).

Uma convulsão não significa epilepsia, até 10% das pessoas em todo o mundo têm uma convulsão durante a vida, sendo necessário duas ou mais convulsões não provocadas para um possível diagnóstico. A manifestação desta condição interfere na rotina do indivíduo, uma vez que há o comprometimento transitório da consciência e consequente possibilidade de lesões físicas, problemas sociais e psicológicos, como a depressão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo possuem epilepsia e quase 90% delas ocorrem em países em desenvolvimento, devido ao aumento do risco de doenças endêmicas, como a malária ou a neurocisticercose, a maior incidência de acidentes de trânsito, lesões relacionadas com o nascimento e variações na infraestrutura médica. A forma mais comum, que afeta seis em cada dez pessoas, é a idiopática, sem causa identificável. Epilepsia secundária ou sintomática é quando há causa identificável, podendo ser por lesões cerebrais decorrentes de lesões pré-natais ou perinatais, anomalias congênitas ou condições genéticas associadas com malformações cerebrais, um ferimento grave na cabeça, um acidente vascular cerebral que restringe a quantidade de oxigênio para o cérebro, tumor cerebral, dentre outras. (GOMES, 1997; LAFRANCE; KANNER; HERMANN, 2008; THURMAN, 2013; SAVAGE, 2014; WHO, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O tratamento medicamentoso da epilepsia é sintomático, tendo seu início em 1857 quando Locock introduziu o sal de brometo (BRODIE, 2010). Os principais mecanismos farmacodinâmicos envolvidos na eficácia clínica das drogas

antiepiléticas (DAEs) a nível celular incluem o aumento da inibição mediada por GABA (ácido gama-aminobutírico), atenuação da transmissão glutamatérgica excitotóxica e a modulação de canais iônicos voltagem-dependentes (Na^+ , K^+ e Ca_2^+) (ROGAWSKI e LOSCHER, 2004; BANERJEE *et al.*, 2014; HUNG *et al.*, 2014).

Embora atualmente exista um vasto arsenal de drogas anticonvulsivantes utilizados na clínica, a farmacorresistência e um número considerável de reações adversas dificultam o tratamento, deixando cerca de 30% dos pacientes sem um tratamento adequado (LOSCHER; SCHMIDT, 2006; MELDRUM; ROGAWSKI, 2007; BANERJEE *et al.*, 2014; TAIWEA *et al.*, 2016). Desta forma, novos medicamentos antiepilépticos eficazes são necessários para melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas acometidas pela epilepsia.

1.1.1 Neurotransmissão e epilepsia

Os neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) e inibitórios (ácido gama-aminobutírico e glicina) fazem a mediação de essencialmente toda comunicação neuronal rápida. Devido a sua larga distribuição, estes aminoácidos influenciam todas as funções do sistema nervoso central (SNC) (WATKINS; OLVERMAN, 1987; HUNG *et al.*, 2014). Desequilíbrios entre respostas excitatórias e inibitórias podem ter consequências diversas, indo desde convulsões ou excito toxicidade à depressão do SNC similar a observada com o uso de sedativos e hipnóticos, estando estes neurotransmissores envolvidos em processos de epilepsia e isquemia. (DINGLELINE; MCBAIN, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2005, BANERJEE *et al.*, 2014).

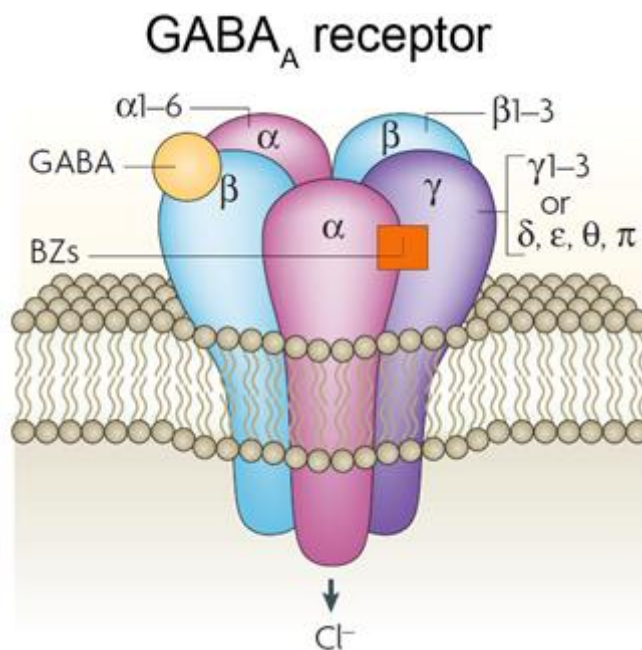
Particularmente, vários estudos sugerem que os principais mecanismos envolvidos na gênese da convulsão estão relacionados a um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória GABAérgica. (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Na situação em repouso, os neurônios possuem carga interna negativa e carga externa positiva, estando polarizados. A ativação da neurotransmissão glutamatérgica leva à abertura de canais iônicos na membrana do neurônio, permitindo influxo de íons cálcio e sódio. Este evento irá despolarizar a célula, gerando disparo neuronal. A sinalização GABAérgica permite influxo de íons carregados negativamente, como cloreto (Cl^-), hiperpolarizando a célula neuronal, dificultando o início de uma

despolarização dos neurônios (BRACCI *et al.*, 2001; LE DUGOU; HOLDEN; KULLMANN, 2011; JANE; LODGE; COLLINGRIDGE, 2009; MÉNDEZ; BACCI, 2011; HUNG *et al.*, 2014).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) atua em um dos três tipos de receptores: GABA_A, GABA_B ou GABA_C (MEHTA; TCKU, 1999). O receptor GABA_A, representado na Figura 1, é o receptor de neurotransmissores inibitórios predominante no sistema nervoso central de vertebrados e possuem uma variedade de locais de ligação, através dos quais diferentes fármacos podem modular a corrente de Cl⁻ mediada por GABA. Os benzodiazepínicos e barbitúricos são conhecidos por potencializar alostericamente a corrente mediada por GABA. Inversamente, drogas convulsivas como a picrotoxina (PTX) e vários inseticidas são conhecidas por inibir a corrente (HUANG *et al.*, 2001).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do receptor GABA_A



Fonte: Jacob *et al.*, 2008. Cinco subunidades (2 alfas, 2 betas e 1 gama) se reúnem para formar um canal heteropentamérico permeável ao Cl⁻. A ligação do neurotransmissor GABA ocorre na interface entre as subunidades alfa e beta e desencadeia a abertura do canal, permitindo o rápido influxo de Cl⁻ para dentro da célula. A ligação de benzodiazepínicos (BZs) ocorre na interface entre as subunidades alfa e gama e potencializa o fluxo de Cl⁻ induzido por GABA.

1.1.2 Modelo experimental de convulsão induzido por pentilenotetrazol

Durante o último século, diversos modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de mimetizar esta desordem e com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre epilepsias. Desde a década de 1960, os modelos experimentais servem como screening farmacológico de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997), contribuindo, paralelamente, com informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises.

Inicialmente, os modelos foram classificados em genéticos e não genéticos. O primeiro consiste na geração de crises espontâneas geralmente relacionadas a alterações na formação e/ou no desenvolvimento do sistema nervoso (LOSCHER, 1984). Tal abordagem permite estudar a desordem de forma crônica, tendo em vista que ao decorrer do desenvolvimento do animal ocorrerão crises convulsivas recorrentes. O segundo consiste na submissão do animal a estímulos químicos ou elétricos, os quais culminam em crises convulsivas (STEWART *et al.*, 2012).

O pentilenotetrazol (PTZ) é um agente químico capaz de gerar tanto crises convulsivas agudas, quanto crônicas (método de abrasamento) (TAKECHI *et al.*, 2012; TAIWEA *et al.*, 2016). Este é um dos compostos mais utilizados nos últimos 60 anos com o propósito de desenvolvimento de drogas antiepilépticas (DAEs) (LOSCHER, 2011).

A ação convulsiva do PTZ deve-se ao seu antagonismo não competitivo sobre receptores GABA_A, diminuindo a ação inibitória do GABA no SNC (RAMANJANEYULU E TICKU, 1984). O GABA, ao ligar-se no receptor GABA_A na pós-sinapse, promove a abertura do canal iônico do receptor, permitindo o influxo de íons cloreto e o efluxo de íons de potássio do neurônio alvo (SIEGHART E SPERK, 2002). À medida que o PTZ atinge o SNC, este se liga aos receptores GABA_A impedindo a ação do GABA, conseqüentemente bloqueando o influxo de íons (RAMANJANEYULU E TICKU, 1984).

O PTZ, inicialmente, produz espasmos mioclônicos, movimentos fugazes de excitação ou de relaxamento muscular que acarretam uma contração rápida e sincronizada dos músculos envolvidos, que se tornam subseqüentemente mantidos e podem levar a uma crise tônico-clônica generalizada (CRESTANI *et al.*, 2002). Assim, neste modelo, o aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte

indicativo de uma ação anticonvulsivante (DE SARRO *et al.*, 1996; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002).

1.1.3 Áreas cerebrais selecionadas: Córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado

As regiões que mais comumente originam descargas epiléticas em seres humanos são o córtex e hipocampo. São também essas estruturas que, em modelos animais, apresentam maior susceptibilidade a crises. Dentre as regiões do córtex, o córtex pré-frontal é uma das regiões cerebrais relacionadas com o surgimento e disseminação de crises convulsivas. Nessa área, existem diferentes tipos celulares, incluindo neurônios piramidais excitatórios e GABAérgicos inibitórios, o qual enviam projeções glutamatergicas para diferentes regiões cerebrais, incluindo o núcleo accumbens, núcleo que faz parte do estriado ventral, que é uma das três subdivisões do corpo estriado (DELONG *et al.*, 2000; MIDDLETON & STRICK, 2000; CHEN *et al.*, 2016).

O corpo estriado, composto pelo núcleo caudado, putamen e estriado ventral, é o principal núcleo da base receptor de impulsos glutamatergicos excitatórios. Essa região possui abundância de receptores excitatórios, sendo a neurotransmissão glutamatergica relacionada às convulsões (ENGEL *et al.*, 2001). Os núcleos da base estão envolvidos com o controle motor, planejamento e execução de estratégias motoras complexas. Estes núcleos consistem em vários núcleos subcorticais interconectados com projeções para o córtex, tálamo e certos núcleos do tronco encefálico. Eles recebem impulsos de entrada principalmente do córtex cerebral e tálamo e mandam impulsos de saída de volta para o córtex (via tálamo) e para o tronco encefálico. Desta forma, os núcleos da base são os principais componentes de um amplo circuito cortical-subcortical ligando o córtex e o tálamo (DELONG *et al.*, 2000).

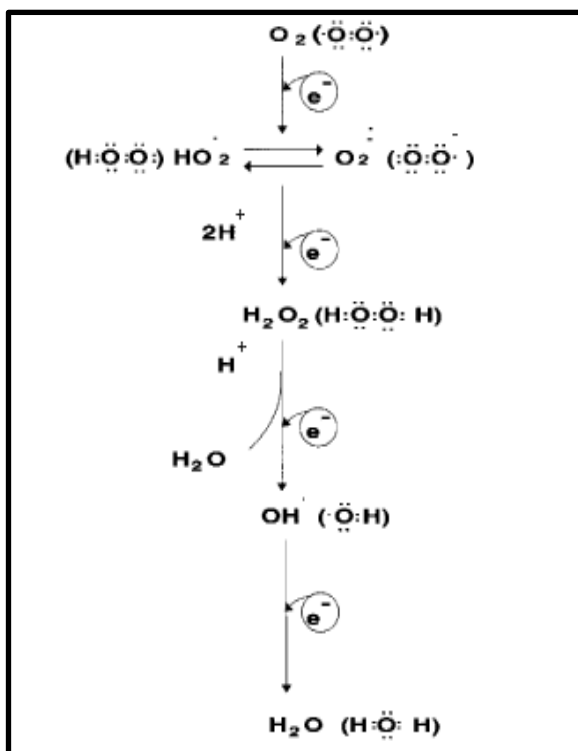
Conforme mencionado anteriormente, outra região envolvida em episódios convulsivos é o hipocampo, o qual possui importantes conexões com o tálamo, hipotálamo e córtex entorrinal. Estas conexões lhe permitem atuar como conferidor das informações sensoriais provenientes do córtex entorrinal e confrontá-las com as predições geradas no sistema límbico, que, por sua vez, integra informações de outras partes do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal. Animais com epilepsia apresentam

intensa morte neuronal predominante nessa área. (SCORZA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

1.1.4 Radicais livres e o estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central

Um radical livre define-se como um átomo ou grupo de átomos que possuem um ou mais elétrons não emparelhados em sua órbita, e, uma vez que necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem, são altamente reativos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As denominadas espécies reativas são originadas a partir de radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre outras espécies reativas como as de nitrogênio, são parte integrante do metabolismo humano e são observadas em diversas condições fisiológicas, como demonstrado na Figura 2 (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Figura 2 –Redução tetraivalente do O₂ na mitocôndria até a formação de água (H₂O).



Fonte: Adaptado de Cohen, 1989. Várias espécies reativas são formadas durante o processo de redução do O₂ na mitocôndria.

A redução incompleta de O₂ pode ocorrer em situações patológicas levando a formação de EROs que, não controlados, reagem com moléculas importantes,

incluindo enzimas, lipídios de membrana e DNA. O estresse oxidativo é o mecanismo mais importante no desenvolvimento e progressão da epilepsia e outras doenças, incluindo a doença de Alzheimer, doenças degenerativas crônicas, acidente vascular cerebral, artrite reumatoide, diabetes e outras (TAIWE *et al.*, 2016).

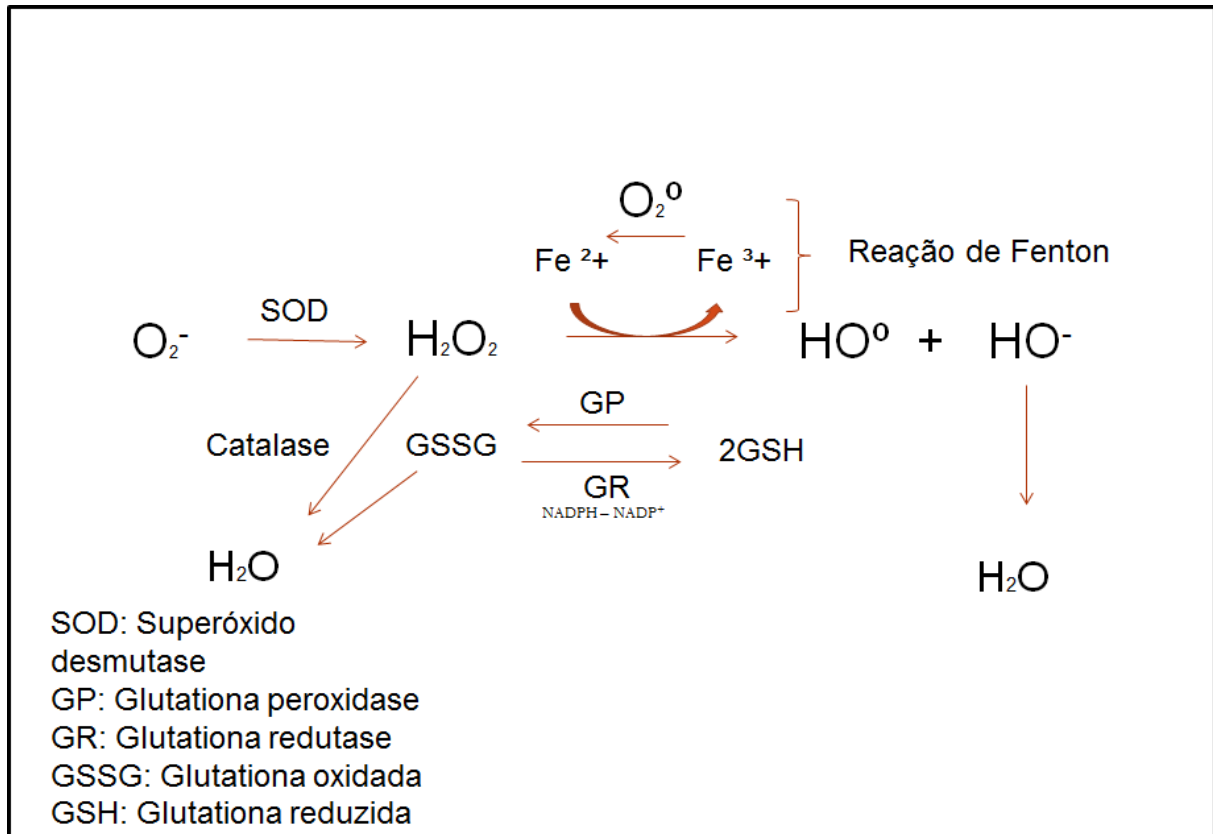
As espécies reativas podem reagir com ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, comprometendo a estrutura da membrana, levando a destruição e morte celular, processo denominado de peroxidação lipídica. O cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (HALLIWELL, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001). Entre as espécies reativas de nitrogênio, destaca-se o peroxinitrito, que leva a desordem mitocondrial, culminando em morte por necrose ou apoptose. No processo patológico, a superprodução de óxido nítrico (ON) é convertida a peroxinitrito (CZUCZWAR *et al.*, 1999; DE SARRO *et al.*, 1993; LEITS e NICOTERA, 1998).

O NO é um radical livre relativamente abundante que funciona como um importante sinal biológico em vários processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa do corpo, relaxamento da musculatura lisa, dentre outros. Possui baixa reatividade com a maioria das biomoléculas, mas reage facilmente com outros radicais livres levando a formação do peroxinitrito (AGUIAR *et al.*, 2012). A síntese de NO é realizada por um grupo de enzimas denominadas de NO sintases (NOS) composto pela endotelial (NOSe), neuronal (NOSn) e induzível (NOSi), sendo o aumento da produção de NO relacionado com doenças cerebrais e associado com o aumento da função ou expressão dessas enzimas (VIZZARD *et al.*, 1995; DAWSON E DAWSON, 1996; WU, 1996; LUMME *et al.*, 1997; LEIST E NICOTERA, 1998; VANHATALO *et al.*, 1998).

1.1.5 Sistema de defesa antioxidante

Para se proteger, a célula possui sistemas de defesa, que atuam de modo a evitar que o agente cause a lesão, constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GP) e vitamina E e promovendo o reparo por meio do ácido ascórbico, pela glutathiona redutase (GR) e entre outros como demonstrado na Figura 3 (TAIWE *et al.*, 2016).

Figura 3 – Principais mecanismos de inativação de espécies reativas de oxigênio



Fonte: Elaborado pelo Autor. A Superóxido dismutase (SOD) transforma o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser convertido em água (H_2O) pela enzima catalase ou se transformar em radical hidroxil (HO^\bullet) e radical hidroxila (HO^-) devido a reação de Fenton. A hidroxila pode se complexar com H^+ presentes na célula e se transformar em H_2O . A glutatona reduzida (GSH), catalisada pela enzima glutaciona peroxidase (GP), capta o HO^\bullet ou H_2O_2 , levando a formação de glutaciona oxidada (GSSG) que libera uma molécula de H_2O .

A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo endógeno presente em todas as células de mamíferos. Pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). Além disso, participa da eliminação de produtos da lipoperoxidação e do combate às EROs (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

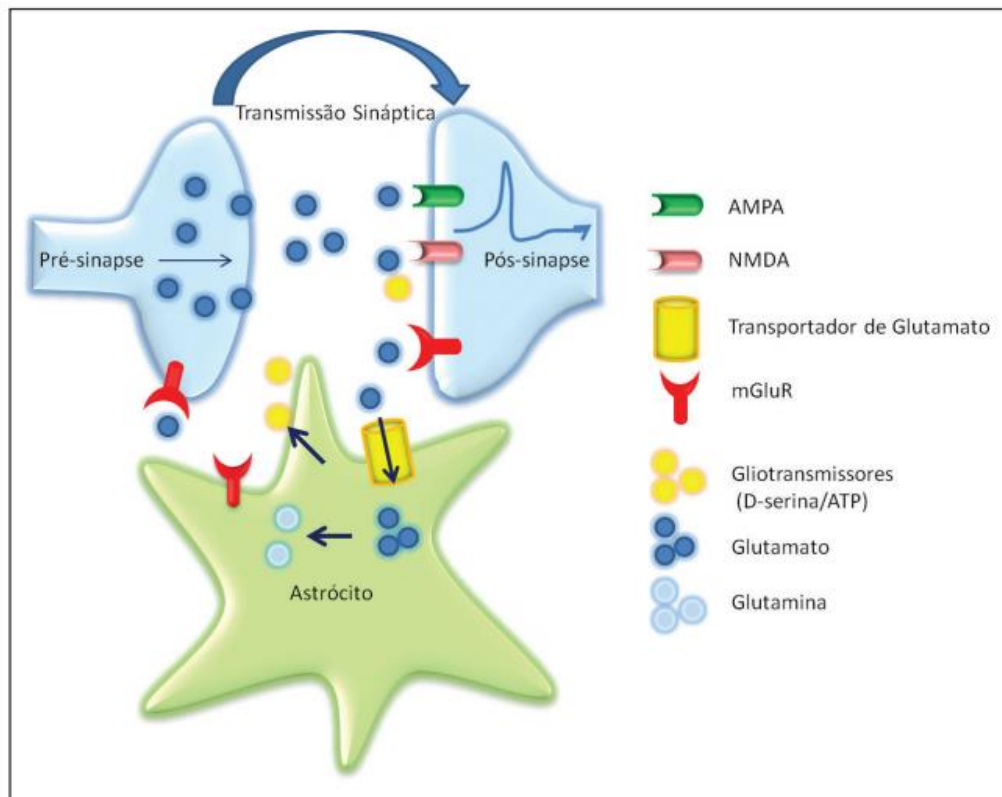
1.2 Astrócitos

Durante a última década, participar das sinapses e da transferência de informação neural deixou de ser exclusiva dos neurônios. Evidências crescentes vêm corroborando para o papel dos astrócitos em diversas etapas da formação, eliminação, estabilização e eficácia das sinapses, assim como possível envolvimento no desenvolvimento de doenças cerebrais como a epilepsia (GOMES *et al.*, 2001; STIPURSKY *et al.*, 2010; 2011; 2012; CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHÄUSER, 2015).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, constituindo aproximadamente metade das células do cérebro humano. Estes desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC, incluindo manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, captação e liberação de diversos neurotransmissores, como no metabolismo dos neurotransmissores glutamato e GABA, participação na formação da barreira hematoencefálica, secreção de fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios, direcionamento de axônios e formação e funcionamento das sinapses (CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHÄUSER, 2015).

O termo sinapse tripartite se refere ao conceito baseado na presença de uma comunicação entre os astrócitos e neurônios no ambiente sináptico, adicionando o conceito de que glia e sinapse trocam informações como demonstrado na Figura 4 (CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHÄUSER, 2015).

Figura 4 – Estrutura da sinapse tripartite composta pelos neurônios pré e pós-sinápticos (em azul) e a célula astrocitária (em verde)



Fonte: Gomes, Tortelli, Diniz, 2013. Liberação de glutamato na fenda sináptica. O receptor metabotrópico tipo II mGluR também está presente pré-sinápticamente e pode limitar a liberação sináptica de glutamato. Astrócito pode liberar diretamente glutamato, regulando a atividade pré- e pós-sináptica. O excesso de glutamato é removido pelos transportadores astrocitários de glutamato. Receptores do tipo AMPA, quando ativados, permitem influxo de sódio e conseqüente despolarização da membrana neuronal. Os receptores NMDA também são ativados pelo glutamato, juntamente com seu co-agonista, a D-serina.

A observação de que astrócitos expressam uma série de receptores de neurotransmissores na sua membrana, assim como a identificação da síntese e secreção dos chamados gliomoduladores pelos astrócitos, mostraram que essas células são responsivas às atividades neuronais, bem como podem modulá-las. (SCHAFER *et al.*, 2013).

Alterações astrocitárias são comuns a diversas doenças neurais e lesões cerebrais caracterizadas por alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares nos astrócitos, conhecidas como reatividade astrocitária. Dentre as alterações astrocitárias podemos observar a formação de cicatrizes gliais, constituída principalmente por astrócitos reativos, resultando na reorganização da arquitetura do

tecido para isolamento físico da área da injúria dentre outras atividades (DONG & BENVENISTE, 2001; SEIFERT *et al.*, 2006; DE KEYSER *et al.*, 2008). Porém astrócitos reativos têm uma redução na sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à diminuição na liberação de enzimas antioxidantes. Como os astrócitos são as principais células de defesa antioxidante no tecido nervoso, os níveis de radicais livres e outros tipos de espécies reativas de oxigênio aumentam em diversas patologias com reatividade astrocitária. Além disso, a importante função de regular os níveis de neurotransmissores na fenda sináptica fica prejudicada em diversas patologias. (RAO *et al.*, 2003).

Na epilepsia, existe a ocorrência de astrócitos reativos tanto em síndromes que causam epilepsia, como em modelos de doença em animais. Nesses casos, os astrócitos apresentam não só redução da expressão de transportadores de glutamato, mas redução da expressão dos canais de potássio retificadores de influxo (canais Kir4.1) responsáveis pela remoção de íons K^+ que ficam acumulados durante intensa atividade sináptica. Isso causa um aumento local de íons K^+ , ocasionando crises epiléticas e enfatizando a importância do estudo desta célula como possível alvo farmacológico em casos de epilepsia (BORDEY; SONTHEIMER, 1998; BEDNER; STEINHÄUSER, 2013; DEVINSKY *et al.*, 2013; CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHÄUSER, 2015).

1.3 Peptídeos de artrópodes: moléculas com potencial efeito biológico

Ao longo dos séculos, os produtos naturais têm servido como uma importante fonte de drogas para tratar e/ou prevenir doenças. Venenos de insetos têm sido usadas pela medicina chinesa e coreana tradicional, bem como antigas civilizações egípcia e grega desde 1000-3000 a.C. para controlar uma série de doenças, incluindo distúrbios neurológicos (SILVA *et al.*, 2015).

Esses compostos vêm sendo explorados e investigados devido à vasta diversidade de suas estruturas químicas e por se tratarem de compostos biologicamente ativos, que podem servir como modelos para novos medicamentos, satisfazendo as novas necessidades terapêuticas. Muitos avanços nesses estudos têm sido alcançados, devido ao desenvolvimento de novas técnicas como proteômica, transcriptoma e genômica. (CHIN *et al.*, 2006; CLARK, 1996; MORTARI *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2014).

Os artrópodes, constituem o grupo de animais mais numerosos do planeta. Nele estão incluídos os insetos, aracnídeos, crustáceos, diplópodes, entre outros. Estudos indicam que este grupo representa cerca de oitenta por cento de todo o reino animal, o que faz dos artrópodes o grupo mais rico em espécies, diversidade de formas, tamanhos, cores e novas moléculas em todo o planeta. O sucesso dos artrópodes em colonizar a terra é atribuído à extraordinária versatilidade química destes animais. Eles produzem diversas substâncias, dentre elas venenos para paralisar e/ou matar suas presas, repelentes e irritantes para afastar seus inimigos, feromônios para comunicação social e reprodução, entre outras funções (MEINWALD; EISNER, 1995).

O grande interesse por diversas áreas científicas, no estudo das novas moléculas oferecidas pelos artrópodes, deve-se às notáveis propriedades que possuem tais como alta eficiência, baixa probabilidade de resistência microbiana, toxicidade limitada e baixa imunogenicidade para o homem (LEWIS; GARCIA, 2003; KING, 2013).

Venenos de abelhas e vespas são conhecidos por serem ricos em moléculas neuroativas que podem ser valiosas para o desenvolvimento de novas drogas ou agir como ferramentas farmacológicas para estudar o funcionamento normal e patológico do sistema nervoso (SILVA *et al.*, 2015).

1.3.1 Veneno de formigas

As formigas (Vespoidea: Formicidae) pertencem à classe Insecta e ordem Hymenoptera, a qual compreende famílias como Apidae (abelhas), e Vespidae (vespas) (GULLAN; CRANSTON, 2010). Com mais de 1000 espécies distribuídas em 28 gêneros, como *Dinoponera* e *Paraponera*. A subfamília Ponerinae é um grupo primitivo de formigas, principalmente encontrado em áreas tropicais. É representada por vários gêneros, como *Dinoponera*, *Paraponera* e *Diacamma*. O gênero *Dinoponera* abriga oito espécies (*D. quadriceps*; *D. australis*, *D. gigantea*, *D. hispida*, *D. lucida*, *D. longipes*, *D. mutica*, *D. snellingi*), conhecidas como falsas tocandiras. Os gêneros *Dinoponera* e *Paraponera* abrigam as formigas de interesse médico. Estudos mostram que a peçonha de formigas da subfamília Formicinae é constituída de misturas simples de ácidos orgânicos, enquanto que a peçonha de formigas das

subfamílias Ponerinae e Myrmicinae é constituída de misturas complexas de proteínas e neurotoxinas (LIMA e BROCHETTO-BRAGA, 2003).

Os estudos sobre peçonhas de formigas são escassos, e as mais bem estudadas são das formigas das subfamílias Myrmaciinae, Ponerinae, Pseudimyrmecinae e Myrmicinae, que se apresentam como soluções aquosas ricas em proteínas enzimáticas e não enzimáticas, aminoácidos livres e pequenos compostos biologicamente ativos como histamina, acetilcolina, norepinefrina e dopamina (SCHMIDT *et al.*, 1986; ATTYGALLE; MORGAN, 1984). Recentemente, foi obtido o transcriptoma da glândula de veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* (Figura 5), onde foi identificado uma variedade de peptídeos, apresentando funções descritas na literatura que variam desde bloqueadores de canais iônicos, de receptores neuronais, até ação antimicrobiana (FAN *et al.*, 2001; SAMY *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2014).

Figura 5 – Formiga *Dinoponera quadriceps*



Fonte: Costa, 2013.

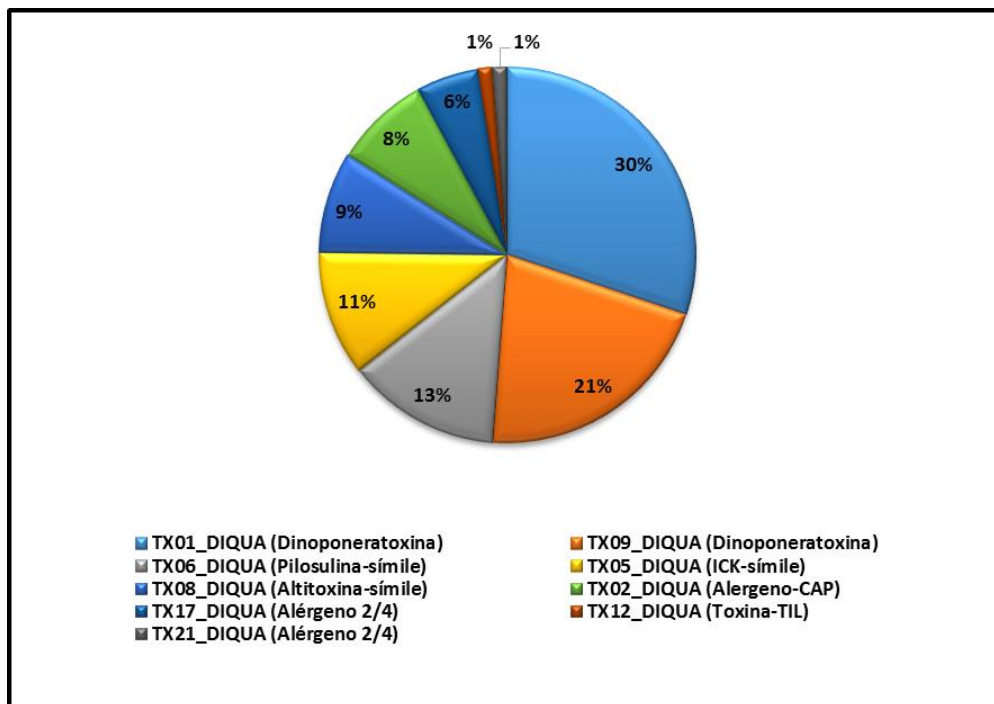
1.3.1.1 Toxinas presentes no veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* e peptídeo sintético LS9

Primariamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito neuroprotetor do veneno da *Dinoponera quadriceps* em modelo químico de convulsão induzido por PTZ, demonstrando a possível existência neste veneno de moléculas com ação

anticonvulsivante capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, bem como que o efeito esteja relacionado possivelmente a atuação no sistema GABAérgico (LOPES *et al.*, 2013).

Posteriormente, nosso grupo de trabalho realizou o estudo transcriptômico da glândula da formiga *Dinoponera quadriceps* e, utilizando a ferramenta Blast, comparou com sequências traduzidas em bancos de dados de proteínas e de nucleotídeos o que permitiu a classificação e identificação de precursores de toxinas conforme apresentado na Figura 6 (TORRES *et al.*, 2014).

Figura 6 - Proporção de transcritos de toxinas expressos na glândula de veneno de *Dinoponera quadriceps*



Fonte: Torres *et al.*, 2014. Os transcritos mais abundantes foram agrupados em dois novos grupos de precursores de toxinas denominados de dinoponeratoxinas (TX01_DIQUA e TX09_DIQUA). O segundo e o terceiro grupo de toxinas mais abundantes (TX06_DIQUA e TX05_DIQUA) foram classificados como pilosulina-símile e ICK-símile. A toxina TX08_DIQUA, classificada como altitoxina, uma neurotoxina. Os precursores das toxinas TX02_DIQUA, TX17_DIQUA e TX21_DIQUA representam substâncias alérgicas. A TX12_DIQUA apresentam um domínio TIL (Trypsin inhibitor-like).

Conforme demonstrado na figura anterior, foi identificado o contig TX06_DIQUA no veneno desta formiga, sendo um dos componentes mais abundantes, e classificado como pilosulina-símile. Após análise proteômica, identificou-se que essa

toxina sofre clivagem em diferentes pontos, os quais levam a formação de Dq-Ia, Dq-Fa, Dq-Ra e Dq-Pa (Figura 7) (TORRES, 2014).

Figura 7 – Alinhamento do precursor codificado pelo contig TX06_DIQUA com peptídeos cuja sequência foi determinada pela análise proteômica

	Peptídeo sinal	Pró-peptídeo	Peptídeo maduro	
TX06_DIQUA	MKLSALS SLVFGMILMMTIMYTN AEAEATAEADADAEEAEAEAEAEAL	LVGALVSTLLSLVPSLMKG	LVGALVSTLLSLVPSLMKG	62
Dq-Ia 872			LVGALVSTL	
Dq-Fa 986			LSLVPSLMK	9
Dq-Ra 1840			LVGALVSTLLSLVPSLMK	18
Dq-Pa 1856			LVGALVSTLLSLVPSLMK	18

Fonte: Torres, 2014. TX06_DIQUA: precursor de poliosulina; Peptídeos da peçonha de *Dinoponera quadriceps*: Dq-Ia; Dq-Fa; Dq-Ra; Dq-Pa. Metionina oxidada está identificado em amarelo.

Dentre os peptídeos formados após clivagem do contig TX06_DIQUA, três deles apresentam um grau de homologia com o peptídeo DA-1837 encontrado na peçonha da *Dinoponera australis* como demonstrado na Tabela 1. O peptídeo DA-1837 foi descrito por apresentar similaridade com peptídeo poneratoxina da peçonha de *Paraponera clavata*, peptídeo que interfere nos canais de sódio bloqueando as transmissões sinápticas no sistema nervoso (PIEK *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 2016). Por conseguinte, Dq-Fa, Dq-Ra e Dq-Pa podem apresentar um possível efeito em canais de sódio, sendo o bloqueio desses canais uma alternativa como alvo farmacológico para o tratamento de crises convulsivas, como observado pelo Zhao *et al* (2011) que ao averiguar a ação de BmK AS, um modulador específico de canal de sódio, originado do veneno do escorpião *Buthus martensii Karsch* (BmK), encontrou, após injeção hipocampal, um efeito capaz de suprimir as crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos, sugerindo que o mesmo possui atividade anticonvulsivante (HUANG *et al.*, 2001; PATSOUKIS *et al.*, 2004).

Tabela1 – Homologia de sequências entre os peptídeos Dq-Fa, Dq-Ra e Dq-Pa da *Dinoponera quadriceps* com o peptídeo DA-1837 da *Dinoponera australis*

Dq-Ra	L V GALVSTLLSLVPSLMK
Dq-Pa	L V GALVSTLLSLVPSLMK
Dq-Fa	LSLVPSLMK
DA-1837	FLGGLIGPLMSLIPGLLK

Fonte: Adaptado de Torres, 2014. Metionina oxidada está identificado em negrito.

Provavelmente, a região composta pelos nove aminoácidos finais dos peptídeos Dq-Fa, Dq-Ra e Dq-Pa pode estar relacionada com efeito biológico, visto que de quatro peptídeos formados a partir de um mesmo precursor, contig TX06_DIQUA, três apresentam similaridade estrutural nessa região. Por tanto, utilizando a estrutura do Dq-Fa como modelo, o peptídeo LS9 foi obtido por síntese química de fase sólida, purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e analisado por espectrofotometria de massa, obtendo teor de pureza superior a 95% e intitulado de LS9 por causa da sua composição estrutural, L devido ao aminoácido leucina, S devido ao serina e 9 por causa do número de aminoácidos que o compõe e utilizado no presente estudo em modelo de convulsão químico induzido por PTZ, método de induzir convulsões bastante utilizado na triagem de drogas anticonvulsivantes, por, possivelmente, ser um dos peptídeos responsáveis pelo efeito anticonvulsivante observado por Lopes *et al* (2013) (HUANG *et al.*, 2001; PATSOUKIS *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da disponibilidade de medicamentos anticonvulsivantes, aproximadamente 30% dos pacientes continuam a viver com epilepsia de difícil controle. Estes pacientes são considerados como resistentes à terapia ou refratários aos medicamentos existentes. Dentro desse contexto, é de extrema importância a busca por substâncias que possam preencher as lacunas existentes no tratamento da epilepsia, sendo os produtos naturais e os sintetizados a partir de fontes naturais recursos promissores para este propósito (TAIWEA *et al.*, 2016; MONGE-FUENTES *et al.*, 2015).

Estudos com veneno de artrópodes demonstraram a existência de uma fonte extraordinária de moléculas bioativas que atuam com seletividade e especificidade no SNC de mamíferos. Este é sustentada por um número crescente de estudos com veneno ou peptídeos extraídos de veneno de vespas, aranhas e escorpiões que mostram eficácia em vários modelos animais de epilepsia (COUTO, 2012; LOPES, 2013; MONGE-FUENTES *et al.*, 2015).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa observou, em estudos anteriores, efeito anticonvulsivante do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* em modelo de convulsão induzido por PTZ quando administrado como pré-tratamento pela via intraperitoneal (ip) (LOPES *et al.*, 2013). Em busca de identificar os possíveis componentes presentes no veneno responsáveis pelo efeito anticonvulsivante, Torres (2014) observou no estudo transcriptômico da glândula do veneno da formiga, seguido por estudo proteômico, peptídeos com potencial efeito biológico, dentre eles o peptídeo Dq-Fa.

Posteriormente, o peptídeo LS9 foi sintetizado, possuindo estrutura semelhante ao peptídeo Dq-Fa, e utilizado no presente estudo em modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos, método de triagem de drogas anticonvulsivantes (HUANG *et al.*, 2001; PATSOUKIS *et al.*, 2004), possibilitando a investigação de uma nova molécula com possível efeito anticonvulsivante que, futuramente, possa ser utilizada como modelo para obtenção de um fármaco, capaz de diminuir crises convulsivas em pacientes refratários aos DAEs existentes no mercado.

Objetivo

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a ação do peptídeo sintético LS9 em modelo animal de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ) e sobre a viabilidade de astrócitos *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar, através de estudos comportamentais, a atividade do peptídeo LS9, administrado por via intraperitoneal, sobre convulsão induzida por PTZ.
- Avaliar parâmetros oxidativos de lesão neural, analisando a concentração de glutathiona reduzida, TBARS e nitrito do modelo *in vivo* estudado.
- Determinar a viabilidade celular, em astrócitos, após tratamento com o peptídeo sintético LS9
- Determinar a viabilidade celular, em astrócitos, após tratamento com o peptídeo sintético LS9, em diferentes concentrações, associado com PTZ.

Material e

Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do peptídeo sintético LS9

O peptídeo foi obtido por síntese química de fase sólida no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia – MarMoBioLab, Instituto de Ciências do Mar/UFC – prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista, sendo purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e analisado por espectrofotometria de massa, obtendo teor de pureza superior a 95%. O peptídeo é encontrado no veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, possuindo como estrutura a sequência de aminoácidos: LSLVPSLMK.

4.2 Animais

Para avaliação da atividade do peptídeo sobre modelo animal de convulsão foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 28 e 33g, mantidos com dieta comum, composta por ração padrão e água *ad libitum*. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados entre $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com ciclos de claro/escuro, 12/12h e circulação de ar controlados.

4.3 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado e registrado sob o número de protocolo 16/2016.

4.4 Drogas utilizadas

Todas as drogas foram adquiridas da empresa Sigma Chemical Co., USA. O peptídeo liofilizado foi diluído em soro fisiológico 0,9% estéril, sendo preparado para administração imediatamente antes de cada análise experimental.

4.5 Modelo de convulsão induzido por PTZ e análises comportamentais

O modelo de indução de convulsão por PTZ foi selecionado, pois estudo anterior com o veneno total da formiga *Dinoponera quadriceps* observou efeito anticonvulsivante somente nesse modelo (LOPES *et al.*, 2013). Os camundongos Swiss machos foram pré tratados com o peptídeo sintético LS9, sendo administrado pela via intraperitoneal (ip.), nas concentrações de 0,1; 0,2 ou 0,4 mg/kg (n= 6 a 8). Estas concentrações foram selecionadas com base em estudo anterior com o veneno

total da formiga *Dinoponera quadriceps* (LOPES *et al.*, 2013). Após meia hora, foi induzida a convulsão em todos os animais através da administração de pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. - Sigma Chemical Co., USA) (YILMAZ, 2007). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados durante 30 minutos para avaliação dos seguintes parâmetros comportamentais (em segundos): latência para a primeira convulsão (tempo decorrido antes da manifestação da primeira convulsão) e latência para a morte (tempo decorrido até a morte do animal). O evento convulsivo foi caracterizado essencialmente pela extensão dos membros posteriores e/ou do salto descoordenado (TURSKI *et al.*, 1983. AGUIAR *et al.*, 2012). No grupo controle, os animais foram pré tratados apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (Soro fisiológico 0,9% estéril).

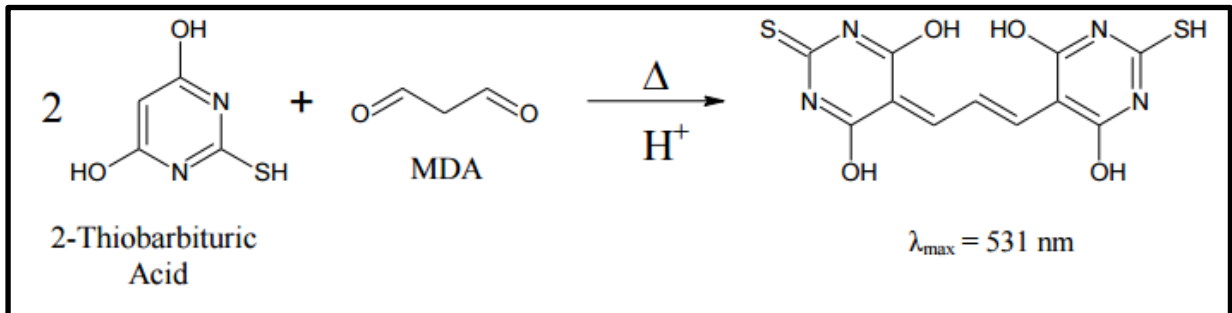
4.6 Avaliação dos parâmetros oxidativos de lesão neural

Em todos os grupos experimentais foram avaliados o grau de lesão de membrana celular (peroxidação dos lipídeos de membrana), formação de óxido nítrico (dosagem de nitrito) e mensuração da concentração da glutatona reduzida (GSH) em três das regiões do encéfalo mais acometidas pelos efeitos deletérios da convulsão: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado, podendo estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de instalação, propagação e/ou manutenção das convulsões (MARINHO *et al.*, 1998). As áreas cerebrais foram homogeneizadas em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4 / 50 mM), a 10% (p/v).

4.5.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi pesquisado através do ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Neste, foi utilizado como marcador a determinação dos níveis de MDA (malondialdeído), o qual é um produto secundário da peroxidação lipídica. Conforme o método de Huong *et al.* (1998), em 63 μ L do homogenato foram adicionados 100 μ L de ácido perclórico 35% e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos e a 4°C. A 150 μ L do sobrenadante resultante foi adicionado 50 μ L de ác. tiobarbitúrico 1,2%. Essa mistura foi levada para banho-maria (\pm 95°C / 30 minutos). Após, resfriou-se e transferiu-se 150 μ L para placa de 96 poços, a fim de se realizar a leitura dos níveis de MDA em espectrofotômetro a 535 nm. Previamente, uma curva padrão de MDA foi feita utilizando-se as concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 e 0,97 μ L/mL.

Figura 8 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e MDA sob condições ácidas

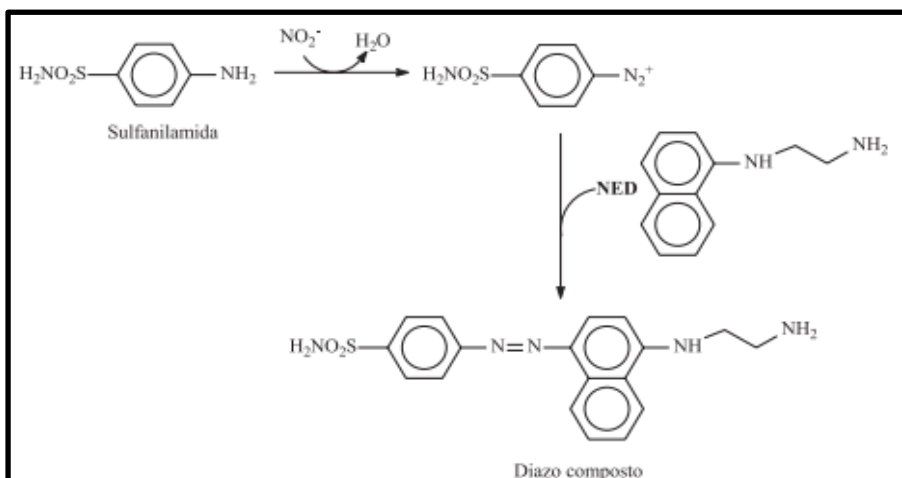


Fonte: Adaptado de Eagle Biosciences.

4.5.2 Determinação do Conteúdo de Nitrito

A mensuração do conteúdo de nitrito foi feita de acordo com o método descrito por Green *et al.* (1981). Este método é utilizado para determinação da formação de radicais derivados de nitrogênio, sendo um modo indireto de se determinar a síntese de óxido nítrico (NO). Em uma placa de 96 poços foi adicionado 100 μL do reagente de Griess (Partes iguais de: Sulfanilamida 0,1% em ác. fosfórico 5%, NEED 1%, Ac. Fosfórico 5% e Água destilada) juntamente com 100 μL do homogenato de tecido a 10% em tampão fosfato. A absorbância foi medida em leitor de microplacas, a 560nm. Previamente, uma curva padrão de nitrito foi gerada utilizando as concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 nmol/mL.

Figura 9 – Mecanismo de reação usado no método de Griess

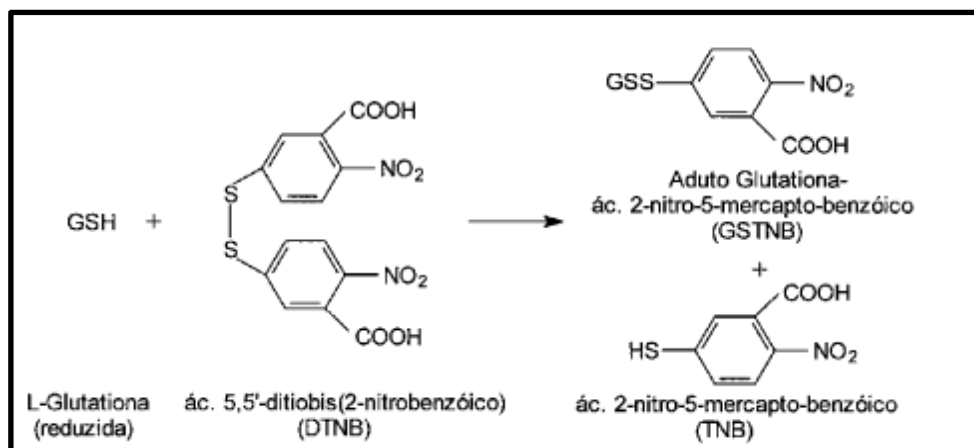


Fonte: Ramos *et al.*, 2006.

4.5.3 Determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH)

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (MORI *et al.*, 1992). Foram preparados homogenatos a 10% das áreas cerebrais estudadas em EDTA 0,02 M, em seguida as amostras foram misturadas ao ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 5000rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 60 μ L do sobrenadante e acrescido 120 μ L de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e 5 μ de DTNB. A absorbância foi medida em leitor de microplacas, a 412nm. Previamente, uma curva padrão de GSH foi gerada utilizando as concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL.

Figura 10 – Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman)



Fonte: Júnior *et al.*, 2001.

4.6 Análise da atividade do LS9 sobre astrócitos *in vitro*

A linhagem de astrócitos corticais imortalizados foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Soraya Soubhi Smali (Laboratório de Sinalização de Cálcio e Morte Celular - Universidade Federal de São Paulo).

4.6.1 Cultivo da linhagem celular utilizada

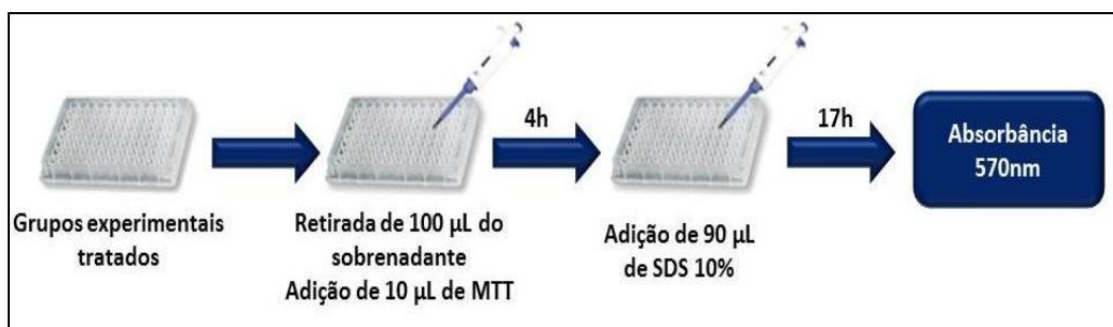
Os astrócitos corticais foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro bovino fetal (10%) e antibióticos

(100.000U/mL de penicilina, 10mg/mL estreptomicina). Foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. Durante o período de cultivo foram feitos repiques sucessivos de acordo com a necessidade das células.

4.6.2 Determinação da viabilidade celular após tratamento com o LS9

O ensaio utilizado na mensuração da viabilidade celular foi do MTT que consiste em uma análise colorimétrica que mede a citotoxicidade de forma indireta (MOSMANN, 1983). O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura por células viáveis. Os cristais são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância (HEINRICH *et al.*, 2005). As células foram plaqueadas e tratadas com o LS9 (100; 80; 60; 40; 20; 10 µmol/mL) ou com uma associação entre LS9 (100; 80; 60; 40; 20 ou 10µmol/mL) e IC 50 de PTZ 33,12 mM/mL (concentração necessária para matar 50% da população de células) (LOPES *et al.*, 2013). Após 24 horas do tratamento, 100 µL do sobrenadante foram removidos e adicionou-se 10 µL de MTT 2,5 mg/mL dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, adicionou-se 90 µL da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% dissolvido em HCL 0,01N, para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 17 horas, e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

Figura 11 - Ensaio de redução do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.



Fonte: De Menezes, 2013.

A porcentagem de viabilidade dos grupos tratados foi calculada pela comparação da absorbância dos grupos testes em relação ao controle, sendo

considerada como 100% a viabilidade média do grupo controle (GOMES, 2006; MOSMANN, 1983).

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm EPM. Na avaliação estatística dos ensaios *in vivo*, para determinação da latência para a primeira convulsão, latência de morte e parâmetros oxidativos foram realizadas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste Student Newman Keuls e ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, para as experimentações *in vitro*. Para ambos os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, os valores de probabilidade (P) menores do que 0,05 foram considerados significativos. O programa utilizado para análises estatísticas foi o GraphPad Prism 5.

Resultados

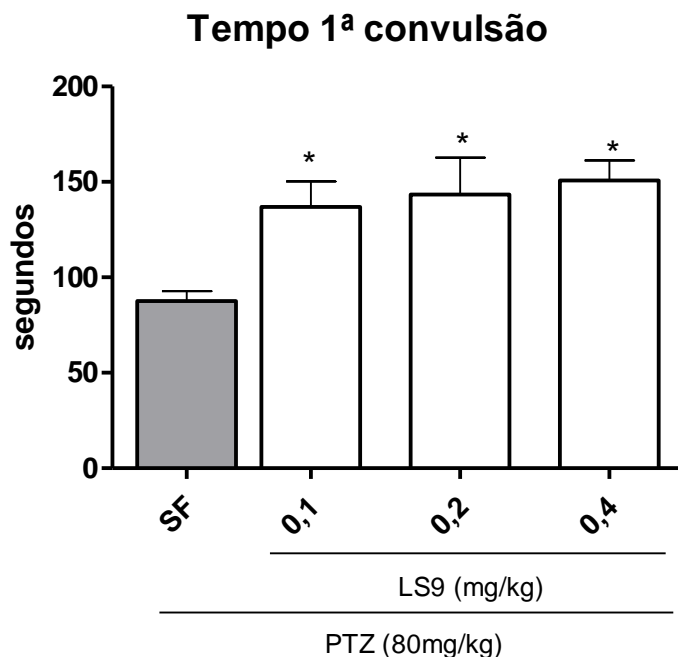
5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vivo*

5.1.1 Determinação da atividade do LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ – ensaios comportamentais

No presente estudo dos efeitos de LS9 sobre modelo de convulsão químico induzido por PTZ, foram analisados nos ensaios comportamentais a latência para primeira convulsão (LPC) e latência para a morte (LM) em segundos. Os resultados comportamentais encontrados mostraram que os animais tratados com todas as concentrações analisadas do peptídeo foram capazes de aumentar a latência para a ocorrência da primeira convulsão (Gráfico 1 e Tabela 1), e a concentração de 0,2mg/kg aumentou, significativamente, o período de latência de morte (gráfico 2 e tabela 1).

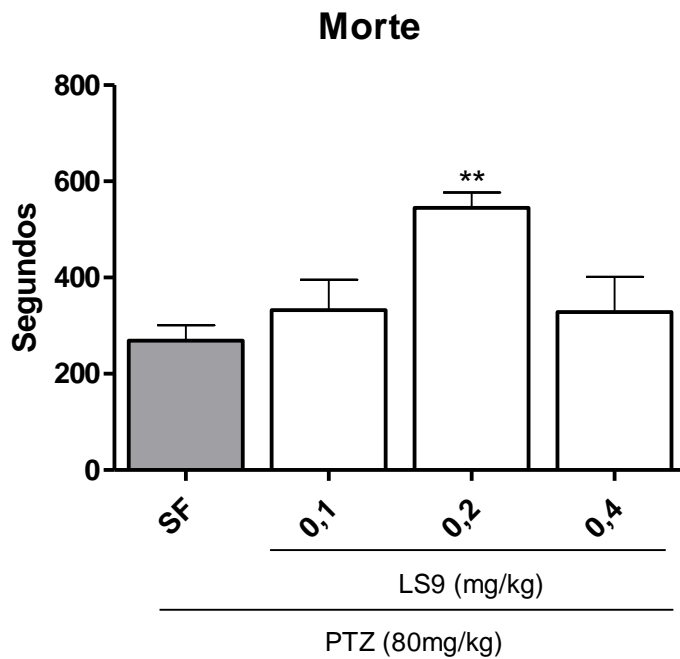
Gráfico 1 - Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre a latência para a primeira convulsão no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos



Fonte: Elaborado pelo Autor. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 8 animais. Animais tratados com LS9 pela via ip. O grupo controle foi pré tratado apenas com veículo utilizado

para solubilizar o peptídeo (SF - soro fisiológico estéril 0,9%). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Gráfico 2 - Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre a latência para a morte no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos



Fonte: Elaborado pelo Autor. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 8 animais. Animais tratados com LS9 pela via ip. O grupo controle foi pré tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (SF - soro fisiológico estéril 0,9%). ** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Tabela 2 - Efeito do peptídeo sintético LS9 no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos

Grupos	Pentilenotetrazol (80mg/kg, i.p.)	
	LPC	LM
Controle	87,50 ± 14,62	269,3 ± 101,0
LS9 0,1 mg/kg	136,9 ± 35,44*	332,6 ± 167,1
LS9 0,2 mg/kg	143,4 ± 58,10*	544,8 ± 65,01**
LS9 0,4 mg/kg	150,8 ± 23,47*	328,7 ± 125,9

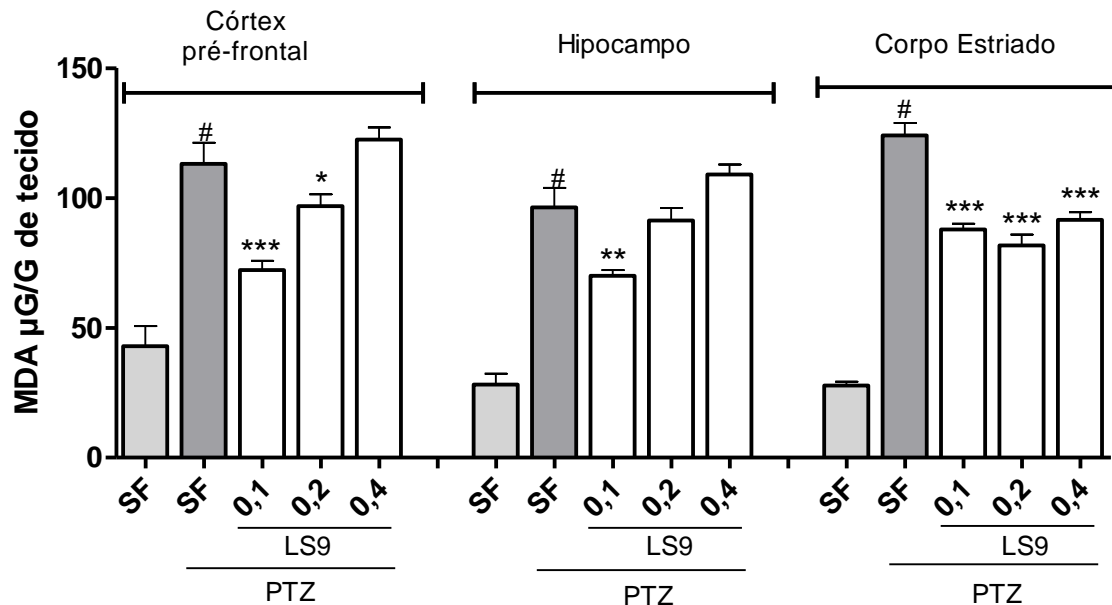
Fonte: Elaborado pelo Autor. Latência para a primeira convulsão (LPC) (segundos) e latência para a morte (LM) (segundos). Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 8 animais. Animais tratados com LS9 pela via ip. O grupo controle foi pré tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (soro fisiológico estéril 0,9%). *p < 0,05; **p < 0,001 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.1.2 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica após tratamento com peptídeo sintético LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ

Para medir a peroxidação lipídica nas áreas cerebrais analisadas, foi utilizado o método de mensuração de malondialdeído (MDA), um produto secundário do processo de peroxidação. O grupo que foi administrado soro fisiológico 0,9% e depois foi induzido a convulsão com PTZ obteve aumento de MDA nas três áreas cerebrais analisadas em relação ao controle basal (animais que foram tratados somente com soro fisiológico 0,9%). Observou-se diminuição dos níveis de MDA no córtex pré-frontal nas concentrações 0,1 e 0,2mg/kg, hipocampo na concentração de 0,1mg/kg e corpo estriado em todas as concentrações analisadas no grupo em que o peptídeo sintético LS9 foi administrado como pré-tratamento em comparação ao grupo que foi

administrado soro fisiológico 0,9%, e depois foi induzido a convulsão com PTZ, como demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Efeito do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol sobre o grau de peroxidação lipídica em camundongos



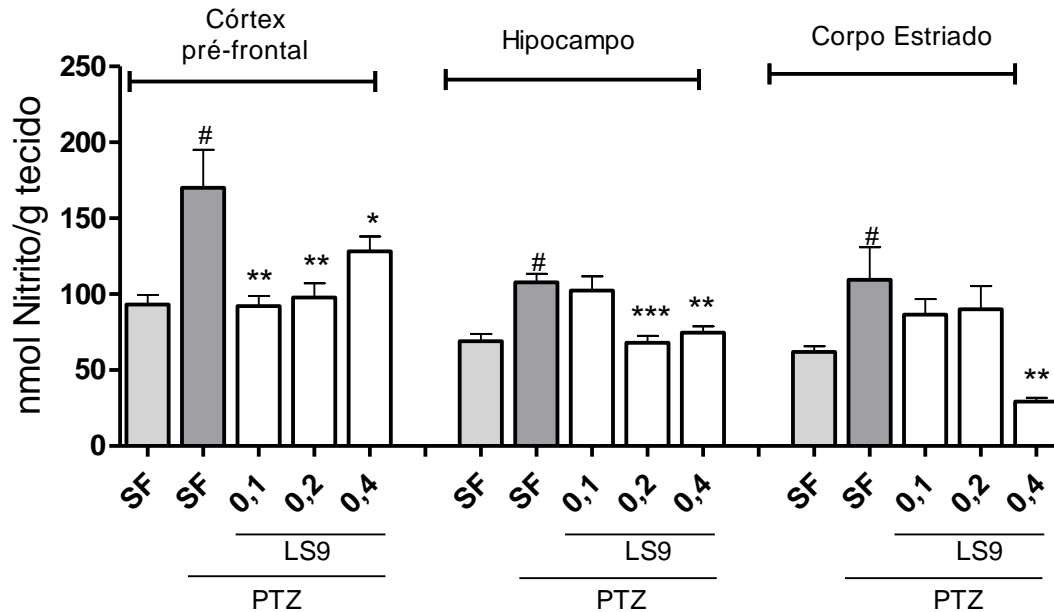
Fonte: Elaborado pelo Autor. Determinação dos níveis de MDA por espectrofotometria. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 8 animais. Animais pré-tratados com LS9 mg/kg pela via ip. O grupo controle positivo foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar os peptídeos (SF - soro fisiológico estéril 0,9%) e depois foi induzida a convulsão com PTZ (80mg/kg). O grupo controle negativo apenas foi tratado com SF, constituindo níveis basais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle positivo e # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.1.3 Determinação dos níveis de nitrito após tratamento com peptídeo sintético LS9 sobre modelo de convulsão induzido por PTZ

A formação de óxido nítrico nas áreas cerebrais analisadas, foi realizada utilizando o método descrito por Green *et al.* (1981) que possui como marcador indireto a quantificação de nitrito. Comparando os grupos que foram pré-tratados com soro fisiológico 0,9%, foi visto que o PTZ promoveu aumento da concentração de nitrito. Houve diminuição na formação de nitrito no córtex pré-frontal no modelo de convulsão estudado em todos os grupos que foram pré-tratados com o peptídeo sintético LS9. No hipocampo o efeito foi semelhante nos grupos pré-tratados com

concentrações de 0,2 e 0,4 mg/kg e no corpo estriado na concentração de 0,4 mg/kg, como observado no Gráfico 4, em comparação ao grupo pré-tratado com soro fisiológico 0,9% e posteriormente induzido convulsão com PTZ.

Gráfico 4 - Efeito do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol sobre a formação de nitrito em camundongos

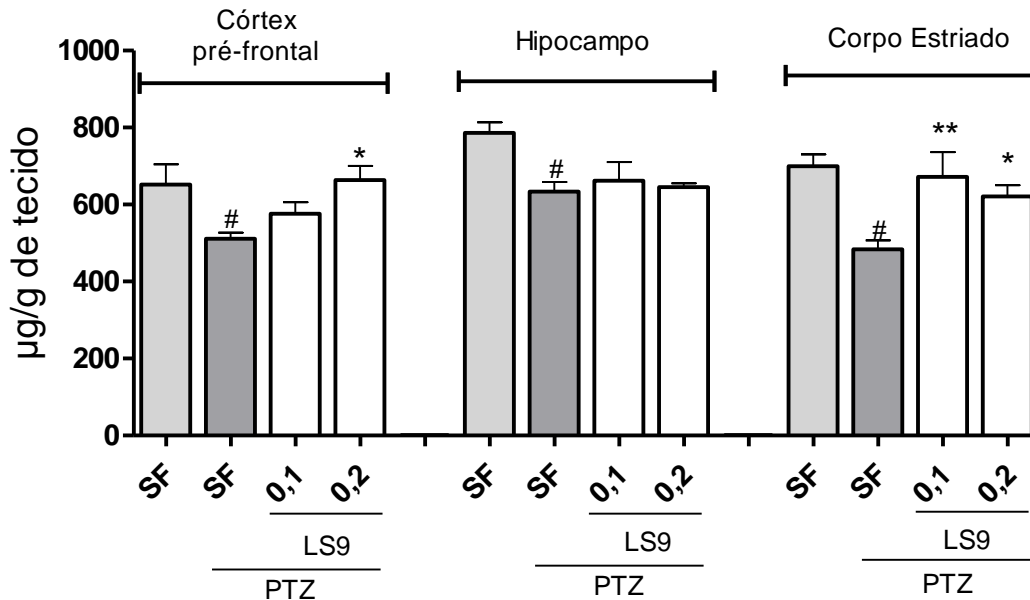


Fonte: Elaborado pelo Autor. Determinação do conteúdo de nitrito por espectrofotometria. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 8 animais. Animais pré-tratados com LS9 mg/kg pela via ip. O grupo controle positivo foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar o peptídeo (SF - soro fisiológico estéril 0,9%) e depois foi induzida a convulsão com PTZ (80mg/kg). O grupo controle negativo apenas foi tratado com SF, constituindo níveis basais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle positivo e # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.1.4 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em animais submetidos ao modelo de convulsão por PTZ e pré-tratados com LS9

A indução da convulsão com o PTZ diminuiu os níveis de GSH em relação ao grupo que foi administrado somente soro fisiológico 0,9%. O resultado obtido pela administração do LS9 0,2mg/kg, foi o aumento dos níveis de GSH no córtex pré-frontal, já nas concentrações de 0,1 e 0,2mg/kg houve aumento no corpo estriado e não houve alteração no hipocampo (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Níveis de glutatona reduzida de camundongos tratados com peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol



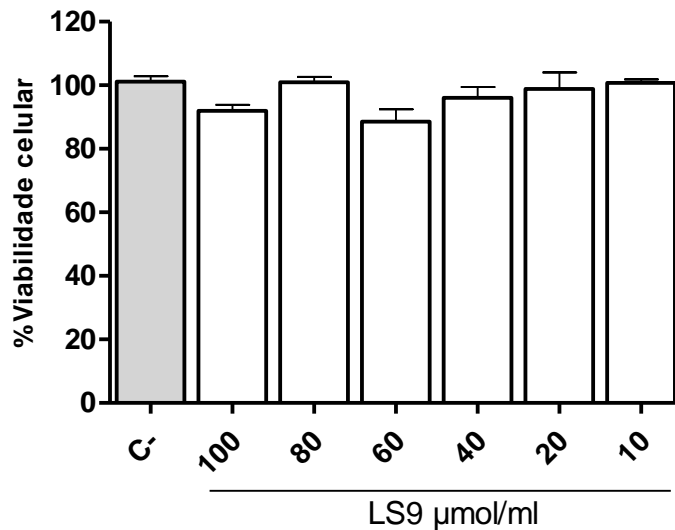
Fonte: Elaborado pelo Autor. Determinação de glutatona reduzida por espectrofotometria. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 8 animais. Animais pré-tratados com LS9 mg/kg pela via ip. O grupo controle positivo foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar o peptídeo (SF - soro fisiológico estéril 0,9%) e depois foi induzida a convulsão com PTZ (80mg/kg). O grupo controle negativo apenas foi tratado com SF, constituindo níveis basais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle positivo e # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.2 Ensaios *in vitro*

5.2.1 Efeito do peptídeo sintético LS9 sobre a viabilidade de astrócitos corticais

Com o intuito de analisar o efeito do peptídeo sintético LS9 sobre astrócitos, o peptídeo foi incubado com diferentes concentrações (100, 80, 60, 40, 20 ou 10 $\mu\text{mol/ml}$) por 24h. Os resultados mostram que esse peptídeo não foi capaz de diminuir a viabilidade das células utilizadas no presente estudo (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações do peptídeo sintético LS

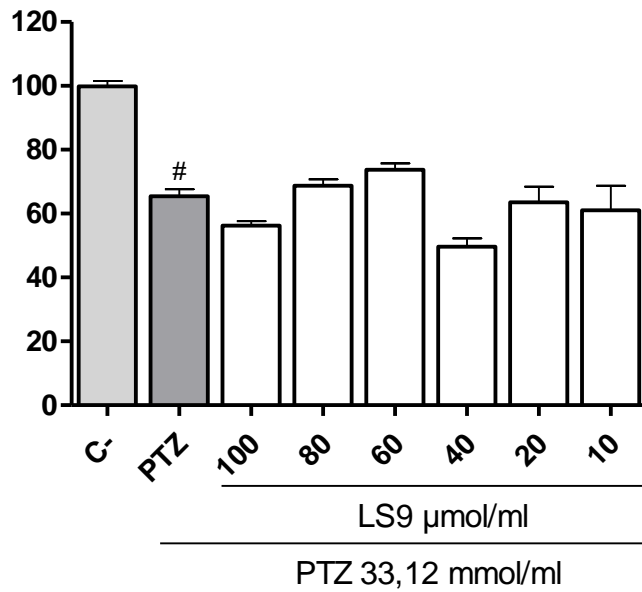


Fonte: Elaborado pelo Autor. Controle negativo (C-) foi exposto somente ao veículo utilizado para solubilizar o peptídeo (PBS – tampão fosfato salino). Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

5.2.2 Efeito do peptídeo sintético LS9 associado com IC 50 PTZ sobre a viabilidade de astrócitos corticais

No presente estudo, associamos o peptídeo LS9 em diferentes concentrações (100, 80, 40, 20 ou 10 μmol/ml) com a IC50 PTZ (concentração necessária para inibir em 50% a viabilidade celular) no intuito de observar alteração no percentual de viabilidade de astrócitos corticais, contudo os resultados encontrados sugerem que o LS9 não promoveu alteração como demonstrado no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de LS9 em associação a IC 50 PTZ



Fonte: Elaborado pelo Autor. IC50 PTZ 33,12 mmol/ml (LOPES *et al.*, 2013). Controle negativo (C-) foi exposto somente ao veículo utilizado para solubilizar o peptídeo (PBS – tampão fosfato salino). Resultados expressos como média \pm EPM. #p < 0,05 comparado ao grupo controle negativo. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Visando a identificação de possível molécula com potencial efeito terapêutico, presente no veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, analisou-se o efeito do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido pelo PTZ. O mesmo possui estrutura semelhante ao peptídeo Dq-Fa, encontrado no veneno da formiga mencionada anteriormente (TORRES, 2014). Como resultado do estudo comportamental, observou-se aumento da latência para primeira convulsão e aumento da latência de morte na dose de 0,2mg/kg.

O método de indução de convulsão pelo PTZ é um dos métodos de triagem de drogas anticonvulsivantes mais utilizados, sendo o aumento da latência para primeira convulsão indício de efeito anticonvulsivo (DE SARRO *et al.*, 1996; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002; LOSCHER, 2011). Adicionalmente, nesse modelo se observou, após pré-tratamento com veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, efeito neuroprotetor (LOPES *et al.*, 2013). Então, para possibilitar a comparação entre os estudos, o mesmo modelo foi selecionado. Assim, nota-se que tanto o peptídeo LS9 como o veneno da *Dinoponera quadriceps* apresentaram efeito anticonvulsivo, sugerindo que esse peptídeo seria um dos componentes, presentes no veneno, envolvido com o efeito observado.

A análise transcriptômica e proteômica de veneno de formigas, vespas, aranhas e escorpiões, demonstraram a existência de compostos bioativos que interagem com diferentes receptores de mamíferos no SNC. São poucos os estudos com veneno de formigas em modelos de doenças que acometem o sistema nervoso. Contudo, a vários anos, os venenos de vespas, escorpiões e aranhas são analisados quanto ao seu potencial efeito nesses modelos, demonstrando a existência e, posterior isolamento, de moléculas com ação biológica, inclusive em modelos de indução de convulsão (PIZZO *et al.*, 2000; PIZZO *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2013; MONGE-FUENTES *et al.*, 2015).

Pizzo *et al* (2000) observaram, em estudo com o veneno desnaturado da vespa social *Agelaia vicina*, a inibição forte e de forma não competitiva da recaptação de glutamato e GABA nos sinaptossomas do córtex cerebral de ratos. Posteriormente, foram isoladas duas neurotoxinas, a AvTx 7 e AvTx8. A primeira inibiu a captação de glutamato de uma forma dependente da dose e não competitiva (PIZZO *et al.*, 2004). Em comparação, foi demonstrado que AvTx8 atuava intensificando a via GABAérgica

(DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Outro estudo com o veneno de vespas do gênero *Polybia*, observou que peptídeos de baixo peso molecular apresentaram efeito antiepilético. Os mesmos foram extraídos do veneno da vespa *Polybia paulista* e administrados pela via intracerebral, promovendo aumento da latência para primeira convulsão em modelo de convulsão induzido pelo PTZ (COUTO, 2012).

Peptídeos de aranhas e escorpião com ação no SNC, mais especificamente em modelos de convulsão, estão sendo estudados desde 1990, quando Jackson e Parks identificaram um peptídeo denominado AG2 no veneno da aranha *Agelenopsis aperta*, e observaram que quando era administrado por via intravenosa ou por via intracerebral produzia supressão dose-dependente de convulsões comportamentais, induzidas em ratos, pelo ácido caínico, picrotoxina ou bicuculina. Outros estudos analisaram duas moléculas isoladas do veneno da aranha *Parawixia bistriata*, o parawixin2 e parawixin10, e observaram ação anticonvulsivante em vários modelos de convulsão incluindo PTZ, sendo a primeira capaz de inibir a recaptação de GABA e glicina numa forma dose dependente e a segunda atuando no sistema glutamatérgico e transmissão glicinérgica, não alterando a via GABAérgica (GELFUSO *et al.*, 2007; FACHIM *et al.*, 2011). Dentre os peptídeos identificados em veneno de escorpião, os peptídeos BMK IT2 e BmK AS, isolados do veneno do *Buthus martensi Karsch*, apresentaram efeito anticonvulsivante em modelo de convulsão induzido por PTZ ou pilocarpina, atuando na modulação seletiva de subtipos de canais de sódio no hipocampo (ZHAO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2011).

Estes achados demonstram que moléculas extraídas de veneno de artrópodes promoveram efeito semelhante ao encontrado no presente estudo. Observa-se que os peptídeos apresentaram alta eficácia, especificidade e potência para seus alvos moleculares, diminuindo a possibilidade de interação com receptores não específicos, podendo o mesmo ser evidenciado quando o mecanismo de ação do LS9 for elucidado, necessitando de estudos futuros para melhor análise. Essas características, desenvolvidas e selecionadas naturalmente, não são comumente encontrados em outras pequenas moléculas naturais. (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; GELFUSO *et al.*, 2007; FACHIM *et al.*, 2011; MONGE-FUENTES *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o papel do estresse oxidativo na patogênese da epilepsia tem sido estudado. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) a longo prazo aumenta o risco de neurodegeneração. O estresse oxidativo causado pelo aumento dos radicais livres podem desempenhar um papel importante nos

mecanismos associados com o início das crises epilépticas e sua progressão (SHIN *et al.*, 2011). EROs são capazes de atacar membranas lipídicas e resultar em um evento denominado peroxidação lipídica. Esta tem sido reportada por contribuir para a função deficiente da membrana lipídica durante a epileptogênese (BASHKATOVA *et al.*, 2000; MULSCH *et al.*, 1994).

Metabólitos do óxido nítrico tem estado relacionados ao desenvolvimento de toxicidade causada pelo oxigênio no SNC. Estudos demonstram que em alguns modelos de convulsão desenvolvidos em ratos, como, por exemplo, aqueles utilizando ácido kaínico ou PTZ, há acentuado aumento da geração de NO (BASHKATOVA *et al.*, 2003; MULSCH *et al.*, 1994). Dentre um dos mecanismos envolvidos nesse efeito maléfico do NO está o fato dele poder reagir com radicais superóxido formando peroxinitrito, o qual é um potente indutor de morte celular (CZUCZWAR *et al.*, 1999; DE SARRO *et al.*, 1993). Produção excessiva de radicais livres poderia induzir a atividade convulsiva por inativar diretamente a glutamina-sintetase, que aumenta os níveis do neurotransmissor excitatório glutamato (OLIVER *et al.*, 1990).

PTZ através de receptores NMDA de glutamato ativa a liberação intracelular de cálcio que, conseqüentemente, ativa a via de cálcio-calmodulina para aumentar a expressão de proteína NO-sintase (NOS), esta, por sua vez, aumenta a produção de NO, podendo ocasionar aumento da indução de crises epilépticas tônico-clônicas generalizadas (ITOH E WATANABE, 2009). O nitrito (metabólito estável do NO) tem sido implicado em muitos mecanismos moleculares envolvidos nas convulsões, podendo modular uma cascata de efeitos excitatórios no SNC e participar do subsequente dano neuronal (DALKARA *et al.*, 1994).

Os radicais livres no processo convulsivo podem ser neutralizados por um sistema elaborado de defesa antioxidante, tais como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, catalase, glutathione redutase e glutathione reduzida (LIU, 1997). Baixas concentrações de GSH tecidual podem ser interpretadas como evidência de desequilíbrio redox, pois como GSH é uma defesa de primeira linha contra a superprodução de radicais livres, seu conteúdo reduzido é tomado como um índice de estresse oxidativo (FLOREANI *et al.*, 1999). Estudos prévios demonstraram diminuição da concentração de glutathione reduzida após convulsões induzidas por PTZ (OBAY *et al.*, 2008), bem como induzidas por outros agentes convulsivantes (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com estes dados, decidiu-se avaliar o nível de estresse oxidativo pela mensuração de malondialdeído (MDA), nitrito e glutathiona reduzida (GSH). Os resultados do presente estudo mostraram que as convulsões induzidas pelo PTZ promoveram aumento de peroxidação lipídica e nitrito, além de diminuição dos níveis de GSH. O pré-tratamento com o peptídeo LS9 foi capaz de diminuir os níveis de MDA e nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado e aumentar o nível de glutathiona reduzida no córtex pré-frontal e no corpo estriado.

Lopes *et al.* (2013) observou que o veneno total da *Dinoponera quadriceps* foi capaz de diminuir a produção de MDA e nitrito somente no córtex pré-frontal quando administrado pela via intraperitoneal, apresentando efeito somente em modelo de indução de convulsão por PTZ. Esses achados indicam que o peptídeo LS9 pode ser um dos componentes presentes no veneno com capacidade antioxidante, visto que a administração do peptídeo isolado promoveu efeito ainda mais promissor, possivelmente relacionado com a concentração que foi utilizada, superior a concentração que é encontrado no veneno da formiga, ou por causa da inexistência de outras moléculas, que estão presentes no veneno, que poderiam interferir com o efeito biológico, visto que o peptídeo possuía pureza superior a 95%.

Assim, nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte, a atividade anticonvulsivante do LS9 pode estar relacionada à possíveis efeitos antioxidantes contra peroxidação lipídica e formação de óxido nítrico, pois tem sido relatado que substâncias antioxidantes são capazes de inibir significativamente a convulsão induzida pelo PTZ (ILHAN *et al.*, 2005; TAIWEA *et al.*, 2016) e tem-se manifestado um interesse substancial no uso de substâncias antioxidantes para proteger os componentes celulares da ação deletéria dos radicais livres durante a atividade convulsiva, especialmente a peroxidação lipídica. Em vários estudos experimentais, foi demonstrado que o uso de antioxidantes pode ser uma abordagem potencial, diminuindo a excitotoxicidade e prevenindo a neurotoxicidade por inibição da produção de EROs (ILHAN *et al.*, 2005).

A epileptogênese, por ser um processo altamente complexo, não deve ser vista apenas através do componente neuronal. Confirmando isto, estudos pré-clínicos e clínicos tem, cada vez mais, mostrado a participação de outras estruturas no desenvolvimento da epilepsia, como células da glia (WETHERINGTON; SERRANO; DINGLELINE, 2008), vascularização cerebral (FRIEDMAN; KAUFER; HEINEMANN, 2009) e leucócitos periféricos (GREENWOOD *et al.*, 2002).

Os estudos estão modificando a visão de integração entre neurônios e glia, bem como a integração da glia com a modulação e participação na transmissão da atividade sináptica. Os astrócitos exercem papel fundamental na qualidade de transmissão sináptica uma vez que o glutamato é recaptado em sua grande maioria pelos receptores astrocitários GLT-1 e GLAST (SHELDON E ROBINSON, 2007). O termo sinapse tripartite se refere ao conceito de que a transmissão de informação dentro do SNC não se dá apenas entre um terminal axonal e outro terminal dendrítico (ou terminais pré e pós-sinápticos respectivamente), mas que estes terminais teriam uma triangulação com uma ramificação astrocitária (STIPURSKY, ROMAO *et al.*, 2011; STIPURSKY, SPOHR *et al.*, 2012).

Estudo prévio realizado por Lopes (2014) identificou que o PTZ diminuiu a viabilidade de astrócitos corticais *in vitro*, podendo este efeito ser mais um possível mecanismo de atuação do PTZ, culminando no desenvolvimento de convulsão, devido ao comprometimento da recaptação de glutamato bem como remoção de íons K⁺ que ficam acumulados durante intensa atividade sináptica (BORDEY; SONTHEIMER, 1998; BEDNER; STEINHÄUSER, 2013; CRUNELLI V, CARMIGNOTO G, STEINHÄUSER C., 2015).

Com base nos recentes achados sobre o envolvimento das células da glia com o desenvolvimento de distúrbios neurais e com modulação de sinapses neuronais, decidiu-se averiguar se o LS9 apresentava algum potencial citotóxico quando exposto a cultura de astrócitos corticais *in vitro*, visto que essas células são de fundamental importância para a manutenção do funcionamento do SNC. Os resultados observados demonstraram ausência de efeito tóxico, semelhante ao resultado encontrado quando a mesma linhagem celular foi exposta ao veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, sendo este um achado importante, pois a destruição dessa célula pode comprometer o funcionamento neuronal (Lopes, 2014).

Lopes (2014) observou que a maior dose analisada do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* associada ao PTZ (33,12 mmol/ml) promoveu uma intensificação do efeito tóxico, diminuindo a viabilidade celular de astrócitos. Diante dos dados apresentados anteriormente, decidimos averiguar se o LS9 possuía a capacidade de alterar a viabilidade de células expostas ao associar com a mesma concentração de PTZ. Os resultados encontrados sugerem que o LS9 não foi capaz de intensificar ou diminuir o efeito deletério, sugerindo que, provavelmente, não é o

peptídeo presente no veneno que acentua o efeito tóxico quando em associação com o PTZ, mostrando que o composto sintético é mais seguro que o veneno total.

Curiosamente, DAEs utilizados como tratamento para epilepsia foram capazes de diminuir a viabilidade celular de astrócitos corticais *in vitro*, quando os mesmos eram incubados com concentrações proporcionais as utilizadas para o tratamento da epilepsia. Não se sabe o impacto desse resultado no tratamento, porém, diante das novas descobertas sobre a importância dessa célula glial, novos fármacos que não apresentam efeito tóxico em astrócitos e que o possuem como possível alvo terapêutico podem, futuramente, desempenhar papel promissor para o tratamento dessa doença, sendo a falta de efeito tóxico do LS9, nessa linhagem celular, um resultado promissor em comparação a esses fármacos (CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHÄUSER, 2015; PAVONE, CARDILE, 2003).

Estudos futuros com o LS9 serão realizados em outras linhagens celulares, incluindo neurônio e micróglia e em outros modelos de indução de convulsão, para avaliar a toxicidade e possível mecanismo de ação envolvido, contribuindo para o aumento do conhecimento sobre a ação biológica de moléculas presentes no veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que o peptídeo sintético LS9, um dos peptídeos presentes no veneno total da formiga *Dinoponera quadriceps*, promoveu efeito anticonvulsivante quando administrado como pré-tratamento em modelo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol *in vivo*. Os animais pré-tratados com LS9 apresentaram diminuição da peroxidação lipídica, do nitrito e aumento dos níveis de glutathiona reduzida. Além disso, o peptídeo não promoveu alteração da viabilidade celular em cultura de astrócitos corticais *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.C.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.; DE ABREU, R.N.; CHAVES, E.M.; DO VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.; VASCONCELOS, S.M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev.** 2012.

AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAUJO, P.V.P.; VASCONCELOS, G.S.; CHAVES, E.M.C.; DO VALE, O.C.; MACEDO, D.S.; DE SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; VASCONCELOS, S.M.M. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. **Epilepsy Behav.**, v. 24, p. 324–328, 2012.

ATTYGALLE, AB; MORGAN, ED. Chemicals from the glands of ants. **Chemical Society Review**, v. 13, p245-278, 1984.

BAGETTA, G.; PAOLETTI, A. M.; LETA, A.; DEL DUCA, C.; NISTICO, R.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M. T. Abnormal expression of neuronal nitric oxide synthase triggers limbic seizures and hippocampal damage in rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 291, p. 255-260, 2002.

BANERJEE, J.; CHANDRA, S. P.; KURWALE, N.; TRIPATHI, M. Epileptogenic networks and drug-resistant epilepsy: Present and future perspectives of epilepsy. **Research-Utility for the epileptologist and the epilepsy surgeon.**, v. 17, p. 134-140, 2014.

BASHKATOVA, V.; NARKEVICH, V.; VITSKOVA, G.; VANIN, A. The influence of anticonvulsivante drugs on nitric oxide levels and lipid peroxidation in the rat brain during penthylenetetrazole-induced epileptiformmodel sseizures. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 487-492, 2003.

BEDNER, P.; STEINHÄUSER, C. Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. **Neurochem. Int.**, v.S0197-0186, n.13, 000144, 2013.

BEDNER, P.; STEINHÄUSER, C. Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. **Neurochem. Int.**, v.S0197-0186, n.13, 000144, 2013.

BIALER, M. & WHITE, H. S. Key factors in the Discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 68-82, 2010.

BIALER, M.; WHITE, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 9, p. 68–82, 2010.

BORDEY, A.; SONTHEIMER, H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. **Epilepsy Res.**, v.32, n.1-2, p.286-303, 1998.

BORDEY, A.; SONTHEIMER, H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. **Epilepsy Res.**, v.32, n.1-2, p.286-303, 1998.

BRACCI, E.; VREUGDENHIL, M.; HACK, S.P.; JEFFERYS, J.G. Dynamic modulation of excitation and inhibition during stimulation at gamma and beta frequencies in the CA1 hippocampal region. **Journal of Neurophysiology**, v.85, p.24-12-2422, 2001.

BRANCOA, C. S.; SCOLAA, G.; RODRIGUESA, A. D.; LAPROVITERAB, V. C.; HEINZENB, M.; SANTOSC, M. T.; FANKC, B.; FREITASC, S. C. V.; SALVADOR, A. S. C. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, 2013.

BRODIE, M.J. Antiepileptic drug therapy the story so far. **Seizure**, v. 19, p. 650-655, 2010.

CALABRESI, P.; DI FILIPPO, M.; GHIGLIERI, V.; TAMBASCO, N.; PICCONI, B. Levodopa induced dyskinesias in patients with Parkinson's Disease: Filling the bench-to bedside gap. **Lancet Neurol.**, v. 9, p. 1106–1117, 2010.

CHAUDHARY, U.J.; DUNCAN, J.S.; LEMIEUX, L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: persistente beliefs. **Epilepsy & Behavior**, v. 21, p. 109-114, 2011.

CLARK, AG; EISEN, MB; SMITH, DR; BERGMAN, CM; OLIVER, B; et al. Evolution of genes and genomes on the Drosophila phylogeny. **Nature**, v450, p203-218, 2007.

COHEN MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, p. 918-31, 1989.

COUTO, L.L.; DOS ANJOS, L.C.; ARAUJO, M.A.F.; MOURÃO, C.A.; SCHWARTZ, C.A.; FERREIRA, L.B.; MORTARI, M.R. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Pharmacogn. Mag.**, v. 8, p. 292–299, 2012.

CRESTANI, F.; ASSANDR, R.; TAUBER, M.; MARTIN, J. R.; RUDOLPH, U. Contribution of the alpha 1-GABAA receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 679-684, 2002.

CRUNELLI, V.; CARMIGNOTO, G.; STEINHÄUSER, C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. **Neuroscientist**. V.21, p.62-83, 2015.

CZUCZWAR, S. J.; TUTKA, P.; KLONOWSKI, p.; KLEINROK, Z. N(G)-Nitro-Larginine impairs the anticonvulsive action of ethosuximide against pentylenetetrazole. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 366, p. 137-42, 1999.

DALKARA, T.; YOSHIDA, T.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M.A. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1447-1452, 1994.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 5147-59, 1994.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death Differentiation**, v. 3, p. 71-8, 1996.

DE KEYSER, J.; MOSTERT, J.P.; KOCH, M.W. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol. Sci.*, v.267, n.1-2, p.3-16, 2008.

DE OLIVEIRA, L.; CUNHA, A.O.; MORTARI, M.R.; PIZZO, A.B.; MIRANDA, A.; COIMBRA, N.C. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelais vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. **Brain Res**, v.1031, p. 74–81, 2005.

DE SARRO, G.; GITTO, R.; RIZZO, M.; ZAPPIA, M.; DE SARRO, A. 1,4-Benzodiazepine derivatives as anticonvulsant agentes in DBA/2 mice. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 6, p. 935-941, 1996.

DE SARRO, J.; DI PAOLA, E.D.; DE SARRO, A.; VIDAL, M.J.; L-Arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep piriform córtex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 230, p. 151-8, 1993.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 163-173, 1989.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; NAJJAR, S.; DE LANEROLLE, N.C.; ROGAWSKI, M.A. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.*, pii: S0166-2236(12)00205-6, 2013.

DIAZ, A.; MENDEZ, R.M.; GALVÁN, A.S.; NAVA, A.J. M.C.; RÍOS, R. S.G. B.C. Antioxidant, Anticonvulsive and Neuroprotective Effects of Dapsone and Phenobarbital Against Kainic Acid-Induced Damage in Rats. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1819–1827, 2013.

DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C. Glutamate and Aspartate. In: SIEGEL, G.J. et al. (Ed). *Basic Neurochemistry, molecular cellular and medical aspects*. **Lippincott Williams & Wilkins**, p. 315, 1999.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v.36, n.2, p.180-90, 2001.

ENGEL, J.JR.; SCHWARTZKROIN, P.A.; MOSHÉ, S.L.; LOWENSTEIN, D.H. *Brain plasticity and epilepsy*. Academic Press, San Diego, 2001.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M. Venomics: Unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **J. Mass Spectrom**, v.43, p. 279–295, 2008.

FACHIM HA, CUNHA AO, PEREIRA AC, BELEBONI RO, GOBBO-NETO L, LOPES NP, COUTINHO-NETO J, DOS SANTOS WF. Neurobiological activity of Parawixin

10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia bistriata* spider venom (Araneidae: Araneae). *Epilepsy Behav*, v. 22, p. 58-64, 2011.

FAN, YX; SONG, J; SHEN, HB; KONG, X. PredCSF: an integrated feature-based approach for predicting conotoxin superfamily. **Protein Pept Lett**, v18, n3, p261-267, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FISHER, R.S. Redefining epilepsy. *Curr Opin Neurol*, v. 28, p.130-5, 2015.

FLOREANI, M.; SKAPER, S.D.; FACCI, L.; LIPARTITI, M.; GIUSTI, P. Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. **FASEB J**, v.11, p. 1309–1315, 1999.

FRIEDMAN A, KAUFER D, HEINEMANN U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res*, v. 85, p.142-9, 2009.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 349-358, 1994.

GELFUSO, E.A.; LIBERATO, J.L.; CUNHA, A.O.; MORTARI, M.R.; BELEBONI, R.O.; LOPES, N.P.; DOS SANTOS, W.F. Parawixin2, a novel non-selective GABA uptake inhibitor from *Parawixia bistriata* spider venom, inhibits pentylentetrazole-induced chemical kindling in rats. *Neurosci Lett*. May, v. 24, p. 543-12, 2013.

GOMES, F. C.; SPOHR, T.C.; MARTINEZ, R.; MOURA NETO, V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Braz. J Med. Biol. Res.**, v.34, n.5, p.611-20, 2001.

GOMES, F.C.A; TORTELLI, V.P; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, p. 77, 2013.

GOMES, M.M. Frequência populacional de epilepsia. *Revista Brasileira de Neurologia*, v.33, n.1, p. 3-7, 1997.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56–58, 1981.

GULLAN, PJ; CRANSTON, PS. The insects: an outline of entomology. **Wiley-Blackwell:Chichester**; 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, 2007.

HEINRICH MC1, KUHLMANN MK, GRGIC A, HECKMANN M, KRAMANN B, UDER M. Cytotoxic effects of ionic high-osmolar, nonionic monomeric, and nonionic iso

osmolar dimeric iodinated contrast media on renal tubular cells in vitro. **Radiology**. V. 235, p. 843-9, 2005.

HUANG, R.Q.; BELL-HORNER, C.L.; DIBAS, M.L.; COVEY, D.F.; DREWE, J.A.; DILLON, G.H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A))receptors: mechanism and site of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, p. 986–995, 2001.

HUNG, A.Y.; SCHWARZSCHILD, M.A. Treatment of Parkinson's Disease: What's in the non-dopaminergic pipeline? **Neurotherapeutics**, v. 11, p. 34–46, 2014.

HUONG, N. T.; MATSUMOTO, K.; KASA, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol. Pharm. Bull**, v. 21, p. 978-981, 1998.

ILHAN, A., M.A.; ALADAG, A.; KOCER, A.; BOLUK, A.; GUREL, F.; ARMUTCU. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. **Brain Research Bulletin**, v. 65, p. 495–499, 2005.

ILHAN, A.; GUREL, A.; ARMUTCU, F.; KAMISLI, S.; IRAZ, M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylentetrazol-induced kindling in mice. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 456-464, 2005.

ITOH, K.; WATANABE, M. Paradoxical facilitation of pentylentetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Neuroscience**, v. 17, p. 735-43, 2009.

JACKSON, H.; PARKS, T.N. Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from *Agelenopsis* spider venom. **Brain Res**, v. 3, p. 338-41, 1990.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, p. 331-43, 2008.

JANE, D.E.; LODGE, D.; COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v.56, p. 90-113, 2009.

JOHNSON, S.R.; RIKLI, H.G.; SCHMIDT, J.O.; EVANS, M.S. A reexamination of poneratoxin from the venom of the bullet ant *Paraponera clavata*. **Peptides.**, v. 3, p. S0196-9781, 2016.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P., KUBOTA, L. T. Envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

KING, GF. Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. **Aust Biochem.**, v. 44, p. 13–5, 2013.

LAFRANCE, W.C.Jr.; KANNER, A.M. & HERMANN, B. Psychiatric comorbidities in epilepsy. **International Review of Neurobiology**, v.83, p.347-383, 2008.

LE DUIGOU, C.; HOLDEN, T.; KULLMANN, D.M. Short- and long-term depression at glutamatergic synapses on hippocampal interneurons by group I mGluR activation. **Neuropharmacology**, v.60, p. 748-756, 2011.

LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. **Exp. Cell Res.**, v. 239, p. 183-201, 1998.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, p. 790–802, 2003.

LIMA, PRM; BROCHETTO-BRAGA, MR. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **JVAT**, v9, p149-162, 2003.

LOPES, K. S. Estudo do potencial terapêutico do veneno da *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de convulsão *in vivo* e sobre astrocitos *in vitro*. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Ceará-UFC, 2014.

LOPES, K. S.; RIOS, E. R. V.; LIMA, C. N.C.; LINHARES, M. I.; TORRES, A. F. C.; HAVT, A.; QUINET, Y. P.; FONTELES, M. M. F.; MARTINS, A. M. C. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, v. 63, p. 141-145, 2013.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the Discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, p. 359-68, 2011.

LOSCHER, W. Genetic animal models of epilepsy as a unique resource for the evaluation of anticonvulsant drugs. **A review. Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 6, p. 531-47, 1984.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

LOWENSTEIN, D.H. Edging toward breakthroughs in epilepsy diagnostics and care. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 11, p. 1-2, 2015.

LUMME, A.; VANHATALO, S.; SADENIEMI, M.; SOINILA, S. Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic neurons following axonal injury or colchicine treatment. **Exp. Neurol.**, v. 144, p. 248-57, 1997.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIM, V.M.S.; VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**. v. 33, p. 299-306, 1998.

MEHTA, A.K.; TICKU, M.K. Na update on GABA A receptors. **Brain Res. Ver.**, v. 29, p. 196-217, 1999.

MEINWALD, J.; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 3, p.14-8, 1995.

MELDRUM, B.S.; ROGAWSKI, M.A. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental**, v. 4, p. 18-61, 2007.

MÉNDEZ, P. & BACCI, A. Assortment of BABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. **Neural Plasticity**, v.2011, p. 1-14, 2011.

MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F. M. M.; CAMPOS, G. A. A.; SILVA, J. C.; BIOLCHI, A. M.; DOS ANJOS, L. C.; GONÇALVES, J. C.; LOPES, K. S.; MORTARI, M.R. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, p. 21-31, 2015.

MORI, H.; KOGURE, M.; KUMABE, K.; ANAL. LETT. Determination of Hydroperoxides with the Use of Immobilized Glutathione Peroxidase in a Flow System. **Journal Analytical Letters**, v. 25, p. 1643, 1992.

MORTARI MR, CUNHA AOS. New perspectives in drug discovery using neuroactive molecules from the venom of arthropods. In: Baptista GR, editor. *An Integrative View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*, p. 91–117, 2013.

MULSCH, A.; SCHRAY-UTZ, B.; MORDVINTEEV, P.I.; VANIN, A.F.; NIELSEN, E.O.; SCHEEL-KRUGER, J.; OLESEN, S.P. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *NeuroReport*, v. 5, p. 2325-2328, 1994.

MURASHIMA, Y.L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Ictogenesis and epileptogenesis in el mice. **Epilepsia**, v. 5, p. 130-135, 2002.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; FERREIRA, E.C.; ABDALLA, D.S.P.; AMADO, D.; BELLISIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res**, v. 46, p. 121-128, 2001.

NÔGA, D.A.M.F., CAGNI, F.C., SANTOS, J.R., SILVA, D., AZEVEDO, D.L.O., ARAÚJO, A., SILVA, R.H., RIBEIRO, A. M. Pro-and Anticonvulsant Effects of the Ant Dinoponera quadriceps (Kempf) Venom in Mice. **Neotrop. Entomol.**, p. 1-8, 2015.

OBAY, B.D.; EZEL TAS, D.; TUMER, C.; BILGIN, H.M.; ATMACA, M. Dose dependente effects of ghrelin on pentylenetetrazole induced oxidative stress in a rat seizure model. **Peptides**, v. 29, p. 448-455, 2008.

OLIVEIRA, A. A. Efeitos do levetiracetam no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; GEORGIU, C.D.; ANGELATOU, F.; MATSOKIS, N.A.; PANAGOPOULOS, N.T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. **Epilepsy Research**, v. 62, p. 65–74, 2004.

PAVONE, A. e CARDILE, V. An In Vitro Study of New Antiepileptic Drugs and Astrocytes. **Epilepsia**, v. 44, p. 34–39, 2003.

PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. 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**, v. 14, p. 88–94, 2000.

PIZZO, A.B.; FONTANA, C.K.; RIBEIRO, A.M.; MIRANDA, A.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Characterization of the actions of avtx 7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. **J Biochem Mol Toxicol**, v.18, p. 61–8, 2004.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DE ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 179-184, 2002.

RAMANJANEYULU, R.; Ticku, M. K. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur J Pharmacol**, v. 98, p. 337-45, 1984.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1114-1120, 2006.

RAO, V.R.; LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **Current Biology**, v.25 n. 17, p. 42-46, 2015.

RIBEIRO, M.C.; ÀVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.M; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. α -Tecoferol protects against pentylenetetrazol and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res.**, v. 66, p. 185-194, 2005.

ROGAWSKI, M.A. & LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, p.553-564, 2004.

SAMY, RP; GOPALAKRISHNAKONE, P; STILES, BG; GIRISH, KS; SWAMY, SN; HEMSHEKHAR, M; TAN, KS; ROWAN, EG; SETHI, G; CHOW, VT. Snake venom phospholipases A (2): a novel tool against bacterial diseases. **Curr Med Chem**, v19, n36, p6150-6162, 2012.

SAVAGE, N. The complexities of epilepsy. **Nature**, v.511, p. 2-3, 2014.

SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E.K.; STEVENS, B. The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, v.61, n.1, p.24-36, 2013.

SCHMIDT, JO; BLUM, MS; OVERAL, WL. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v24, n9, p907–921, 1986.

SEIFERT G, SCHILLING, K.; STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.7, p.3, p.194-206, 2006.

SHELDON, A.L.; ROBINSON, M.B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*, v. 51, p.333-55, 2007.

SHIN,E.J.; BACH, J.H.; NGUYEN, T.T.L.; JUNG, B.D.; OH, K.W.; KIM, M.J.; JANG, C.G.; ALI, S.F.; KO, S.K.; YANG, C.H. *Gastrodia elata* BI attenuates cocaine-induced conditioned place preference and convulsion, but not behavioral sensitization in mice: Importance of GABAA receptors. **Current Neuropharmacology**, v. 9, p. 26-29, 2011.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. **Curr Top Med Chem**, v. 2, p. 795-816, 2002.

SILVA, J.; MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F.; LOPES, K.; DOS ANJOS, L.; CAMPOS, G.; ARENAS, C.; BIOLCHI, A.; GONÇALVES, J.; GALANTE, P.; CAMPOS, L.; MORTARI, M. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. **Toxins**, v. 7, p. 3179-3209, 2015.

SNYDER, G.L.; FIENBERG, A.A.; HUGANIR, R.L.; GREENGARD, P. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein Mr 32kDa/protein phosphatase-a pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 10297-303, 1998.

STEFAN, H.; PAULINI-RUF, A.; HOPFENGARTNER, R.; RAMPP, S. Network characteristics of idiopathic generalized epilepsies in combined MEG/EEG. **Epilepsy Research**, v.85, p.187-198, 2009.

STEWART, A.M.; DESMOND, D.; KYZAR, E.; GAIKWAD, S.; ROTH, A.; RIEHL, R.; COLLINS, C.; MONNIG, L.; GREEN, J.; KALUEFF, A. V. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? **Brain Res Bull**, v. 87, p. 135-43, 2012.

STIPURSKY, J. SPOHR, T.C.; SOUSA, V.O.; GOMES, F.C. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. **Neurochem Res.**, v.37, n.11, p.2402-18, 2012.

STIPURSKY, J.; ROMÃO, L.; TORTELLI, V.; NETO, V.M.; GOMES, F.C. Neuron glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. **Life Sci.**, v.89, p.524-531, 2011.

STIPURSKY, J.; SPOHR, T.C.; SOUSA, V.O.; GOMES, F.C. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: Ulrich, A.H. (Org.). *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy*. Springer, v.1, p.145-164, 2010.

TAIWEA, G. S; TCHOYAB, T. B.; MENANGAB, J. R.; DABOLEC, B; DE WAARDD, M; Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. **J Ethnopharmacol.** V. 16, p. 31205-3, 2016.

TAKECHI, K.; SUEMARU, K.; KAWASAKI, H.; ARAKI, H. Impaired memory following repeat pentylenetetrazol treatments in kindled mice. **Yakugaku Zasshi**, v. 132, p. 179-82, 2012.

THURMAN, D.J. The epidemiology of SUDEP: a public health perspective. **Epilepsy Currents**, v.13, n.9, 2013.

TORRES, A.F. Caracterização genômica e biológica do veneno de *Dinoponera quadriciceps*. Tese (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Ino) Universidade Federal do Ceará. 2014.

TORRES, A.F.C; HUANG, C.; CHEONG-MENG, C.; LEUNG, S. W.; PRIETO-DA-SILVA, A. L. R. B. HAVT, A.; QUINET, Y. P.; MARTINS, A. M. C.; LEE, S. M. Y.; RA´DIS-BAPTISTA, G. Transcriptome Analysis in Venom Gland of the Predatory Giant Ant *Dinoponera quadriciceps*: Insights into the Polypeptide Toxin Arsenal of Hymenopterans. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

TURSKI, W. A; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARTZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983.

VANHATALO, S.; LUMME, A.; SOINILA, S. Colchicine differentially induces the expressions of nitric oxid synthases in central and peripheral catecholaminergic neurons. **Exp. Neurol.**, v. 150, p. 107-114, 1998.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIZZARD, M. A.; ERDMAN, S. L.; DE GROAT, W. C. Increased expression. Of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 4033-45, 1995.

WALKER, F.O. Huntington's disease. **Lancet**, v. 369, p. 218–28, 2007.

WATKINS, J.C.; OLVERMAN, H. J. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 265-272, 1987.

WETHERINGTON, J.; SERRANO, G.; DINGLELINE, R. Astrocytes in the epileptic brain. **Neuron.**, v. 24, p. 168-78, 2008.

WHITE, H. S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 38, p. 9-17, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy, 2016. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>.

WU, D.; HERSCH, L. B. Choline acetyltransferase: Celebrating its fiftieth year. **J. Neurochem**, v. 62, n. 1653-63, 1994.

YILMAZ, I.; SEZER, Z.; KAYIR, H.; UZBAY, T. I. Mirtazapine does not affect pentylentetrazole- and maximal electroconvulsive shock-induced seizures in mice. **Epilepsy Behav.**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2007.

ZHAO, R.; WENG, C.C.; FENG, Q.; CHEN, L.; ZHANG, X.Y.; ZHU, H.Y. Anticonvulsant activity of BmK AS, a sodium channel site 4-specific modulator. **Epilepsy Behav**, v. 20(2), p. 267–76, 2011.

ZHAO, R.; WENG, C.C.; FENG, Q.; CHEN, L.; ZHANG, X.Y.; ZHU, H.Y.; WANG, Y.; JI, Y.H. Anticonvulsant activity of BmK AS, a sodium channel site 4-specific modulator. **Epilepsy Behav**, v. 20, p. 267-76, 2011.