



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KAMILA SOARES LOPES

**Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de
convulsão *in vivo* e sobre astrócitos *in vitro***

FORTALEZA

2014

KAMILA SOARES LOPES

Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de convulsão *in vivo* e sobre astrócitos *in vitro*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

- L853e Lopes, Kamila Soares.
 Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de convulsão *in vivo* e sobre astrócitos *in vitro* / Kamila Soares Lopes. – 2014.
 80f. : il. color., enc. ; 30 cm.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2014.
 Área de concentração: Farmácia.
 Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Venenos de Formiga. 2. Epilepsia. 3. Estresse Oxidativo. 4. Astrócitos. I. Título.

CDD 615.1

KAMILA SOARES LOPES

Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de convulsão *in vivo* e sobre astrócitos *in vitro*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC)

Profª. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Departamento de Farmácia (UFC)

Profª. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC)

À Deus, meu pai no céu.
E aos meus pais na terra, Antônio e Helena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus, por me dar forças para vencer as dificuldades do dia a dia e alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Antonio e Helena, por nunca terem medido esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade. Pelo enorme apoio, carinho e dedicação. Vocês são minha base, meu tudo. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Kércia, Silvio e Marcelo, pois sei que sempre poderei contar incondicionalmente com o carinho e amparo de vocês.

Ao meu esposo, Kelson. Muitos não sabem das dificuldades que passamos para podermos estar juntos hoje. Reconheço que cada esforço valeu a pena. Hoje sou verdadeiramente feliz. Muito obrigada por toda sua compreensão, companheirismo, dedicação, incentivo e amor. Te amo.

As minhas amigas, Anielle e Fernanda. Saibam que sempre estarei com vocês, mesmo que em pensamento. A distância nunca irá apagar ou enfraquecer o vínculo que criamos. Sempre estarei a postos, para o que der e vier.

À minha orientadora, Alice Maria, que é uma das pessoas mais generosas que conheci na minha vida. Meu crescimento científico e capacitação para explorar novos horizontes devem-se à senhora. Muito obrigada por ter me dado todas as maravilhosas oportunidades que tive e sempre ter acreditado e investido no meu potencial. Serei sempre grata.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia, Emiliano, Camila Nayane e Lucilene (Lena). A ajuda de vocês foi providencial na execução dessa pesquisa. Deus os abençoe e cuide sempre.

À professora Marta, pelo suporte e confiança à nossa pesquisa.

À todos os integrantes e colegas do Laboratório de Cultivo Celular (LCC). Muito obrigada por toda a ajuda e suporte.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Baleki)

RESUMO

Nos últimos anos, esforços consideráveis têm sido feitos no sentido de identificar peptídeos naturais neuroativos e neuroprotetores derivados do veneno de diferentes espécies animais. Nesse trabalho foi estudada a atividade do veneno de *Dinoponera quadriceps* nativo (vDq) e desnaturado (vdDq) em modelos animais de convulsão quimicamente induzidos *in vivo* e sobre a viabilidade de astrócitos corticais *in vitro*. Camundongos Swiss machos (28-33g) foram pré-tratados com o vDq (0,1 ou 0,5 mg/kg, e.v, n= 6-8), vdDq (0,5 ou 2,0 mg/kg, i.p., n= 6-8) ou com vdDq (0,1 ou 0,5 mg/kg, e.v., n= 6-8). Meia hora após o pré-tratamento intraperitoneal ou dez minutos após o pré-tratamento endovenoso com o veneno foi induzida a convulsão em todos os animais através da administração de pentilenotetrazol (80 mg/kg), pilocarpina (400 mg/kg,) ou estriçnina (3,0 mg/kg). Na análise comportamental, foram registrados os tempos para ocorrência da primeira convulsão e morte e o percentual de sobrevivida. Para determinação dos parâmetros de stress oxidativo foram utilizadas três áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) de animais utilizados na análise comportamental, a fim de se determinar o grau de peroxidação lipídica, pela mensuração dos níveis de malondialdeído (MDA), e o conteúdo de nitrito. No ensaio *in vitro*, foi determinada a viabilidade celular de astrócitos corticais após o tratamento com diferentes concentrações de vDq, PTZ e vDq + PTZ. 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*. Foi observado que o vDq apresentou efeito apenas no modelo de PTZ, tanto na análise comportamental quanto na determinação dos parâmetros oxidativos. O pré-tratamento com vDq reduziu significativamente o tempo para ocorrência da primeira convulsão (0,1 mg/kg: $77,83 \pm 5,27$ comparado com $101,0 \pm 3,31$ segundos no grupo controle; 0,5 mg/kg: $74,43 \pm 3,94$ comparado com $101,0 \pm 3,31$ segundos no grupo controle), enquanto que o vdDq causou aumento do percentual de sobrevivida quando pré-tratado por via i.p. (0,5 mg/kg: 25% de sobrevivida comparado com 0% no grupo controle; 2,0 mg/kg: 62,5% de sobrevivida comparado com 0% no grupo controle) e e.v (0,5 mg/kg: 28,57% de sobrevivida comparado com 0% no grupo controle). Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, tanto o pré-tratamento com o vDq quanto com o vdDq causaram aumentos dos níveis de MDA nas três áreas cerebrais analisadas. O conteúdo de nitrito também sofreu elevação após pré-tratamento com vDq, nas três áreas cerebrais, e após o pré-tratamento com vdDq, via e.v., apenas no hipocampo. Quanto aos ensaios de viabilidade celular, foi observado que o vDq, isoladamente, não foi capaz de alterar esse parâmetro. O PTZ causou redução da viabilidade de astrócitos de modo dose-dependente e com uma IC 50 (índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo) correspondente a 33,12 mM. O tratamento combinado entre vDq (100 µg/mL) e PTZ (IC 50) também causou redução da viabilidade das células. Os resultados sugerem que o vDq possivelmente apresenta ambos componentes neurotóxicos e neuroprotetores, e os astrócitos devem ser uma das células envolvidas na neurotoxicidade do veneno.

Palavras-chave: Venenos de formiga. Epilepsia. Estresse oxidativo, Astrócitos

ABSTRACT

In last years, considerable efforts have been made to identify neuroactive and neuroprotective peptides derived from the venom of different natural species. In this work, were studied the activity of *Dinoponera quadriceps* native (DqV) and denatured (DqDV) venom on chemically induced seizures models *in vivo* and on *in vitro* cortical astrocytes viability. Male Swiss mice (28- 33g) were pretreated with DqV (0.1 or 0.5 mg/kg, e.v., n = 6-8), DqDV (0.5 or 2.0 mg/kg, i.p., n = 6-8) or DqDV (0.1 or 0.5 mg/kg, e.v., n = 6-8). 30 minutes after the intraperitoneal pretreatment or ten minutes after intravenous pretreatment with the venom was induced seizures in all animals by the administration of pentylenetetrazole (80 mg/kg) pilocarpine (400 mg/kg) or strychnine (3.0 mg/kg). In behavioral analysis, we recorded the time to the first seizure and to death and the percentage of survival. To determine the parameters of oxidative stress was dissected three brain areas (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) of animals used in behavioral analysis, in order to determine the degree of lipid peroxidation, by measuring the levels of malondialdehyde (MDA), and the content of nitrite. In *in vitro* assay, cell viability of cortical astrocytes was determined after treatment with different concentrations of DqV, PTZ and DqV + PTZ. The data were analyzed by ANOVA followed by a Student Newman-Keuls (for *in vivo* tests) or Bonferroni (for *in vitro* experiments) as post hoc tests. It was observed that the DqV had effect only on the PTZ model, both in behavioral analysis as for the determination of the oxidative parameters. Pretreatment with DqV significantly reduced the time until the occurrence of first seizure (0.1 mg/kg: 77.83 ± 5.27 compared to the 101.0 ± 3.31 seconds in the control group; 0.5 mg/kg: 74.43 ± 3.94 compared to the 101.0 ± 3.31 seconds in the control group), while DqDV caused an increase in the percentage of survival when pretreated by i.p. (0.5 mg/kg: 25% of survival compared with 0% in the control group, 2.0 mg/kg: 62.5% of survival compared with 0% in control group) and e.v (0.5 mg/kg: 28.57% of survival compared with 0% in control group). routes. In relation to the oxidative stress parameters, both pretreatments with DqV and with DqDV caused increases of MDA levels in all three brain areas analyzed. The nitrite content also increased after pretreatment with DqV in the three areas of the brain and after pretreatment with DqDV via e.v., only in the hippocampus. About cell viability assays, were observed that DqV was not able to change this parameter. The PTZ reduced the cell viability of astrocytes in a dose-dependent way, with an IC 50 (cytotoxicity index to 50% of the cell population under study) corresponding to 33.12 mM. The combined treatment of DqV (100 $\mu\text{g/mL}$) and PTZ (IC 50) also caused a reduction in cell viability. The results suggest that the DqV, probably, has both neurotoxic and neuroprotective components, and that the astrocytes should be the cells involved in the venom's neurotoxicity.

Keywords: Ant venoms, Epilepsy, Oxidative stress, Astrocytes

LISTA DE FIGURAS

1. Fotografia de formigas da espécie *Dinoponera quadriceps* em seu habitat natural (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) (Quinet, Y.P. 2010). 20
2. Aparelho secretório da formiga *Dinoponera quadriceps* (Quinet, Y.P. 2010). 21
3. Desenho esquemático da sinapse tripartida, onde um simples astrócito envia seus processos e esses são capazes de se conectarem a numerosas sinapses (CLASADONTE e HAYDON, 2012). 27
4. Fotografia de um dos ninhos artificiais onde as formigas da espécie *Dinoponera quadriceps* foram mantidas. 34
5. Procedimento de extração da peçonha da formiga *Dinoponera quadriceps*. 35
6. Administração do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq) e de agentes convulsivantes em camundongos Swiss machos, por via intraperitoneal. 36
7. Aparato desenvolvido para auxiliar na administração endovenosa. 37
8. Administração do veneno de *Dinoponera quadriceps* nativo (vDq) e desnaturado (vdDq) em camundongos Swiss machos, por via endovenosa, a partir da veia da cauda. 37

LISTA DE TABELAS

1. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (segundos), latência para a morte (LM) (segundos) e percentual de sobrevivência (S) nos modelos de convulsão induzidos por Pentilenotetrazol (PTZ), Pilocarpina (PILO) e Estricnina (STRC). Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). 43
2. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via i.p., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (seg.), latência para a morte (LM) (seg.) e percentual de sobrevivência (S) em modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ). Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). Uma avaliação estatística da curva de sobrevivência utilizando o teste Logrank (Mantel-Cox) foi realizada separadamente, com a comparação das curvas de controle *versus* as curvas correspondentes aos tratamentos. 45
3. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via e.v., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (seg.), latência para a morte (LM) (seg.) e percentual de sobrevivência (S) em modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ). Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste 45

Student-Newman-Keuls). Uma avaliação estatística da curva de sobrevida utilizando o teste Logrank (Mantel-Cox) foi realizada separadamente, com a comparação das curvas de controle *versus* as curvas correspondentes aos tratamentos.

LISTA DE GRÁFICOS

1. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriciceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). 47
2. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriciceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pilocarpina, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). 48
3. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriciceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Estricnina, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). 48
4. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriciceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado 49

para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pilocarpina, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). **49**

6. Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Estricnina, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). **50**

7. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via i.p. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). **52**

8. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle **52**

(ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

9. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via i.p. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). **53**

10. Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via e.v e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). **53**

11. Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações do veneno de *Dinoponera quadriceps* (vDq). **55**

12. Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de pentilenotetrazol (PTZ). Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não tratado. **56**

13. Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações da combinação de vDq + PTZ IC 50. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle PTZ IC 50. **58**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASPE	Assistência à Saúde de Pacientes com Epilepsia
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
DAEs	Drogas antiepilépticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
e.v.	Administração endovenosa
IC 50	Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
i.p.	Administração intraperitoneal
LM	Latência para a morte
LPC	Latência para a primeira convulsão
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina de tampão-fosfato
PILO	Pilocarpina
PoTX	Poneratoxina
PTZ	Pentilenotetrazol
S	Percentual de sobrevivida
SNC	Sistema nervoso central
STRC	Estricnina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
vDq	Veneno nativo de <i>Dinoponera quadriceps</i>
vdDq	Veneno desnaturado de <i>Dinoponera quadriceps</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	1.1 A natureza como fonte para a cura dos males que acometem o corpo humano	17
1.2	Os venenos dos insetos e as formigas	18
1.3	Epilepsia	21
1.4	Radicais livres e o estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central	24
1.5	Astrócitos	25
1.6	Screening farmacológico de drogas anticonvulsivantes utilizando modelos animais	28
1.7	Justificativa e relevância desse estudo	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Obtenção das formigas e extração da peçonha	34
3.2	Animais	35
3.3	Drogas	35
3.4	Modelos de convulsão induzidos quimicamente <i>in vivo</i> e análises comportamentais	36
3.5	Avaliação dos parâmetros oxidativos de lesão neural dos modelos <i>in vivo</i>	38
3.5.1	Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS) dos modelos <i>in vivo</i>	38
3.5.2	Determinação do Conteúdo de Nitrito dos modelos <i>in vivo</i>	38
3.6	Análise da atividade do vDq sobre astrócitos <i>in vitro</i>	39
3.6.1	Linhagem celular	39
3.6.2	Cultivo da linhagem celular utilizada	39
3.6.3	Estudos de viabilidade celular em cultura de astrócitos	39

3.6.3.1	Determinação da viabilidade celular após tratamento com o veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> e com pentilenotetrazol	39
3.7	Aspectos éticos	40
3.8	Análise estatística	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Determinação da atividade do veneno sobre modelos de convulsões induzidos quimicamente <i>in vivo</i> – ensaios comportamentais	42
4.2	Determinação da atividade do veneno sobre modelos de convulsões induzidos quimicamente <i>in vivo</i> – determinação do estresse oxidativo envolvido	46
4.3	Efeitos do vDq e do PTZ sobre a viabilidade de astrócitos corticais <i>in vitro</i>	55
5	CONCLUSÕES	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	APÊNDICES	73

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 A natureza como fonte para a cura dos males que acometem o corpo humano

A natureza sempre despertou no ser humano um verdadeiro fascínio não apenas pelos recursos oferecidos para alimentação, mas por ser sua principal fonte de descobertas. Produtos naturais derivados de animais, plantas e microrganismos têm sido utilizados para tratar doenças desde os primórdios da medicina (KOEHN e CARTER, 2005).

Newman e colaboradores (2003) em seus levantamentos demonstraram que, entre os anos de 1981 a 2002, dentre as 877 pequenas moléculas classificadas como novas entidades químicas, cerca de metade (49%) eram classificadas como produtos naturais, seus análogos semi-sintéticos ou compostos sintéticos baseados neles. Em uma análise posterior, levando-se em consideração agora um período compreendido entre os anos de 1981 a 2012, verificou-se que os produtos naturais ou seus derivados representavam aproximadamente 74% e 59% das novas entidades químicas antibacterianas e anticancerígenas, respectivamente (NEWMAN e CRAGG, 2012). Isso demonstra o crescente investimento que há muito tempo vem sendo dado às pesquisas científicas que buscam estudar as propriedades terapêuticas de matérias-primas oriundas da natureza. Dentre algumas das várias razões capazes de explicar o sucesso dos produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos estão: a sua diversidade química elevada, os efeitos da pressão evolucionária para criar moléculas biologicamente ativas e a semelhança estrutural dos alvos proteicos de muitas espécies (KOEHN e CARTER, 2005).

Nesse contexto, as peçonhas animais aparecem como uma rica fonte de compostos naturais bioativos, uma vez que desenvolveram alta afinidade e seletividade para uma variada gama de alvos biológicos, especialmente proteínas de membrana, tais como canais iônicos, receptores e transportadores (FRY *et al.*, 2009; LEWIS e GARCIA, 2003). Algumas características apresentadas pelos venenos animais os fazem atrativos no que diz respeito ao desenvolvimento de drogas, tais como a elevada potência e especificidade de muitos peptídeos derivados desses venenos, a sua facilidade de síntese química e/ou à produção recombinante e a resistência à degradação proteolítica apresentada por muitos peptídeos ricos em pontes dissulfetos (HARVEY, 1995; LEWIS e GARCIA, 2003; OLIVERA, 2006).

Em alguns casos, esses produtos naturais são utilizados diretamente como agentes terapêuticos, como a tubocurarina, que foi o primeiro relaxante muscular introduzido na prática anestésica, ou podem servir como ponto inicial para o desenvolvimento de fármacos,

ou seja, como protótipos (HARVEY *et al.*, 1998). Um exemplo clássico desse último caso refere-se ao medicamento anti-hipertensivo Captopril®. Este foi desenvolvido a partir da modelagem molecular de um peptídeo isolado do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, o qual imita, estrutural e funcionalmente, o fator potencializador de bradicinina (HAYASHI e CAMARGO, 2005).

O processo típico envolvido na descoberta de uma nova molécula com propriedade farmacológica oriunda de produto natural engloba, de forma geral, as seguintes etapas: extração a partir da fonte, identificação de determinada atividade biológica, concentração, fracionamento e purificação (KOEHN e CARTER, 2005). Nos últimos anos, os grandes esforços despendidos para a descoberta de novas drogas baseadas em venenos animais resultaram na elaboração de algumas ferramentas terapêuticas bem sucedidas. Dentre alguns dos exemplos mais recentes de sucesso estão a ω -conotoxina MVIIA (Ziconotide, Prialt®), um peptídeo proveniente do veneno do caracol aquático *Conus magus* aprovado pelo FDA, em 2004, como um analgésico para tratamento da dor crônica (MILJANICH, 2004), e a exenatida (Byetta®), um peptídeo contendo 39 aminoácidos cuja sequência é homóloga em 50% daquela presente no peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1), derivada da saliva do monstro de Gila (*Heloderma suspectum*) e aprovada no ano de 2005 para o tratamento do diabetes tipo 2 (MALONE *et al.*, 2009).

1.2 Os venenos dos insetos e as formigas

Excetuando-se alguns casos como o mel utilizado como alimento, a seda como matéria-prima para vestuário e a polinização das plantas, a maioria das pessoas consideram os insetos como pragas, e o que talvez muitas delas não saibam é que, cada vez mais, compostos com relevância terapêutica estão sendo extraídos a partir de toxinas produzidas por esses seres vivos (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

O filo Arthropoda é o mais abundante e diversificado, apresentando um total de aproximadamente 75% das espécies animais do mundo, e os venenos produzidos por suas espécies são reconhecidos como uma das maiores fontes de moléculas biologicamente ativas (PIMENTA e DE LIMA, 2005; SCHWARTZ *et al.*, 2012). Dentro desse contexto podemos destacar as espécies da ordem Hymenoptera, a qual abrange abelhas, vespas e formigas. A peçonha dos himenópteros é composta por um complexo coquetel de componentes químicos diferentes, onde se podem incluir peptídeos, enzimas, neurotoxinas, aminas biogênicas,

aminoácidos e lipídeos, os quais demonstram potencial para exercerem funções farmacológicas e terapêuticas (CHEN e LARIVIERE, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2009; PALMA, 2006). Os componentes do veneno dessas espécies evoluíram como uma espécie de barreira, protegendo suas colônias contra predadores através de sua picada dolorosa, que muitas vezes resultam em edema, inchaço e até mesmo em morte (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

As formigas representam o grupo mais numeroso dentre os insetos e estão entre os organismos de maior biodiversidade da Terra (HOFFMAN, 2010). Em sua classificação taxonômica, as formigas estão relacionadas à classe Insecta, ordem Hymenoptera e família Formicidae. Essa família está ainda subdividida em algumas subfamílias, tais como a Myrmicinae, Ponerinae e Formicinae. Na subfamília Ponerinae são encontradas as maiores formigas do mundo, as quais chegam a medir de 3 a 4 cm de comprimento (SIQUIEROLI *et al.*, 2007), e alguns dos gêneros nos quais ela subdivide-se são *Dinoponera*, *Paraponera* e *Diacamma*. Apesar das espécies dessa subfamília distribuírem-se pelo mundo inteiro, são mais abundantes em regiões tropicais.

O gênero *Dinoponera* é constituído por seis espécies (*D. australis*, *D. gigantea*, *D. longipes*, *D. lucida*, *D. mutica* e *D. quadriceps*), todas com distribuição por algumas regiões da América do Sul (Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica) e conhecidas popularmente como falsas tocandiras (SCHOETERS e BILLEN, 1995; SIQUIEROLI *et al.*, 2007). Em nossa região as formigas da espécie *Dinoponera quadriceps*, as quais são o objeto de estudo dessa pesquisa, podem ser encontradas na Serra de Maranguape, localizada na região metropolitana de Fortaleza, e na Reserva Natural Serra das Almas, localizada na região dos Inhamuns, interior do Ceará.



Figura 1: Fotografia de formigas da espécie *Dinoponera quadriceps* em seu habitat natural (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) (Quinet, Y.P. 2010).

Bem como outras espécies de hymenopteros, as formigas do gênero *Dinoponera* apresentam um aparelho especializado para picada, o qual está localizado no último segmento do seu corpo, o gáster, e associa-se a duas outras estruturas: glândula de Dufour e glândula de veneno (Figura 2). Apesar da ocorrência de envenenamento não ser comum, um relato de caso descreveu que sua picada pode provocar manifestações sistêmicas como febre, tremores, dano tecidual, sudorese, náuseas, vômitos, linfadenopatia e arritmias cardíacas (HADDAD JUNIOR *et al.*, 2005).



Figura 2: Aparelho secretório da formiga *Dinoponera quadriceps* (Quinet, Y.P. 2010).

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).

1.3 Epilepsia

A epilepsia provavelmente foi descrita pela primeira vez em escritos antigos egípcios cerca de 2000 anos a.C. e desde então vem atormentando a humanidade por séculos (SHIN *et al.*, 2011). Na Idade Média, pessoas portadoras de epilepsia eram perseguidas e evitadas devido ao medo de contágio, sendo as crises epiléticas vistas como características de alguma feitiçaria (GOMES, 2006).

Essa patologia pode ser definida como um distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição persistente a gerar crises epiléticas, estando esta última definida como uma ocorrência transitória de sinais e / ou sintomas devidos à atividade neuronal excessiva ou anormal do cérebro (FISHER *et al.*, 2005). Em termos de prevalência e incidência, a epilepsia é um dos distúrbios neurológicos graves mais comuns, chegando a afetar cerca de 50 milhões

de pessoas em todo o mundo, e, destas, 90% estão em países considerados em desenvolvimento (World Health Organization, 2006). A estimativa de prevalência no Brasil é de cerca de 1,4% da população geral, o que representa uma taxa bastante elevada do ponto de vista epidemiológico, e, segundo dados da Assistência à Saúde de Pacientes com Epilepsia (ASPE), a cada hora mais 11 pessoas são diagnosticadas com esse problema (BRASIL, 2010).

Esse distúrbio neurológico pode originar-se de insultos às estruturas cerebrais, tais como traumas, tumores, acidentes vasculares cerebrais ou infecções, ou ainda pode desenvolver-se devido a mutações genéticas em um ou mais genes relacionados a canais iônicos ou neurotransmissores que controlam a excitabilidade neuronal (BIALER e WHITE, 2010). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a neurocisticercose é considerada a causa mais frequente de epilepsia adquirida (NDIMUBANZI *et al.*, 2010). Apesar do importante progresso na compreensão das crises convulsivas nas últimas décadas, as bases celulares das epilepsias no homem permanecem ainda desconhecidas (LÖSCHER e SCHMIDT, 2006).

O tratamento medicamentoso da epilepsia é sintomático, tendo seu início em 1857 quando Locock introduziu o sal de brometo (BRODIE, 2010). A existência de um arsenal de drogas antiepilépticas (DAEs) oferta um leque de opções terapêuticas, o que pode tornar o tratamento mais personalizado (BIALER e WHITE, 2010). Os principais mecanismos farmacodinâmicos envolvidos na eficácia clínica das DAEs a nível celular incluem o aumento da inibição mediada por GABA, atenuação da transmissão glutamatérgica excitatóxica e a modulação de canais iônicos voltagem-dependentes (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) (ROGAWSKI e LÖSCHER, 2004).

Há uma tendência em classificar algumas síndromes epilépticas como canalopatias (PORTO *et al.*, 2007). Os canais de Na^+ voltagem-dependentes são um dos principais responsáveis pela rápida despolarização da membrana neuronal presente amplamente e de forma desordenada nos processos epilépticos, e mutações em algumas de suas subunidades foram descobertas em algumas formas de epilepsia (HÜBNER e JENTSCH, 2002; KWAN *et al.*, 2001;). Sabe-se que o aumento agudo do influxo de Ca^{+2} é importante para manutenção da hiperexcitabilidade reflexa que ocorre em processos convulsivos e o bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes aparece como uma alternativa capaz de interferir farmacologicamente com a atividade convulsiva (MACNAMARA, 1999; WEIERGRÄBER *et al.*, 2010). A importância dos canais de potássio voltagem-dependentes como alvo de drogas anticonvulsivantes tem sido descrita na literatura, uma vez que eles são importantes nos processos de repolarização e hiperpolarização da membrana celular após

geração do potencial de ação, e foi observado que mutações em genes responsáveis pela sua formação podem gerar uma hiperexcitabilidade devido à diminuição da repolarização celular (PORTO *et al.*, 2007).

O ácido γ -aminobutírico, ou mais conhecidamente GABA, é o principal neurotransmissor inibitório atuante no sistema nervoso central (SNC) e o envolvimento do sistema GABAérgico na epilepsia, assim como em outras doenças, como ansiedade, transtorno do pânico, e espasticidade muscular, não é um achado recente (BÖHME e LUDDENS, 2001). Algumas evidências experimentais e clínicas fornecem apoio para o papel do GABA no mecanismo e tratamento da epilepsia, tais como: anormalidades na função GABAérgica foram observadas em modelos animais de epilepsia, agonistas de GABA suprimem epilepsias e seus antagonistas produzem convulsões, dentre outros achados (TREIMAN, 2001). Ao ser liberado na sinapse, o GABA atua em um dos três tipos de receptores: GABA A, GABA B ou GABA C. GABA A e GABA C são receptores ionotrópicos acoplados diretamente a canais de Cl^- , e GABA B são receptores metabotrópicos capazes de ativarem canais de Ca^{2+} e K^+ através de proteínas G.

A grande maioria das sinapses excitatórias no cérebro de mamíferos é mediada pelo aminoácido L-glutamato (L-glu), que exerce sua ação através de três tipos de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e um grupo de oito receptores metabotrópicos (FONNUM, 1984; WATKINS, 2000). A hiperestimulação constante de receptores ionotrópicos L-glu pode levar à degeneração neuronal através da excitotoxicidade (ÄNGEHAGEN *et al.*, 2003; OLNEY *et al.*, 1991; SATTLER e TYMIANSKI, 2000).

Embora a grande maioria das crises epilépticas (70%) possam ser controladas com a utilização de medicamentos de baixo custo, ainda existem pacientes convivendo em condições intratáveis, seja pelo tipo de crise ou por fármaco-resistência, como também aqueles que sofrem pelos efeitos colaterais das DAEs disponíveis, os quais variam em frequência e gravidade. Isso reforça a importância do desenvolvimento de novas DAEs que venham a suprir as necessidades desse grupo de pessoas não atendidas, assim como também para proporcionar melhoras ao tratamento farmacológico daqueles que fazem uso dessa medicação mas são inevitavelmente acometidos com seus efeitos colaterais indesejados.

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). Tais compostos têm um papel muito importante na origem da vida e da evolução biológica, deixando efeitos benéficos sobre os organismos (MACCORD, 2000). Os radicais livres celulares mais comumente conhecidos são os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e o monóxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}$). Radicais de oxigênio estão envolvidos em muitas atividades bioquímicas das células, tais como transdução de sinais, transcrição gênica e regulação da atividade de guanilato ciclase solúvel, sendo produzidos pelo corpo principalmente como resultado do metabolismo aeróbico (UTTARA *et al.*, 2009). Já o monóxido de nitrogênio, ou mais comumente conhecido como óxido nítrico, é uma molécula de sinalização importante que essencialmente regula o relaxamento e proliferação de células do músculo liso vascular, os leucócitos de adesão, a agregação de plaquetas, dentre outras funções (ZHENG e STORZ, 2000).

As denominadas espécies reativas são originadas a partir de radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), dentre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Quando sua síntese encontra-se exacerbada, o organismo dispõe de eficientes sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que conseguem controlar e restabelecer o equilíbrio. Porém, quando os sistemas de defesa contra a formação acentuada de radicais livres apresentam falhas, as concentrações aumentadas desses compostos podem atuar sobre importantes macromoléculas, resultando em diversificados danos às estruturas celulares e originando o denominado estresse oxidativo. Tal processo resulta, com frequência, em morte celular via oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos e nucleotídeos (AUDDY *et al.*, 2003; DROGE, 2002).

Uma vez que o cérebro demanda grandes quantidades de oxigênio em relação aos outros órgãos do organismo, então ele se apresenta especialmente sensível ao processo de estresse oxidativo. Além disso, apresenta altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, que são propensos a sofrerem peroxidação lipídica, é rico em ferro, o qual pode catalisar a formação de radicais hidroxila, e apresenta baixa atividade enzimática de catalase, a qual corresponde a um dos mecanismos antioxidantes enzimáticos (SHIN *et al.*, 2011).

A produção de radicais livres é associada à patogênese de algumas doenças neurodegenerativas (MALINSKA *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é considerado como possível mecanismo de patogênese da epilepsia (CHANG e YU, 2010). Seu papel nessa condição neuropatológica começou a ser reconhecido há pouco tempo (ASHRAFI *et al.*, 2007) e os estudos concentram-se, basicamente, em determinar se a atividade convulsivante prolongada em animais resulta no aumento da formação de EROs, e também se a injúria oxidativa contribui para a lesão cerebral induzida pela convulsão (SHIN *et al.*, 2011). Dentre as áreas cerebrais em que ocorre o dano neuronal, o córtex pré-frontal, o hipocampo e o corpo estriado, além de serem as áreas mais acometidas, podem estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de instalação, propagação e/ou manutenção das convulsões (MARINHO *et al.*, 1998).

1.5 Astrócitos

O SNC é composto por dois tipos celulares: neurônios e células da glia. Estas últimas foram descobertas por Rudolph Virchow, um anatomista alemão, em meados do século XIX (CLASADONTE e HAYDON, 2012). O termo glia refere-se a cinco tipos celulares: oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann, células ependimárias e micróglia, que juntas correspondem a cerca de 85% das células presentes no SNC (TEIXEIRA, 2012).

Os astrócitos são células caracterizadas morfológicamente por apresentarem prolongamentos que irradiam a partir de seu corpo celular, daí então a origem de sua denominação (astro= estrela e cito= célula). Por muito tempo essas células foram vistas como meras coadjuvantes nas redes neuronais, porém, com os recorrentes avanços da neurociência, foi observado que, devido a sua estreita relação com os neurônios, os astrócitos são considerados reguladores chaves do funcionamento cerebral (HALASSA *et al.*, 2007; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ e ASCHNER, 2013).

Durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, as células precursoras neuronais geram inicialmente os neurônios e em seguida os astrócitos (CLARKE e BARRES, 2013). No início dos anos 1990, estudos utilizando preparações de fatias cerebrais demonstraram que astrócitos e neurônios compartilham entre si quase o mesmo conjunto de canais e receptores, e isso levou a conclusão de que os astrócitos apresentam a maquinaria necessária para detectar e responder à atividade neuronal (SEIFERT *et al.*, 2006). Porém, ao contrário dos neurônios, não são células eletricamente excitáveis, ou seja, não geram impulsos elétricos. Essas células exibem uma forma de excitabilidade que é baseada na variação da

concentração intracelular de Ca^{2+} , uma vez que a ativação de seus receptores para neurotransmissores leva a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , estímulo esse que pode propagar-se para as células vizinhas como uma espécie de onda intracelular de Ca^{2+} (CORNELL-BELL *et al.*, 1990; SCEMES e GIAUME, 2006). Esse aumento do Ca^{2+} intracelular promove a liberação dos denominados gliotransmissores, os quais são substâncias neuroativas capazes de controlar diversos processos cerebrais, tais como tônus vascular e atividade neuronal (HAYDON e CARMIGNOTO, 2006).

Dentre algumas das muitas funções dessas células estreladas estão a sustentação, nutrição e controle da atividade sináptica dos neurônios. Ao redor do seu domínio de ocupação, seus numerosos prolongamentos celulares podem entrar em contato com milhares de sinapses, dendritos e também à microvasculatura cerebral, e, deste modo, tem sido proposto que essas células proporcionam suporte metabólico aos neurônios. Astrócitos também são capazes de realizar a modulação das vias de sinalização de transmissores, incluindo glutamato, GABA e adenosina, e, conseqüentemente apresentam potencial para modular a transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (CLASADONTE e HAYDON, 2010; HALASSA *et al.*, 2007). Isso se dá em virtude da formação da chamada sinapse tripartida. Esta é constituída por três integrantes: elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos neuronais e os astrócitos, a partir de seus processos celulares (Figura 3). A sinapse tripartida constitui-se um dos sítios de atuação dos gliotransmissores, os quais atuam sobre o processo sináptico através de mecanismos capazes de regularem a função pré-sináptica e modular a resposta pós-sináptica.

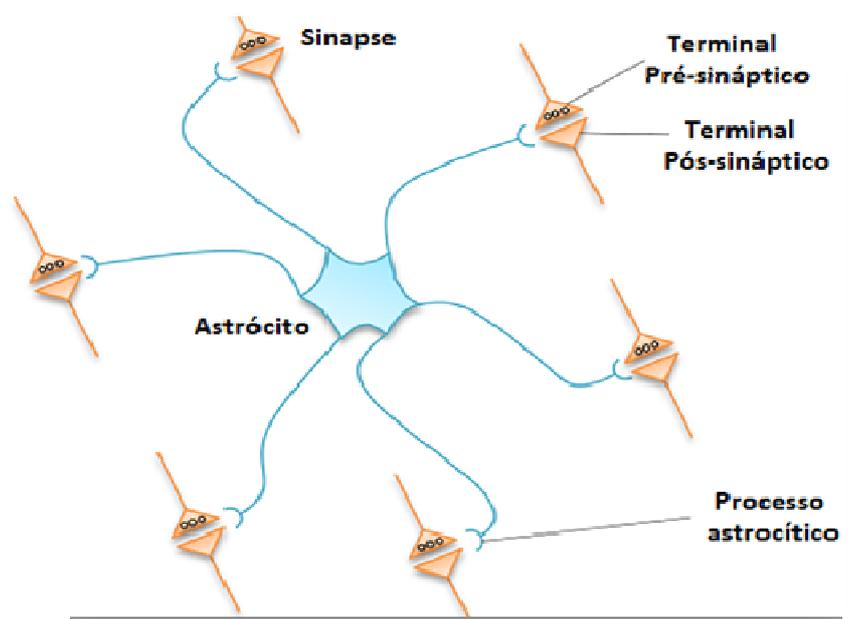


Figura 3: Desenho esquemático da sinapse tripartida, onde um simples astrócito envia seus processos e esses são capazes de se conectarem a numerosas sinapses (CLASADONTE e HAYDON, 2012).

Até recentemente, a epilepsia foi considerada como uma condição quase que exclusivamente relacionada aos neurônios. Levando-se em consideração o conceito atualmente aceito de que os astrócitos são parte ativa e integrante no processo de comunicação da transmissão sináptica excitatória e inibitória, evidências emergentes tem sugerido um papel crítico para estas células da glia na patogênese de distúrbios neurológicos, como a epilepsia (HALASSA *et al.*, 2007; WETHERINGTON *et al.*, 2008). Alguns trabalhos relatam que os astrócitos podem contribuir hipoteticamente para a epileptogênese por qualquer das três vias: início de hiperatividade neuronal em neurônios previamente normais, promoção de disparos epilépticos em neurônios anormais e fracasso na neutralização e detenção da hiperatividade neuronal (LANEROLLE *et al.*, 2010; TIFFANY-CASTIGLIONI e CATIGLIONI, 1986).

Atualmente todas as DAEs são direcionadas para atuar sobre neurônios, e, devido à desvantagem de seus mecanismos de ação também suprimirem a atividade neural normal, melhores conhecimentos sobre as funções de astrócitos abrem as portas para novas estratégias de tratamento (HEUSER *et al.*, 2014). Esse novo alvo promissor para intervenções

em epilepsia ganha maior destaque após Tian e colaboradores (2005) sugerirem em suas pesquisas que as descargas epileptogênicas são secundárias à patologia glial.

1.6 Screening farmacológico de drogas anticonvulsivantes utilizando modelos animais

Apesar do bem sucedido desenvolvimento de algumas novas DAEs nas últimas décadas, a busca por novas terapias com melhor eficácia e tolerabilidade continua a ser um objetivo almejado (BIALER e WHITE, 2010). Alguns modelos experimentais são utilizados na realização de triagens (screenings) farmacológicas de drogas antiepilépticas, onde o principal objetivo é a contenção das crises convulsivas por meio das drogas em estudo, tratando-se, assim, de uma medida sintomática e não necessariamente curativa (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2007).

Modelos experimentais utilizando animais são de grande utilidade na triagem farmacológica de novos fármacos com propriedades anticonvulsivantes, uma vez que servem para uma variedade de propósitos, onde dentre alguns deles podemos destacar: avaliar a eficácia de um composto com atividade anticonvulsivante contra diferentes tipos de convulsões; investigar se uma nova droga tem vantagem em relação àquela estabelecida clinicamente para a terapia, principalmente no que diz respeito àqueles tipos de crises difíceis de serem tratadas; estimar as concentrações plasmáticas eficazes de novas DAEs em seus primeiros ensaios clínicos (LÖSCHER, 2011). Alguns desses modelos caracterizam-se pela utilização de compostos capazes de causar um quadro convulsivo, como é o caso dos modelos de convulsão quimicamente induzidos utilizando Pentilenotetrazol (PTZ), Piocarpina (PILO) e Estricnina (STRC).

O PTZ é um dos principais indutores de convulsão utilizados na triagem pré-clínica de compostos com propriedades anticonvulsivantes (QUINTANS-JÚNIOR e MELLO, 2006; SMITH *et al.*, 2007). Tal composto pode ser utilizado para reproduzir modelos de crises generalizadas do tipo ausência ou mioclônicas, a partir da administração de uma dose menor do que 40 mg/kg, assim como também para gerar crises tônico-clônicas, o que pode ser alcançado a partir de uma dose de 70mg/kg (ELOQAYLI *et al.*, 2003; SNEAD *et al.*, 2000). O mecanismo de ação convulsivante do PTZ é pouco entendido, mas tem sido reportada a capacidade de promover convulsões por inibir canais de cloreto associados com receptores do tipo GABA A, reduzindo assim a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (SILVA *et al.*, 1998). A pilocarpina é amplamente utilizada em modelos experimentais de epilepsia, e

estudos demonstram que a sua administração induz o desenvolvimento de convulsões, estado epiléptico e lesão cerebral em roedores (MARINHO *et al.*, 1997; TURSKI *et al.*, 1989). Porém, o bloqueio do início das convulsões pode ser feito através de drogas anticolinérgicas, o que sugere que a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos está envolvida na instalação do processo convulsivo (FREITAS e TOMÉ, 2010). Já a esticnina é um antagonista competitivo da glicina, a qual terá seus efeitos inibitórios sobre o SNC diminuídos, acarretando numa crise convulsiva intensa que geralmente leva os animais a óbito (MAZZAMBANI, 2005).

Particularmente em neurociência, toxinas naturais têm apresentado um importante papel no desenvolvimento de ferramentas farmacológicas, apresentando alta afinidade e seletividade sobre mecanismos neuronais (BELEBONI *et al.*, 2004; MELLOR e USHERWOOD, 2004; WANG e CHI, 2004). Neste contexto, peçonhas de alguns artrópodes aparecem como potenciais fontes de substâncias neuroativas, fornecendo novas ferramentas para o desenho racional de fármacos (BELEBONI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PIZZO *et al.*, 2000). Seus locais de ação no SNC de mamíferos podem incluir canais iônicos, receptores ou podem agir através da liberação de neurotransmissores (CARNEIRO *et al.*, 2003; FONTANA *et al.*, 2003; KONNO *et al.*, 2000; PIZZO *et al.*, 2004; PURALI, 2003; YOKOTA *et al.*, 2001).

Tais características apresentadas pelos venenos oriundos de artrópodes despertaram consideráveis interesses por parte da comunidade científica mundial em relação a seus componentes potencialmente neuroativos, e, nos últimos anos, uma variedade de toxinas provenientes desses seres foram identificadas, isoladas e sintetizadas. Alguns dos exemplos são: identificação e isolamento de um pequeno neuropeptídeo proveniente da peçonha da formiga *Paraponera clavata*, denominado poneratoxina (PoTX), o qual atua sobre os canais de sódio e tem uso potencial para aplicação em inseticidas biológicos (BLUM e HERMANN, 1978; DUVAL *et al.*, 1992; HERMANN *et al.*, 1984; PIEK *et al.*, 1991; SCHMIDT, 1990; SZOLAJSKA *et al.*, 2004); isolamento da neurotoxina AvTx7, presente no veneno da vespa *Agelaia vicina*, com capacidade para inibir a captação de glutamato de forma dose-dependente e não competitiva (PIZZO *et al.*, 2004); descoberta de que o veneno da formiga *Dinoponera australis* contém mais de 75 proteínas e peptídeos, onde dentre eles incluem-se componentes modificadores de canais iônicos (HOFFMAN, 2010; JOHNSON *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos com venenos de vespas despertam especial atenção, principalmente no que diz respeito à possibilidade de descoberta de novas moléculas potencialmente úteis para o desenho racional de compostos a serem usados na farmacoterapia da convulsão. Podemos

citar como exemplo o fato de Cunha *et al.* (2005) constatarem que o veneno desnaturado da vespa *Polybia ignobilis* apresenta atividade anticonvulsivante em alguns modelos animais e contém componentes capazes de interagir com receptores de GABA e glutamato em sinaptossomas de córtex de rato, e também a demonstração dos efeitos do veneno desnaturado da vespa social *Polybia occidentalis*, o qual demonstrou ser capaz de bloquear convulsões induzidas quimicamente por biculina, picrotoxina e ácido kainico em modelos animais (MORTARI *et al.*, 2005).

1.7 Justificativa e relevância desse estudo

Levando-se inicialmente em consideração os fatos de que estudos com venenos de vespas, às quais pertencem à mesma ordem das formigas, Hymenoptera, demonstraram sua atividade anticonvulsivante em alguns modelos animais (CUNHA *et al.*, 2005; MORTARI *et al.*, 2005; PIZZO *et al.*, 2004), e que o veneno da formiga *Dinoponera australis* apresenta componentes relacionados com a modulação de canais iônicos, então supomos que o veneno de *Dinoponera quadriceps* poderia apresentar alguma ação sobre modelos de convulsão.

Tal hipótese ganhou mais força após nós demonstrarmos a atividade neuroprotetora do vDq sobre em modelo de convulsão induzido por PTZ (LOPES, 2011). Em tal estudo nós constatamos que o veneno de *Dinoponera quadriceps*, quando administrado por via intraperitoneal (i.p.), causou aumento na latência para a primeira convulsão e tendência ao aumento da latência de morte, assim como também se mostrou capaz de reduzir a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos. Esse foi um achado bastante interessante, uma vez que o aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte indicativo de uma possível ação anticonvulsivante, e algumas DAEs, como o clonazepam e diazepam, aumentam esse parâmetro (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002).

Diante das constatações mencionadas acima, e tendo-se em vista que nosso laboratório desenvolve estudos voltados para a busca de substâncias de origem animal com valor terapêutico, então foi decidido dar continuidade às experimentações a fim de melhor entender os efeitos do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre a perspectiva da convulsão. Vale ressaltar que o estudo proposto é pioneiro, uma vez que não existiam relatos associados à atividade desse veneno sobre convulsões. Assim, os dados gerados podem contribuir para a ampliação dos conhecimentos relacionados aos efeitos biológicos do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, presente na Serra de Maranguape-CE, bem como no direcionamento para a busca por substâncias biologicamente ativas e com possíveis potenciais terapêuticos.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a atividade do veneno de *Dinoponera quadriceps* nativo (vDq) e desnaturado (vdDq) em modelos animais de convulsão quimicamente induzidos *in vivo* e sobre a viabilidade de astrócitos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar a atividade do vDq, administrado por via endovenosa, sobre convulsões induzidas por pentilenotetazol, pilocarpina e estricnina;
- ✓ Pesquisar a atividade do vdDq, administrado por via intraperitoneal e endovenosa, sobre convulsões induzidas por pentilenotetazol;
- ✓ Mensurar parâmetros oxidativos de lesão neural em todos os modelos de convulsão estudados, através da determinação da peroxidação dos lipídeos de membrana e da determinação do conteúdo de nitrito.
- ✓ Avaliar a viabilidade celular de astrócitos frente ao tratamento com diferentes concentrações do vDq, PTZ ou da combinação entre vDq e PTZ;

Materiais e Métodos



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das formigas e extração da peçonha

As colônias de formigas foram coletadas na serra de Maranguape-CE (autorização do IBAMA No. 28794-1). Após a identificação do ninho, o mesmo foi escavado e todos os exemplares encontrados foram coletados com auxílio de pinças e levados ao Laboratório de Entomologia/UECE para criação em ninhos artificiais (Figura 4) e extração da peçonha.

Cada formiga foi segurada com uma pinça e a parte posterior de seu gáster foi levemente pressionada por um tubo capilar (Figura 5). A peçonha foi retirada do capilar com auxílio de tampão acetato de amônia, 10mM, pH 6.8; liofilizada e conservada em freezer - 20°C até seu uso nos ensaios experimentais (SOUSA *et al.*, 2012).



Figura 4: Fotografia de um dos ninhos artificiais onde as formigas da espécie *Dinoponera quadriceps* foram mantidas.



Figura 5: Procedimento de extração da peçonha da formiga *Dinoponera quadriceps*.

3.2 Animais

Para avaliação da atividade do veneno sobre modelos animais 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.

3.3 Drogas

Todas as drogas foram adquiridas da empresa Sigma Chemical Co., USA. O vDq liofilizado foi diluído em solução salina de tampão-fosfato (PBS), sendo preparado para administração imediatamente antes de cada análise experimental. Enquanto o vdDq foi preparado a partir de sua diluição inicial em PBS, de acordo com a concentração pretendida, e posterior aquecimento em banho-maria (100°C / 10 minutos), seguido de centrifugação (4480 rpm/ 3minutos) (ZHU *et al.*, 2013).

3.4 Modelos de convulsão induzidos quimicamente *in vivo* e análises comportamentais

Os animais foram pré-tratados com o vDq (0,1 ou 0,5 mg/kg, e.v, n= 6-8), vdDq (0,5 ou 2,0 mg/kg, i.p., n= 6-8) ou com vdDq (0,1 ou 0,5 mg/kg, e.v., n= 6-8). Meia hora após o pré-tratamento intraperitoneal (Figura 6) ou dez minutos após o pré-tratamento endovenoso (Figuras 7 e 8) com o veneno foi induzida a convulsão em todos os animais através da administração de pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. - Sigma Chemical Co., USA) (YILMAZ, 2007), pilocarpina (400 mg/kg, i.p. - Sigma Chemical Co., USA) (TURSKI *et al.*, 1983) ou estriçnina (3,0 mg/kg, i.p. - Sigma Chemical Co., USA) (APRISON *et al.*, 1987). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados durante 30 ou 60 minutos para avaliação dos seguintes parâmetros comportamentais (em segundos): latência para a primeira convulsão (tempo decorrido antes da manifestação da primeira convulsão), latência para a morte (tempo decorrido até a morte do animal) e sobrevivida (o número de animais que permaneceram vivos). 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, para cada modelo de convulsão, os animais foram pré-tratados apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS).



Figura 6: Administração do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq) e de agentes convulsivantes em camundongos Swiss machos, por via intraperitoneal.



Figura 7: Aparato desenvolvido para auxiliar na administração endovenosa.



Figura 8: Administração do veneno de *Dinoponera quadriceps* nativo (vDq) e desnaturado (vdDq) em camundongos Swiss machos, por via endovenosa, a partir da veia da cauda.

3.5 Avaliação dos parâmetros oxidativos de lesão neural dos modelos *in vivo*

Em todos os modelos experimentais estudados, foram avaliados o grau de lesão de membrana celular (peroxidação dos lipídeos de membrana) e formação de radicais derivados de nitrogênio (dosagem de nitrito) em três das regiões do encéfalo mais acometidas pelos efeitos deletérios da convulsão: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. As áreas cerebrais foram homogeneizadas em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4 / 50 mM), a 10%.

3.5.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS) dos modelos *in vivo*

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 μL do homogenato foram adicionados 100 μL de ácido perclórico 35% e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos e a 4°C. A 150 μL do sobrenadante resultante foi adicionado 50 μL de ác. tiobarbitúrico 1,2%. Essa mistura foi levada para banho-maria ($\pm 95^\circ\text{C}$ / 30 minutos). Após, resfriou-se e transferiu-se 150 μL para placa de Elisa 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

3.5.2 Determinação do Conteúdo de Nitrito dos modelos *in vivo*

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.

3.6 Análise da atividade do vDq sobre astrócitos *in vitro*

3.6.1 Linhagem celular

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

3.6.2 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.

3.6.3 Estudos de viabilidade celular em cultura de astrócitos

3.6.3.1 Determinação da viabilidade celular após tratamento com o veneno de *Dinoponera quadriceps* e com pentilenotetrazol

- Ensaio com MTT

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 1×10^5 céls/mL e tratadas com o vDq (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL), PTZ (10, 20, 40 e 60 mM/mL) ou com uma combinação entre vDq (100, 50, 25, 12,5 µg/mL) e PTZ (33,12 mM/mL), por 24hs. Após o tratamento das células, o substrato da cultura foi retirado e então adicionado 10µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) dissolvido em PBS (500µg/mL). Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, as quais são capazes de converter o MTT em sal de formazan, um produto colorido e insolúvel em água. Após incubação por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e adicionado SDS (10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e, em seguida, uma leitura espectrofotométrica foi realizada em um comprimento de onda de 570nm (MOSMANN,1983).

3.7 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado e registrado sob o número de protocolo 43/2011.

3.8 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 foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Uma avaliação estatística da curva de sobrevida utilizando o teste Logrank (Mantel-Cox) foi realizada separadamente, com a comparação das curvas de controle *versus* as curvas correspondentes aos tratamentos. Para análise estatística dos ensaios *in vitro*, foi realizada ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para ambos os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, os valores de probabilidade (P) menores do que 0,05 foram considerados significativos.

Resultados
e
Discussão



4 Resultados e Discussão

A diversidade biológica não possui distribuição uniforme pelo planeta, estando concentrada principalmente nas florestas tropicais, o que as torna as regiões mais ricas em número de espécies em todo o mundo (CALDERON *et al.*, 2010). Especula-se que aproximadamente 70% das espécies do mundo estejam presentes em apenas 12 países, sendo estes: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e Zaire. (MYERS *et al.*, 2000; OLSON e DINERSTEIN, 1998; OLSON *et al.*, 2001). Nos últimos anos, esforços consideráveis têm sido feitos no sentido de identificar peptídeos naturais neuroativos e neuroprotetores derivados do veneno de diferentes espécies animais (JONES *et al.*, 2001; LEWIS e GARCIA, 2003; MASSENSINI *et al.*, 2003; TSETLIN e HUCHO, 2004).

Algumas toxinas isoladas de venenos animais podem exercer efeitos neurotóxicos, como convulsões e tremores em experimentações *in vivo*, contudo também surgiram evidências de suas atividades antiepilépticas ou anticonvulsivas em convulsões recorrentes assim como também ocorrência de efeitos neuroprotetores (MCINTOSH e JONES, 2001). Até o momento, apenas uma pequena parte da biodiversidade tem sido explorada cientificamente, estando a maioria dos estudos focados na relação estrutural-atividade de neurotoxinas *in vitro*, e, apesar da necessidade de novas terapêuticas para o tratamento de diversos transtornos neurológicos, a atividade *in vivo* dessas neurotoxinas tem sido explorada limitadamente (MORTARI *et al.*, 2007).

4.1 Determinação da atividade do veneno sobre modelos de convulsões induzidos quimicamente *in vivo* – ensaios comportamentais

No presente estudo dos efeitos do vDq sobre modelos de convulsão induzidos quimicamente, ao ser utilizado um pré-tratamento por via endovenosa (e.v.), foram observadas alterações significativas nos ensaios de avaliação comportamental apenas em modelo de convulsão induzido por PTZ. Neste, a administração prévia do vDq (0,1 e 0,5 mg/kg) foi capaz de reduzir o tempo para ocorrência da primeira convulsão, e não foram observadas alterações significativas tanto nos parâmetros da latência de morte quanto na sobrevida (Tabela 1).

Grupos tratados		Controle	vDq 0,1 mg/kg	vDq 0,5 mg/kg
PTZ (80 mg/kg, i.p.)	LPC	101,0 ± 3,31	77,83 ± 5,27*	74,43 ± 3,94*
	LM	306,9 ± 43,77	237,3 ± 36,82	267,1 ± 39,11
	S	0%	0%	0%
PILO (400 mg/kg, i.p.)	LPC	422,8 ± 56,86	410,0 ± 22,44	401,8 ± 19,27
	LM	498,3 ± 73,67	432,4 ± 22,22	424,9 ± 19,39
	S	0%	0%	0%
STRC (3,0 mg/kg, i.p.)	LPC	129,1 ± 6,48	121,1 ± 12,44	114,9 ± 6,69
	LM	150,6 ± 5,84	170,4 ± 18,05	169,5 ± 23,77
	S	0%	0%	0%

Tabela 1: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera* quadriceps (vDq), quando administrado por via e.v., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (segundos), latência para a morte (LM) (segundos) e percentual de sobrevivência (S) nos modelos de convulsão induzidos por Pentilenotetrazol (PTZ), Pilocarpina (PILO) e Estricnina (STRC). Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Levando-se em consideração os mecanismos de ação relacionados aos três modelos de convulsão estudados, isso nos sugere que os efeitos observados com o vDq provavelmente não estão relacionados com as vias colinérgicas ou glicinérgicas, e possivelmente tem sua atuação associada ao sítio de ligação do PTZ, ou seja, talvez atuando através da modulação de canais de cloreto associados a receptores do tipo GABA A. Adicionalmente, estudos demonstram que o veneno de uma formiga do mesmo gênero, *Dinoponera australis*, apresenta em sua constituição moléculas classificadas como modificadores de canais iônicos (HOFFMAN, 2010; JOHNSON *et al.*, 2010).

Curiosamente, o efeito do vDq descrito acima apresenta-se como o oposto daquele observado por nosso grupo de pesquisa em experimentação anterior a esta. Naquela oportunidade foi verificada a ocorrência de efeitos neuroprotetores, uma vez que, quando o veneno foi administrado por via intraperitoneal, ocorreu aumento da latência para a primeira convulsão e redução da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal dos animais (LOPES, 2011). Porém, quando administramos o vDq por via endovenosa, foi observada a ocorrência de efeitos deletérios, pois houve redução da latência para a primeira convulsão.

Com base nos efeitos relatados acima, nós sugerimos que o vDq pode conter ambos componentes neuroprotetores e neurotóxicos, os quais, respectivamente, atuam em favor da neurotransmissão inibitória ou reduzindo esse tipo de neurotransmissão. Efeito contraditório como esse já foi observado anteriormente em experimentações envolvendo o veneno proveniente de outra espécie pertencente à ordem Hymenoptera, a vespa social

Agelaia vicina, no qual evidenciaram a presença de dois peptídeos, AvTx 7 e AvTx 8, atuantes em ambas as neurotransmissões excitatórias e inibitórias (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PIZZO *et al.*, 2004).

A presença de componentes de alto peso molecular no veneno pode ser outra hipótese capaz de explicar esse efeito contraditório observado. Em outras pesquisas observou-se que tais constituintes podem estar relacionados com efeitos deletérios sobre o SNC, como é o caso da experimentação em que Cunha e colaboradores (2005) demonstraram que o veneno desnaturado da vespa *Polybia ignobilis* apresentou efeito anticonvulsivante em alguns modelos de convulsão quando comparado com os efeitos tóxicos do veneno bruto. Deste modo, nós sugerimos que a neurotoxicidade do vDq possa estar relacionada a presença de algum componente macromolecular, que provavelmente estava presente na circulação sanguínea do animal quando o veneno foi injetado por via e.v., mas ausente quando o veneno foi administrado por via i.p.

De posse do conhecimento sobre os efeitos antagônicos apresentados pelo veneno bruto e desnaturado da vespa *Polybia ignobilis* relatados anteriormente, então decidimos submeter o vDq ao processo de desnaturação para verificar se haveria também alguma alteração em sua atividade. Como, dentre os três mecanismos analisados, o veneno bruto apresentou ação apenas em modelo de convulsão induzido por PTZ, então decidimos submeter o vDq apenas à análises por esse modelo químico de indução. Ao observarmos os resultados obtidos com o vDq, no que diz respeito a análise dos parâmetros comportamentais avaliados, a hipótese acima levantada referente à existência e ação dos componentes macromoleculares ganhou maior força. Nós constatamos que os animais, quando pré-tratados com o vDq, visualmente mostraram-se bastante resistentes à morte ocasionada por uma dose potencialmente letal de PTZ utilizada nas experimentações, o que resultou em aumentos nos percentuais de sobrevivência. Estes ocorreram de modo dose-dependente quando o vDq foi administrado por via i.p. (0,5 e 2,0 mg/kg) (Tabela 2), e, em relação ao pré-tratamento e.v., foram observados apenas com a maior dose, 0,5 mg/kg (Tabela 3).

Grupos tratados (i.p.)	PTZ (80 mg/kg, i.p.)		
	LPC	LM	S
Controle	94,25 ± 5,84	404,0 ± 46,20	0%
vdDq 0,5 mg/kg	120,5 ± 10,71	539,3 ± 36,67	25%*
vdDq 2,0 mg/kg	120,3 ± 12,11	320,0 ± 91,74	62,5%*

Tabela 2: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via i.p., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (seg.), latência para a morte (LM) (seg.) e percentual de sobrevivência (S) em modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ). Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). Uma avaliação estatística da curva de sobrevivência utilizando o teste Logrank (Mantel-Cox) foi realizada separadamente, com a comparação das curvas de controle *versus* as curvas correspondentes aos tratamentos.

Grupos tratados (e.v.)	PTZ (80 mg/kg, i.p.)		
	LPC	LM	S
Controle	130,1 ± 16,33	496,6 ± 58,13	0%
vdDq 0,1 mg/kg	110,9 ± 8,57	516,0 ± 122,2	0%
vdDq 0,5 mg/kg	121,0 ± 16,44	646,0 ± 164,7	28,57%*

Tabela 3: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via e.v., sobre a latência para a primeira convulsão (LPC) (seg.), latência para a morte (LM) (seg.) e percentual de sobrevivência (S) em modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ). Valores expressos como média ± EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). *p < 0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). Uma avaliação estatística da curva de sobrevivência utilizando o teste Logrank (Mantel-Cox) foi realizada separadamente, com a comparação das curvas de controle *versus* as curvas correspondentes aos tratamentos.

A partir destes resultados foi observado que, além de acentuar os efeitos protetores evidenciados pelo tratamento i.p., o veneno desnaturado foi capaz de abolir os efeitos tóxicos apresentados outrora pelo veneno nativo administrado via e.v. Tomando-se por base relatos anteriores de que o vdDq apresenta um conteúdo proteico relevante, correspondente a 64,4% do teor do veneno (SOUSA *et al.*, 2012), nós sugerimos que tais macromoléculas talvez fossem as responsáveis pelo efeito danoso observado, uma vez que o

processo de desnaturação ao qual o veneno foi submetido pode ter ocasionado uma alteração e/ou desorganização da estrutura proteica a ponto de torna-la inativa ao seu sítio de ação.

4.2 Determinação da atividade do veneno sobre modelos de convulsões induzidos quimicamente *in vivo* – determinação do estresse oxidativo envolvido

Outro importante evento que tem sido reportado estar envolvido no processo convulsivo é o estresse oxidativo (ASHRAFI *et al.*, 2007; MIGLIORE *et al.*, 2005; PERRY *et al.*, 2002). Evidências emergentes se concentram sobre o papel do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial tanto como uma consequência quanto como uma causa de crises epiléticas.

ERO 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, e a determinação dos níveis de MDA, o qual é seu produto final, tem sido usada como um marcador desse processo. Metabólitos do NO têm 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.*, 2000; 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. No entanto, os efeitos agudos do excesso de NO neuronal no cérebro ainda são motivo de controvérsias, pois alguns relatos apontam sua ação tanto pró- como anticonvulsivante (CZUCZWAR *et al.*, 1999; DE SARRO *et al.*, 1993).

Em nossas análises envolvendo os parâmetros de estresse oxidativo foi observado que o pré-tratamento e.v. com o vDq não foi capaz de causar alterações significativas em nenhum desses parâmetros relacionados às convulsões induzidas por PILO (Gráficos 2 e 5) ou STRC (Gráficos 3 e 6), ou seja, ocorreram alterações apenas no modelo experimental utilizando o PTZ (Gráficos 1 e 4). Neste, foi constatado que houve aumento dos níveis de MDA nas áreas do córtex pré-frontal (0,1 mg/kg: $43,22 \pm 3,39$ μg de MDA/g de tecido comparado com $27,86 \pm 1,75$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 0,5 mg/kg: $43,24 \pm 2,89$ μg de MDA/g de tecido comparado com $27,86 \pm 1,75$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle), hipocampo (0,1: $56,02 \pm 2,85$ μg de MDA/g de tecido comparado com $42,99 \pm 3,55$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 0,5 mg/kg: $56,62 \pm 4,79$ μg de MDA/g de tecido

comparado com $42,99 \pm 3,55$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) e corpo estriado ($0,5$ mg/kg: $59,52 \pm 4,99$ μg de MDA/g de tecido comparado com $42,85 \pm 3,75$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) (Gráfico 1), além do conteúdo de nitrito também sofrer aumento nessas três áreas cerebrais analisadas: córtex pré-frontal ($0,1$ mg/kg: $176,9 \pm 8,24$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $99,13 \pm 6,74$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle; $0,5$ mg/kg: $178,6 \pm 8,28$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $99,13 \pm 6,74$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle), hipocampo ($0,1$ mg/kg: $189,4 \pm 9,71$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $129,9 \pm 10,03$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle; $0,5$ mg/kg: $200,6 \pm 10,96$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $129,9 \pm 10,03$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle) e corpo estriado ($0,1$ mg/kg: $231,3 \pm 11,72$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $136,7 \pm 11,68$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle; $0,5$ mg/kg: $222,3 \pm 14,44$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $136,7 \pm 11,68$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle) (Gráfico 4).

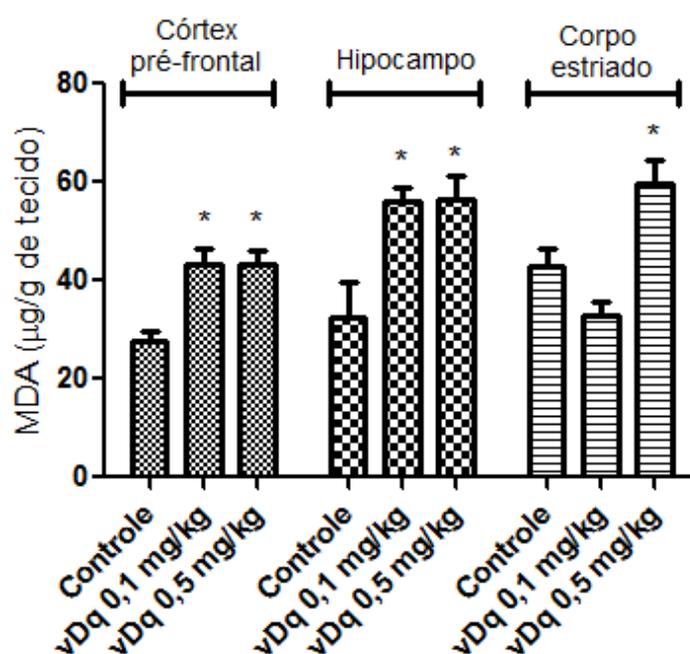


Gráfico 1: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

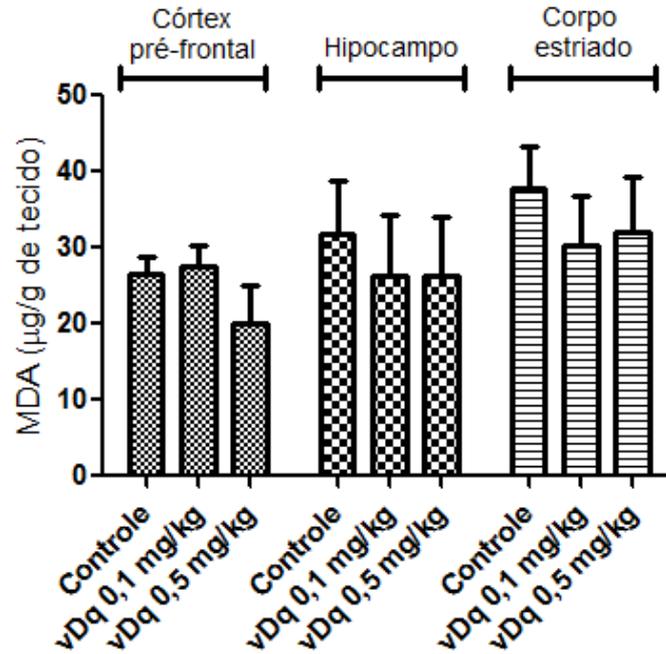


Gráfico 2: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pilocarpina, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

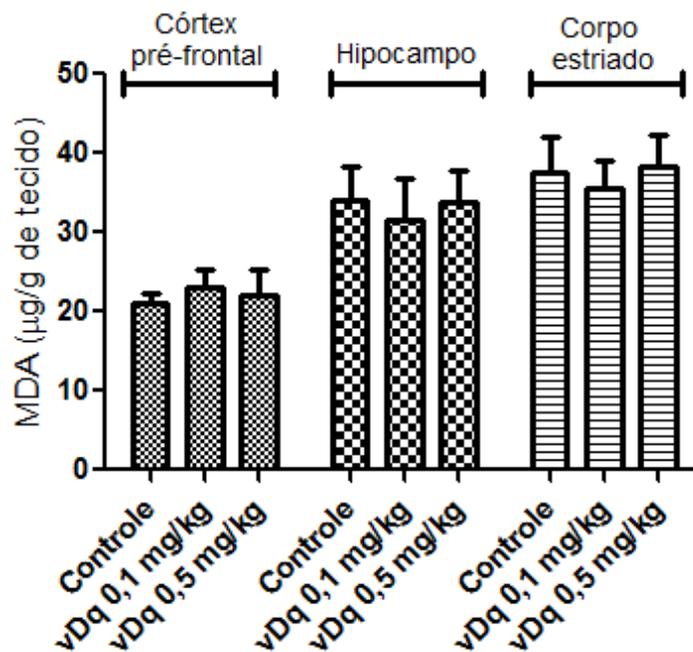


Gráfico 3: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Estricnina, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

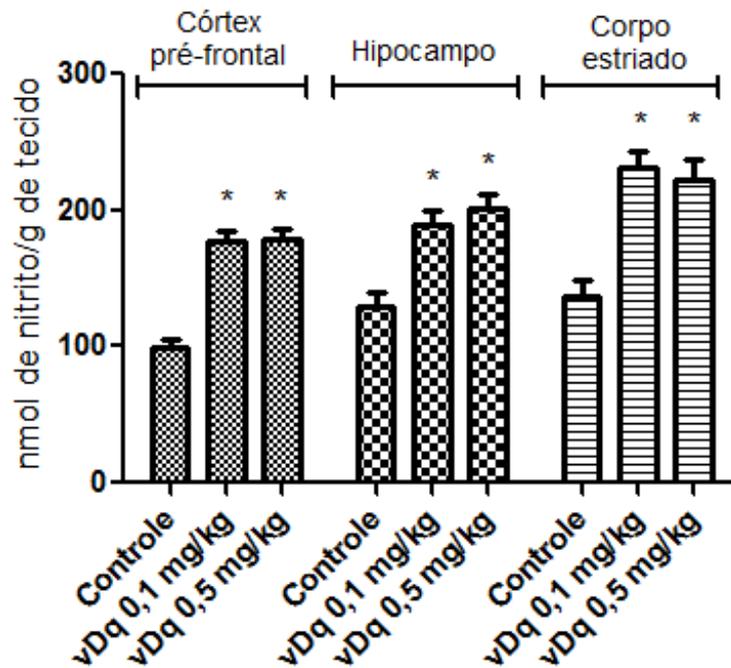


Gráfico 4: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

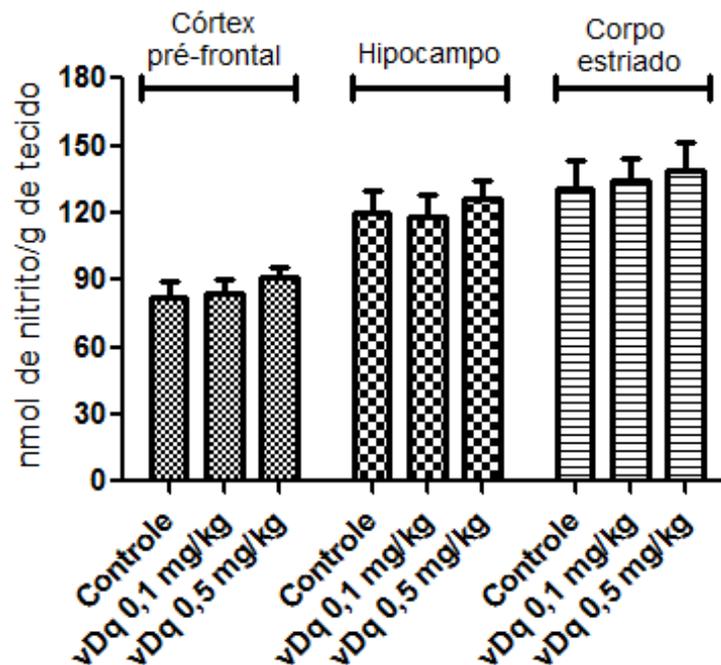


Gráfico 5: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pilocarpina, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

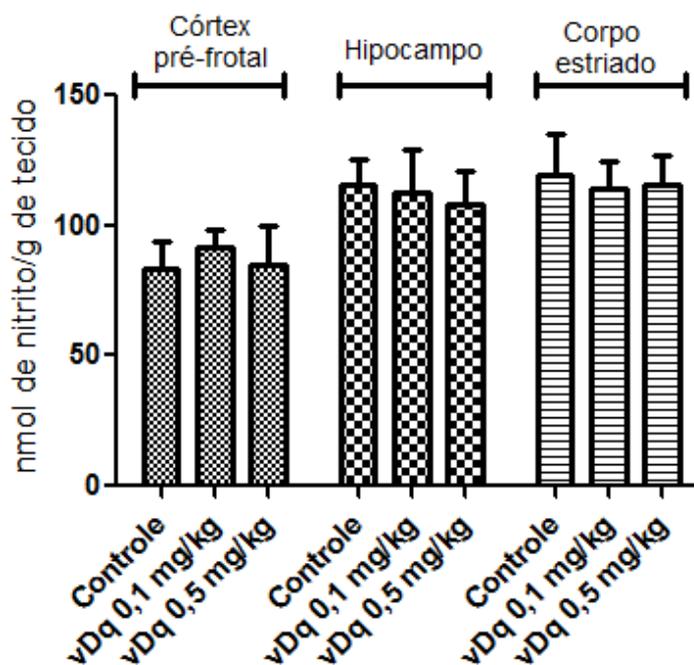


Gráfico 6: Efeito do veneno nativo de *Dinoponera quadriciceps* (vDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Estricnina, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Analisando-se o evento convulsivo em si e diante do prévio conhecimento de que esse transtorno neurológico pode relacionar-se com o aumento de processos oxidativos em nível de SNC, os dados acima apresentados estão de acordo com aqueles referentes aos ensaios comportamentais, quando evidenciamos efeito tóxico do vDq sobre convulsões induzidas por PTZ. Anteriormente, nós havíamos demonstrado que o pré-tratamento com o vDq, por via i.p., causou redução dos níveis de MDA no córtex pré-frontal de camundongos, o que evidenciou um efeito neuroprotetor (LOPES, 2011). Sendo assim, deparamo-nos mais uma vez com um efeito antagônico envolvendo os pré-tratamentos i.p. e e.v.

Esses resultados sugerem que o vDq talvez possa conter moléculas capazes de interferir positivamente e negativamente com os mecanismos oxidante/antioxidantes celulares envolvidos em convulsões causadas por PTZ. Interessantemente, enquanto os efeitos neuroprotetores foram observados apenas no córtex pré-frontal de camundongos, os efeitos neurotóxicos ocorreram nas três áreas cerebrais analisadas. Deste modo, um possível componente com propriedades antioxidantes parece ter afinidade por um alvo específico presente na estrutura cortical.

Em relação ao estresse oxidativo associado ao vdDq, em convulsões induzidas por PTZ, foi observado que ocorreu um efeito neurotóxico tanto quando os animais foram pré-tratados por via i.p. quanto por via e.v. Foi constatado que o pré-tratamento i.p. não foi capaz de causar aumento do conteúdo de nitrito em nenhuma das áreas cerebrais analisadas (Gráfico 9), mas causou acentuação dos níveis de MDA nas áreas do córtex pré-frontal (0,5 mg/kg: $8,84 \pm 0,66$ μg de MDA/g de tecido comparado com $6,34 \pm 0,58$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 2,0 mg/kg: $12,69 \pm 0,78$ μg de MDA/g de tecido comparado com $6,34 \pm 0,58$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle), hipocampo (0,5 mg/kg: $8,46 \pm 0,29$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,4 \pm 0,22$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 2,0 mg/kg: $11,21 \pm 0,56$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,4 \pm 0,22$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) e corpo estriado (2,0 mg/kg: $14,01 \pm 1,79$ μg de MDA/g de tecido comparado com $5,15 \pm 0,42$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) (Gráfico 7). Enquanto o pré-tratamento e.v. causou elevações das dosagens de MDA nas regiões do córtex pré-frontal (0,1 mg/kg: $7,77 \pm 0,37$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,85 \pm 0,26$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 0,5 mg/kg: $9,73 \pm 0,40$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,85 \pm 0,26$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle), hipocampo (0,1 mg/kg: $6,07 \pm 0,35$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,24 \pm 0,19$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle; 0,5 mg/kg: $6,99 \pm 0,44$ μg de MDA/g de tecido comparado com $4,24 \pm 0,19$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) e corpo estriado (0,5 mg/kg: $6,40 \pm 0,49$ μg de MDA/g de tecido comparado com $3,35 \pm 0,24$ μg de MDA/g de tecido no grupo controle) (Gráfico 8), e aumentou os níveis do conteúdo de nitrito apenas na região do hipocampo (0,5 mg/kg: $40,63 \pm 7,36$ nmol de nitrito/g de tecido comparado com $17,87 \pm 4,18$ nmol de nitrito/g de tecido no grupo controle) (Gráfico 10).

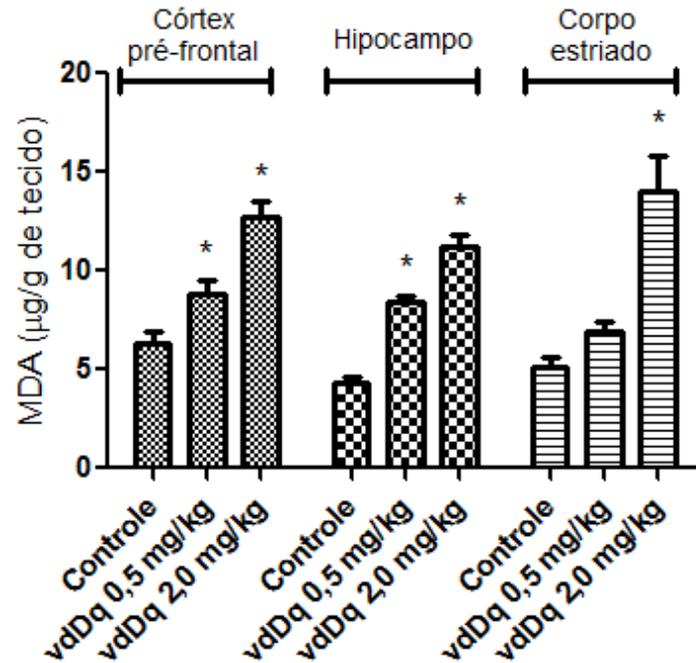


Gráfico 7: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via i.p. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

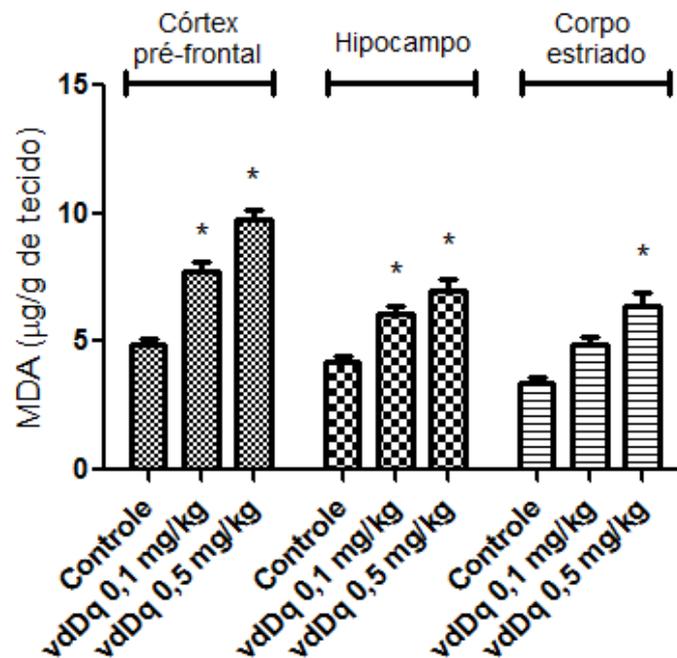


Gráfico 8: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriceps* (vdDq), quando administrado por via e.v. e em modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol, sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de MDA. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

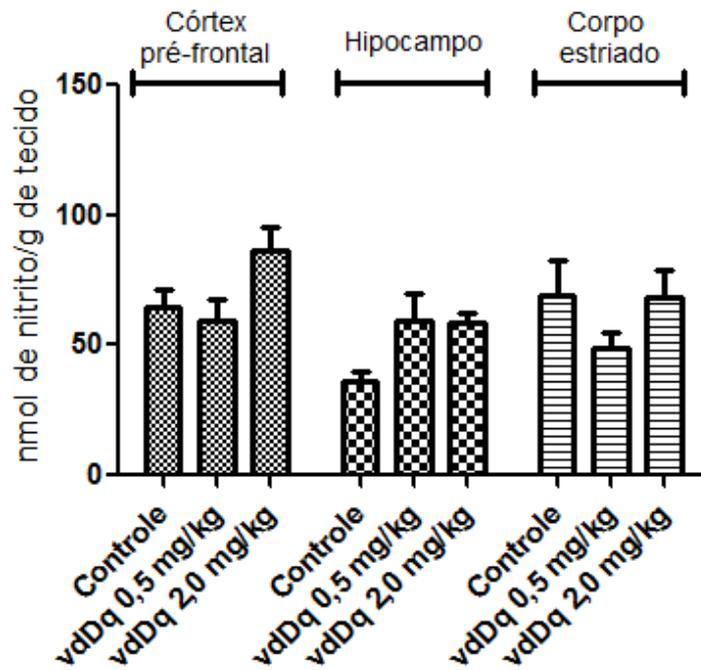


Gráfico 9: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriciceps* (vdDq), quando administrado por via i.p. e em modelo de convulsão induzida por Pentileno-tetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

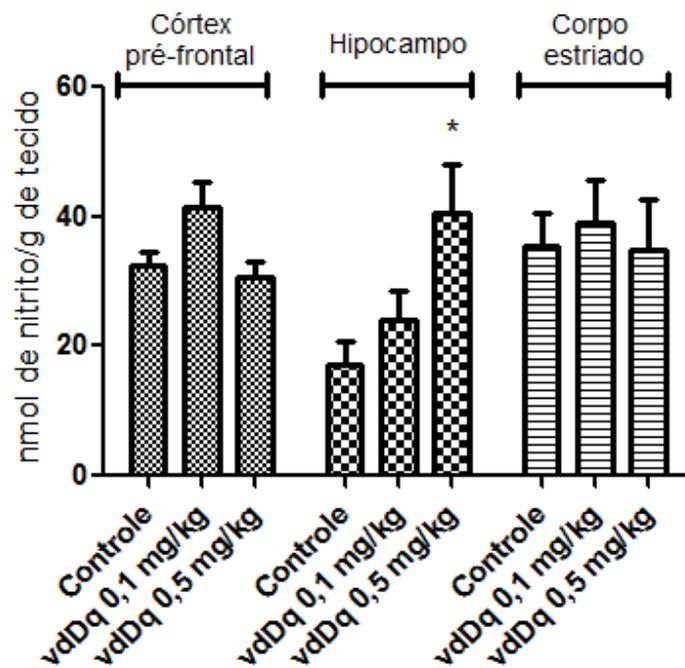


Gráfico 10: Efeito do veneno desnaturado de *Dinoponera quadriciceps* (vdDq), quando administrado por via e.v e em modelo de convulsão induzida por Pentileno-tetrazol, sobre a formação de radicais derivados do nitrogênio através da determinação do conteúdo de nitrito. Valores expressos como média \pm EPM de grupos composto por 6-8 animais. O grupo controle foi pré-tratado apenas com veículo utilizado para solubilizar a droga (PBS). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Uma das principais tendências na investigação de novos composto com atividade anticonvulsivante é busca por drogas com características neuroprotetoras (MELDRUM, 2001). Dados mostram a eficácia de algumas substâncias com propriedades antioxidantes na terapia de perturbações convulsivas (KABUTO *et al.*, 1998). Observando os resultados acima elencados, em relação ao vdDq, e associando-os com aqueles obtidos a partir dos ensaios comportamentais, percebemos que apesar deste nos mostrar um efeito protetor, está associado a uma maior oxidação das áreas cerebrais analisadas. À primeira vista essa ação parecer um tanto quanto estranha e contraditória, principalmente ao nos depararmos com a seguinte indagação: Como um composto pode ser capaz de exercer efeitos protetores diante da perspectiva comportamental e deletérios diante do cenário oxidativo?

Em um primeiro momento chegamos a imaginar que devido ao aumento da sobrevida, então os animais passaram a estarem mais expostos aos eventos relacionados à oxidação. Porém rechaçamos essa ideia após verificarmos que o conjunto dos resultados brutos das dosagens de MDA (aqueles não tratados estatisticamente) apresentava-se bastante homogêneo. Ou seja, mesmo aqueles animais que seguiram o curso normal de morte apresentaram danos oxidativos parelhos àqueles que permaneceram vivos durante todo o período de observação experimental e, assim, uma análise estatística separada desses animais não levaria a resultado diferente dessa apresentada acima.

Diante dessa indagação, passamos a pressupor algumas outras hipóteses que seriam passíveis de explicá-la. Primeiro, sabe-se que as peçonhas extraídas de animais constituem-se como um pool de variadas moléculas, então provavelmente o composto responsável pelos efeitos comportamentais pode ser diferente daquele relacionado aos achados oxidativos. Além disso, a análise desse efeito evidenciado pelo vdDq nos faz sugerir que um possível agente neuroprotetor/antioxidante presente no veneno possivelmente tem estrutura proteica, enquanto que o componente neurotóxico/pró-oxidante não o tem. Segundo, os mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais e oxidativos talvez não estejam diretamente correlacionados, ou seja, podem ser independentes e atuantes por vias distintas. Caso essa teoria seja mesmo verdadeira, então passaríamos a considerar que, nesse caso, os achados oxidativos não se apresentam como consequência e/ou causa daqueles comportamentais, e vice-versa. Mesmo porque, pelo menos aparentemente, o aumento da oxidação não foi determinante para levar os animais à morte, o qual seria um desfecho esperado diante da dose de PTZ que foi utilizada na indução convulsiva.

Perante o que foi exposto acima, faz-se necessário proceder com novas investigações no sentido de averiguar a conformidade das hipóteses levantadas acerca dos

efeitos do vDq e do vdDq sobre o modelo de convulsão induzido por PTZ. Além do mais, outro passo fundamental é determinar quais frações do veneno são responsáveis pelos efeitos apresentados.

4.3 Efeitos do vDq e do PTZ sobre a viabilidade de astrócitos corticais *in vitro*

Os resultados referentes à exposição de astrócitos corticais a diferentes concentrações do vDq (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$) nos mostram que este não é capaz de exercer, estatisticamente, qualquer efeito sobre a viabilidade desse tipo celular, apesar de aparentemente observar-se uma relativa tendência à redução da viabilidade celular após tratamento com a maior dose em análise, 200 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 11).

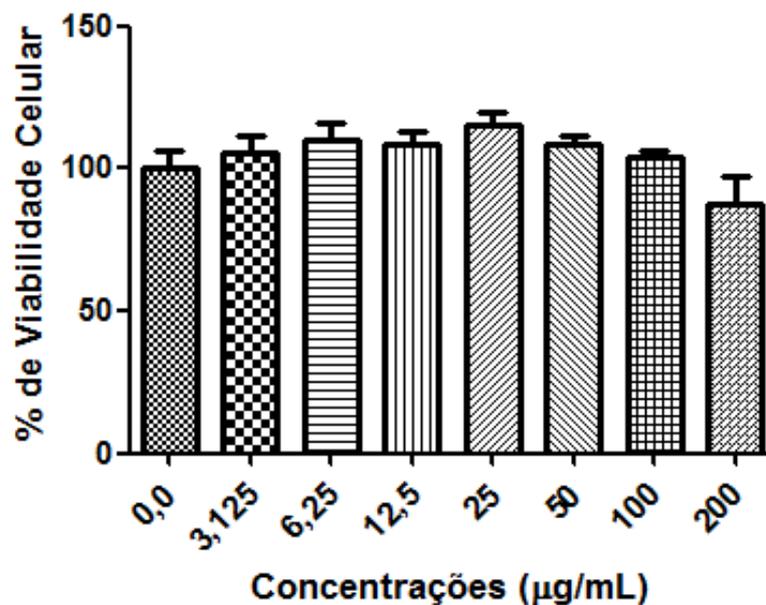


Gráfico 11: Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações do veneno de *Dinoponera quadricaps* (vDq). Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Os astrócitos são o tipo celular predominante no cérebro de roedores e são ainda mais abundantes no cérebro humano (QU *et al.*, 2005). De fato, são células consideradas elementos integrantes no circuito da plasticidade sináptica e desempenham funções fisiológicas importantes no SNC (HALASSA *et al.*, 2007), principalmente no que diz respeito a seu suporte aos neurônios de variadas maneiras: orientação durante a embriogênese, homeostase iônica, fornecimento de precursores para a síntese de neurotransmissores, dentre

muitas outras. Portanto, tais atribuições desempenhadas por essas células da glia são essenciais para a sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, à vida do organismo. Sendo assim, esse dado referente à ausência de atividade do vDq sobre astrócitos, quando exposto isoladamente, pode ser bastante importante, uma vez que um composto capaz de influenciar negativamente na viabilidade dessas células poderia vir a comprometer indiretamente o funcionamento normal da rede neuronal.

Quanto ao efeito do PTZ sobre a viabilidade da linhagem celular em teste, em nossas análises observamos que ele foi citotóxico à essas células em todas as quatro doses analisadas (10 mM/mL: $86,24 \pm 4,01$ % de células viáveis comparado com $100,0 \pm 4,95$ % de células viáveis no grupo não tratado; 20 mM/mL: $77,88 \pm 0,62$ % de células viáveis comparado com $100,0 \pm 4,95$ % de células viáveis no grupo não tratado; 40 mM/mL: $42,33 \pm 2,32$ % de células viáveis comparado com $100,0 \pm 4,95$ % de células viáveis no grupo não tratado; 60 mM/mL: $17,26 \pm 0,39$ % de células viáveis comparado com $100,0 \pm 4,95$ % de células viáveis no grupo não tratado), de modo dose-dependente, e apresentando uma IC 50 (índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo) correspondente a 33,12 mM (Gráfico 12).

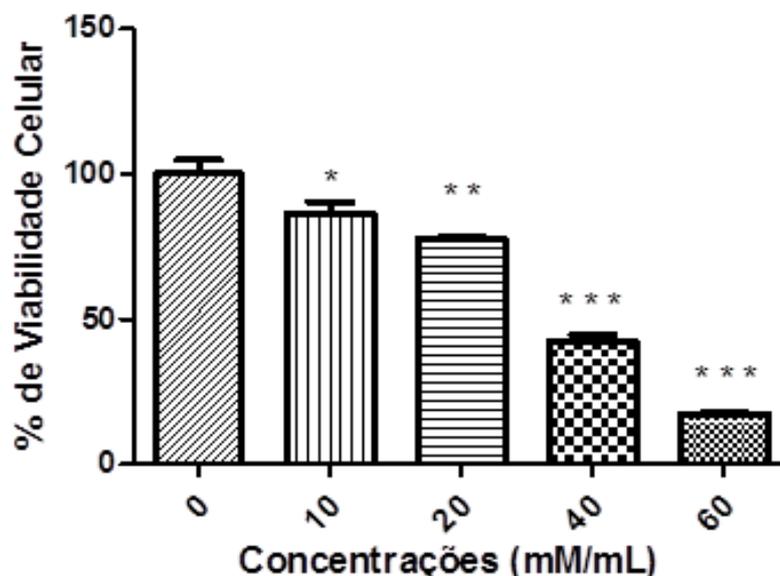


Gráfico 12: Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de pentilenotetrazol (PTZ). Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não tratado ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle não tratado. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle não tratado.

Expor culturas de astrócitos à agentes conhecidos por afetar neurônios e registrar suas respostas celulares em um ambiente controlado é o primeiro passo em direção a uma melhor compreensão de como essas células gliais podem participar em processos neuropatológicos específicos (PAVONE e CARDILE, 2003). Receptores do tipo GABA A, os quais são sítios de ação do PTZ, além de poder ser encontrados na membrana pós-sináptica dos neurônios também tem demonstrado estarem presentes em astrócitos (VERKHRATSKY e STEINHÄUSER, 2000). Previamente uma pesquisa demonstrou que o PTZ é capaz de afetar o metabolismo de astrócitos em cultura (QU *et al.*, 2005). Uma das análises feitas nesse estudo foi a determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), ensaio este que também pode ser utilizado como método para determinação da viabilidade de células em cultura e sua integridade de membrana, onde foi demonstrado que a exposição de astrócitos corticais e cerebelares a até 6 mM de PTZ, durante 3 semanas, não foi capaz de causar alterações da atividade de LDH, no entanto, a atividade dessa enzima diminuía com o aumento da concentração de PTZ.

O resultado evidenciado por nós corrobora em parte com aquele demonstrado por Zhu e colaboradores (2012), quando estes observaram que havia redução da viabilidade celular de astrócitos hipocampais expostos ao PTZ nas doses de 20 e 40 mM, de modo dose-dependente, mas não à de 10 mM. Como em nossa experimentação observamos efeito citotóxico também com a concentração de 10 mM, isso nos faz supor que provavelmente os astrócitos corticais são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do PTZ do que aqueles oriundos da região do hipocampo.

De posse do conhecimento gerado sobre a citotoxicidade do PTZ, e conhecendo sua IC 50 correspondente (33,12 mM), então decidimos analisar se o pré-tratamento com vDq (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL) era capaz de exercer alguma influencia sobre uma cultura de astrócitos exposta à concentração de PTZ capaz de reduzir a viabilidade dessas células à metade. Como resultado foi observado que houve redução da viabilidade celular envolvendo o pré-tratamento com vDq na concentração de 100 µg/mL e subsequente exposição a dose correspondente a IC 50 do PTZ ($26,38 \pm 1,23$ % de células viáveis comparado com $47,95 \pm 3,19$ % de células viáveis no grupo tratado com a IC 50 do PTZ), ou seja, uma espécie de efeito tóxico sinérgico (Gráfico 13).

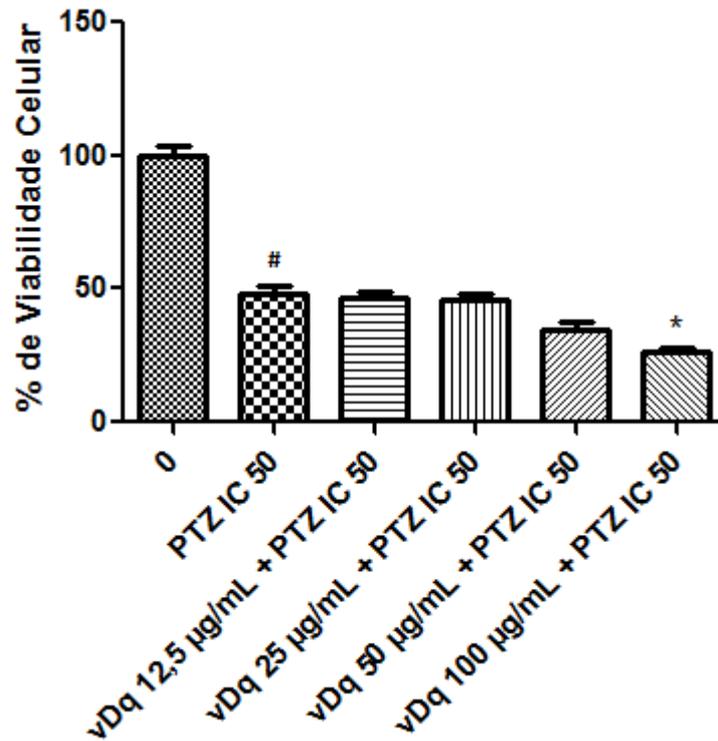


Gráfico 13: Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações da combinação de vDq + PTZ IC 50. Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não tratado. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle PTZ IC 50.

Diante do resultado exposto acima, nós sugerimos que provavelmente os astrócitos são um dos tipos celulares envolvidos na neurotoxicidade evidenciada nos ensaios *in vivo*, tanto relacionados aos efeitos observados após o pré-tratamento do vDq por via e.v., como quanto aos danos oxidativos correspondentes ao pré-tratamento com vDq nas duas vias de administração analisadas.

Está bem demonstrado na literatura que a lesão cerebral provoca uma sequência de respostas celulares que podem levar a morte neuronal, no entanto pouco se sabe sobre como os mesmos processos afetam os astrócitos circundantes. Como se sabe mais sobre as propriedades dos neurônios epilépticos, então se pode entender melhor os mecanismos de ação de drogas que impedem a hiperexcitabilidade neuronal. Sendo assim, não é novidade o fato de que as DAEs utilizadas na atualidade foram desenvolvidas no sentido de exercerem um efeito protetor sobre neurônios. Porém, estudos demonstram que essas drogas podem causar toxicidade sobre astrócitos. As experimentações de Pavone e Cardile (2003) revelaram que ocorre redução da viabilidade celular de astrócitos corticais de rato expostos à diferentes

drogas anticonvulsivantes, mesmo em doses correspondentes ao intervalo terapêutico recomendado, e ainda não está claro se tal fato é benéfico ou prejudicial.

Deste modo, ainda não se pode prever se esse efeito do vDq sobre a viabilidade de astrócitos, em resposta ao dano propiciado pelo PTZ, é uma característica que venha a contribuir de modo positivo ou negativo sobre o evento convulsivo. Futuras pesquisas sobre o impacto do vDq em outras linhagens celulares envolvidas no processo convulsivo, tal como o teste diretamente sobre neurônios, aliado a descoberta da fração do veneno responsável pelos efeitos protetores revelados *in vivo*, podem sugerir melhor em qual direção a aplicação deste produto natural pode ser mais útil ao desenvolvimento de uma nova ferramenta farmacológica.

Conclusões



5 CONCLUSÕES

✓ O pré-tratamento endovenoso com vDq apresentou ação apenas em modelo de convulsão induzido por PTZ.

✓ O vDq, quando administrado por via e.v., causou efeitos neurotóxicos comprovados pelas alterações em parâmetros comportamentais (redução da latência para a primeira convulsão) e oxidativos (elevação dos níveis de MDA e nitrito) sobre modelo de convulsão induzido por PTZ.

✓ O vdDq, administrado por via i.p. e por via e.v., foi capaz de causar efeitos protetores sobre os parâmetros comportamentais (aumento da sobrevida), porém causou efeitos tóxicos em relação aos parâmetros oxidativos, (elevações dos níveis de MDA após pré-tratamento por ambas as vias, e de conteúdo de nitrito relacionado a administração por via e.v.).

✓ O vDq provavelmente contém ambos componentes neurotóxicos e neuroprotetores, assim como ambos componentes oxidantes e antioxidantes.

✓ Quando administrado isoladamente, o vDq não é capaz de alterar a viabilidade celular de uma cultura de astrócitos corticais.

✓ O PTZ causa redução dose-dependente da viabilidade de astrócitos corticais em cultura, apresentando uma IC 50 correspondente a 33,12 mM.

✓ O tratamento associado entre o vDq, na concentração de 100µg/mL, e a dose corresponde a IC 50 do PTZ foi capaz de causar redução da viabilidade celular de uma cultura de astrócitos corticais.

✓ Os astrócitos provavelmente são um dos tipos celulares envolvidos nos efeitos neurotóxicos do vDq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.P.; VASCONCELOS, G.S.; CHAVES, E.M.C.; DO VALE, O.C.; MACÊDO, 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.
- ÄNGEHAGEN, M.; BEN-MENACHEM, E.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. **Neurochem Res**, v. 28, n. 2, p. 333-340, 2003.
- APRISON, M. H.; LIPKOWITZ, K. B.; Simon, J. R. Identification of a glycine-like fragment on the strychnine molecule. **J Neurosci Res.**, v. 17, n. 3, p. 209-13, 1987.
- ASHRAFI, M. R.; SHAMS, S.; NOURI, M.; MOHSENI, M.; SHABANIAN, R.; YEKANINEJAD, M. S.; CHEGINI, N.; KHODADAD, A.; SAFARALIZADEH, R. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. **Epilepsia**, v. 48, p. 1750–1755, 2007.
- AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, F.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAIAS, F. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for management of neurodegenerative disease. **J Ethnopharmacol**, v. 84, p. 131-138, 2003.
- BASHKATOVA, V. G.; VITSKOVA, G. YU.; NARKEVICH, V. B.; VANIN, A. F.; MIKOYAN, V. D.; RAYEVSKY, K. S. Nitric oxide content measured by ESR spectroscopy in the rat brain is increased during pentylenetetrazole-induced seizures. **J. Mol. Neurosci.**, v. 14, p. 183– 190, 2000.
- BELEBONI, R. O.; PIZZO, A. B.; FONTANA, A. C. K.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W. F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **Eur J Pharmacol.**, v. 493, p. 1-17, 2004.
- BIALER, M.; WHITE, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature rev. drug discov.**, v. 9, n. 1, p. 68-82, 2010.
- BLUM, M. S. Biochemical defenses of insects. In: ROCKSTEIN, M. Biochemistry of insects. London: Academic Press, p. 465-513, 1978.
- BÖHME, I.; LUDDENS, H. The inhibitory neural circuitry as target of antiepileptic drugs. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 11, p. 1257-1274, 2001.
- BRASIL. Melhorar a aceitação, diagnóstico, tratamento, serviços e prevenção de epilepsia em todo o mundo. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=35093>. Acesso em 14/11/2010.
- BRODIE, M.J. Antiepileptic drug therapy the story so far. **Seizure**, v. 19, p. 650-655, 2010.

CALDERON, L.A.; DA SILVA, L.H.P.; STÁBELI, R.G. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da Amazônia legal. **REU**, v. 36, n. 3, p. 15-41, dez. 2010.

CARNEIRO, A. M. D.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M. H. L.; CORDEIRO, M. N.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; GO'MEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, V. F. Expression of a functional recombinant Phoneutria nigriventer toxin active on K⁺ channels. **Toxicon**, v. 41, p. 305- 313, 2003.

CHANG, S.J.; YU, B.C. Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and oxidative status in epilepsy. **J. bioenerg. biomembranes.**, v.42, n. 6, p. 457-459, 2010.

CHEN, J.; LARIVIERE, W.R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. **Prog. Neurobiol.**, v. 92, p. 151-183, 2010.

CLARKE, L.E.; BARRES, B.A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 311-321, 2013.

CLASADONTE, J.; HAYDON, P.G. Astrocytes and epilepsy. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 53, 2010.

CLASADONTE, J.; HAYDON, P.G. Astrocytes and Epilepsy. **In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors, Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th edition. National Center for Biotechnology Information (US)**, p. 1-19, 2012.

CORNELL-BELL, A.H.; FINKBEINER, S.M.; COOPER, M.S.; SMITH, S.J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. **Science**, v. 247, n. 4941, p. 470-473, 1990.

CUNHA, A. O. S.; MORTARI, M. R.; OLIVEIRA, L.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 141, parte c, p. 50-57, 2005.

CZUCZWAR, S. J.; TUTKA, P.; KLONOWSKI, P.; KLEINROK, Z. N(G)-Nitro-L-arginine impairs the anticonvulsive action of ethosuximide against pentylenetetrazole. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 366, p. 137- 142, 1999.

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 cortex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 230, p. 151- 158, 1993.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUVAL, A.; MALÉCOT, C. O.; PELHATE, M.; PIEK, T. Poneratoxin, a new toxin from an ant venom, reveals an interconversion between two gating modes of the Na channels in frog skeletal muscle fibres. **Pflugers Arch.**, v. 420, p. 239-247, 1992.

ELOQAYLI, H.; DAHL, C.B.; GÖTESTAM, K.G.; UNSGÅRD, G.; HADIDI, H.; SONNEWALD, U. Pentylentetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 85, p. 1200–1207, 2003.

FISHER, R.S.; BOAS, W.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic seizures and epilepsy. Definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, n. 42, p. 1-11, 1984.

FONTANA, A. C.; GUIZZO, R.; BELEBONI, R. O.; MEIRELLES E SILVA, A. R.; COIMBRA, N. C.; AMARA, S. G.; SANTOS, W. F.; COUTINHO-NETTO, J. Purification of a neuroprotective component of Parawixia bistriata spider venom that enhances glutamate uptake. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 1297-1309, 2003.

FREITAS R. M.; TOMÉ A. R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Rev Psiq Clín.**, v. 37, p. 105-8, 2010.

FRY, B.G.; ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D.E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J.D.; KING, G.F.; NEVALAINEN, T.J.; NORMAN, J.A.; LEWIS, R.J.; NORTON, R.S.; RENJIFO, C.; DE LA VEGA, R.C. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 10, p. 483-511, 2009.

GOMES, M.M. História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol.**, v. 12, n. 3, p. 161-167, 2006.

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

HADDAD JUNIOR, V.; CARDOSO, J. L. C.; MORAES, R. H. P. Description of na injury in a human caused by a false tocanira (*Dinoponera gigantean*, Perty, 1833) with a revision of folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giant ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family ponerinae). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 4, p. 235-238, 2005.

HALASSA, M.M.; FELLIN, T.; HAYDON, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.

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

HARVEY, A. L.; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLFELDT, J. A.; JERUSALINKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-1640, 1998.

HARVEY, A.L. From venoms to toxins to drugs. **Chem. Ind.**, v. 22, p. 914-916, 1995.

HAYASHI, M.A.; CAMARGO, A.C. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops Jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1163-1170, 2005.

HAYDON, P.G.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 1009–1031, 2006.

HERMANN, H. R.; BLUM, M. S.; WHEELER, J. W.; OVERAL, W. L.; SCHMIDT, J. O.; CHAO, JUNG-TAI. Comparative anatomy and chemistry of the venom apparatus and mandibular glands in *Dinoponera grandis* (Guérin) and *Paraponera clavata* (F.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). **Ann. entomol. Soc. Amer.**, v. 77, n. 3, p. 272-279, 1984.

HEUSER, K.; SZOKOL, K.; TAUBOLL, E. The role of glial cells in epilepsy. **Tidsskr Nor Legeforen.**, v. 134, n. 1, p. 37 – 41, 2014.

HOFFMAN, D.R. Ant venoms. **Curr. Opin. allergy clin. Immunol.**, v. 10, p. 342-346, 2010.

HÜBNER, A.; JENTSCH, T.J. Ion channel diseases. **Human Molecular Genetic.**, v. 11, n. 20, p. 2438-45, 2002.

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

JOHNSON, S. R.; COPELLO, J. A., EVANS, M. S.; SUAREZ, A. V. A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 702-710, 2010.

JONES, R.M.; CARTIER, G.E.; MCINTOSH, J.M.; BULAJ, G.; FARRAR, V.E.; OLIVERA, B.M. Composition and therapeutic utility of conotoxins from genus *Conus* Patent status 1996 – 2000. **Exp. Opin. Ther. Patents**, v. 11, p. 603– 623, 2001.

KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, p. 237–243, 1998.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature rev. drug discov.**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; YASUHARA, T.; NAKATA, Y.; MIWA, A.; KAWAI, N. Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins. **Neurosci. Lett.**, v. 285, p. 29-32, 2000.

KWAN, P.; SILLS, G.J.; BRODIE, M.J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology Therapy**, v. 90, p. 21-34, 2001.

LANEROLLE, N. C.; LEE, T. S.; SPENCER, D. D. Astrocytes and Epilepsy. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 424-438, 2010.

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

LIMA, P. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **J Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, p. 149-162, 2003.

LOPES, K. S. **Estudo Da Atividade Do Veneno De *Dinoponera quadriceps* Sobre Convulsão Em Modelos Animais**: 2011. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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

LÖSCHER, 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. 359-368, 2011.

MALINSKA, D.; KULAWIAK, B.; KUDIN, A.P.; KOVACS, R.; HUCHZERMEYER, C.; KANN, O.; SZEWCZYK, A.; KUNZ, W.S. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 1163–1170, 2010.

MALONE, J.; TRAUTMANN, M.; WILHELM, K.; TAYLOR, K.; KENDALL, D.M. Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 18, p. 359-367, 2009.

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.

MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; BRUIN, V. M. S.; AGUIAR, L. M. V.; PINHO, R. S. N.; VIANA, G. S. B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neurosci Lett.**, v. 235, p. 13-16, 1997.

MASSENSINI, A.R.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V. Sodium channel toxins and neurotransmitter release. **Neurochem. Res.**, v. 28, n. 10, p. 1607– 1611, 2003.

MAZZAMBANI, L. **Avaliação das propriedades farmacológicas dos compostos imídicos cíclicos selecionados e da agmatina no sistema nervoso central**. Dissertação (Mestrado). 2005. Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas. Universidade Vale do Itajaí. Itajaí – São Paulo, 2005.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 108, n. 8, p. 652-659, 2000.

MCINTOSH, J.M.; JONES, R.M. Cone venom—from accidental stings to deliberate injection. **Toxicon**, v. 39, p. 1447– 1451, 2001.

MCNAMARA, J.O. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature**, v. 399, p. 15-22, 1999.

MELDRUM, B.S., Why and when are seizures bad for the brain? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 445– 446, 2001.

MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. R. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. **Toxicon**, v. 43, p. 493-508, 2004.

MIGLIORE, L.; FONTANA, I.; COLOGNATO, R.; COPPEDÈ, F.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. **Neurobiol. Aging**, v. 26, p. 587–595, 2005.

MILJANICH, G.P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 3029-3040, 2004.

MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; SOARES, A.M. Pharmacological perspectives of wasp venom. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, p. 944-952, 2009.

MORTARI, M.R. Arthropod Venoms: A Vast Arsenal of Insecticidal Neuropeptides. **Peptide science**, v. 98, n. 4, p. 385-405, 2010.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxinas from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, n. 1, p. 171-183, 2007.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; OLIVEIRA, L.; VIEIRA, E. A. G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Anticonvulsant and Behavioral Effects of the Denatured Venom of the Social Wasp *Polybia accidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 97, p. 289-295, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v65, p55-63, 1983.

MULSCH, A.; BUSSE, R.; MORDVINTCEV, P.; VANIN, A.; NIELSEN, E.; SCHEEL-KRUGER, J.; OLESEN, S. P. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. **NeuroReport**, v. 5, p. 2325–2328, 1994.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NDIMUBANZI, P.C.; CARABIN, H.; BUDKE, C.M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y.J.; RAINWATER, E.; DICKEY, M.; REYNOLDS, S.; STONER, J.A. A systematic review of the frequency of neurocytotoxicosis with a focus on people with epilepsy. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n.11, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural products as a source of new drugs over the 30 years from 1981-2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

OLIVEIRA, L.; CUNHA, A. O.; MORTARI, M. R.; PIZZO, A. B.; MIRANDA, A.; COIMBRA, N. C.; DOS SANTOS, W. F. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. **Brain Res.**, v. 103, p. 74-81, 2005.

OLIVERA, B.M. Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 31173–31177, 2006.

OLNEY, J. W.; LABRUYERE, J.; WANG, G.; WOZNIAK, D. F.; PRICE, M. T.; SESMA, M. A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. **Science**, v. 254, p. 1515-1518, 1991.

OLSON, D.M.; DINERSTEIN, E. The Global 200: A representation approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. **Conserv. Biol.**, v. 12, n. 3, p. 502-515, 1998.

OLSON, D.M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E.D.; BURGESS, N.D.; POWELL, G.V.N.; UNDERWOOD, E.C.; D'AMICO, J.A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J.C.; LOUCKS, C.J.; ALLNUTT, T.F.; RICKETTS, T.H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J.F.; WETTENGEL, W.W.; HEDAO, P.; KASSEM, K.R. Terrestrial ecoregions of the World: a new map of life on Earth. **BioScience**, v. 51, n. 11, p. 933-938, 2001.

PALMA, M.S. Insect Venom Peptides in, Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier, p. 389-396, Chapter 56. In: Kastin, A. (Ed.), 2006.

PAVONE, A.; CARDILE, V. An In Vitro Study of New Antiepileptic Drugs and Astrocytes. **Epilepsia**, v. 44, n. 10, p. 34–39, 2003.

PERRY, G.; NUNOMURA, A.; HIRAI, K.; ZHU, X.; PEREZ, M. AVILA, J.; CASTELLANI, R. J.; ATWOOD, C. S.; ALIEV, G.; SAYRE, L. M.; TAKEDA, A.; SMITH, M. A. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative disease? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 1475–1479, 2002.

PIEK, T.; HUE, B.; MANTEL, P.; NAKAJIMA, T.; SCHMIDT, J. O. Pharmacological characterization and chemical fractionation of the venom of the ponerine ant, *Paraponera clavata* (F.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 481-486, 1991.

PIMENTA, A.M.; DE LIMA, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **J. Pept. Sci.**, v. 11, p. 670–676, 2005.

PIZZO, A. B.; BELEBONI, R. O.; FONTANA, A. C. K.; RIBEIRO, A. M.; MIRANDA, A.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W. F. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 18, p. 61-68, 2004.

- PIZZO, A. B.; FONTANA, A. C. K.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W. F. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gaminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 14, p. 88-94, 2000.
- PORTO, L.A.; SIQUEIRA, J.S.; SEIXAS, L.N.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas – Uma breve revisão. **J Epilepsy Clin Neurophysiol.**, v. 13, n. 4, p. 169-175, 2007.
- PURALI, N. Stimulation of GABA release by scorpion venom in an isolated synapse in the crayfish (*Astacus leptodactylus*). **Toxicon**, v. 41, p. 383-389, 2003.
- QU, H.; ELOQAYLI, H.; SONNEWALD, U. Pentylentetrazole Affects Metabolism of Astrocytes in Culture. **J. neurosci. res.**, v. 79, p. 48-54, 2005.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELLO LEAM. In: Almeida RN. **Psicofarmacologia - Fundamentos práticos**. 1. ed. Editora Guanabara Koogan, 2006.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Q.; DE LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BEDOR, C. N. G.; JÚNIOR, R. G. C. S. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 163-166, 2007.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; 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. 3, p. 179-84, 2002.
- RATCLIFFE, N.A.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; BUTT, T.M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, p. 747-769, 2011.
- ROGAWSKI, M.A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. **Nature Med**, v. 10, p. 685-692, 2004.
- SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calciumdependent excitotoxicity. **J Mol Med**, v. 78, n. 1, p. 3-13, 2000.
- SCEMES, E.; GIAUME, C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. **Glia**, v. 54, n.7, p. 716–725, 2006.
- SCHMIDT, J. O. Hymenopteran venoms: striving toward the ultimate defense against vertebrates. In: EVANS, D. L.; SCHMIDT, J. O. (Ed). **Insect defenses, adaptive mechanisms and strategies of prey and predators**. Albany, State University of New York Press, p. 387-419, 1990.
- SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology and ultrastructure of the convoluted gland in the ant *Dinoponera australis* (Hymenoptera:Formicidae). **Int J Insect Morphol e Embryol**, v. 24, n. 3, p. 323-332, 1995.
- SCHWARTZ, E.F.; MOURÃO, C.B.F.; MOREIRA, K.G.; CAMARGOS, T.S.;

MORTARI, M.R. Arthropod Venoms: A Vast Arsenal of Insecticidal Neuropeptides. **Peptide science**, v. 98, n. 4, p. 385-405, 2012.

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

SHIN, E.J.; JEONG, J.H.; CHUNG, Y.H.; KIM, W.K; KO, K.H.; BACH, J.H.; HONG, J.S.; YONEDA, Y.; KIM, H.C. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochem. int.**, v. 59, p. 122-137, 2011.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 14, n. 23, 2013.

SILVA, L. F.; PEREIRA, P.; ELISABETSKY, E. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen. Pharmac.*, v. 31, p. 47-50, 1998.

SIQUIEROLI, A. C. S.; SANTANA, F. A.; RODRIGUES, R. S.; VIEIRA, C. U.; CARDOSO, R.; GOULART, L. R.; BONETTI, A. M. Phage display in venom gland in *Dinoponera australis* (HYMENOPTERA:FORMICIDAE). **J Venom Anim Toxins incl Trop Disc**, IX Symposium of the Brazilian Society on Toxinology, v. 13, n. 1, p. 291, 2007.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

SNEAD, O.C.; BANERJEE, P.K.; BURNHAM, M.; HAMPSON, D. Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). **J. Neurosci.**, v. 20, p. 6218–6224, 2000.

SOUSA, P.L.; QUINET, Y.; PONTE, E.L.; VALE, J.F.; TORRES, A.F.C.; PEREIRA, M.G.; ASSREUY, A.M.S. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 144, n.1, p. 213–216, 2012.

SZOLAJSKA, E.; POZNANSKI, J.; FERBER, M. L.; MICHALIK, J.; GOUT, E.; FENDER, P.; BAILLY, I. DUBLET, B.; CHROBOCZEK, J. Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. Structure and expression in insect cells and construction of a bioinsecticide. **Europ. J. Biochem.**, v. 271, n. 11, p. 2127-2136, 2004.

TEIXEIRA, J.P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. 2012. Dissertação (Pós-graduação em Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

TIAN, G. F.; AZMI, H.; TAKANO, T.; XU, Q.; PENG, W.; LIN, J.; OBERHEIM, N.; LOU, N.; WANG, X.; ZIELKE, G. R.; KANG, J.; NEDERGAARD, M. An astrocytic basis of epilepsy. **Nat. med.**, v. 11, n. 9, p. 973-981, 2005.

TIFFANY-CASTIGLIONI, E.; CASTIGLIONI, A. J. J. Astrocytes in epilepsy. In: Fedoroff S, Vernadarkis A, eds. *Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes*. New York: **Academic Press**, p. 401– 424, 1986.

TREIMAN, D.M. GABAergic Mechanisms in Epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, n. 3, p. 8–12, 2001.

TSETLIN, V.I.; HUCHO F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBS Letts.**, v. 557, p. 9 – 13, 2004.

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.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse.**, v. 3, n. 2, p. 154-171, 1989.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Curr. neuropharmacol.**, v. 7, p. 65-74, 2009.

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.

VERKHRATSKY, A.; STEINHÄUSER, C. Ion channels in glial cells. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 32, p. 380–412, 2000.

WANG, C. Z.; CHI, C. W. Conus peptides—a rich pharmaceutical treasure. **Acta Biochim Biophys**, v. 36, n. 11, p. 713-723, 2004.

WATKINS, J. C. L-Glutamate as a central neurotransmitter: looking back. **Biochem Soc Trans**, n. 28, v. 4, p. 297-309, 2000.

WEIERGRÄBER, M.; STEPHANI, U.; KÖHLING, R. Voltage-gated calcium channels in the etiopathogenesis and treatment of absence epilepsy. **Brain res. rev.**, v. 62, p. 245-271, 2010.

WETHERINGTON, J.; SERRANO, G.; DINGLELINE, R. Astrocytes in the epileptic brain. **Neuron**, v. 58, n. 2, p.168–178, 2008.

World Health Organization. **Neurological disorders: public health challenges**. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/index.html>. Acesso em 14/11/2013.

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.

YOKOTA, H.; TSUBOKAWA, H.; MIYAWAKI, T.; KONNO, K.; NAKAYAMA, H.; MASUZAWA, T.; KAWAI, N. Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1

neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. **Neurosci. Res.**, v. 41, p. 365-371, 2001.

ZHENG, M.; STORZ, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 1-6, 2000.

ZHU, K. Z.; LIU, Y. L.; GU, J. H.; QIN, Z. H. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of orally Administrated Denatured Naja Naja Atra Venom on Murine Rheumatoid Arthritis Models. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

ZHU, H.; CHEN, M.F.; YU, W.J.; WANG, W.J.; LI, F.; LIU, W.C.; WO, Y.; XIA, R. DING, W.L. Time-dependent changes in BDNF expression of pentylentetrazole-induced hippocampal astrocytes in vitro. **Brain research**, v. 1439, p. 1-6, 2012.

APÊNDICES

Neurochemistry International 63 (2013) 141–145



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurochemistry International

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

The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models [☆]



Kamila Soares Lopes ^a, Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios ^b, Camila Nayane de Carvalho Lima ^b, Maria Isabel Linhares ^b, Alba Fabíola Costa Torres ^a, Alexandre Havt ^b, Yves Patric Quinet ^c, Marta Maria de França Fonteles ^{a,b}, Alice Maria Costa Martins ^{a,b,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

^c Laboratory of Entomology, State University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2013

Received in revised form 29 May 2013

Accepted 1 June 2013

Available online 7 June 2013

Keywords:

Dinoponera quadriceps venom

Ant

Seizure

ABSTRACT

Arthropod venoms are potential sources of neuroactive substances, providing new tools for the design of drugs. The aim of this study was to evaluate the effects of *Dinoponera quadriceps* venom (DqV) on seizure models in mice induced by pentylenetetrazole (PTZ), pilocarpine, and strychnine. In the PTZ model, intraperitoneal treatment with DqV (0.5 mg/kg) increased the time until the first seizure and the percentage of survival (155.4 ± 27.7 s/12.5%, $p < 0.05$) compared to the control group (79.75 ± 3.97 s/0%), whereas endovenous treatment (0.1 and 0.5 mg/kg) decreased the time until the first seizure (0.1 mg/kg: 77.83 ± 5.3 s versus 101.0 ± 3.3 s in the control group; 0.5 mg/kg: 74.43 ± 3.9 s versus 101.0 ± 3.3 s for the control group, $p < 0.05$). We did not observe significant changes in the pilocarpine- and strychnine-induced seizure models. In assays that measured oxidative parameters in the PTZ model, intraperitoneal treatment with DqV (0.5 and 2.0 mg/kg) only decreased the levels of MDA and nitrite in the cortex. However, endovenous treatment with DqV (0.1 and 0.5 mg/kg) increased the levels of MDA in the cortex and hippocampus and at a dose of 0.5 mg/kg in the striatum. Moreover, increased in nitrite content was observed in all three of the brain regions analyzed. Taken together, the *D. quadriceps* venom caused both neuroprotective and neurotoxic effects in a PTZ-induced seizure model, and this effect was dependent on the route of administration used.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy affects approximately 50 million people worldwide (Kramer and Cash, 2012) and is defined as a chronic disorder of the brain that is characterized by spontaneous and recurrent seizure activity, which is triggered by the abnormal discharge of neurons (Löscher, 1998; Tunnickliff, 1996). Treatment of this neurological disorder deserves special attention. Although anticonvulsant drugs have proven their efficacy, their use has demonstrated considerable side-effects. Furthermore, patients suffer from intractable conditions related to the type of crisis, drug resistance or other

factors. Thus, there is a need for the development of new alternative therapeutic tools.

Animal venoms are sources of bioactive substances with biotechnological potential (Escoubas and King, 2009; Magalhães et al., 2007; Sanchez and Swenson, 2007). Their active molecules have structures with broad chemical diversity, biochemical specificity, and other molecular properties, that make them favorable as substances that lead to discovery of new drugs (Altmann, 2001; Clardy and Walsh, 2004). Brazil exhibits great biological diversity due to its varied climatic and geographical features, presenting a broad field for the study of products derived from its fauna and flora.

Previously, a variety of toxins derived from arthropods were isolated and purified and have been shown to be a source of neuroactive substances (Beleboni et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Pizzo et al., 2000). The venom of the species of the Hymenoptera order (wasp, bees and ants) consists of a complex mixture of proteins, peptides and other compounds (Santos et al., 2011) that act on ion channels and receptors or that function via neurotransmitter release (Carneiro et al., 2003; Pizzo et al., 2004;

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Address: Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceara, Rua Cap. Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, CEP: 60430-170, Fortaleza, Ceara, Brazil. Tel.: +55 85 3366 8269; fax: +55 85 3366 8262.

E-mail address: martinsalice@gmail.com (A.M.C. Martins).

Yokota et al., 2001). These properties provide new tools for the therapeutic design of novel drugs.

The *Dinoponera quadricaps* ant (Hymenoptera, Formicidae) is distributed in northeastern Brazil. Paiva and Brandão, 1995. Until the present moment, the biological effects of *D. quadricaps* venom (DqV) are poorly known and exist only one study demonstrating their antinociceptive property (Souza et al., 2012). In respect to studies on the central nervous system, the wasps are the best studied species of Hymenoptera order. Cunha et al. (2005) observed that the denatured venom of the wasp *Polybia ignobilis* exhibits anticonvulsant activity in some animal models and contains components that are capable of interacting with GABA and glutamate receptors in synaptosomes in the rat cortex. Furthermore, other venom of Hymenoptera order, extracted from the social wasp *Polybia occidentalis* also deserves particular attention due to its activity in experimental seizure models. It has been shown to block seizures that have been chemically induced by bicuculline, picrotoxin and kainic acid (Mortari et al., 2007).

The aim of this present study was to evaluate the effect of DqV on chemically induced seizure models.

2. Materials and methods

2.1. *Dinoponera quadricaps* venom

Ant colonies were collected (IBAMA authorization No. 28794-1) in "Serra de Maranguape" in Ceara State in Northeastern Brazil. The ants were maintained at the Laboratory of Entomology at the State University of Ceara. The venom was extracted using a capillary tube and was lyophilized and maintained at -20°C until further use (Souza et al., 2012).

2.2. Animals

Male Swiss mice (28–33 g) were maintained at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ under a 12/12 h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. These animals were used in the chemically induced seizure models. This study was submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Ceara (No. 43/2011).

2.3. Drugs

All of the drugs were purchased from Sigma Chemical Co., USA. The lyophilized DqV was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and prepared for administration immediately prior to each experimental assay.

2.4. Models of chemically induced seizures and behavioral assessment

Male Swiss mice were pretreated with DqV (0.5 or 2.0 mg/kg; $n = 6-8$, i.p.) or (0.1 or 0.5 mg/kg, $n = 6-8$, e.v.). Thirty or ten minutes after the i.p. or e.v. administration, respectively, the seizures were induced in the animals using pentylenetetrazole (PTZ) (80 mg/kg, i.p.), pilocarpine (PILO) (400 mg/kg, i.p.) or strychnine (STRC) (3.0 mg/kg, i.p.) (Aprison et al., 1987; Turski et al., 1983; Yilmaz et al., 2007). The animals were placed in individual cages and were observed for 30 or 60 min to assess the following behavioural parameters (in seconds): latency to first seizure (elapsed time before the first seizure), latency to death (elapsed time until the death) and survival (number of dead animals). The seizure event was characterized primarily by hindlimb extension and/or uncoordinated jump (Turski et al., 1983; Aguiar et al., 2012). In

the control group for each seizure model, the animals were pretreated with vehicle only (PBS).

2.5. Measurement of oxidative stress parameters

The oxidative stress parameters were evaluated in the PTZ-induced animal models because was only which showed significant results on the behavioral assessment tests. Three brain areas (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) were dissected after behavioral assessment and were homogenized at 10% in sodium phosphate buffer to determine the degree of lipid peroxidation.

2.5.1. Determination of lipid peroxidation levels

Lipid peroxide formation was analyzed by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), such as the levels of malondialdehyde (MDA). As previously described by Huong et al. (1998), the homogenates were mixed with 35% perchloric acid and centrifuged. After, 1.2% thiobarbituric acid was added to the supernatants, and the samples were then heated in a boiling water bath at 95°C for 30 min. Finally, the MDA levels were determined spectrophotometrically at an absorbance of 535 nm. In addition, these same brain areas were dissected in animals that were treated with vehicle only (PBS), in the absence of a seizure drug inducer (basal level group). Previously, a standard MDA curve was generated using concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195 and 0.097 $\mu\text{g/mL}$.

2.5.2. Determination of the nitrite content

The concentration of nitrite was measured as previously described by Green et al. (1981). Griess reagent was added to a 96-well plate together with the supernatants of homogenates. Its absorbance was measured using a microplate reader at 560 nm. In addition, the same brain areas in the animals treated with vehicle only (PBS) were dissected in the absence of a seizure drug inducer (basal level group). Previously, a standard curve of nitrite was generated using concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.56 nmol/mL.

2.6. Statistical analysis

The data were expressed as the mean \pm SEM. For the statistical analysis of the first seizure latency and the mean time of death, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by a Student Newman-Keuls post hoc test. Probability (P) values less than 0.05 were considered significant. A statistical evaluation of the survival curve using the Logrank (Mantel-Cox) test was separately performed with comparisons of the drugs curves vs. control curves.

3. Results

3.1. Effects of the *Dinoponera quadricaps* venom on chemically induced seizures and behavioral assessment

In the behavioral analysis, pretreatment with DqV (0.5 mg/kg; i.p.) in a PTZ-induced seizure model significantly increased the time until the first seizure and the survival percentage (Table 1). No significant alterations in the pilocarpine- and strychnine-induced models were observed (Table 1).

When the mice were pretreated with DqV (0.1 and 0.5 mg/kg; e.v.) in the PTZ-induced seizure model, there was a significant reduction in the time until the first seizure (Table 2). No significant changes in the survival percentage and time until death in the PTZ-induced, pilocarpine-induced and strychnine-induced seizure models were observed (Table 2).

Table 1

The effects of the *Dinoponera quadriceps* venom (DqV; intraperitoneally route) on the latency time until the first seizure (LTFS – in seconds), latency to death (LD – in seconds) and survival percentage (S) in seizure models induced by pentylentetrazole, pilocarpine and strychnine.

Treatments groups	Pentylentetrazole			Pilocarpine			Strychnine		
	LTFS	LD	S (%)	LTFS	LD	S (%)	LTFS	LD	S (%)
Vehicle	79.75 ± 3.97	307.4 ± 36.52	0	478.4 ± 29.61	603.1 ± 28.73	0	163.7 ± 11.09	197.1 ± 28.2	0
DqV 0.5 mg/kg	155.4 ± 27.7 [*]	444.3 ± 82.47	12.5 [#]	464.4 ± 24.39	539.4 ± 32.24	0	156.3 ± 26.86	219.6 ± 43.21	0
DqV 2.0 mg/kg	107.2 ± 11.35	446.7 ± 139.5	0	444.6 ± 51.05	487.4 ± 56.96	0	174.8 ± 29.9	344.9 ± 56.13	0

The values are expressed as the mean ± SEM in 6–8 mice.

^{*} $p < 0.05$ compared to the vehicle control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keul's test).

[#] $p < 0.05$ compared to the survival curve of the vehicle control group (Logrank (Mantel–Cox) test).

Table 2

The effects of the *Dinoponera quadriceps* venom (DqV; intravenously route) on the latency time until the first seizure (LTFS – in seconds), latency of death (LD – in seconds) and survival percentage (S) in seizure models induced by pentylentetrazole, pilocarpine and strychnine.

Treatments groups	Pentylentetrazole			Pilocarpine			Strychnine		
	LTFS	LD	S (%)	LTFS	LD	S (%)	LTFS	LD	S (%)
Vehicle	101.0 ± 3.31	306.9 ± 43.77	0	422.8 ± 56.86	498.3 ± 73.67	0	129.1 ± 6.48	150.6 ± 5.84	0
DqV 0.1 mg/kg	77.83 ± 5.27 [*]	237.3 ± 36.82	0	410.0 ± 22.44	432.4 ± 22.22	0	121.1 ± 12.44	170.4 ± 18.05	0
DqV 0.5 mg/kg	74.43 ± 3.94 [*]	267.1 ± 39.11	0	401.8 ± 19.27	424.9 ± 19.39	0	114.9 ± 6.69	169.5 ± 23.77	0

The values are expressed as the mean ± SEM in 6–8 mice.

^{*} $p < 0.05$ compared to the vehicle control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keul's test).

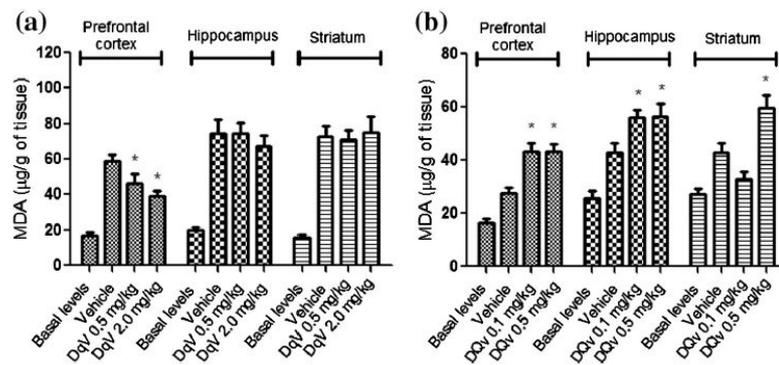


Fig. 1. Effects of the *Dinoponera quadriceps* venom (DqV; intraperitoneal (a) or endovenous (b) route) on the degree of lipid peroxidation by measurement of the MDA levels in the pentylentetrazole-induced seizure model. These results are expressed as the means ± SEM. ^{*} $p < 0.05$ compared to the vehicle group.

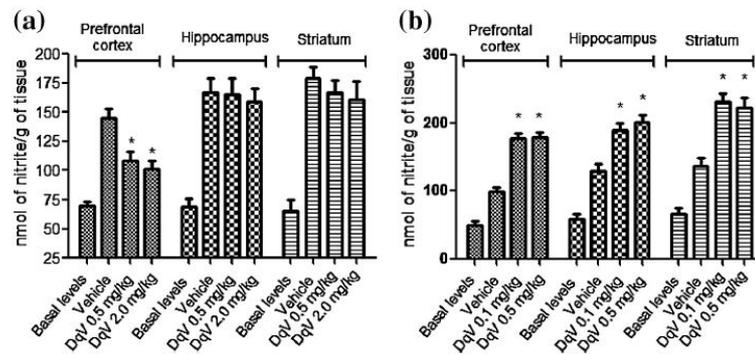


Fig. 2. Effects of the *Dinoponera quadriceps* venom (DqV; intraperitoneal (a) or endovenous (b) route) in the formation of radicals derived from nitrogen by the measurement of the nitrite content in the pentylentetrazole-induced seizure model. These results are expressed as the means ± SEM. ^{*} $p < 0.05$ compared to the vehicle group.

3.2. Effects on the measurement of oxidative stress parameters

Measurement of oxidative stress parameters was performed only in model PTZ induced seizure assay after to observe changes in behavior assessment.

Pretreatment with DqV (0.5 and 2.0 mg/kg; i.p.) decreased the levels of MDA and nitrite content only in the prefrontal cortex of the mice (Figs. 1a and 2a, respectively).

Furthermore, endovenous pretreatment with DqV (0.1 and 0.5 mg/kg) caused an increase in the levels of MDA in the prefrontal cortex and hippocampus, and DqV at a dose of 0.5 mg/kg increased the levels of MDA in the striatum area (Fig. 1b). Moreover, it was observed an increase in the nitrite content in the prefrontal cortex, hippocampal and striatal areas (Fig. 2b).

4. Discussion

Several experimental animal models have been used in pharmacological screenings to identify anticonvulsant drugs. It was used in this study PTZ, pilocarpine and strychnine-induced seizure models. PTZ is a non-competitive antagonist of GABA_A receptors, which act closing Cl⁻ channels, thereby reducing the inhibitory neurotransmission mediated by GABA (Qu et al., 2005; Silva et al., 1998). The blockade of the onset of seizures induced by pilocarpine may be achieved by anti-cholinergic drugs, suggesting that activation of the muscarinic cholinergic receptor contributes to the initiation of seizures (Freitas and Tomé, 2010). Strychnine acts as a competitive antagonist of glycine, which reduces the inhibitory effects on the central nervous system (Kaputlu and Uzbay, 1997).

In our assessment of the effects of DqV in chemically induced seizure models, we observed significant alterations in both behavioral assessment assays and in the measurement of oxidative stress parameters in a PTZ-induced seizure model, suggesting that the effects observed with DqV are probably unrelated to the cholinergic or glycinergic pathways and may interfere with the PTZ binding site, thereby affecting the modulation of chloride channels in GABA_A receptors. About this fact, has been reported that ant venom of the same genera, *Dinoponera australis* contains modifiers of ion channels (Hoffman, 2010; Johnson et al., 2010).

Interestingly, opposing effects of DqV activity were observed when animals received the drug via i.p. administration versus e.v. administration. We found that i.p. pretreatment with DqV resulted in neuroprotective effects because the administration of venom increased the time until the first seizure and reduced the oxidative stress parameters (the degree of lipid peroxidation and the nitrite content). Conversely, e.v. pretreatment caused neurotoxic effects, as demonstrated by the reduction in the time until the first seizure and an increase in the oxidative parameters analyzed. Thus, the venom probably acts by route-dependent modulating the GABA_A receptor.

On the basis of these data, we suggested that DqV may contain both neuroprotective and neurotoxic components which act in favor of inhibitory neurotransmission as well as in the reduction of this type of neurotransmission. Studies show that the venom of other species of order Hymenoptera, the social wasp *Agelais vicina*, contains two peptides, AvTx 7 and AvTx 8, which act on both excitatory and inhibitory neurotransmission (Oliveira et al., 2005; Pizzo et al., 2004).

These opposing effects also may be related to the presence of high molecular weight components in the venom. These molecules probably were presents in the blood circulation of the animal when DqV was injected e.v., but absent when this venom was administered via i.p. It was observed in other work that presence of high molecular weight components may be related with deleterious effects in CNS, as showed by Cunha et al. (2005) that the denatured

venom of the *P. ignobilis* wasp produced anticonvulsant effects compared with the toxic effects in the total venom. With this, we can suggest that the neurotoxicity of DqV might be related to some macromolecular components.

Enzymatic activation or inactivation may also be considered as other hypothesis explaining to the opposing effects of DqV caused by these two administration routes. When DqV was injected e.v., enzymatic inactivation of a neuroprotective component may have occurred. Alternatively, in the absence of the inactivation of these components, the neurotoxic components may be primed and present at sufficient concentrations to exert harmful effects. However, this did not occur when the DqV was administered by intraperitoneal route.

Other important event involved in convulsive processes is the occurrence of oxidative stress (Ashrafi et al., 2007; Migliore et al., 2005; Perry et al., 2002). Lipid peroxidation has been reported to contribute to the deficient function of the lipid membrane during epileptogenesis, and the determination of MDA levels can be used as a marker of this event. Metabolites of nitric oxide (NO) have been implicated in the development of oxygen toxicity in the CNS. Increase in the extracellular concentration of NO is closely related to an increase in the cerebral blood flow, which precedes the appearance of electrical discharges (Demchenko et al., 2001; Sato et al., 2001), moreover NO can react with superoxide radicals forming peroxynitrite, which is a potent inducer of cell death.

The antioxidant agents may be a useful tool for attenuating the oxidative damage involved in seizure events. The measurement of the oxidative stress parameters suggest that the DqV may contain molecules that can positively or negatively interfere with the cellular oxidant/antioxidant mechanisms involved in a PTZ-induced seizure.

Interestingly, while neuroprotective effects were only observed in the prefrontal cortex in mice, neurotoxic effects occurred in three of the analyzed brain areas. Thus, a possible component with antioxidants properties may have an affinity for a specific brain structure, which is only present in the prefrontal cortex.

In conclusion, DqV caused both neuroprotective and neurotoxic effects in a PTZ-induced seizures model, and these effects were dependent on the route of drug administration. These findings contribute to the expansion of knowledge of the biological effects of the *D. quadriceps* ant venom. The results presented in this study are the first demonstration of the effect of DqV in seizures animal models.

Acknowledgments

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- Aguiar, C.C.T., Almeida, A.B., Araújo, P.V.P., Vasconcelos, G.S., Chaves, E.M.C., do Vale, O.C., Macêdo, D.S., de Sousa, F.C.F., Viana, G.S.B., Vasconcelos, S.M.M., 2012. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. *Epilepsy Behav.* 24, 324–328.
- Altmann, K.H., 2001. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 424–431.
- Aprison, M.H., Lipkowitz, K.B., Simon, J.R., 1987. Identification of a glycine-like fragment on the strychnine molecule. *J. Neurosci. Res.* 17 (3), 209–213.
- Ashrafi, M.R., Shams, S., Nouri, M., Mohseni, M., Shabaniyan, R., Yekaninejad, M.S., Chegini, N., Khodadad, A., Safaralizadeh, R., 2007. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia* 48, 1750–1755.
- Beleboni, R.O., Pizzo, A.B., Fontana, A.C.K., Carolino, R.O.G., Coutinho-Netto, J., Santos, W.F., 2004. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur. J. Pharmacol.* 493, 1–17.

- Carneiro, A.M.D., Kushmerick, C., Koenen, J., Arndt, M.H.L., Cordeiro, M.N., Chavez-Olortegui, C., Diniz, C.R., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Prado, V.F., 2003. Expression of a functional recombinant Phoneytria nigriventer toxin active on K⁺ channels. *Toxicol.* 41, 305–313.
- Clardy, J., Walsh, C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829–837.
- Cunha, A.O., Mortari, M.R., Oliveira, L., Carolino, R.O., Coutinho-Netto, J., Dos Santos, W.F., 2005. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141(c), 50–57.
- Demchenko, I.T., Boso, A.E., Whorton, A.R., Piantadosi, C.A., 2001. Nitric oxide production is enhanced in rat brain before oxygen-induced convulsions. *Brain Res.* 917, 253–261.
- Escoubas, P., King, G.F., 2009. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev. Proteomics* 6 (3), 221–224.
- Freitas, R.M., Tomé, A.R., 2010. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. *Rev. Psiq. Clín.* 37, 105–108.
- Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56–58.
- Hoffman, D.R., 2010. Ant venoms. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 10, 342–346.
- Huong, N.T., Matsumoto, K., Kasa, R., Yamasaki, K., Watanebe, H., 1998. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its components. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 978–981.
- Johnson, S.R., Copello, J.A., Evans, M.S., Suarez, A.V., 2010. A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. *Toxicol.* 55, 702–710.
- Kaputlu, I., Uzbay, T., 1997. L-NAME inhibits pentylentetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res.* 753, 98–101.
- Kramer, M.A., Cash, S.S., 2012. Epilepsy as a disorder of cortical Network Organization. *Neuroscientist* 18 (4), 360–372.
- Löscher, W., 1998. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *Eur. J. Pharmacol.* 342, 1–13.
- Magalhães, A., Magalhães, H.P., Richardson, M., Gontijo, S., Ferreira, R.N., Almeida, A.P., Sanchez, E.F., 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146 (4), 565–575.
- Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppedè, F., Siciliano, G., Murri, L., 2005. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 26, 587–595.
- Mortari, M.R., Cunha, A.O., de Oliveira, L., Vieira, E.B., Gelfuso, E.A., Coutinho-Netto, J., Ferreira dos Santos, W., 2007. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 289–295.
- Oliveira, L., Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Pizzo, A.B., Miranda, A., Coimbra, N.C., Dos Santos, W.F., 2005. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigroreticular pathways. *Brain Res.* 103, 74–81.
- Paiva, R.V.S., Brandão, C.R.F., 1995. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 7, 297–312.
- Perry, G., Nunomura, A., Hirai, K., Zhu, X., Perez, M., Avila, J., Castellani, R.J., Atwood, C.S., Aliev, G., Sayre, L.M., Takeda, A., Smith, M.A., 2002. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative disease? *Free Radical Biol. Med.* 33, 1475–1479.
- Pizzo, A.B., Belebani, R.O., Fontana, A.C.K., Ribeiro, A.M., Miranda, A., Coutinho-Netto, J., dos Santos, W.F., 2004. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 61–68.
- Pizzo, A.B., Fontana, A.C.K., Coutinho-Netto, J., Santos, W.F., 2000. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gaminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 88–94.
- Qu, H., Eloqayli, H., Sonnewald, U., 2005. Pentylentetrazole affects metabolism of astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 79, 48–54.
- Sanchez, E.F., Swenson, S., 2007. Proteases from south american snake venoms affecting fibrinolysis. *Curr. Pharm. Anal.* 3 (2), 147–157.
- Santos, L.D., Pieroni, M., Menegasso, A.R.S., Pinto, J.R.A.S., Palma, M.S., 2011. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 17 (4), 364–377.
- Sato, T., Takeda, Y., Hagioka, S., Zhang, S., Hirakawa, M., 2001. Changes in nitric oxide production and cerebral blood flow before development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. *Brain Res.* 918, 131–140.
- Silva, L.F., Pereira, P., Elisabetsky, E., 1998. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen. Pharmac.* 31, 47–50.
- Souza, P.L., Quinet, Y., Ponte, E.L., Vale, J.F., Torres, A.F.C., Pereira, M.G., Assreuy, A.M.S., 2012. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadricaps*. *J. Ethnopharmacol.* 144 (1), 213–216.
- Tunncliffe, G., 1996. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen. Pharmacol.* 27 (7), 1091–1097.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwartz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9, 315–335.
- Yilmaz, I., Sezer, Z., Kayir, H., Uzbay, T.I., 2007. Mirtazapine does not affect pentylentetrazole- and maximal electroconvulsive shock-induced seizures in mice. *Epilepsy Behav.* 11 (1), 1–5.
- Yokota, H., Tsubokawa, H., Miyawaki, T., Konno, K., Nakayama, H., Masuzawa, T., Kawai, N., 2001. Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. *Neurosci. Res.* 41, 365–371.



ACTION OF DINOPONERA QUADRICEPS DENATURED VENOM IN A SEIZURE MODEL AND ON THE VIABILITY OF ASTROCYTES IN VITRO

LOPES, K.S. (1); RIOS, E.R.V. (2); LIMA, C.N.C. (2); MELLO, C.P. (1); TORRES, A.F.C. (1); ERUSTES, A.G. (3); QUINET, Y.P. (4); SMAILI, S.S. (3); FONTELES, M.M.F. (1,2); MARTINS, A.M.C. (1,2)

(1). Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil; (2). Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil; (3). Laboratory of Calcium Signaling and Cell Death, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil; (4). Laboratory of Entomology, State University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil.

kamila_farm@yahoo.com.br

Keywords: *Dinoponera quadriceps* denatured venom, seizure model, PTZ, astrocyte culture, MTT.

In our work we investigated the effect of giant ant *Dinoponera quadriceps* denatured venom (DqDV) in an *in vivo* seizure model induced by Pentylentetrazole (PTZ) and in an *in vitro* test of viability on cell culture of astrocytes. In *in vivo* assay, male Swiss mice (28-33g) were pretreated with DqDV (0.5 or 2 mg/kg, ip, n=8) and after 30 minutes the seizures were induced with PTZ (80 mg/kg, ip, n=8). The parameters studied, in seconds, were the latency to first seizure, latency of death and survival percentage within the first 30 minutes. In this model the control group of each model was treated only with the inductor agent. In the *in vitro* test, astrocytes were maintained in culture on DMEM medium and incubated at 37 °C in an atmosphere of 95% humidity and 5% CO₂. To analyze the cell viability the method of MTT were used. The cells were placed in a 96-well plate and cultured with different concentration of DqDV (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 and 3,12 µg/mL) for 24h. The viability was quantified in a micro plate reader at 570nm. For the statistical analysis of *in vivo* assay, ANOVA followed by Student Newman-Keuls post hoc test was performed. A statistical evaluation of the survival curve using the Logrank (Mantel-Cox) test was separately performed with comparisons of the drugs curves vs. control curves. For statistical analyze of *in vitro* study, ANOVA was performed followed by Bonferroni post hoc test. Probability (P) values less than 0.05 were considered significant. *In vivo* test demonstrated that ip pretreatment with DqDV was able to cause increase in the survival percentage in both doses tested (0.5 mg/kg: 37.5% / 2 mg/kg: 62,5%). The *in vitro* treatment with DqDV did not alter cell viability of astrocytes in any of the doses studied. In conclusion, we observed that DqDV was able to cause improvement in survival of animals and not alter the viability of astrocytes *in vitro*. Financial support: We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.