



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL – PPGBIOANI

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO PEPTÍDEO NEUROVAL,
DESENVOLVIDO A PARTIR DO MASTOPARANO AGELAIA-MP.

JACQUELINE COIMBRA GONÇALVES MOSER

JACQUELINE COIMBRA GONÇALVES MOSER

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO PEPTÍDEO NEUROVAL,
DESENVOLVIDO A PARTIR DO MASTOPARANO AGELAIÁ-MP.

ORIENTADORA: PROF^a DRA. MÁRCIA RENATA MORTARI.

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS – GRADUAÇÃO DE BIOLOGIA
ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTORA EM BIOLOGIA ANIMAL (ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS)

BRASÍLIA, 2017

À Deus e Nossa Senhora

À minha Família (Mãe, Pai, Leo, Fabiano e Zulu – *in memoriam*).

Ave Maria, Cheia de Graça,

O Senhor é convosco

Bendita sois vós entre as mulheres

Bendito é o fruto do vosso ventre Jesus.

Santa Maria, Mãe de Deus,

Rogai por nós pecadores

Agora e na hora de nossa morte

Amém.



Agradecimentos

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por sempre abençoarem o meu caminho e o da minha família. Obrigada!

Agradeço à minha Família. Meu Pai, Lauro, que mesmo um pouquinho mais longe continua sendo meu gerente de projetos. Minha Mãe, Vera, que sempre lutou com todas as forças para nossa educação e nossa felicidade. Meu irmão, Leo, que foi pra bem longe seguir seu caminho e mesmo assim torce muito por mim. Eu amo muito vocês.

Agradeço ao meu marido, Fabiano, ele passou por grande parte da minha formação em meus agradecimentos e continua sendo o melhor amigo, namorado e agora marido que Deus me deu. Eu te amo, obrigada por nunca me deixar desistir.

À minha querida orientadora Márcia, nesses quase oito anos de convivência eu aprendi muito e muito com você. Muitas coisas você me ensinou, algumas infelizmente não conseguiu mudar (minha relação com prazos rsrsrs), mas tenha certeza de que me tornou uma pessoa melhor. Seguindo o seu caminho me tornei professora e espero um dia ser tão grande quanto você. Obrigada.

Ao querido professor Carlos Schwartz (*in memoriam*), sua lambisgória conseguiu. Obrigada por me ensinar muito nesse pouco tempo que passamos juntos!

Aos meus queridos amigos Gordos e agora estão ficando fitness rsrsrsrs. Obrigada por me proporcionarem os momentos mais divertidos. Estamos crescendo, mas sem perder o humor e a juventude.

Aos meus amigos de laboratório que me deram forças em todas as etapas que foram sofridas desse projeto. Que me apoiaram e me entenderam quando eu precisei, rimos e choramos muito. Obrigada: Deia, Kami, Pri, Luana, Gabriel, Vic, Flávia, Lilian, Leandro, Sol, Alessa, Harry, Clau, absolutamente todos,

Obrigada aos meus queridos estagiários, ou como eu os chamo, Salvadores da Jacq. Obrigada por dedicarem seu tempo para aprenderem um pouquinho comigo e me ajudarem muitíssimo nesse trabalho. Sim ele também é de vocês: Luana, Diogo (com você eu aprendi muito), Danilo, Adriana, Rayane e Henrique.

Obrigada aos técnicos do laboratório que me ajudaram muito no projeto, Danilo e Adolfo, sem eles os cortes histológicos e as espectrometrias de massa seriam impossíveis.

Agradeço muito a Marisa, professora que se tornou amiga e me ensinou um pouquinho sobre eletrofisiologia com paixão.

Agradeço a todos os professores do laboratório, pelas conversas, palavras ensinamentos e churrascos. Obrigada Sebben, Beth e Osmino.

Finalmente, agradeço aos animais da pesquisa (camundongos e rãs). E agradeço aos meus bichinhos por me darem um amor que o homem não é capaz de entender. Obrigada: Zulu (*in memoriam*), Mingau e Snow.

Ao DPP-UnB, à CAPES, ao CnPq e à FAPDF pelo apoio financeiro

Ao PPGBioAni, pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 DOR E NOCICEPÇÃO	17
1.1.1 CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES	19
1.1.2 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G	22
1.1.3 RECEPTORES OPIÓIDES	23
1.1.4 NOVOS FÁRMACOS ANALGÉSICOS	24
1.2 HISTÓRICO DOS MASTOPARANOS	26
1.2.1 ESTRUTURA GERAL DOS MASTOPARANOS	28
1.2.2 PRINCIPAIS ATIVIDADES DOS MASTOPARANOS	32
1.2.3 APLICAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS MASTOPARANOS	34
2. OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. PEPTÍDEOS	43
3.1.1. DESENHO RACIONAL E SÍNTESE	43
3.1.2. CONFIRMAÇÃO DA PUREZA E SEQUÊNCIA	43
3.1.3. ALINHAMENTO	45
3.2. BIOENSAIOS	45
3.2.1. COMPOSTOS E SOLUÇÕES	45
3.2.2. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	46
3.2.2.1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS	46
3.2.2.2. ADMINISTRAÇÃO DO PEPTÍDEO NOS ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	49
3.2.2.3. EFEITOS ADVERSOS	50
3.2.2.4. TESTES ANTINOCICEPTIVOS	52
3.2.2.6. ANÁLISE DA CÂNULA GUIA	56
3.2.2.7. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS	57

3.2.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	60
3.2.3.1. ATIVIDADE HEMOLÍTICA	60
3.2.3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO NEUROVAL EM ENSAIOS ELETROFISIOLÓGICOS 61	
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5. CONCLUSÕES.....	102
6. REFERÊNCIAS.....	105

Lista de Figuras

- FIGURA 1:** A) ESQUEMA ESTRUTURAL BIDIMENSIONAL DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES (MODIFICADO DE CATTERALL ET AL, 2005) B) ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTE EM TRÊS ESTADOS: FECHADO, ABERTO E INATIVADO. PEQUENAS VARIAÇÕES DE VOLTAGEM NA MEMBRANA FAZEM COM QUE O SENSOR DE VOLTAGEM (VERDE) SE MOVIMENTE E ABRA O CANAL, PERMITINDO A PASSAGEM DE SÓDIO. COMO A MUDANÇA DE CONFORMAÇÃO DO CANAL PARA QUE ELE VOLTE AO ESTADO FECHADO É LENTA, EXISTE UM MODO DE RÁPIDA INATIVAÇÃO, ONDE UMA DAS ALÇAS BLOQUEIA O PORO FORMADO IMPEDINDO A PASSAGEM DE ÍONS (MODIFICADO DE EIJKELKAMP ET AL, 2012)..... 21
- FIGURA 2:** ÁRVORE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA POLISTINAE. AS MARCAÇÕES EM AZUL INDICAM OS GÊNEROS ONDE FORAM DESCRITOS O MASTOPARANO ÁGELAIA - MP, ENQUANTO AS MARCAÇÕES EM VERMELHO OS GÊNEROS ONDE FORAM DESCRITOS O MASTOPARANO POLYBIA-MPII (WENZEL E CARPENTER, 1994). 28
- FIGURA 3:** ESPECTRÔMETRO DE MASSA AUTOFLEX SPEED (BRUKER DALTONICS®) DO LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA DA UNB..... 44
- FIGURA 4:** QUADRO DEMONSTRATIVO DA DIVISÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS EM CADA BIOENSAIO..... 48
- FIGURA 5:** REPRESENTAÇÃO FIGURADA DO ETOGRAMA DE COMPORTAMENTOS DE NOCICEPÇÃO APRESENTADOS PELO ANIMAL NO TESTE DA PLACA QUENTE (MODIFICADO DE CASARRUBEA ET AL., 2011; GONÇALVES, 2013)..... 52
- FIGURA 6:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA EM CORTE CORONAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO COM CÂNULA GUIA INSERIDA CORRETAMENTE NO VENTRÍCULO LATERAL DIREITO. 1 VENTRÍCULOS LATERAIS. 2 TERCEIRO VENTRÍCULO (ADAPTADO DE PAXINOS; FRANKLING, 2012). 57
- FIGURA 7:** DESENHO ESQUEMÁTICO DA CUBA DE ACRÍLICO PARA O EXPERIMENTO DE SUCROSE GAP. O NERVO CIÁTICO ISOLADO DA RÃ *L. CATESBEIANUS* FOI COLOCADO NA CANALETA QUE PERCORRE AS CINCO CÂMARAS, ISOLADAS MECÂNICA E ELETRICAMENTE POR SELOS DE VASELINA. ELETRODOS DE ESTIMULAÇÃO POSICIONADOS NAS CÂMARAS 1 E 2 GERAM UM IMPULSO NERVOSO QUE SÃO CAPTADOS NAS CÂMARAS 3 E 5. AS CÂMARAS 1, 2, 3 E 5 SÃO PREENCHIDAS POR SOLUÇÃO RINGER E APENAS A CÂMARA 4 POR SOLUÇÃO DE SACAROSE 216 mM. A AMOSTRA A SER TESTADA É COLOCADA NA CÂMARA 3 QUE POSSUI UM SISTEMA DE PERFUSÃO PARA A LAVAGEM, ASSIM COMO A CÂMARA 4 (REMOVIDO DE FERNANDES, 2010). 62

FIGURA 8: SET-UP COMPLETO DE PATCH CLAMP DO LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA DA UNB (FOTO: ANA CAROLINA ORLANDI)..... 64

FIGURA 9: PROTOCOLO DE ESTÍMULO PARA CÉLULAS CHO EXPRESSANDO O CANAL $Na_v 1.7$ 65

Lista de Tabelas

TABELA 1: PRINCIPAIS MASTOPARANOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	30
---	-----------

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Analysis of Variance

AP – Antero Posterior

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

BoTx-A – Toxina botolínica tipo A

CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DDV-Mas7 – *Drug Delivery Vehicle – Mastoparan 7*

DE₅₀ – Dose Efetiva 50

DMSO – Dimetilsulfóxido

DT₅₀ – Dose Tóxica 50

DV – Dorso Ventral

i.c.v. - intracerebroventricular

IA – Índice de antinocicepção

IASP – *International Association for study of pain*

IT – Índice Terapêutico

LC – *Locus Coeruleus*

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*

ML – Médio Lateral

MP – Mastoparano

MS – Mass Spectrometry

Na_v – Canal de sódio voltagem dependente

NMR – Núcleo Magno da Rafe

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PBS-Tx - *Phosphate Buffer Solution – Triton X 100*

PMTX - Pompilidotoxina

PPC – Peptídeo penetrante de célula

PT – permeabilidade transitória

RAPG – Receptores acoplados a proteína G

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TOF – *Time of flight*

TTX - Tetrodotoxina

VLD – Ventrículo Lateral Direito

Resumo

Um dos grandes desafios da saúde pública atual é o tratamento de dores crônicas e/ou recorrentes, visto que em cerca de 50-70% dos casos, analgésicos sistêmicos e terapias conservadoras não são eficazes para o alívio da dor e podem causar graves efeitos adversos. Uma classe de peptídeos presente na peçonha de vespas tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, pois demonstra grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, antitumorais e analgésicos. Esses peptídeos multifuncionais são chamados mastoparanos e, apesar de suas excelentes atividades *in vitro* e *in situ*, a administração sistêmica dessa classe de peptídeos tem induzido efeitos adversos, como citotoxicidade e neurotoxicidade. O propósito desta tese foi desenvolver uma nova molécula com propriedades antinociceptivas (NeuroVAL) a partir do mastoparano Agelaia – MP, com baixos efeitos adversos, além disso, estudar o mecanismo de ação do novo peptídeo. Quando administrado por via i.c.v., uma potente atividade antinociceptiva do NeuroVAL em camundongos Swiss foi observada, em dois modelos de indução de dor térmica (placa quente e retirada de cauda). Sua ação antinociceptiva foi inibida na presença de cloridrato de naloxona (4 mg/kg) e de toxina pertussis (0.25 µg/animal), indicando que a ação pode ser causada pela interação com receptores opióides. Quando testado *in situ* em vias neurais periféricas, foi observado que o NeuroVAL (1 mM) é capaz de reduzir aproximadamente 80% do potencial de ação composto do nervo ciático de rã, sendo esse efeito reversível após a lavagem do meio. Outra ação interessante é a capacidade de bloquear correntes de canais de sódio voltagem dependentes do tipo 1.7, de forma parcialmente reversível quando testado em ensaios eletrofisiológicos no *patch clamp*. Comparando-se os peptídeos Agelaia – MP e NeuroVAL quanto aos efeitos adversos, houve uma redução nos seguintes parâmetros avaliados: hemólise e alterações de comportamentos espontâneos, demonstrando a importância da síntese bioinspirada para o desenvolvimento de fármacos promissores. Muito se avançou no conhecimento da atividade neurofarmacológica dos mastoparanos e do NeuroVAL, embora ainda se faça necessário estudos com a determinação estrutural e as interações moleculares entre os peptídeos e os receptores alvo,

dessa forma será possível conhecer mais sobre a dor, antinocicepção e seus mecanismos moleculares.

Palavras-chave: Dor, antinocicepção, opióides, *patch clamp*, efeitos adversos, vespas.

Abstract

Currently, one of the major challenges faced by public health involves the treatment of chronic and / or recurrent pain, considering that in around 50-70% of the cases, systemic analgesics and conservative therapies are not effective for pain relief and can cause serious adverse effects. On this aspect, a class of peptides found in the venom of wasps has drawn the attention of several researchers, considering its potential for the development of new antimicrobial, antitumor and analgesic drugs. These multifunctional peptides are known as mastoparans, and even though they have shown excellent *in vitro* and *in situ* activity, systemic administration of this class of peptides has induced adverse effects such as cytotoxicity and neurotoxicity. Considering this, the purpose of this study was to develop a molecule (called Neuroval) obtained from mastoparan Agelaia - MP with antinociceptive properties and low intrinsic adverse effects. When administered via intracerebroventricular in Swiss mice, NeuroVAL showed potent antinociceptive activity, as tested in the two thermal pain induction models (hot plate and tail flick). NeuroVAL's antinociceptive action was inhibited in the presence of naloxone hydrochloride (4 mg / kg) and pertussis toxin (0.25 µg / animal), indicating that its action may be caused by its interaction with opioid receptors. When tested *in situ* in peripheral neural pathways, it was observed that NeuroVAL (1 mM) is able to reduce approximately 80% of the action potential in frog's sciatic nerve, being a reversible effect after washing the medium. Another interesting effect was NeuroVAL's ability to block type 1.7 voltage-dependent sodium channel, as seen in patch clamp electrophysiological tests. Comparing Agelaia-MP and NeuroVAL peptides adverse effects, it was evident that there was a reduction in the parameters evaluated: hemolysis and changes in spontaneous behaviors, suggesting the importance of bioguided synthesis of promising drugs. Great progress has been achieved in the understanding of neuropharmacological activity of mastoparans such as NeuroVAL, although new studies are still necessary to determine the structural and molecular interactions between peptides and target receptors, thus, permitting a better understanding about pain, antinociception and its molecular mechanisms.

Key-words: Pain, antinociception, opioids, patch clamp, wasps.

1. Introdução

1.1 Dor e Nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain – IASP) definiu o termo dor como uma “desagradável experiência sensorial e emocional associada a um dano real ou potencial, ou descrita em termos desse dano.” Esse conceito elaborado em 1986 e revisado em 2011, descreve a dor como uma experiência subjetiva e pessoal e com diferentes papéis no organismo. Deve-se ressaltar que mesmo em ocasiões onde não há vocalização ou expressão da dor, não implica necessariamente em sua ausência.

Após a definição de dor houve a necessidade de se elaborar um conceito que não envolvia o componente emocional e cultural, apenas a captação do estímulo pelos nociceptores e o seu processamento em centros encefálicos, ficou então determinado o conceito de nocicepção (IASP, 1994). Pode-se observar a importância dessa diferenciação na experimentação animal, na qual há grande dificuldade de se captar componentes emocionais, principalmente em testes que envolvem respostas reflexas como o da retirada de cauda (JONES, 1992).

Por ser um fenômeno sensorial multidimensional que envolve aspectos culturais, afetivos, comportamentais e crenças, pode-se dizer que a dor é uma experiência pessoal e para melhor abordagem terapêutica, viu-se a necessidade de classificá-la. Os quatro sistemas de classificação de dor mais utilizados são: patofisiológicos (nociceptiva ou neuropática), com base no

tempo de duração (aguda, crônica ou intermitente), na etiologia (maligno ou não maligno) e de acordo com o sítio anatômico afetado (OMS, 2012).

A dor é considerada um dos maiores problemas clínicos, sociais e econômicos em todo o mundo. Atingindo todas as idades, a dor impacta negativamente na qualidade de vida dos pacientes. Estima-se que o gasto anual com essa patologia varie entre 560 a 635 bilhões de dólares, maior do que o gasto com câncer (243 bilhões de dólares), doenças cardiovasculares (309 bilhões de dólares) e diabetes (188 bilhões de dólares) (HENSCHKE et al, 2015).

Sabe-se que a dor crônica está presente em várias etapas da vida, na primeira infância e na adolescência, estima-se que aproximadamente 40% das crianças são afetadas por dores do crescimento (FORNI; JALIKHIAN, 2011). Em geral, estima-se que uma a cada cinco pessoas sofre com dores crônicas severas a moderadas (THEILE e CUMMINS, 2011). Em adultos, aproximadamente 20% da população mundial sofre com dor crônica (PARK; MOON, 2010), sendo considerada uma questão de saúde pública, pois esta é uma condição incapacitante para muitos trabalhadores (KRELING; CRUZ; PIMENTA, 2006). Em idosos, a prevalência de dor crônica é muito maior, tornando-se a queixa principal nos ambulatórios (PASQUALOTTI; SILVEIRA; COLUSSI, 2012).

Embora a dor crônica seja muito comum, ainda não há estudos com a epidemiologia dessa patologia no Brasil, apenas estudos em alguns municípios, que revelam que cerca de 40-50% dos pacientes que dão entrada

nos centros de atendimento emergenciais têm como queixa principal, a dor (BARRETO et al., 2012).

Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos declararam que aproximadamente 86 milhões de norte-americanos se queixam de dores crônicas, destes, 65 milhões (75%) não encontravam-se aptos para o trabalho, seja por invalidez total ou parcial, representando um gasto anual de cerca de 70 bilhões de dólares (MARQUEZ, 2004). Um grande levantamento epidemiológico de dor crônica na Europa constatou também que essa dor afeta intensamente a qualidade de vida dos pacientes. Aproximadamente 19% dos europeus adultos sofrem de dor crônica de intensidade moderada a severa, e destes, 40% não tem um manejo da dor adequado e a maioria não foi assistido por um especialista em dor (BREIVIK et al., 2006).

1.1.1 Canais de Sódio voltagem dependentes

Muito se tem estudado sobre o papel dos canais iônicos no impulso nociceptivo, tanto os voltagem dependentes, quanto os acoplados a receptores. Mutações nesses canais podem causar diversas síndromes relacionadas à nocicepção, desde insensibilidade a dores crônicas severas (CREGG et al., 2010).

Os canais iônicos dependentes de voltagem são uma grande família de proteínas transmembrânicas codificadas por 143 genes. Esses canais, importantes para a transdução de sinal, são um dos alvos farmacológicos mais comuns, perdendo apenas para os receptores acoplados à proteína G e aqueles acoplados a proteína kinase (CATTERALL et al, 2005). A classificação

desses canais depende do íon que ele conduz, sendo os principais envolvidos na condução do estímulo nociceptivo: os canais de cálcio, sódio e potássio (RUIZ; KRAUS, 2015).

Os canais de sódio voltagem dependentes (Na_v) foram descobertos em 1952 por Hodking e Huxley, quando estudavam axônios de lula gigante. Desde então, com o aumento do interesse pela eletrofisiologia e o desenvolvimento de novas tecnologias foram encontrados diversos subtipos de canais de sódio em mamíferos, sendo divididos em duas grandes famílias os Na_v1 , sub classificados em $\text{Na}_v1.1$ até $\text{Na}_v1.9$, e os Na_v2 , mais recentes e por isso ainda não muito estudados.

Basicamente, os canais Na_v são formados por uma grande subunidade α de 260 kDa, que forma um poro, associadas a uma ou duas subunidades β , que diferem de acordo com a região em que o canal está sendo expresso. A subunidade formadora do poro é suficiente e necessária para o funcionamento do canal, contudo a cinética e a dependência de voltagem é constantemente modulada pelas subunidades β (Figura 1) (ISOM et al 2001; CATTERALL *et al*, 2005).

Os Na_v estão presentes em diversas células excitáveis como neurônios e células musculares (CATTERALL et al, 2005; ALEXANDER et al, 2015), e estão envolvidos nos mais variados estímulos sensoriais, inclusive os nociceptivos. Sabe-se contudo, que apenas alguns tipos de Na_v estão expressos em vias relacionadas diretamente a nocicepção, tanto centrais quanto periféricas, estes são $\text{Na}_v 1.1$, $\text{Na}_v 1.3$, $\text{Na}_v 1.6$, $\text{Na}_v 1.7$, $\text{Na}_v 1.8$ e $\text{Na}_v 1.9$ (CATTERALL et al, 2005; ALEXANDER et al, 2015). O bloqueio destes

canais pode inibir a via de sinalização nociceptiva, provocando, portanto, um efeito analgésico.

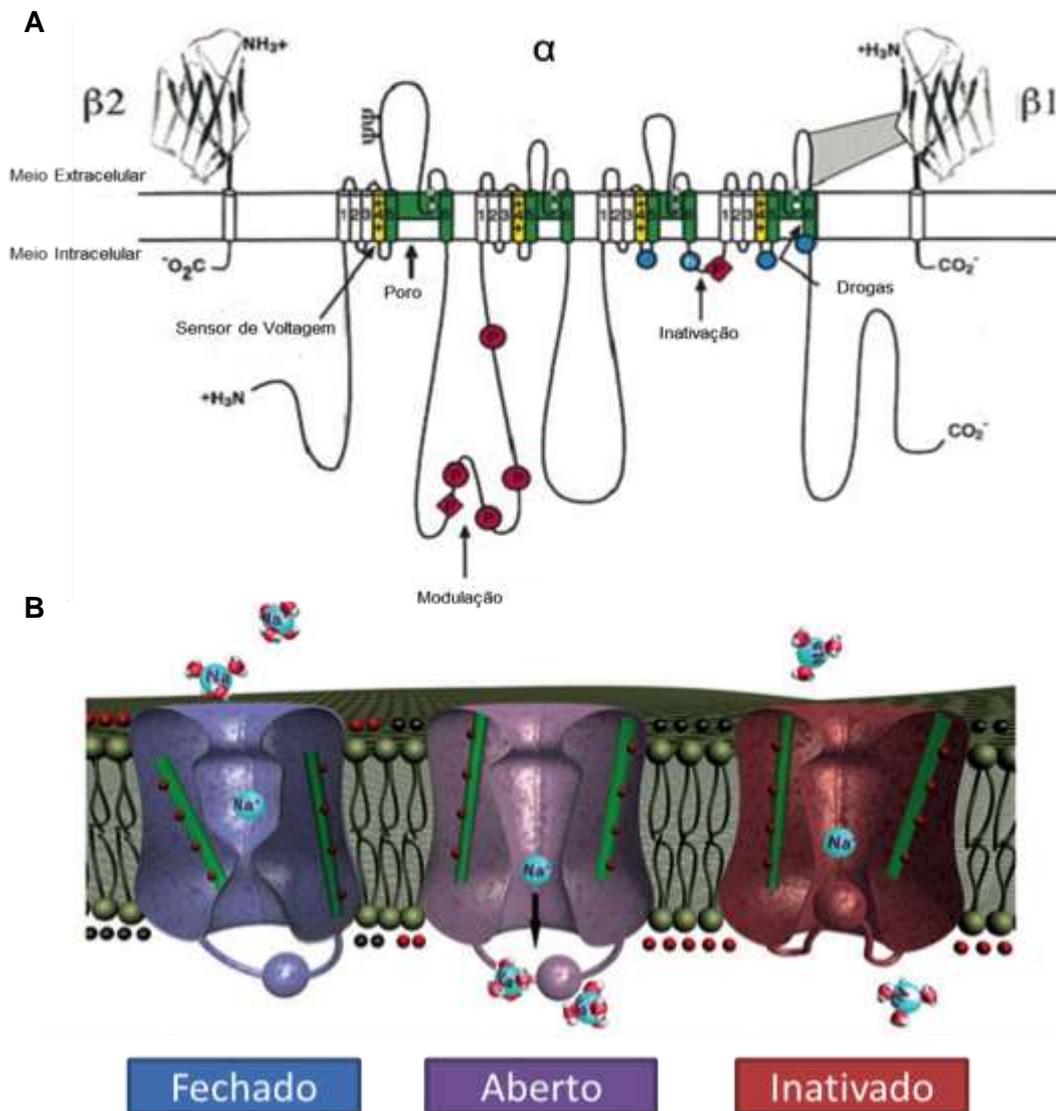


Figura 1: A) Esquema estrutural bidimensional de canais de sódio voltagem dependentes (modificado de CATTERALL et al, 2005) B) Esquema tridimensional de canais de sódio voltagem dependente em três estados: fechado, aberto e inativado. Pequenas variações de voltagem na membrana fazem com que o sensor de voltagem (verde) se movimente e abra o canal, permitindo a passagem de sódio. Como a mudança de conformação do canal para que ele volte ao estado fechado é lenta, existe um modo de rápida inativação, onde uma das alças bloqueia o poro formado impedindo a passagem de íons (modificado de EIJKELKAMP et al, 2012).

Anestésicos locais como a lidocaína, atuam bloqueando canais de sódio voltagem dependentes impedindo assim a condução da informação nociceptiva do sistema nervoso periférico (SNP) para o Sistema Nervoso Central (SNC). Outros fármacos que atuam em canais de sódio e tem sido muito usados para o tratamento de dores neuropáticas são os antiepiléticos carbamazepina e topiramato, que bloqueiam os canais de sódio do SNC. A tetrodotoxina (TTX), um alcalóide guanidínico bloqueador de canais do tipo Na_v tem sido empregada em testes clínicos de fases II e III com indicação principalmente no tratamento de dor em pacientes com câncer (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=TTX&pg=1>, busca em 21/02/2017).

Até o momento, poucas toxinas de vespas com atividade em canais de sódio ligados à transmissão da informação nociceptiva foram descritas, as pompilidotoxinas (PMTX) fazem parte desse grupo. São peptídeos com 13 resíduos de aminoácidos isolados da peçonha de vespas solitárias *Anoplius samariensis* (α -PMTX) e *Batozonellus maculifrons* (β -PMTX). Eles atuam facilitando as sinapses na junção neuromuscular e na inativação lenta dos Na_v (SCHIAVON *et al*, 2010).

1.1.2 Receptores acoplados à proteína G

Os receptores acoplados a proteína G (RAPG) são a maior família de receptores de membrana com aproximadamente 800 membros. Eles são divididos em seis classes (A-F) baseadas nas similaridades estruturais e funcionais, e são responsáveis por inúmeros eventos celulares que resultam

em diferentes respostas fisiológicas como as sensoriais, regulação da pressão sanguínea, resposta imune, comportamento e humor (BOCKAERT; PIN, 1999; GHOSH, 2015).

Existem duas classes gerais de proteínas G: as heterotriméricas, compostas por três subunidades distintas (α , β e γ), e as monoméricas, também denominadas proteínas G pequenas. Cada classe responde de forma diferente a ativação do RAPG, as heterotriméricas quando ativas separam suas subunidades em α e no complexo $\beta\gamma$, as subunidades agora livres ativam diferentes proteínas intracelulares e desencadeiam inúmeras respostas fisiológicas (PURVES et al., 2012).

A segunda classe, a de proteína G monomérica é formada por uma única proteína denominada Ras, essa proteína é responsável por regular a diferenciação e proliferação celular, enviando sinais a receptores de quinases no núcleo (PURVES et al., 2012). Mutações e anomalias nessa via podem desencadear sérios problemas inclusive o câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.1.3 Receptores opióides

Os receptores opióides pertencem a grande família de receptores acoplados a proteína G. Em 1940, o início da jornada na descoberta desses receptores se iniciou com a caracterização dos três principais antagonistas: naloxona, naltrexona e meperidina. Atualmente, estão caracterizados seis receptores opióides, distribuídos em diferentes locais do corpo e nem todos

ligados à analgesia, são eles: μ , κ , δ , ORL-1, ϵ e ζ (DHAWAN et al., 1996; MARTINS et al., 2012).

Genericamente, todos os receptores opióides possuem sete domínios transmembrânicos e estão acoplados a proteínas Gi. Agonistas opióides desencadeiam a ativação de canais de K^+ retificadores de corrente (Kir3) e o bloqueio de canais de Ca^{2+} , o que resulta em uma inibição do estímulo nociceptivo. Diferente dos receptores mencionados anteriormente, os receptores opióides estão expressos apenas nas vias descendentes da dor, tendo um importante papel na antinocicepção. Contudo, novas pesquisas estão sendo conduzidas para desvendar a importância desses receptores na modulação da dor (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011).

1.1.4 Novos fármacos analgésicos

A procura por novos fármacos analgésicos pelas indústrias farmacêuticas teve um crescimento considerável nos últimos 10 anos, sendo atualmente, depois do câncer, a segunda maior área que apresentou crescimento de pesquisas (ARROWSMITH, 2012). Contudo, menos de 10% dos analgésicos que estão sendo avaliados em testes clínicos passam para estudos clínicos fase II. Isso ocorre por diversas razões, em especial porque alguns modelos animais não são tão eficientes para predizer a eficácia em humanos e pela resposta a placebo em alguns testes de analgésicos (http://www.painweek.org/education_posts/analgesc-development/ busca em: 11/01/2016).

As terapias de combate à dor devem ser abordadas multiprofissionalmente levando-se em consideração todos os aspectos

emocionais e culturais da dor abordados anteriormente. Quando o uso de fármacos torna-se necessário é preconizado mundialmente que a terapia deve seguir três passos, quando em adultos, e dois passos em tratamento pediátrico. O manejo da dor dos três passos envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), agonistas opióides fracos (ex.: codeína) e agonistas opióides fortes (ex.: morfina), escalonando-os quando necessário. Enquanto a terapia pediátrica elimina o uso de agonistas opióides fracos, iniciando o segundo passo com baixas doses de agonistas opióides fortes (WHO, 2012).

Além disso, em casos de dor provocada por lesão em nervos, o tratamento pode envolver o uso de antidepressivos e antiepiléticos para regular e deprimir a comunicação sináptica do nervo lesionado, diminuindo conseqüentemente a dor.

Embora tenham ocorrido avanços na área de alívio da dor, o foco não tem sido o desenvolvimento de novas moléculas com atividade analgésica, e sim, principalmente, a redução dos efeitos adversos das moléculas mais utilizadas no mercado para esse fim, os opióides. A falta de compreensão da dor aguda, a dificuldade em desenhar estudos clínicos corretos para o teste de novos analgésicos, eliminando-se o efeito placebo, tem limitado o avanço no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria (POWER, 2011).

Levando-se em consideração a descoberta de novos alvos farmacológicos para dor, a especificidade de peptídeos derivados de peçonha de artrópodes para esses alvos e o grande número de pacientes resistentes aos tratamentos convencionais para a dor, a busca de novos agentes

antinociceptivos específicos, de fácil administração e como uma boa relação custo benefício se faz necessária.

1.2 Histórico dos Mastoparanos

Em 1979, Hirai e colaboradores caracterizaram farmacológica e estruturalmente um peptídeo inédito da peçonha da vespa oriental *Vespa lewisii*. Foi observada, como atividade principal, a capacidade de degranular mastócitos, por esse motivo o composto foi denominado Mastoparano (MP), além disso, teve sua estrutura determinada por degradação de Edman, apresentando a seguinte sequência de aminoácidos INLKALAALAKKIL-NH₂.

Posteriormente, com o desenvolvimento tecnológico e o interesse pela busca de novos compostos farmacológicos extraídos da peçonha de animais, foi observado a presença de peptídeos com as mesmas características do MP em outras espécies de vespas. Assim, os mastoparanos deixaram de ser apenas um peptídeo e se tornaram uma classe, a mais abundante em peçonha de vespas sociais e solitárias (NAKAJIMA et al., 1986).

Apesar de apresentarem semelhanças estruturais e funcionais com peptídeos isolados da peçonha de abelhas e da secreção cutânea de sapos, melitina e bombinina, respectivamente, acreditava-se que os mastoparanos eram peptídeos restritos a artrópodes da ordem Hymenoptera, famílias Vespidae, Pompilidae e Sphecidae (ARGIOLAS; PISANO, 1983; BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2012; CSORDAS; MICHL, 1969). Contudo, em 2015, Zare-Zardini e colaboradores isolaram um mastoparano do macerado do Louva-a-Deus *Sphodromantis viridis*, que foi denominado Mastoparano-S (LRLKSIVSYAKKVL-NH₂), devido a sua elevada similaridade estrutural com o

Mastoparano-B (LKLKSIVSWAKKVL-NH₂), isolado da *Vespa basalis*, apresentando apenas dois resíduos de aminoácidos diferentes. Similar ao observado para outros mastoparanos, o Mastoparano – S mostrou uma potente atividade antimicrobiana. Essa atividade antimicrobiana foi avaliada em bactérias gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Leuconostoc mesenteroides*) e gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), além de fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*) e leveduras (*Candida albicans*). Todos os microorganismos testados mostraram sensibilidade ao peptídeo com MIC variando entre 15,1 a 28,3 µg/mL (ZARE-ZARDINI; TAHERI-KAFRANI; ORDOOEI, 2015).

As sequências dos mastoparanos são bastante conservadas, e muitas vezes o mesmo peptídeo é encontrado em espécies de vespas muito distantes filogeneticamente (figura 1). Exemplos disso são os mastoparanos Agelaia-MPI e Polybia-MPII, isolados das peçonhas das vespas sociais *Agelaia pallipes* e *Polybia paulista*, respectivamente. Ambos também foram encontrados na peçonha das vespas *Parachartergus fraternus* e *Pseudopolybia vespiceps* (BAPTISTA-SAIDEMBERG, 2011; GONÇALVES et al, 2016; MENDES et al., 2004).

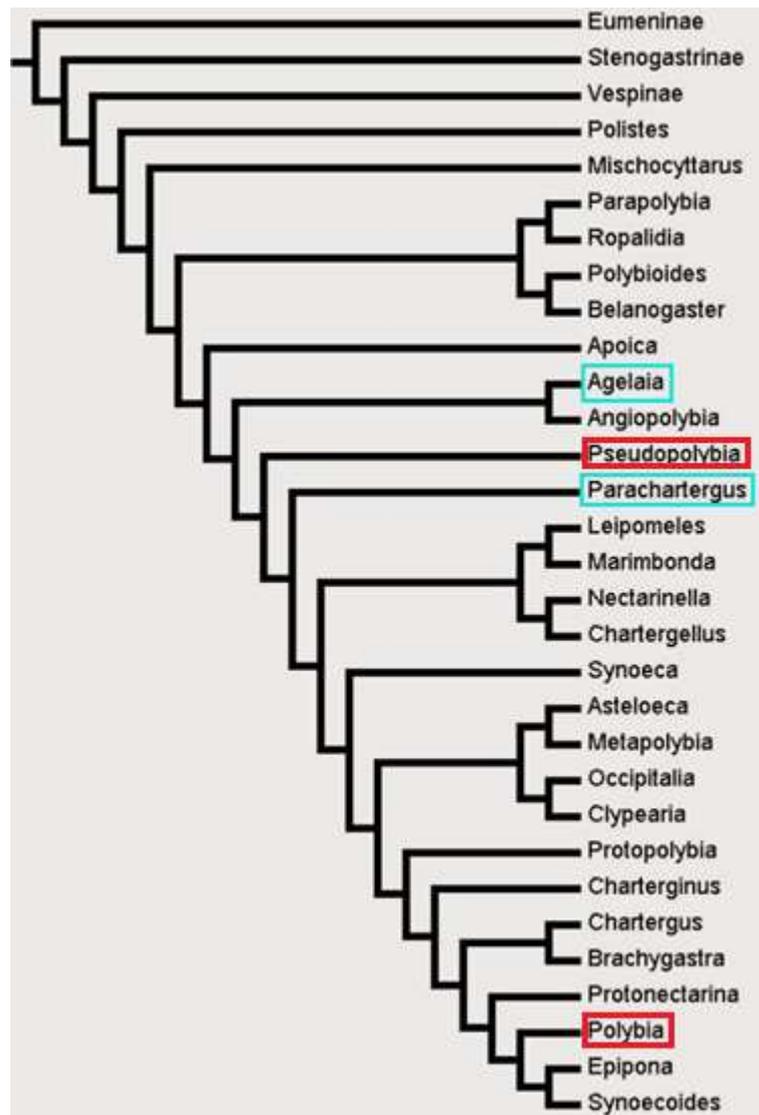


Figura 2: Árvore filogenética da família Polistinae. As marcações em azul indicam os gêneros onde foram descritos o mastoparano Agelaia - MP, enquanto as marcações em vermelho os gêneros onde foram descritos o mastoparano Polybia-MPII (WENZEL e CARPENTER, 1994).

1.2.1 Estrutura Geral dos Mastoparanos

Estruturalmente, um mastoparano pode ser identificado por apresentar algumas características comuns, tais como: 10 a 14 resíduos de aminoácidos, dois a quatro resíduos de lisina, amidação na porção C-terminal, ausência de cisteínas, além de assumir uma conformação secundária em α -hélice, quando

em contato com fosfolipídeos de membrana (DOS SANTOS CABRERA et al., 2008; NAKAJIMA et al., 1986). Essas características permitem que os mastoparanos possuam elevada capacidade de penetrar as membranas, o que resulta em sua multifuncionalidade, que pode ser resumida em duas grandes funções: citolítica e ativadora de proteína G (JONES; HOWL, 2006).

Tendo em vista a capacidade dos mastoparanos em penetrar membranas biológicas, pode-se incluí-los em uma classe maior de peptídeos denominados Peptídeos Penetrantes de Células (PPC). Os PPC são peptídeos de sequência curta que penetram nas células sem utilizar os mecanismos de endocitose e podem ser divididos em três classes: derivados de proteína, quiméricos e sintéticos (LINDGREN; LANGEL, 2011).

Outra forma de classificar os PPC é de acordo com sua estrutura química em catiônicos e anfipáticos. A sequência dos PPC catiônicos é rica em resíduos básicos como arginina, lisina e histidina, e são, esses resíduos, os principais responsáveis pela sua capacidade em penetrar membranas biológicas, interagindo com motivos aniônicos ou ácidos das membranas. Paralelamente, os anfipáticos possuem caudas lipofílicas e hidrofílicas que permitem sua entrada na membrana (BOLHASSANI, 2011).

Embora existam diferentes maneiras de classificá-los, uma característica comum a todos os PPC é sua elevada quantidade de resíduos básicos de lisina (BOLHASSANI, 2011), esses resíduos estão presentes em grande quantidade na sequência dos mastoparanos como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1: Principais mastoparanos isolados da peçonha de vespas e suas atividades biológicas

Mastoparano	Sequência (NH ₂)	MM (Da)	Atividade Biológica	Hemólise	Referencias
Agelaia MP-I	INWL K LG K AIIDAL	1567.95	Secreção insulina	Hemolítico	Mendes <i>et al</i> , 2004
EMP-AF	INLL K IA K GII K SL	1524.02	Junção neuromuscular		Konno <i>et al</i> , 2000
Protopolybia MPI	INWL K LG K VSA I L	1454.90			Mendes <i>et al</i> , 2005
Mastoparano-C	INW K ALLAVAK K IL	1581.02	Ativa Proteína G		Argiolas e Pisano, 1984
Mastoparano-X	INW K GIAAMAK K LL	1556.93	Ativa Proteína G		Hirai <i>et al</i> , 1979b
Mastoparano-B	L K L K SIVSWAK K V L	1613.02	Edema, Antimicrobiano		Ho e Hwang, 1991
Mastoparano-S	LRL K SIVSYAK K V L	1618.03	Antimicrobiano		Zare-Zardini <i>et al</i> , 2015
EMP-ER	LNL K GIF K KVASLLT	1645.04	Antimicrobiano		Não Hemolítico
Protopolybia M ^{PII}	INW K AIIEAA K QAL	1568.91	Ativa Proteína G	Mendes <i>et al</i> , 2005	
Protopolybia M ^{PIII}	INWL K LG K AVIDAL	1553.94	Ativa Proteína G	Mendes <i>et al</i> , 2005	

*Em vermelho, os resíduos de lisina.

Nesse contexto, DE SOUZA e colaboradores (2011) estudaram o efeito da localização das lisinas em quatro mastoparanos, sendo três naturais (Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Polybia-MP1) e um modificado (MK-578). Foi observado que quando os resíduos de lisina estão localizados no meio da sequência, sua atividade de penetração em membranas biológicas é reduzida em comparação com a presença de lisinas localizadas no início (4-5 aminoácido) ou no final (11-13 aa) da cadeia peptídica. Uma hipótese descrita pelos pesquisadores foi a de que os resíduos de lisina localizados na posição 5, 7 e 8 da sequência de aminoácidos criam uma superfície hidrofóbica heterogênea que diminui a interação com membranas biológicas, reduzindo, consequentemente, sua penetração e sua atividade antimicrobiana, hemolítica e degranuladora.

Além da presença desses resíduos, sabe-se que todos os mastoparanos naturais descritos até o momento são amidados na porção C-terminal. Essa amidação é responsável pela estabilização da estrutura secundária em α -hélice que estes mastoparanos apresentam quando imersos em soluções lipídicas (SFORÇA et al., 2004), além de impedir a degradação proteolítica (ANDREU; RIVAS, 1998). Essa conclusão foi corroborada por DA SILVA e colaboradores (2014) ao estudar dois mastoparanos um natural, com NH_2 na região C-terminal, e um sintético, com OH na mesma porção. Diminuição das atividades antimicrobiana, hemolítica e degranuladora foram observadas, assim como, a interação com membranas biológicas também foi prejudicada no peptídeo coma ausência da amidação.

A maioria dos mastoparanos apresentam a sequência de aminoácidos isoleucina(I)-asparagina(N)-triptofano(W) na porção N-terminal, seguidos de uma lisina (K) ou leucina (L) (NAKAJIMA et al., 1986). Alguns membros dessa família, no entanto, apresentam um resíduo ácido no lugar da N, geralmente um ácido aspártico (D) (LEITE et al., 2011). Essa troca contribui para a estabilização da α -hélice (MARQUSEE; ROBBINS; BALDWIN, 1989) e modifica a atividade do peptídeo, diminuindo sua capacidade de degranulação de mastócitos e sua atividade hemolítica. Vale ressaltar, que mastoparanos com sequência inicial IDW apresentam elevada atividade antimicrobiana (DE SOUZA, 2006).

Para melhor compreender o papel dos resíduos de aminoácidos ácidos na região N-terminal dos mastoparanos, LEITE e colaboradores (2011) avaliaram a hidrofobicidade e a atividade lítica de cinco mastoparanos, Polybia-

MPI, Polybia-MPII, Polybia-MPIII, um análogo sintético Polybia N2-MPI e o Mastoparano- X (MP-X). Os resultados obtidos por esses autores confirmaram a capacidade dos resíduos ácidos de estabilizarem a α -hélice do mastoparano, e que alterações nas características de hidrofobicidade e hidrofiliidade do peptídeo mudam, conseqüentemente, a interação com a bicamada lipídica e sua capacidade lítica.

O conhecimento das características estruturais dos mastoparanos e da função de cada um dos seus resíduos possibilita a elucidação da interação com os alvos dessa classe de peptídeos e o desenvolvimento de novas estruturas *mastoparan-like*, com importantes efeitos farmacológicos, como: antimicrobianos, antitumorais, hipoglicemiantes e neuroativos (BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2012; MORENO; GIRALT, 2015; ROCHA et al., 2009; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ; GARZÓN, 1994, 1995; YANDEK et al., 2007; ZHANG et al., 2013).

1.2.2 Principais atividades dos mastoparanos

Como componente peptídico majoritário da peçonha de vespas sociais e solitárias (NAKAJIMA et al., 1986), os mastoparanos estão envolvidos em diversos efeitos patofisiológicos após o envenenamento, tais como: degranulação de mastócitos (sua principal característica funcional), atividades inflamatórias, lise de membranas celulares, hemólise, liberação de histamina e, conseqüente vasodilatação, além da indução de quimiotaxia de neutrófilos e células T helper, resultando no recrutamento de outros leucócitos para o local inflamado (HANCOCK; DIAMOND, 2000). Os mastoparanos podem, ainda,

ativar a fosfolipase A2 presente na peçonha e no tecido do paciente acidentado, levando a um aumento da lesão tecidual e do edema (ARGIOLAS; PISANO, 1984).

Os peptídeos degranuladores de mastócitos atuam também como agentes promotores de exocitose em diversas células de mamíferos, promovendo a secreção de serotonina a partir de plaquetas e de prolactina na glândula pituitária (OZAKI et al., 1990; YAJIMA et al., 1997).

A multifuncionalidade dos mastoparanos descrita por diversos autores deve-se, em parte, à sua capacidade de mimetizar receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, ativando-a (HIGASHIJIMA et al., 1988; JONES; HOWL, 2006). Os mastoparanos podem modular a atividade da proteína G sem que atue diretamente em seu receptor, por esse motivo são considerados atualmente uma ferramenta de excelência para o estudo desse complexo sistema de sinalização intracelular (HIGASHIJIMA et al., 1988; JONES; HOWL, 2006; TODOKORO et al., 2006).

Muitas doenças neurológicas, como transtornos de humor, epilepsia, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e dor crônica estão relacionadas a receptores acoplados a proteína G (GONZÁLEZ-MAESO et al., 2002; GUIXA-GONZALEZ et al., 2012; LAGERSTROM; SCHIOTH, 2008; THATHIAH; DE STROOPER, 2011). Dessa forma, na última década, os mastoparanos têm sido considerados fármacos promissores para o tratamento de diversas doenças neurológicas, ou para o estudo dessas desordens, seja em sua forma natural, modificada ou quimérica (SILVA et al., 2015).

1.2.3 Aplicação farmacológica dos mastoparanos

Embora os mastoparanos possuam muitos efeitos potencialmente tóxicos, estudos farmacológicos estão desvendando novas atividades desses incríveis peptídeos multifuncionais, tais como: antimicrobiana, antitumoral, analgésica e estimuladora da secreção de insulina.

Além da degranulação de mastócitos, atividade farmacológica que auxiliou a nomear esta classe de peptídeos, a atividade antimicrobiana é uma característica comum dos mastoparanos. Sua capacidade de interagir com membranas biológicas e desestabilizar a bicamada lipídica, provocando a lise da célula, confere aos mastoparanos funções bactericidas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias. Estes peptídeos têm se mostrado promissores para o combate de bactérias, inclusive cepas clínicas multirresistentes, sejam administrados sozinhos ou associados a outros antibióticos (CHEN et al., 2008; HENRIKSEN et al., 2014; LIN et al., 2012; YANG et al., 2013).

Os mastoparanos naturais são pouco seletivos às membranas de mamíferos ou de bactérias, conseqüentemente, sua administração sistêmica causa muitos efeitos adversos. Na tentativa de solucionar esse problema e aumentar sua especificidade, pesquisadores têm se empenhado em adaptar a estrutura desse peptídeo, fazendo com que se torne seletivo para a membrana de bactérias (MORENO; GIRALT, 2015).

Em relação a ação antiviral, foi desenvolvido um peptídeo derivado do mastoparano clássico denominado Mastoparano-7 (INLKALAALAKALL-NH₂) que apresentou uma potente atividade antiviral contra vírus envelopados isolados. Por ter facilidade de romper membranas, o MP7 desestabiliza a

membrana viral e dificulta a entrada do vírus na célula (SAMPLE et al., 2013). Atualmente, existem apenas dois antivirais de amplo espectro, Ribavarina e Interferon, muito usados para o tratamento de hepatite C. Embora sejam eficazes no combate a viroses, produzem muitos efeitos adversos, como fadiga, mal-estar, perda de peso, depressão, náusea, anorexia, diarreia, neutropenia, retinopatia, febre e tosse seca (CHAMBERS et al., 1997; GARCIA et al., 2012; HELAL; ZACHARIAS; DE ALENCAR, 2006; KAWANO et al., 1996).

Ainda em relação ao efeito quimioterápico dos mastoparanos, Carter e colaboradores (2013) testaram 33 peptídeos antimicrobianos contra duas diferentes espécies de *Plasmodium sp.* (*P. falciparum* e *P. berghei*), dentre os peptídeos testados estão o Mastoparano X e o Transportan 10, uma quimera de peptídeos com 21 resíduos de aminoácidos, no qual a região C-terminal contém o Mastoparano e na região N-terminal seis resíduos do neuropeptídeo galanina. Os peptídeos demonstraram uma boa atividade antiparasitária *in vitro* com o parasita isolado, mas não tão relevante quando avaliado em ovócitos de *Anopheles gambiae* infectados com o parasita.

Além de sua ação como antiparasitário, o Transportan e o Transportan 10 foram desenvolvidos para penetrar a barreira hematoencefálica (BHE). Essa estrutura é responsável pela regulação da homeostase e da permeabilidade cerebral, contudo, fazer um fármaco transpassá-la é um desafio para os farmacologistas. Com o avanço da farmacocinética, biologia molecular, nanotecnologia e toxilogia, têm sido desenvolvidas estratégias com o objetivo de facilitar a passagem pela BHE e, conseqüentemente, aumentar a concentração cerebral dos fármacos (CHEN; LIU, 2012). Os CPP, em especial

os mastoparanos, têm sido utilizados como entregadores de fármacos por sua capacidade de penetração, sendo acoplados aos compostos para facilitar sua entrada no Sistema Nervoso Central (SNC).

Sendo assim, com o objetivo de permitir a passagem pela BHE, foram criados peptídeos quiméricos denominados Transportan, descritos anteriormente, que são resultado da fusão de um Mastoparano ao neuropeptídeo Galanina. O Transportan tradicional é formado pelo Mastoparano-X completo conectado a 12 resíduos de Galanina por uma lisina, resultando em uma quimera com 27 resíduos de aminoácidos (POOGA et al., 1998). Enquanto o Transportan-10 foi desenvolvido da mesma forma que o anterior, porém com apenas sete resíduos terminais da Galanina (YANDEK et al., 2007). A Galanina é um neuropeptídeo, com 30 resíduos de aminoácidos, descoberta em 1983 em humanos (para revisão ver WEBLING et al., 2012). Seu nome é derivado da fusão dos aminoácidos Glicina e Alanina, presentes na região C e N-terminal, respectivamente. Largamente distribuída no SNC e periférico, a Galanina tem sido associada a patofisiologia de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Epilepsia (WEBLING et al., 2012). Segundo Counts e colaboradores (2008), a superexpressão do neuropeptídeo detectada em pacientes com Alzheimer pode preservar as funções da via colinérgica estriatal, o que conseqüentemente, pode diminuir os sintomas da doença. A construção quimérica Transportan e Transportan-10 pode ser usada como um sistema de entrega da Galanina para o SNC e como tratamento para doenças neurodegenerativas (SILVA et al., 2015).

Recentemente, foi demonstrado a capacidade do mastoparano Polybia-MPI em eliminar células tumorais sensíveis e resistentes, com alta seletividade,

em especial, devido a sua preferência por interagir com membranas carregadas negativamente (aniônicas), o que resulta em morte celular por necrose e menores efeitos adversos para os pacientes (LEITE et al., 2015; WANG et al., 2008). Embora tenha sido determinada a morte celular por necrose, o mecanismo pelo qual culminou nesse resultado ainda não foi elucidado.

Assim como as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos, as células tumorais também desenvolveram resistência aos oncoquimioterápicos mais usados, por mecanismos bem semelhantes aos de resistência bacteriana como a bomba de efluxo dos compostos recém absorvidos (AMBUDKAR et al., 1999). Evidentemente, novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer têm sido buscados incansavelmente pela indústria farmacêutica e os mastoparanos têm se mostrado um potente candidato ao cargo de novo fármaco.

O mastoparano clássico também apresentou uma potente função antitumoral em células de melanoma murino com atividade *in vivo* e *in vitro*. Diferentemente do Polybia MPI, a morte celular causada pelo mastoparano clássico foi por apoptose e seu mecanismo de ação tem sido largamente estudado. Foi detectada ativação de caspases 9, 12 e 13, decorrentes de ativação mitocondrial, além disso o aumento da expressão de proteínas pro-apoptóticas (Bax e Bim) e anti-apoptóticas (Bcl-XL) (DE AZEVEDO et al., 2015). Essa foi a primeira vez que um mastoparano teve descrita esta atividade, assim como o mecanismo de ação envolvido no efeito antitumoral.

Sabe-se também que os mastoparanos têm a capacidade de elevar a permeabilidade em mitocôndrias isoladas e desencadear o processo de

apoptose pela liberação de proteínas, como as do citocromo c (JONES et al., 2008; PFEIFFER et al., 1995). A mitocôndria é uma importante organela, cuja principal função é a conservação de energia em forma de ATP. Para que isso ocorra é imprescindível um controle do gradiente eletroquímico de H^+ na membrana mitocondrial interna. Esse gradiente é mantido graças à resistência da membrana interna à permeabilidade de solutos e íons. Contudo, algumas condições, como a presença de Ca^{2+} e fosfato inorgânico, podem aumentar a permeabilidade da membrana interna, sendo esse fenômeno denominado Permeabilidade Transitória (PT) (BERNARDI et al., 1998; GUNTER; PFEIFFER, 1990; ZORATTI; SZABO, 1995).

Inicialmente, acreditava-se que os mastoparanos poderiam estar se ligando a proteínas da membrana mitocondrial e com isso a PT poderia ser modificada. Contudo, foi observado, a partir do uso de mastoparanos naturais e seus enântiômeros, que a mudança da permeabilidade da membrana mitocondrial se deve, não pela interação dos mastoparanos com enzimas ou proteínas, mas sim uma interação com os fosfolipídeos da membrana mitocondrial interna. Sendo assim, o mastoparano se insere na membrana e forma um poro que conseqüentemente aumenta a permeabilidade mitocondrial (YAMAMOTO et al., 2014).

Por também atuarem como ativadores da proteína G, os mastoparanos são capazes de influenciar diversas vias de transdução de sinal, uma delas é a responsável pela secreção de insulina. O mastoparano clássico é capaz de aumentar a secreção de insulina nas ilhotas β pancreáticas, pois inibe a ativação de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) aumentando a

concentração intracelular de Ca^{2+} (DANIEL et al., 2002; EDDLESTONE et al., 1995).

Além do mastoparano clássico, o Agelaia-MPI, isolado das peçonhas das vespas sociais *Agelaia pallipes* e *Parachartergus fraternus* (BAPTISTA-SAIDEMBERG, 2011; GONÇALVES, 2013), também é capaz de estimular a secreção de insulina em células β isoladas de camundongos, efeito induzido independentemente do estímulo com glicose (BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2012). Embora o mecanismo pelo qual a Agelaia-MPI aumente a secreção de insulina ainda não tenha sido elucidado, Saidemberg e colaboradores (2012) excluíram a possibilidade desse peptídeo ter o mesmo mecanismo de ação do peptídeo clássico, concluindo que embora pertençam a mesma classe de moléculas, os mecanismos de ação intracelular dos mastoparanos podem ser diferenciados.

Outra importante função dos mastoparanos é que eles podem atuar como um antídoto para uma das mais poderosas neurotoxinas do mundo, a Toxina Botulínica A (BoTx-A). Essa toxina se liga às proteínas SNARE das vesículas neuronais carregadas de acetilcolina, impedindo assim a liberação desse neurotransmissor responsável pela contração muscular, dessa forma o paciente com intoxicação por essa toxina apresenta uma paralisia muscular relaxada.

Apenas um grama dessa toxina cristalizada pode matar um milhão de pessoas, quando dispersa no ar (MONTECUCCO; SCHIAVO, 1995). Essa intoxicação é tão rápida e severa que foi cogitado seu uso como arma biológica na Segunda Guerra Mundial. O tratamento de pacientes intoxicados consiste em uma terapia sorológica, contudo, não é possível reverter os sintomas,

apenas parar a progressão da intoxicação (KOEPEKE; SOBEL; ARNON, 2008). Por esse motivo, Zhang e colaboradores (2013), desenvolveram uma estrutura quimérica denominada Drug Delivery Vehicle-Mas 7 (DDV-Mas 7), composta pelo Mastoparano 7 associada a um fragmento de cadeia pesada não tóxica da BoTx-A. O DDV-Mas 7 é capaz de induzir a liberação de neurotransmissores *in vitro*, revertendo o efeito da BoTx-A. Dessa forma, a acetilcolina pode ser liberada e, conseqüentemente, ocorre a contração muscular e a reversão do efeito da intoxicação.

Quanto aos efeitos neurobiológicos dos mastoparanos, em 1994, Blazquez e colaboradores testaram pela primeira vez o mastoparano clássico, isolado da *Vespula lewisii*, por via intracerebroventricular (i.c.v.), que é a via mais utilizada na pesquisa básica para avaliação da eficácia de substâncias neuroativas. Na dose de 10^{-22} - 10^{-9} mol/ animal, o mastoparano clássico não induziu efeitos neuroativos em camundongos. Contudo, quando injetado em conjunto com peptídeos opióides, observou-se uma considerável e duradoura redução no efeito do Sulfato de morfina e de encefalinas. Apenas 20 anos depois, estudos com o mastoparano Agelaia-MPI demonstraram um efeito antinociceptivo da molécula quando injetado por via i.c.v., contudo em uma dose muito maior que a administrada por Blazquez (GONÇALVES *et al*, 2016). Essa foi a primeira descrição dessa atividade em mastoparanos e sua sequência baseou o desenvolvimento do peptídeo do presente trabalho, o NeuroVAL.

Desde 2009, os mastoparanos têm sido estudados no combate a uma das piores dores descritas por pacientes, a algisia gerada por câncer ósseo. O

peptídeo foi injetado por via intratecal (5 µg/animal), e testado em modelos de algesia induzidos por dor térmica, apresentando um potente efeito antinociceptivo nesses animais com osteosarcoma induzido (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Paralelamente, um efeito neurotóxico em neurônios da placa motora também foi observado com a administração do Polybia-MPII (ROCHA et al., 2009). Essa ação neurotóxica do peptídeo ocorre na região terminal do axônio do neurônio motor, onde ocorrem mudanças patológicas restritas a essa região, sem que se tenha rompimento da membrana ou por ação mitocondrial (ROCHA et al., 2009). Esse peptídeo já tem diversas ações relatadas, como atividade hemolítica e miotóxica (ROCHA et al., 2007, 2008).

Os mastoparanos têm sido considerados importantes ferramentas para o estudo do funcionamento fisiológico normal e patológico e, promissoramente, estão sendo utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

O desenvolvimento do NeuroVAL objetivou reduzir os efeitos citolíticos e neurotóxicos do Agelaia-MP, mantendo-se os efeitos antinociceptivos, além de permitir a passagem do peptídeo pela barreira hematoencefálica (BHE) possibilitando o seu uso futuro como um fármaco.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenhar racionalmente um novo composto peptídico antinociceptivo utilizando o mastoparano Agelaia-MPI como modelo, visando a diminuição dos efeitos adversos e elucidar seu mecanismo de ação

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenhar racionalmente o composto peptídico analgésico com auxílio de ferramentas biotecnológicas;
- ✓ Avaliar os efeitos adversos do novo peptídeo e compará-los aos efeitos do peptídeo natural-modelo e do sulfato de morfina (hemólise, *open-field* e rotarod);
- ✓ Avaliar a eficácia antinociceptiva do novo peptídeo utilizando modelos animais (camundongos Swiss) de indução de dor aguda por estimulação térmica (*tail flick* e *hot plate*);
- ✓ Avaliar os perfis farmacológicos desse composto através de curvas de dose-efeito e tempo-efeito;
- ✓ Determinar o índice terapêutico clínico dos compostos peptídicos (NeuroVAL e Agelaia – MP) em camundongos;
- ✓ Avaliar a expressão da proteína c-Fos em núcleos cerebrais de controle e processamento nociceptivo;
- ✓ Elucidar o mecanismo de ação do NeuroVAL com testes *in vivo* (antagonismo farmacológico, Naloxona e Toxina Pertussis) e *in vitro* *Sucrose gap* e *Patch clamp*.

3. Material e Métodos

3.1. Peptídeos

3.1.1. Desenho racional e síntese

A partir do mastoparano Agelaia-MP (INWLKLGKAIIDAL-NH₂, MM: 1566,95 Da), que apresentou atividade antinociceptiva quando injetado por via i.c.v. (GONÇALVES *et al.*, 2016), foram realizadas modificações de forma a reduzir efeitos adversos intrínsecos de peptídeos da classe dos mastoparanos e aumentar o seu efeito antinociceptivo. Dessa forma, foi desenvolvido o NeuroVAL, e após a definição da sequência desejada foi realizada a síntese em fase sólida do NeuroVAL por duas empresas AminoTech P&D[®] e FastBio[®].

3.1.2. Confirmação da pureza e sequência

Para a confirmação da pureza e da sequência do peptídeo sintetizado quimicamente foi realizada uma análise por espectrometria de massa, utilizando MALDI-TOF/TOF em um equipamento AutoFlex Speed (Bruker Daltonics[®], Alemanha) (Figura 3). Os peptídeos NeuroVAL e Agelaia – MP foram aliquotados, ressuspendidos (solução de água deionizada e acetonitrila – 50%, e água deionizada, respectivamente) e misturados a uma matriz de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinâmico na proporção de 1:3. Posteriormente, essa mistura foi aplicada em duplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384 e após a cristalização, as amostras estavam prontas para análise.

Para a obtenção dos espectros de Massa (MS), o equipamento foi operado no modo refletido positivo, que possui maior exatidão para a determinação de massas diferentes. Já para a obtenção das sequências, espectros MS/MS, foi utilizado o método LIFT.

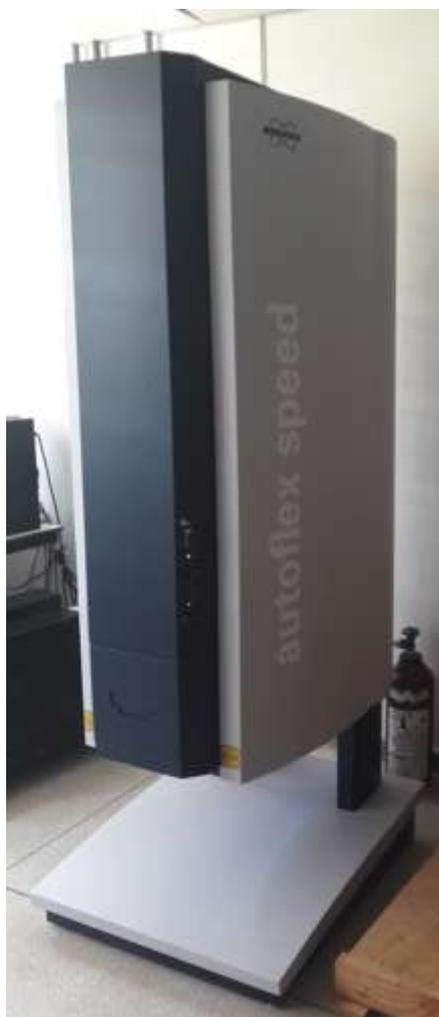


Figura 3: Espectrômetro de massa Autoflex speed (Bruker Daltonics®) do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB.

A interpretação dos espectros obtidos e o sequenciamento *de novo* foram realizados com o auxílio do *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha). Alíquotas do peptídeo foram submetidas às análises citadas a cada

seis meses a fim de monitorar e garantir a estabilidade do composto em estudo.

O grau de pureza de ambos os peptídeos foram informados em laudos fornecidos pelas empresas anexados ao final do trabalho.

3.1.3. Alinhamento

Para se verificar a originalidade do peptídeo, sua sequência de aminoácidos foi comparada com outras sequências de peptídeos neuroativos de vespas e mastoparanos disponíveis na base de dados online BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Para avaliação da similaridade das sequências foi realizado o alinhamento pela ferramenta de múltiplos alinhamentos Clustal W2, que permite comparar mais de três sequências proteicas simultaneamente, também disponível online (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.2. Bioensaios

3.2.1. Compostos e Soluções

Durante o desenvolvimento da tese foram utilizados os seguintes compostos: sulfato de morfina 10 mg/mL (Cristália[®]), toxina pertussis (Sigma[®]), cloridrato de naloxona (Hipolabor[®]), DMSO (Amresco[®]), solução salina 0,9%, Solução Ringer (cloreto de sódio - NaCl 111mM; cloreto de potássio - KCl 1,9

mM, cloreto de cálcio - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,1 mM, bicarbonato de sódio - NaHCO_3 2,4 mM, glicose 10mM para 1 litro de solução pH 7,4), solução de Krebs (NaCl 118 mM; KCl 4,6 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,7 mM; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,1 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM; NaHCO_3 25 mM; glicose 11 mM; pH 7,4), sacarose 30%, solução interna (CsF 105 mM; CsCl 27 mM; NaCl 5 mM; MgCl_2 2 mM; EGTA 10 mM; HEPES 10 mM) e solução externa para células CHO que expressam canais Na_v (NaCl 130 mM; KCl 5 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; HEPES mM; Glicose 10 mM).

3.2.2. Ensaio *in vivo*

3.2.2.1. Sujeitos experimentais

Os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA, 2008) e a lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) foram rigorosamente seguidos. Além disso, esta pesquisa foi devidamente submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/ IB) da Universidade de Brasília, sob os seguintes números de protocolo UnBDoc nº 63878/2011 e 66738/2016. Além disso, foi obtida a Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Processo nº 010476/2013-0) com a finalidade de pesquisa científica.

Camundongos Swiss fêmeas, com 6 a 8 semanas de vida e peso entre 20 e 30 g, foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os animais experimentais foram acondicionados, oito

por gaiola (41x34x16 cm), e mantidos em biotério de manutenção com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período experimental, foram oferecidas água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais de acordo com a Figura 4.

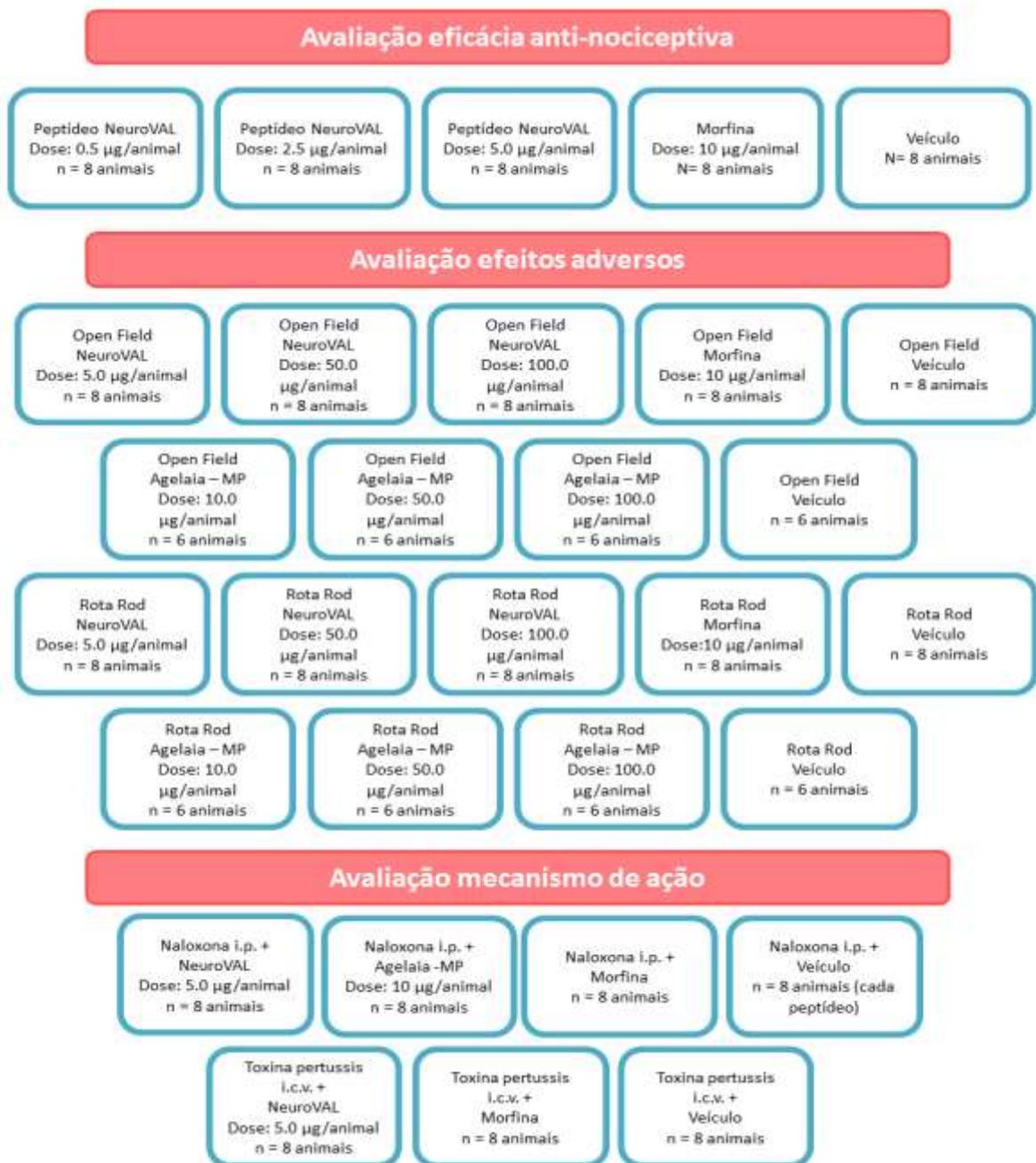


Figura 4: Quadro demonstrativo da divisão dos grupos de animais em cada bioensaio.

Exemplares de rã touro (*Lithobates catesbeianus*) foram adquiridos do ranário Rander (DF) e mantidas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com condições controladas de temperatura, água

e umidade do ar. Esses animais foram utilizados para a avaliação da atividade dos peptídeos NeuroVAL e Agelaia – MP no potencial de ação composto, realizando-se a técnica de *sucrose gap*.

3.2.2.2. Administração do peptídeo nos ensaios *in vivo*

A via de administração escolhida para avaliar a eficácia antinociceptiva do NeuroVAL foi a intracerebroventricular (i.c.v.). Para tanto, foi necessária a realização de uma neurocirurgia, em camundongos, para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral cerebral, de maneira a administrar o composto diretamente no encéfalo. A cânula era composta por um segmento de agulha hipodérmica BD-25X7 (22 G) com 10,0 mm de comprimento e 0,7mm de diâmetro externo.

Os animais foram previamente sedados e anestesiados com uma solução salina de cloridrato de ketamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg). Após a sedação profunda, avaliada pela ausência de reflexos da pata, os animais foram fixados em um estereotáxico (*Insight*[®], Ribeirão Preto, SP). Previamente a cirurgia, foi realizada a limpeza e a desinfecção do campo cirúrgico com Iodo Povidine[®] e a tricotomia da cabeça do animal. Com o campo cirúrgico limpo e deisnfectado foi administrada localmente lidocaína (2%) e norepinefrina (0.01%), para anestésiar e reduzir o sangramento na região da cirurgia. Logo a seguir, o crânio do animal foi exposto para a implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral direito (VLD): Antero – Posterior (AP) – 0,21 mm, Médio – Lateral (ML) – 1,0 mm, Dorso – Ventral (DV) – 2,3 mm, tendo

como base o ponto do Bregma, de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (2012). Após as devidas marcações, foram realizadas duas perfurações no crânio do animal, uma para a implantação da cânula guia no VLD e outra para fixar um parafuso que auxilia na permanência do acrilato dental, aumentando a durabilidade do capacete e no equilíbrio devido à presença da cânula. Após o procedimento, foi administrada uma pomada tópica antimicrobiana (Sulfato de Neomicina e Bacitracina - Nebacetin[®]), como profilaxia para infecções locais.

Ao fim da neurocirurgia, os animais foram encaminhados ao biotério de manutenção sob as condições anteriormente relatadas. Após 4-6 dias de recuperação, foram realizados os bioensaios. Um segmento de agulha gengival de 10,1 mm de comprimento foi utilizado como agulha de injeção, acoplada a uma seringa de precisão (Hamilton[®]) por um filamento de polietileno. Este material permitiu a administração dos compostos pela cânula guia com o auxílio de uma bomba de infusão (AVS Projetos[®]). Os compostos foram injetados com volume final de 1 a 5 μ L/animal e na velocidade 1 μ L/min.

3.2.2.3. Efeitos Adversos

As alterações estruturais realizadas no peptídeo Agelaia – MP que originaram o NeuroVAL, tiveram como objetivo reduzir os efeitos adversos causados pela administração do mastoparano. Para isso foi necessário comparar os efeitos dos dois peptídeos realizando testes de avaliação comportamental (Rotarod e Open Field) e a determinação do índice terapêutico de ambos os compostos.

Foram realizados testes para avaliar, os efeitos do Agelaia – MP e do NeuroVAL, na coordenação motora e na atividade geral espontânea dos

animais. O peptídeo Agelaia – MP foi administrado via i.c.v. nas doses 100, 50 e 10 µg/animal, assim como os controles, veículo (água deionizada) e sulfato de morfina, todos com volume final de 1µL. Já o NeuroVAL também foi administrado via i.c.v. nas doses de 100, 50 e 5 µg/animal, com volumes de 5, 2.5 e 1 µL respectivamente. Somados a dois grupos controle: veículo (água deionizada e DMSO 20%) e sulfato de morfina, ambos com volume final de 1 µL.

- Descoordenação motora

Alterações na coordenação motora e a determinação do índice terapêutico dos peptídeos foram avaliadas no "Rotarod" (Insight®). Para tanto, os animais passaram por um processo de treinamento no equipamento, que consistiu em sessões de cinco ciclos de cinco minutos com intervalos de cinco minutos de descanso entre cada ciclo.

No dia do teste, previamente a injeção, os animais foram selecionados e aqueles que não permaneceram durante cinco minutos no equipamento foram descartados. Foi avaliado o efeito do mastoparano a partir do registro do tempo de latência para queda durante quatro horas nos seguintes períodos de tempo 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min após as injeções.

- Alterações na atividade geral espontânea

Para avaliação da atividade geral espontânea dos animais foi utilizado o ensaio Open Field, que consiste em avaliar os comportamentos do animal após ser posicionado no centro de uma arena de acrílico (60 cm de diâmetro e 12 cm de altura, dividida em 12 quadrantes) durante 20 min. Para facilitar a análise pelo observador, esse experimento foi filmado e analisado com auxílio do software X-Plo-Rat 2005.

Neste bioensaio, foi considerado o tempo total gasto por cada animal em cada um dos seguintes comportamentos: exploratório, imobilidade, autolimpeza e elevação (modificados a partir de, SPELLER; WESTBY, 1996).

3.2.2.4. Testes antinociceptivos

Para a avaliação do efeito antinociceptivo do peptídeo foram utilizados dois modelos de indução de nocicepção térmica: placa quente e retirada de cauda. Os testes avaliam respostas supraespinhais e respostas medulares reflexas, respectivamente.

- Placa Quente

No teste da placa quente (*Hot plate*, AVS projetos[®]), os animais foram colocados em uma cuba de acrílico sobre uma placa quente de alumínio a 55.0 ± 0.5 °C. Os parâmetros de observação foram: as latências de fuga do aparelho (pulo) e lambidas das patas posteriores (Figura 5).

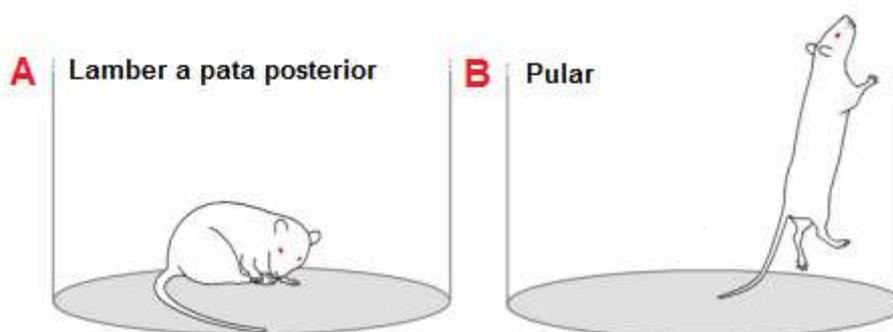


Figura 5: Representação figurada do etograma de comportamentos de nocicepção apresentados pelo animal no teste da placa quente (modificado de CASARRUBEA et al., 2011; GONÇALVES, 2013).

Os animais foram selecionados previamente à neurocirurgia, sendo excluídos aqueles que não apresentaram comportamento de escape em até 15 segundos. No dia do teste, foi determinada uma linha de resposta basal constituída da média de três latências de escape obtidas em intervalos de 5 min antes da sessão teste, caso a latência média fosse superior a 15 segundos o animal também era descartado (BANNON e MALMBERG, 2007). As latências de escape foram registradas após os tratamentos nos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210 e 240 min. Grupos independentes de animais (n=8, por grupo) foram tratados com veículo (solução de água deionizada com 20% de DMSO), sulfato de morfina (20 µg/animal) e NeuroVAL (5, 2.5 e 0.5 µg/animal), todos injetados por via i.c.v. com volume final de 1 µL.

As latências de respostas motoras ao estímulo nocivo (LA – latências de antinocicepção) foram normalizadas pelo índice de antinocicepção (IA) utilizando a fórmula:

$$IA = \frac{(\text{Latência do teste}) - (\text{Latência média basal})}{30 - (\text{Latência média basal})}$$

Onde:

Latência do teste, representa o tempo em segundos que o animal levou para apresentar um comportamento de escape após a administração da droga.

Latência média basal, representa a média de três tempos de escape antes da administração da droga.

Valor 30, representa o tempo máximo em segundos que o animal pode permanecer na placa quente sem apresentar lesão tecidual.

Os resultados foram expressos em médias ± E.P.M. dos valores de IA e

a área sob a curva (AUC).

- *Retirada de Cauda*

O teste de retirada de cauda (*tali-flick*) foi realizado em um equipamento chamado Analgesímetro (Insight[®]) que utiliza o princípio do calor irradiado, cuja cauda do animal é posicionada em um filamento metálico que após acionamento, aumenta a temperatura em velocidade constante (8 °C/s). Um detector de presença infravermelho se comunica com a fonte aquecedora, desligando-a quando há detecção de movimento. Além disso, o Analgesímetro é calibrado para atingir uma temperatura máxima de 75 °C evitando lesões na cauda do animal (BANNON e MALMBERG, 2007; LE BARS et al. 2001).

Assim como mencionado no teste acima, foram registradas as medidas de base antes dos tratamentos em intervalos de cinco minutos sendo que os animais que não apresentaram latência de escape de até 2,0 segundos durante essa base foram automaticamente descartados do teste. As latências de escape foram registradas após os tratamentos nos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210 e 240 min. Grupos independentes de animais (n=8, por grupo) foram tratados com veículo (solução de água deionizada com 20% de DMSO), sulfato de morfina (20 µg/animal) e NeuroVAL (5, 2.5 e 0.5 µg/animal), todos injetados por via i.c.v.

Assim como no teste da placa quente, o IA foi avaliado de acordo com o tempo de permanência no equipamento durante o estímulo térmico. Os resultados foram expressos em médias ± E.P.M. dos valores de IA e a área sob a curva (AUC).

$$IA = \frac{(\text{Latência do teste}) - (\text{Latência média basal})}{6 - (\text{Latência média basal})}$$

Onde:

Latência do teste, representa o tempo em segundos que o animal levou para apresentar um comportamento de escape após a administração da droga.

Latência média basal, representa a média de três tempos de escape antes da administração da droga.

Valor 6, representa o tempo máximo em segundos que o animal pode permanecer na placa quente sem apresentar lesão tecidual.

3.2.2.5. Envolvimento de receptores opióides e da ativação de proteína G na ação antinociceptiva dos peptídeos NeuroVAL e Agelaia – MP.

Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares que levam à resposta antinociceptiva dos peptídeos NeuroVAL e Agelaia-MP foram realizados testes de interação farmacológica com antagonistas opióides e bloqueadores de proteína G *in vivo* e testes eletrofisiológicos *in vitro*.

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados também os teste da placa quente e da retirada de cauda, seguindo-se os mesmos protocolos descritos anteriormente nos testes de avaliação da atividade antinociceptiva. Contudo, previamente ao ensaio, foram aplicados os antagonistas opióide e de proteína G, cloridrato de naloxona e toxina pertussis, respectivamente.

Com a intenção de estudar a interação farmacológica do NeuroVAL com receptores opióides, foi administrado 5 µg de NeuroVAL em cada camundongo via i.c.v. conjuntamente com o antagonista não seletivo cloridrato de naloxona, via i.p. e na dose de 4 mg/kg. Por ter uma meia vida curta, a naloxona foi administrada a cada hora, durante as quatro horas de ensaio, seguindo o mesmo protocolo dos ensaios antinociceptivos já descritos.

Já para avaliar a ação do NeuroVAL ao interagir com receptores acoplados a proteína G, foi injetado 0,25 µg de toxina pertussis em cada animal, seis dias antes do ensaio por via i.c.v. (BLAZQUEZ *et al*, 1994). No dia do ensaio antinociceptivo foram injetados 5 µg do peptídeo por animal também via i.c.v. e, posteriormente, foram realizados os ensaios de indução de dor por estimulação térmica, seguindo-se os mesmo protocolos dos ensaios de eficácia.

3.2.2.6. Análise da Cânula Guia

Após os experimentos de avaliação dos efeitos adversos, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésicos barbitúricos via i.v. (Tiopental sódico - 60 mg/kg) e em seguida foram injetados 10 µL de azul de metileno pela cânula guia. O cérebro do animal foi removido e imerso em uma solução de formol a 4%. Para avaliar a posição da cânula guia foi realizado um corte no plano coronal na região do ventrículo, identificada pelo furo da cânula, com auxílio de uma matriz após imersão de 24h em formalina. O cérebro que apresentou coloração azul nos ventrículos laterais foi considerado como correto e, portanto incluído nas análises estatísticas (Figura 6).

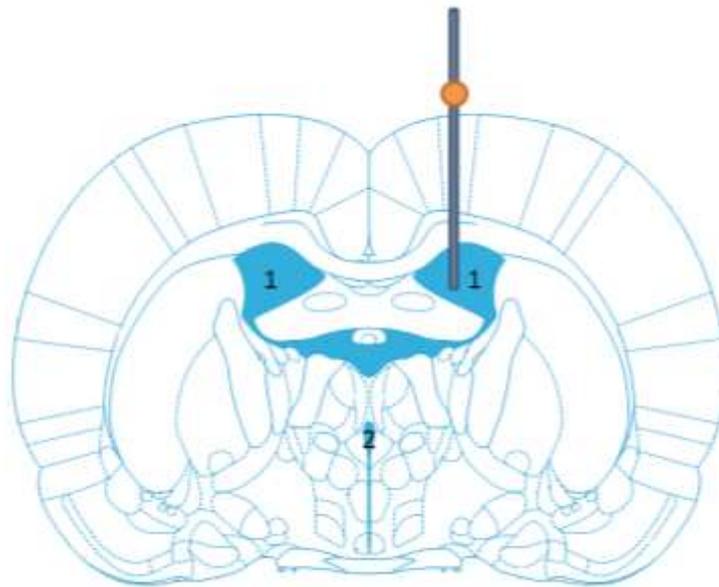


Figura 6: Representação esquemática em corte coronal de encéfalo de camundongo com cânula guia inserida corretamente no ventrículo lateral direito. 1 Ventrículos laterais. 2 Terceiro Ventrículo (Adaptado de PAXINOS; FRANKLING, 2012).

3.2.2.7. Avaliação da expressão da proteína c-Fos

Após os ensaios de avaliação da eficácia antinociceptiva do NeuroVAL, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®] – 50 mg/kg) e perfundidos intracardicamente pelo ventrículo esquerdo. O processo de perfusão tem como objetivo substituir o tecido conjuntivo sanguíneo por formalina, dessa forma, ocorre a fixação do tecido cerebral rapidamente e é possível eliminar vestígios de sangue, que podem confundir a análise do pesquisador durante a leitura dos cortes histológicos.

O sangue foi removido com a injeção de 10 mL de tampão fosfato (PBS, pH 7.4 a 4°C), seguida de 10 mL de solução fixadora formaldeído 4% (PBS 0,5 M; pH 7.4 a 4°C) manualmente. Ao final da perfusão, os cérebros foram

extraídos e pós-fixados em solução de formaldeído 4% por, pelo menos, 24 horas. Após este período os mesmos foram colocados em solução de sacarose 30% (PBS 0.1M) por 48 a 72 horas, até que tenham precipitado.

Os encéfalos foram seccionados a 30 µm em vibrátomo (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental) em três regiões envolvidas no controle e processamento da dor: Núcleo Magno da Rafe (NMR), e Locus Coeruleus (LC). Os cortes foram colocados em solução *anti-freezing* até o processamento imunohistoquímico.

A imunohistoquímica foi iniciada com a lavagem dos cortes em PBS para a remoção completa da solução *anti-freezing*. A primeira etapa da coloração envolve o bloqueio da peroxidase endógena, que foi realizado por uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% durante 30 minutos, a temperatura ambiente e em agitação constante (TS-2000A VDRL Shaker, Biomixer). Essa solução foi removida e os cortes foram lavados com uma solução de PBS com 0.3% de Triton X-100 (PBS-Tx), que favorece a penetração dos anticorpos nas membranas.

Após a remoção do PBS-Tx os cortes foram banhados com soro normal de cabra, utilizado para prevenir ligações inespecíficas dos anticorpos com proteínas intracelulares. Após este tratamento não foram realizadas lavagens, o soro normal de cabra foi retirado e os cortes foram incubados com anticorpo primário, contra proteína c-Fos, produzido em coelho (Sigma), diluído em PBS-Tx 1:1000, durante 48 horas a 4°C, sob agitação constante.

Decorridas as 48 horas de incubação os cortes foram novamente lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário (KPL), anti-IgG de coelho, produzido em cabra, na concentração de 1:200, diluído em PBS-Tx,

durante duas horas a temperatura ambiente e agitação constante. Após a incubação com o segundo anticorpo, os cortes foram lavados duas vezes, com PBS (15 minutos cada).

Após as lavagens, os cortes foram incubados com o complexo PAP (Sigma Aldrich[®]), diluído em PBS na concentração de 1:500, durante 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente e agitação constante. Após essa etapa, as secções foram incubadas em uma solução de 0,006% de 3,3' diaminobenzidina (DAB; Sigma Aldrich[®]), diluída em PBS, por 10 minutos, a temperatura ambiente e agitação constante. Em seguida, foi acrescentado a este meio de incubação, a solução de peróxido de hidrogênio 10%, na proporção de 1:1000 (1µL de solução de peróxido de hidrogênio para cada 1mL de solução de DAB). Os cortes permaneceram com esta solução durante 10 minutos a temperatura ambiente e agitação constante. Ao final do processo imunohistoquímico, os cortes foram lavados várias vezes com PBS e colocados em lâminas gelatinizadas.

Após a secagem dos cortes, estes foram desidratados com soluções crescentes de álcool (70%, 96% e 100%), diafinizados em xilol e montados com Entellan[®] (Merk) e lamínulas.

Para determinar a especificidade da reação, foi realizado um controle que cumpriu todas as etapas descritas nesse protocolo, contudo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

A obtenção das imagens para análise quantitativa da marcação da proteína c-Fos nas estruturas NMR e LC, foi realizada em microscópio óptico (Leica DM2000) acoplado câmera digital (Leica DFC 310 FX), com auxílio do software (Leica, Las V4.1.0).

Em cada imagem as estruturas (NMR e LC) foram identificadas de acordo com o atlas de Paxinos e Frankling (2012). Para essa contagem, foram utilizados de 2-4 animais de cada grupo experimental e de 2-3 cortes diferentes de cada região. A contagem não levou em consideração a intensidade da coloração. Os resultados foram expressos como média de células imunorreativas a c-Fos por região.

3.2.3. Ensaios *in vitro*

3.2.3.1. Atividade hemolítica

A capacidade em induzir hemólise dos peptídeos Agelaia – MP e NeuroVAL foi avaliada em um *pool* de eritrócitos de camundongos Swiss seguindo o protocolo de Rangel e colaboradores (2011). O *pool* obtido após punção intracárdica foi lavado três vezes em solução de Krebs, centrifugado (5000 rpm, 5 min.) e ressuspenso, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos a 4%.

Os peptídeos testados, Agelaia – MP e NeuroVAL, foram solubilizados em Krebs em uma concentração de 0,5 mM e 1 mM, respectivamente. Essas concentrações foram baseadas em MENDES e colaboradores (2004) que avaliaram a atividade hemolítica do Agelaia-MP em hemácias de ratos.

Posteriormente foram diluídos seriadamente em uma placa de 96 poços em triplicata de modo que a maior concentração do Agelaia – MP foi de 500 μ M e a menor de 0,2 μ M. Enquanto que o peptídeo NeuroVAL teve a concentração mais alta de 1 mM e a mais baixa de 0,4 μ M. Em seguida, 50 μ L da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço, obtendo-se um volume final de

100 µL por poço. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante e centrifugadas a 5000 rpm durante 3 min.

O sobrenadante foi transferido e a hemoglobina liberada foi monitorada pela medida da absorbância a 550 nm. Os controles, branco (50 µL de Krebs) e positivo (50 µL de TritonX-100, 1%) foram usados como 0% e 100% de hemólise, respectivamente. A porcentagem de hemólise (%) foi calculada como:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(\text{AB amostra}) - (\text{AB branco})}{(\text{AB controle positivo}) - (\text{AB branco})} \times 100$$

Onde: AB representa a absorbância da amostra medida em 550 nm.

3.2.3.2. Avaliação do efeito do NeuroVAL em ensaios eletrofisiológicos

- *Avaliação da atividade do peptídeo no potencial de ação composto*

A ação do peptídeo sintético NeuroVAL foi avaliada sobre o potencial de ação composto no nervo ciático isolado de rã (*Lithobates catesbeianus*), utilizando a técnica de *Single Sucrose-Gap* (modificada de STRONG; SMITH; KEANA, 1973).

A rã foi anestesiada, teve seus nervos ciáticos retirados e a camada de tecido conjuntivo que recobre o nervo foi cuidadosamente removida, permanecendo somente as fibras. Após o procedimento, o nervo foi colocado horizontalmente na cubeta de experimentação. Esta cubeta é subdividida em

cinco câmaras, de forma que a fibra tenha contato com cada uma das câmaras, que foi isolada mecânica e eletricamente com vaselina, impedindo a comunicação das soluções.

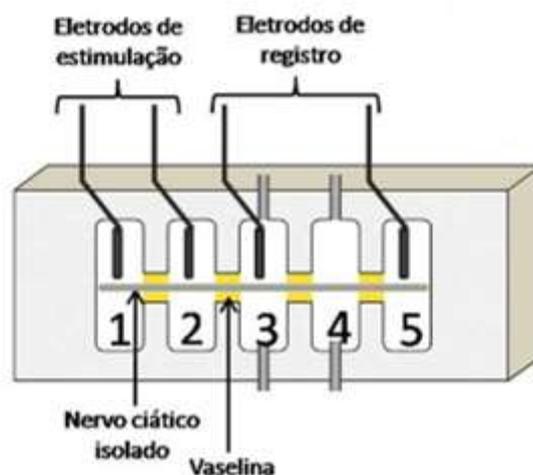


Figura 7: Desenho esquemático da cuba de acrílico para o experimento de sucrose gap. O nervo ciático isolado da rã *L. catesbeianus* foi colocado na canaleta que percorre as cinco câmaras, isoladas mecânica e eletricamente por selos de vaselina. Eletrodos de estimulação posicionados nas câmaras 1 e 2 geram um impulso nervoso que são captados nas câmaras 3 e 5. As câmaras 1, 2, 3 e 5 são preenchidas por solução Ringer e apenas a câmara 4 por solução de sacarose 216 mM. A amostra a ser testada é colocada na câmara 3 que possui um sistema de perfusão para a lavagem, assim como a câmara 4 (Removido de FERNANDES, 2010).

As duas primeiras câmaras foram utilizadas para a estimulação supramáxima, que constitui de pulsos de voltagem de 6 a 7V, com duração de 25 μ s, gerado pelo estimulador (S8- Grass Instruments).

Na terceira câmara, que possui sistema de perfusão e pode ser constantemente lavada, foram aplicadas as amostras NeuroVAL na concentração de 1mM e os controles, água e DMSO 20% e Lidocaína. No

momento da aplicação da amostra o sistema de perfusão foi interrompido por 30 min para avaliação dos efeitos sobre o potencial de ação.

Na quarta câmara, também com sistema de perfusão, foi colocada uma solução de 216 mM de sacarose, renovada constantemente durante todo o período de teste. Com exceção dessa câmara, todas as outras foram preenchidas com solução fisiológica para anfíbios – Ringer (11 mM de NaCl, 1.9 mM de KCl, 2.4 mM de NaHCO₃ e 1.1 mM de CaCl₂) mantendo o nervo submerso.

Os registros foram realizados nas câmaras 3 e 5 por eletrodos de Ag-Cl ligados a um amplificador diferencial DC de alta impedância e com ganho de 50 vezes acoplado a um osciloscópio digital Tektronix TDS 360. Os registros foram anotados e fotografados a cada 5 minutos após a aplicação da amostra durante um tempo de 30 minutos e por igual tempo após a lavagem.

- Avaliação do efeito dos peptídeos em canais iônicos para sódio voltagem dependentes

Estes experimentos foram realizados pela Dra. Marisa Rangel, pesquisadora do Instituto Butantan e professora visitante do Departamento de Ciências Fisiológicas, com o auxílio do aluno Diogo Tibery.

Para verificar a atuação do NeuroVAL em canais de sódio do tipo Na_v1.7, expressos de forma heteróloga em células de ovário de hamster (CHO), foi utilizada a técnica de *Patch Clamp* na configuração *whole-cell*. A técnica consiste na formação de um selo de alta resistência (> 1G Ω) entre a

micropipeta, conectada a um eletrodo de Ag/AgCl, e a membrana da célula. A membrana é então rompida por meio de uma sucção aplicada à pipeta, formando uma continuidade física e elétrica entre a solução contida na micropipeta (solução interna) e o citoplasma.

As micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de vidro utilizando-se um estirador e foram preenchidas com a solução interna para canais Na_v. Os registros das correntes de sódio foram obtidos em temperatura controlada a 22 °C, através de um amplificador EPC 10 *Patch-clamp* (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Alemanha), em um computador pelo *software PatchMaster* (Figura 7).



Figura 8: *Set-up* completo de *patch clamp* do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB (Foto: Ana Carolina Orlandi).

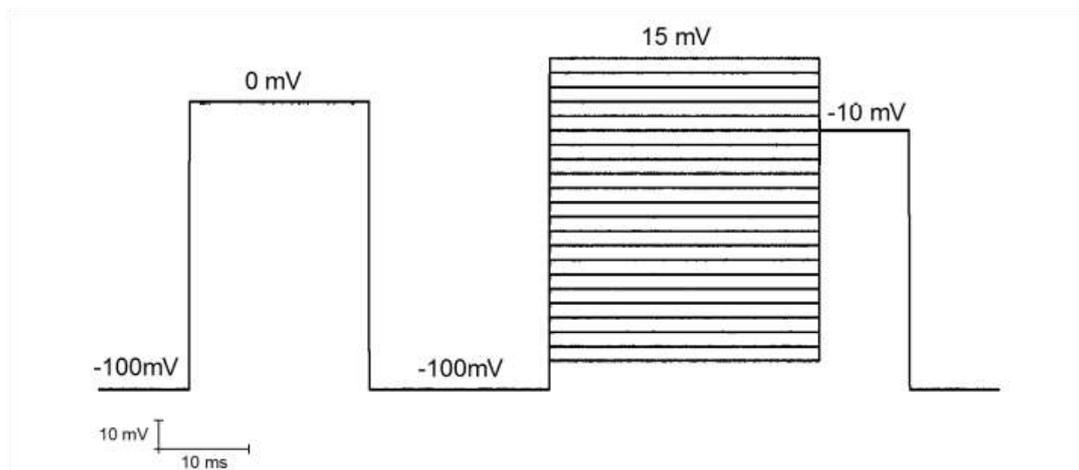


Figura 9: Protocolo de estímulo para células CHO expressando o canal Na_v 1.7.

O protocolo de estímulo dos experimentos realizados no *patch clamp* possuía três etapas, um pré-pulso, que eleva a voltagem da membrana em 100 mV, um pulso que eleva a voltagem da membrana gradativamente em 115 mV e um pós-pulso que eleva a voltagem da membrana em 90 mV imediatamente após o pulso (Figura 8).

O peptídeo NeuroVal foi diluído a 1mM (Milli-Q e DMSO na proporção 95:5) e testado nas concentrações de 50 e 100 μM. Experimentos controle realizados com Milli-Q e DMSO nas mesmas proporções empregadas na diluição do peptídeo não causaram alterações durante o experimento.

Os dados de condutância (g) por voltagem (v) foram ajustados em uma função de Boltzmann para análise da dependência de voltagem e inibição de corrente.

$$y = \frac{1}{1 + e^{(V - V_{as})/k}}$$

3.3. Análise Estatística

Os testes de eficácia antinociceptiva, avaliação *in vivo* do mecanismo de ação e avaliação do comprometimento motor pelo rotarod, foram submetidos ao teste de análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*two-way* ANOVA). Os dados apresentam duas variáveis, tratamento e tempo, que precisam ser avaliadas de forma isolada e em interação. Como pós-teste foi utilizado o Bonferroni.

Enquanto, as áreas sob a curva e os dados do ensaio da avaliação geral espontânea foram analisados usando ANOVA de uma via, seguidas do teste de Tukey como pós-teste, assim como os dados dos ensaios comportamentais para avaliação dos efeitos adversos.

A avaliação da Dose Efetiva 50 (DE₅₀), concentração do fármaco que provoca metade da resposta analgésica máxima, e da Dose Tóxica 50 (DT₅₀), concentração do fármaco que provoca metade da resposta tóxica máxima (latência de desequilíbrio e queda do equipamento), foi realizada pela análise da curva dose-efeito gerada pelos testes de eficácia antinociceptiva e de toxicidade no rotarod. Para isso foi realizada uma regressão logarítmica não-linear com o índice de antinocicepção para a DE₅₀ e a mesma análise com o tempo de latência para a queda do equipamento rotarod na DT₅₀.

Todas as análises estatísticas computacionais foram realizadas no software *GraphPad Prism*® 6.0.

----- Início da parte confidencial -----

----- **Fim da parte confidencial** -----

5. Conclusões

Através dos resultados analisados e apresentados na presente tese, pode-se concluir que:

- ✓ O peptídeo sintético NeuroVAL possui sequência inédita.
- ✓ O peptídeo NeuroVAL não apresentou efeito hemolítico.
- ✓ A atividade geral espontânea dos animais não foi alterada em nenhuma das doses testadas de NeuroVAL. Entretanto, houve alteração na coordenação motora quando avaliada pelo teste do rotarod.
- ✓ O peptídeo NeuroVAL apresentou um potente efeito antinociceptivo quando injetado via i.c.v. em camundongos, nos testes da placa quente e da retirada de cauda.
- ✓ O mecanismo de ação do peptídeo nos testes antinociceptivos foi parcialmente elucidado por ensaios eletrofisiológicos e antagonismo farmacológico.
- ✓ A administração do peptídeo NeuroVAL via i.c.v. alterou a expressão basal de c-Fos em regiões encefálicas específicas de processamento nociceptivo, NMR e LC.
- ✓ Apesar de o mastoparano Agelaia-MP ser um antinociceptivo eficaz, ele produz um comprometimento motor significativo em camundongos quando injetado via i.c.v. em doses 5 e 10 vezes maiores que a efetiva.

6. Referências

ALEXANDER, S. P. et al. The concise guide to pharmacology 2015/16: voltage-gated ion channels. *Br. J. Pharmacol.* v172 p. 5904-5941. 2015.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, dez. 2011.

AMBUDKAR, S. V et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, p. 361–398, 1999.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: An overview. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 47, n. 6, p. 415–433, 1998.

ANTOSOVA, Z. et al. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 628–635, nov. 2009.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13697–13702, 1983.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, Mastoparan C and Cabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10106–10111, 1984.

ARROWSMITH, J. A decade of change. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 1, p. 17–18, 2012.

BANNON, A. W. e MALBERG, A. B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. **Curr Protoc Neurosci**. Cap.8. Unidade 8.9. 2007.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B. **Análise Peptidômica Dos Venenos De Vespas Sociais Neotropicais**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2011.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B. et al. Agelaia MP-I: A peptide isolated from the venom of the social wasp, *Agelaia pallipes pallipes*, enhances insulin secretion in mice pancreatic islets. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 596–602, 2012.

BARRETO, R. D. F. et al. Avaliação de dor e do perfil epidemiológico, de pacientes atendidos no pronto-socorro de um hospital universitário. **Revista Dor**, v. 13, n. 3, p. 213–219, 2012.

BERNARDI, P. et al. The mitochondrial permeability transition. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 8, n. 3-4, p. 273–281, 1998.

BLAZQUEZ, P. S. e GARZON, J. Mastoparan reduces the supraspinal analgesia mediated by IX/6-opioid receptors in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.258 p.159-162. 1994.

BOCKAERT, J.; PIN, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. **The EMBO journal**, v. 18, n. 7, p. 1723–1729, abr. 1999.

BOLHASSANI, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid

and drug delivery in cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1816, n. 2, p. 232–46, 2011.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European journal of pain (London, England)**, v. 10, n. 4, p. 287–333, maio 2006.

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BYRNE, J. H. e DAFNY, N. (eds.), Neuroscience Online: An Electronic Textbook for the Neurosciences <http://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/> Department of Neurobiology and Anatomy, The University of Texas Medical School at Houston (UTHealth) © 1997, all rights reserved.

CARTER, V. et al. Killer Bee Molecules: Antimicrobial Peptides as Effector Molecules to Target Sporogonic Stages of Plasmodium. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2013.

CASARRUBEA, M. et al. Learning influence on the behavioral structure of rat response to pain in hot-plate. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 177–183, 2011.

CATTERALL, W.A.; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol Rev.** v57 p. 397-409. 2005.

CHAMBERS, R. B. et al. Interferon alfa-associated retinopathy. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 97, n. 1, p. 43–45, jan. 1997.

CHEN, W. et al. Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1887–1892, 2008.

CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 640–665, 2012.

CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 387–396, jun. 2001.

COUNTS, S. E.; PEREZ, S. E.; MUFSON, E. J. Galanin in Alzheimer's disease: neuroinhibitory or neuroprotective? **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 12, p. 1842–1853, jun. 2008.

CREGG, R. et al. Pain channelopathies. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 11, p. 1897–1904, jun. 2010.

CSORDAS, A.; MICHL, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 7, n. 2, p. 103–108, set. 1969.

DA SILVA, A. V. R. et al. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2357–2368, 2014.

DANIEL, S. et al. A link between Cdc42 and syntaxin is involved in mastoparan-stimulated insulin release. **Biochemistry**, v. 41, n. 30, p. 9663–9671, jul. 2002.

DE AZEVEDO, R. A. et al. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor

activity in vivo. **Peptides**, v. 68, p. 113–119, 2015.

DE SOUZA, B. M. Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas. **Biologia**, 2006.

DE SOUZA, B. M. et al. Investigating the effect of different positioning of lysine residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 77–90, 2011.

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacological reviews**, v. 48, n. 4, p. 567–592, 1996.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **European biophysics journal : EBJ**, v. 37, n. 6, p. 879–891, jul. 2008.

EIJIKELKAMP, N. et al. Neurological prospectives on voltage-gated sodium channels. **Brain**. v135 p.1585-2612. 2012.

EDDLESTONE, G. T. et al. Mastoparan increases the intracellular free calcium concentration in two insulin-secreting cell lines by inhibition of ATP-sensitive potassium channels. **Molecular pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 787–797, abr. 1995.

FERNANDES, S. C. R. Caracterização química e biológica de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira *Nhandu coloratovillosus* (Shimitd, 1998). Universidade de Brasília, 2010.

FERRANDIZ-HUERTAS, C. et al. Trafficking of ThermoTRP Channels. **Membranes**, v. 4, n. 3, p. 525–564, 2014.

FORNI, J. E. N.; JALIKHIAN, W. **Dor do crescimento Revista Dor scielo** , 2011.

FRANCESCHINI, A.; ADINOLFI, E. P2X receptors: New players in cancer pain. **World journal of biological chemistry**, v. 5, n. 4, p. 429–436, nov. 2014.

GARCIA, T. J. et al. Efeitos colaterais do tratamento da hepatite C no polo aplicador do ABC. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 5, p. 543–549, 2012.

GHOSH, P. Heterotrimeric G proteins as emerging targets for network based therapy in cancer: End of a long futile campaign striking heads of a Hydra. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 7, p. 469–474, jul. 2015.

GILRON, I.; DICKENSON, A. H. Emerging drugs for neuropathic pain. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 19, n. 3, p. 249–259, 2014.

GONÇALVES, J. C. Identificação e efeitos antinociceptivos de um mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus* . 2013.

GONÇALVES, 2016

GONZÁLEZ-MAESO, J. et al. Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of alpha(2A)-adrenoceptors. **Molecular psychiatry**, v. 7, n. 7, p. 755–767, 2002.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, S. et al. Involvement of enkephalins in the inhibition of osteosarcoma-induced thermal hyperalgesia evoked by the blockade of peripheral P2X3 receptors. **Neuroscience Letters**, v. 465, n. 3, p. 285–289,

2009.

GUIXA-GONZALEZ, R. et al. Crosstalk within GPCR heteromers in schizophrenia and Parkinson's disease: physical or just functional? **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 8, p. 1119–1134, 2012.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **The American journal of physiology**, v. 258, n. 5 Pt 1, p. C755–86, maio 1990.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, set. 2000.

HELAL, J.; ZACHARIAS, L. C.; DE ALENCAR, L. M. Trombose de veia central da retina em paciente usu??ria de interferon e ribavirina: Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 4, p. 601–604, 2006.

HENRIKSEN, J. R. et al. Side chain hydrophobicity modulates therapeutic activity and membrane selectivity of antimicrobial peptide mastoparan-X. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.

HENSCHKE, N. et al. Economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v.90 p. 139-147. 2015.

HIGASHIJIMA, T. et al. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **Journal of**

Biological Chemistry, v. 263, n. 14, p. 6491–6494, 1988.

HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942–1944, ago. 1979.

HO, C. L. e HUANG, L. L. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. **Biochem J.** v274 p. 453-456. 1991.

HODKING, A. L. e HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **J. Physiol.** v117, p. 500-544. 1952.

ISOM, L. L. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. **Neuroscientist.** v7 p. 42-54. 2001.

JONES, S. et al. Mitoparan and target-selective chimeric analogues: membrane translocation and intracellular redistribution induces mitochondrial apoptosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 5, p. 849–863, maio 2008.

JONES, S.; HOWL, J. Biological applications of the receptor mimetic peptide mastoparan. **Current protein & peptide science**, v. 7, n. 6, p. 501–508, 2006.

JULIUS, D. Molecular mechanisms of nociception . **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KAWANO, T. et al. Retinal complications during interferon therapy for chronic hepatitis C. **The American journal of gastroenterology**, v. 91, n. 2, p. 309–313, fev. 1996.

KELLENBERGER, S.; SCHILD, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. **Physiological reviews**, v. 82, n. 3, p. 735–767, jul. 2002.

KOEPKE, R.; SOBEL, J.; ARNON, S. S. Global occurrence of infant botulism, 1976-2006. **Pediatrics**, v. 122, n. 1, p. e73–82, jul. 2008.

KONNO, K. et al. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**. v38 p. 1505-1515. 2000.

KONNO, K. et al. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Peptides**. v27 p.2624-2631. 2006.

KRELING, M. C.; CRUZ, D.; PIMENTA, C. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 59, n. 1, p. 509–513, 2006.

LAGERSTROM, M. C.; SCHIOTH, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 4, p. 339–357, abr. 2008.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.

LEE, Y.; LEE, C.-H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Molecules and cells**, v. 20, n. 3, p. 315–324, 2005.

LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic

activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 91–100, 2011.

LEITE, N. B. et al. PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 5, p. 936–947, 8 dez. 2015.

LIN, C. H. et al. In vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli isolates from animals. **Peptides**, v. 36, n. 1, p. 114–120, 2012.

LINDGREN, M.; LANGEL, U. Classes and prediction of cell-penetrating peptides. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 683, p. 3–19, 2011.

MARQUEZ, J. O. **Dor Diagnóstico e Tratamento Bases de anatomia e fisiopatologia**. [s.l: s.n.]. v. 1, 2004.

MARQUSEE, S.; ROBBINS, V. H.; BALDWIN, R. L. Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 14, p. 5286–5290, jul. 1989.

MARTINS, R. T. et al. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75–79, 2012.

MASON, J. M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. **Future medicinal chemistry**, v. 2, n. 12, p. 1813–1822, dez. 2010.

MENDES, M. A. et al. Structural and biological characterization of two novel

peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 67–74, 2004.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 101–106, 2005.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome biology**, v. 1, n. 4, 2000.

MIZOGUCHI, H. et al. New vistas in opioid control of pain. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 87–91, 2012.

MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 28, n. 4, p. 423–472, nov. 1995.

MORENO, M.; GIRALT, E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1126–1150, 2015.

MORTARI, M. R. et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 860–869, 2007.

MUCHA, R. F.; VOLKOVSKIS, C.; KALANT, H. Conditioned increases in locomotor activity produced with morphine as an unconditioned stimulus, and the relation of conditioning to acute morphine effect and tolerance. **Journal of**

comparative and Physiological Psychology. v95 p.351-362. 1981.

NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v. 25 Suppl, p. S115–21, 1986.

NEUMANN, H.; NEUMANN-STAUBITZ, P. Synthetic biology approaches in drug discovery and pharmaceutical biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 75–86, jun. 2010.

NÓBREGA, M. M. Síntese, purificação, caracterização e análise da atividade antinociceptiva de peptídeos opióides. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

OZAKI, Y. et al. Mastoparan, a wasp venom, activates platelets via pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 170, n. 2, p. 779–785, jul. 1990.

PANDIT, N. K. Introdução Às Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro, 1 ed. 2008.

PARK, H. J.; MOON, D. E. Pharmacologic management of chronic pain. **The Korean journal of pain**, v. 23, n. 2, p. 99–108, 2010.

PASQUALOTTI, A.; SILVEIRA, M. M.; COLUSSI, E. L. Prevalence of Chronic Pain in Adults and Elderly. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, p. 39–44, 2012.

PATTI, C. L. et al. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. v81 p.923-927. 2005.

PAXINOS, G. e FRANKLING, K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4^a ed. **Academic Press**. 2012.

PFEIFFER, D. R. et al. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4923–4932, mar. 1995.

POOGA, M. et al. Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 863, p. 450–453, dez. 1998.

POWER, I. An update on analgesics. **Br J Anaesth.** 107(1):19-24. 2011.

PURVES, D. et al. **Neuroscience**. [s.l: s.n.].

RANG, H.P., DALE, M.M. et al. Farmacologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANGEL, M. et al. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon**. v57 p. 1081-1092. 2011.

ROCHA, T. et al. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 589–599, 2007.

ROCHA, T. et al. Mastoparan effects in skeletal muscle damage: An ultrastructural view until now concealed. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 3, p. 220–229, mar. 2008.

ROCHA, T. et al. The neurotoxicological effects of mastoparan *Polybia*-MP II at the murine neuromuscular junction: An ultrastructural and immunocytochemical study. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 4, p. 395–404, 2009.

RUIZ, M. DE L.; KRAUS, R. L. . Voltage-Gated Sodium Channels : Structure , Function , Pharmacology and Clinical Indications. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2015.

SAMPLE, C. J. et al. A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses. **Peptides**, v. 48, p. 96–105, 2013.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; GARZÓN, J. Mastoparan reduces the supraspinal analgesia mediated by μ/δ - opioid receptors in mice. **Eroupean Journal of Pharmacology**, v. 258, p. 159–162, 1994.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; GARZÓN, J. alpha N-acetyl-beta-endorphin-(1-31) disrupts the diminishing effect of mastoparan on opioid- and clonidine-evoked supraspinal antinociception in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 273, n. 2, p. 787–792, 1995.

SATO, A. K. et al. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 638–642, dez. 2006.

SCHIAVON, E. et al. Voltage-gated sodium channel isoform-specific effects of pompilidotoxins. **FEBS Journal**. v277 p. 918-930. 2010.

SFORÇA, M. L. et al. How C-Terminal Carboxyamidation Alters the Biological Activity of Peptides from the Venom of the Eumenine Solitary Wasp. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5608–5617, 2004.

SILVA, J. et al. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3179–3209, 2015.

SPELLER, J. M.; WESTBY, G. W. Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei. **Experimental brain research**, v. 110, n. 3, p. 425–434, ago. 1996.

STRONG, P. N.; SMITH, J. T.; KEANA, J. F. A convenient bioassay for detecting nanomolar concentrations of tetrodotoxin. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 11, n. 5, p. 433–438, ago. 1973.

THATHIAH, A.; DE STROOPER, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73–87, fev. 2011.

THEILE, J. W.; CUMMINS, T. R. Recent Developments Regarding Voltage-Gated Sodium Channel Blockers for the Treatment of Inherited and Acquired Neuropathic Pain Syndromes. **Frontiers in Pharmacology**. 2:54. 2011.

TODOKORO, Y. et al. Structure of Tightly Membrane-Bound Mastoparan-X, a G-Protein-Activating Peptide, Determined by Solid-State NMR. **Biophys. J.**, v. 91, n. 4, p. 1368–1379, 2006.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 387–417, 2007.

VIOLANTE, G. et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* v25 p.1600-1603. 2002.

WANG, K. et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, n. 6,

p. 963–968, 2008.

WENZEL, J. W. e CARPENTER, J. M. Comparing methods: adaptative traits and tests of adaptation. **Phylogenetics and Ecology**. 1994.

WEBLING, K. E. B. et al. Galanin receptors and ligands. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, p. 146, 2012.

WHO. Persisting pain in children package: WHO Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. 2012.

YAJIMA, Y. et al. Mastoparan-stimulated prolactin secretion in rat pituitary GH3 cells involves activation of Gq/11 proteins. **Endocrinology**, v. 138, n. 5, p. 1949–1958, maio 1997.

YAMAMOTO, T. et al. Mastoparan peptide causes mitochondrial permeability transition not by interacting with specific membrane proteins but by interacting with the phospholipid phase. **FEBS Journal**, v. 281, n. 17, p. 3933–3944, 2014.

YANDEK, L. E. et al. Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. **Biophysical journal**, v. 92, n. 7, p. 2434–2444, 2007.

YANG, X. et al. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. **Toxicon**, v. 74, p. 151–157, 2013.

ZARE-ZARDINI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; ORDOOEI, M. Identification and Biochemical Characterization of a New Antibacterial and Antifungal Peptide Derived from the Insect *Sphodromantis viridis*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80,

n. 4, p. 433–440, 2015.

ZHANG, P. et al. Mastoparan-7 rescues botulinum toxin-A poisoned neurons in a mouse spinal cord cell culture model. **Toxicon**, v. 76, p. 37–43, 2013.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1241, n. 2, p. 139–176, jul. 1995.