



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Atividade anticonvulsivante do Ppnp7, um neuropeptídeo  
isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista***

Lucianna Lopes do Couto

Brasília, DF

Fevereiro, 2012



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Atividade anticonvulsivante do Ppnp7, um neuropeptídeo  
isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista***

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal da Universidade de  
Brasília, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre  
em Biologia Animal.

Lucianna Lopes do Couto

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

Fevereiro, 2012

## Dedicatória

*Aos meus pais, Maria Olívia e Henri*

*Ao meu irmão, Fillipe*

*À minha amiga, Naiara*

*À minha orientadora, Márcia*

“A fé e a razão: as duas asas pelas quais  
nos elevamos para a contemplação da Verdade”

*João Paulo II*

## Agradecimentos

A Deus, por tudo.

À minha família inteira, pelo amor incondicional.

À Naiara, pela amizade e pelo apoio.

Ao Gustavo, pelo carinho e pela ajuda.

Às minhas amigas e aos meus amigos, pelo incentivo.

À minha orientadora, Márcia, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade.

Às vespas e aos ratos.

Aos professores do LTx, Elisabeth, Carlos, Osmino, pelos ensinamentos e pela companhia.

Ao Prof Dr Luciano, pela colaboração para a realização da espectrometria de massa.

Ao Prof Dr Fernando Noll, pela colaboração para a identificação das vespas.

Às minhas amigas e colegas da farmacologia, Priscilla, Cecília, Flávia, Jacqueline, Karla, Larissa, Luiza, Adriana, Juliana, Bruna, Maíra, Lilian, Lorena, pelo apoio e pela companhia.

Aos amigos e colegas do LTx, pela ajuda e companhia.

Ao DPP-UnB e CNPq, à CAPES e FAPDF, pelo apoio financeiro.

Aos colegas do PPG BioAni, pela companhia.

Ao PPG BioAni, pela oportunidade.

## Sumário

Lista de Figuras e Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução .....	- 1 -
1.1. Epilepsia .....	- 1 -
1.1.1. Mecanismos de ação e fármacos antiepilépticos.....	- 2 -
1.2. Venenos e peçonhas de animais .....	- 6 -
1.2.1. A peçonha de vespas .....	- 8 -
1.2.1.1. Peçonha da vespa social <i>Polybia paulista</i> .....	- 14 -
2. Objetivos .....	- 16 -
2.1. Objetivo geral.....	- 16 -
2.1.1. Objetivos específicos .....	- 16 -
3. Material e métodos.....	- 17 -
3.1. Isolamento e caracterização do neuropeptídeo a partir da peçonha da vespa social <i>Polybia paulista</i> .....	- 17 -
3.1.1. Coleta e primeiros procedimentos .....	- 17 -
3.1.2. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência .....	- 18 -
3.1.3. Análise por meio de espectrometria de massa .....	- 19 -
3.2. Bioensaios .....	- 20 -
3.2.1. Manutenção dos animais .....	- 21 -
3.2.2. Procedimento para a implantação de uma cânula guia em ratos ...	- 21 -
3.2.3. Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	- 22 -
3.2.4. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos .	- 24 -

3.2.5.	Avaliação do comprometimento motor.....	- 26 -
3.3.	Análises histológicas.....	- 27 -
3.4.	Análises estatísticas.....	- 28 -
4.	Resultados .....	- 29 -
4.1.	Análises histológicas.....	- 29 -
4.2.	Bioensaios realizados com os CBMM-Pp .....	- 30 -
4.2.1.	Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	- 30 -
4.2.2.	Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos .	- 32 -
4.3.	Separação por cromatografia líquida de alta eficiência.....	- 34 -
4.4.	Análise por espectrometria de massa .....	- 37 -
4.5.	Bioensaios realizados com o Ppnp7 .....	- 42 -
4.5.1.	Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	- 42 -
4.5.2.	Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos .	- 45 -
4.5.3.	Avaliação do comprometimento motor.....	- 50 -
5.	Discussão.....	- 52 -
6.	Conclusões .....	- 60 -
7.	Anexo .....	- 61 -
8.	Referências Bibliográficas.....	- 62 -

Apêndice

## Lista de Figuras e Tabelas

**Figura 1.** Representação de uma região sináptica com os principais elementos celulares (adaptada de Mortari *et al*, 2007a e Berne *et al*, 2004). O funcionamento inapropriado destes elementos pode levar ao desenvolvimento da epilepsia, e, neste contexto, os fármacos antiepilépticos devem antagonizar a condição patológica e estabelecer novamente o equilíbrio. - 5 -

**Figura 2.** Exemplar de *Polybia paulista*. - 13 -

**Figura 3.** (A) Coleta de um ninho com exemplares da vespa social *Polybia paulista*. (B) Ninho com exemplares desta vespa. - 17 -

**Figura 4.** Etapas do procedimento para a implantação de uma cânula guia em ratos. (A) Após a anestesia, o rato foi fixo em um estereotáxico. (B) O crânio foi exposto para a implantação da cânula no ventrículo lateral (C) com base na linha do bregma. (D) No fim do procedimento, a cânula foi fixa com acrílico dental. - 22 -

**Figura 5.** Arena para o bioensaio do campo aberto, para a avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos. - 25 -

**Figura 6.** Bioensaio do *rotarod*, para a avaliação do comprometimento motor. - 27 -

**Figura 7.** Análises histológicas. (A) Após a eutanásia dos ratos, cada cérebro foi retirado depois de uma injeção via i.c.v. do corante azul de metileno. A seta branca evidencia a marca da cânula, e a linha tracejada representa o local do corte. (B) Corte com um exemplo de uma cânula corretamente posicionada durante o

procedimento para a sua implantação. O corante foi injetado apenas em um ventrículo lateral, mas todo o ventrículo cerebral foi corado. - 29 -

**Figura 8.** Curva de porcentagem de proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses (350, 210 e 70 µg/animal) dos CBMM-Pp (n = 5-8). Para o cálculo da DE<sub>50</sub> foi feita a análise de Probit. - 30 -

**Figura 9.** Latência para o início da crise máxima induzida pelo PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n = 5-8) dos CBMM-Pp (350, 210 e 70 µg/animal). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo DZP; + $p < 0,05$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo CBMM-Pp 70 µg/animal. - 31 -

**Figura 10.** Tempo total, em segundos, gasto pelos ratos (n = 5-6) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto, após a injeção dos CBMM-Pp (350, 210 e 70 µg/animal). As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey. \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo veículo. - 33 -

**Figura 11.** Número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos (n = 5-6) na arena do bioensaio do campo aberto em 30 min, após a injeção dos CBMM-Pp (350, 210 e 70 µg/animal). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo. a) DZP, b) 70 µg/animal, c) 210 µg/animal e d) 350 µg/animal. - 34 -

**Figura 12.** Perfil cromatográfico obtido a partir da separação dos CBMM-Pp por cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna de fase reversa semipreparativa C18 Vydac®, com os solventes água deionizada e acetonitrila,

eluição com 5% de acetonitrila por 20 min e em seguida com 5% até 60% de acetonitrila em 40 min, fluxo de 2 mL/min, absorvância monitorada a 214 nm. As três setas azuis indicam as frações testadas nos bioensaios para avaliar a atividade anticonvulsivante. - 35 -

**Figura 13.** Perfil cromatográfico obtido a partir da separação da fração de número 7 por cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna de fase reversa analítica C18 Synergi Phenomenex®, com os solventes água deionizada e acetonitrila, eluição com 5% até 45% de acetonitrila em 80 min, fluxo de 1 mL/min, absorvância monitorada a 214 nm. - 36 -

**Figura 14.** Espectro de massa da fração 7 obtido em MALDI TOF/TOF, com o íon majoritário. - 37 -

**Figura 15.** Espectro de massa obtido em MALDI TOF/TOF do Ppnp7, com alto grau de pureza. - 38 -

**Figura 16.** Sequenciamento *de novo* do Ppnp7. Foram consideradas as séries de íons *y*, assinalada acima, e *b*, assinalada abaixo, com a representação dos aminoácidos por letras. - 40 -

**Figura 17.** Espectros de massa obtidos em MALDI TOF/TOF para verificar a digestão com tripsina, nos tempos 0, 2, 4 e 8 h após a mistura da enzima com o peptídeo. - 41 -

**Figura 18.** Curva de porcentagem de proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses (4,5, 3 e 1,5 µg/animal) do neuropeptídeo Ppnp7 (n = 5-8). Para o cálculo da DE<sub>50</sub> foi feita a análise de Probit. - 43 -

**Figura 19.** Latência para o início da crise máxima induzida pelo PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais (n = 5-8) do Ppnp7 (4,5, 3 e 1,5 µg/animal). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; ## $p < 0,01$  comparado ao grupo DZP. - 44 -

**Figura 20.** Curva de porcentagem de sobrevivência durante o bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante do Ppnp7, nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal (n = 5-8). - 44 -

**Figura 21.** Duração relativa da crise epiléptica máxima induzida por PTZ no bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante do Ppnp7, nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal (n = 5-8). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. - 45 -

**Figura 22.** Tempo total, em segundos, gasto pelos ratos (n = 5-7) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal. As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo DZP. - 47 -

**Figura 23.** Tempo acumulado, em segundos, gasto pelos ratos (n = 5-7) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$

comparado ao grupo DZP. a) DZP, b) 1,5 µg/animal, c) 3 µg/animal e d) 4,5 µg/animal. - 48 -

**Figura 24.** Número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos (n = 5-7) durante os 30 min do bioensaio do campo aberto, após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; + $p < 0,05$  e ++ $p < 0,01$  comparado ao grupo DZP. a) DZP, b) 1,5 µg/animal, c) 3 µg/animal e d) 4,5 µg/animal. - 50 -

**Tabela 1.** Exemplos de compostos de alta massa molecular já identificados a partir da peçonha de vespas, de acordo com a espécie. - 9 -

**Tabela 2.** Classificação das crises epilépticas, de acordo com Racine (1972), e modificada por Lüttjohann e colaboradores (2009). - 24 -

**Tabela 3.** Descrição dos comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto (modificados a partir de Speller e Westby, 1996). - 25 -

**Tabela 4.** Latências médias para a queda dos ratos do equipamento *rotarod* nos tempos considerados durante o bioensaio (média ± EPM). - 51 -

## Resumo

Couto LL. *Atividade anticonvulsivante do Ppnp7, um neuropeptídeo isolado da peçonha da vespa social Polybia paulista* [dissertação]. Brasília: Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2012. 72p.

A epilepsia é um distúrbio neurológico complexo, manifestado por aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo, e 90% destas estão em países em desenvolvimento. Para o tratamento dos diferentes tipos de epilepsia, existem no mercado diversos fármacos, porém muitos destes geralmente são caros, apresentam limitações e produzem efeitos colaterais, e assim reduzem a qualidade de vida do paciente. Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos é importante, e, neste contexto, os compostos neuroativos isolados da peçonha de artrópodes e, em especial, de vespas, são um recurso em potencial, pois atuam com afinidade e especificidade nas funções sinápticas excitatórias e inibitórias de mamíferos. O objetivo desta pesquisa foi identificar um peptídeo anticonvulsivante na peçonha de *Polybia paulista*. Vespas foram coletadas no Distrito Federal após obtenção de licença de coleta e manutenção. Glândulas e reservatórios de peçonha foram homogeneizados em água deionizada e acetonitrila 1:1 e centrifugados, e o sobrenadante foi ultrafiltrado com um filtro de até 3000 Da, para a obtenção dos compostos de baixa massa molecular (CBMM-Pp). Para a separação dos CBMM-Pp, foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna de fase reversa semipreparativa (RP-HPLC). A fração com atividade anticonvulsivante foi recromatografada em coluna analítica, e o neuropeptídeo, Ppnp7, foi submetido à espectrometria de massa MALDI TOF/TOF para obtenção da massa molecular, da sequência de aminoácidos e do grau de pureza. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram submetidos a um procedimento para implantação de uma cânula no ventrículo lateral, para injeção via i.c.v. Para a avaliação da atividade anticonvulsivante, foi utilizado o modelo de indução química aguda de crises epiléticas por meio do convulsivante pentilenotetrazol (subcutânea, 105 mg/kg). Foram registradas a ocorrência de e a latência para o início da crise epilética máxima. A avaliação de possíveis alterações na atividade geral espontânea dos ratos foi realizada por meio do bioensaio do campo aberto, enquanto a avaliação de um possível comprometimento motor foi feita por meio do bioensaio do *rotarod*. O Ppnp7 isolado da fração neuroativa foi sequenciado, e a estrutura primária apresenta nove resíduos de aminoácidos. Curvas de proteção contra a crise epilética máxima foram obtidas a partir da utilização de três doses dos CBMM-Pp (350, 210 e 70 µg/animal) e do Ppnp7 (4,5, 3 e 1,5 µg/animal) ( $p < 0,05$ ). Houve também um aumento significativo da latência para o início desta crise ( $p < 0,05$ ). O Ppnp7 não provocou alterações na atividade geral espontânea nem comprometimento motor. Portanto, esta pesquisa demonstrou como compostos isolados da peçonha de vespas sociais, pouco explorados até o momento, podem ser importantes recursos na busca por novos fármacos e na compreensão de distúrbios neurológicos.

Palavras-chave: vespa social *Polybia paulista*, atividade anticonvulsivante, pentilenotetrazol, campo aberto, *rotarod*, compostos de baixa massa molecular, neuropeptídeo.

## Abstract

Couto LL. *Anticonvulsant activity of Ppnp7, a neuropeptide isolated from the venom of the social wasp Polybia paulista* [dissertation]. Brasília: Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2012. 72p.

Epilepsy is a complex neurological disorder, manifested by approximately 50 million people worldwide (90% are in “developing” countries). For the treatment of this disorder, there are several drugs available, but most of them are expensive, have limitations and produce side effects, reducing the quality of life of patients. Therefore, the development of new drugs is important, and, in this context, the neuroactive compounds isolated from the venom of arthropods, and in particular wasps, are a potential resource because they act with affinity and specificity in excitatory and inhibitory synaptic functions in mammals. The purpose of this study was to identify an anticonvulsant peptide in the venom of *Polybia paulista*. Wasps were collected in Distrito Federal, Brazil, after obtaining a license for collection and maintenance. Venom glands and reservoirs were homogenized and centrifuged, and the supernatant was ultrafiltered (<3000 Da), to obtain the low molecular weight compounds (LMWC-Pp). For separation of LMWC-Pp, the high performance liquid chromatography was performed on a reversed-phase semipreparative column (RP-HPLC). The anticonvulsant fraction was rechromatographed on an analytical column, and the neuropeptide, Ppnp7, was subjected to MALDI TOF/TOF mass spectrometry to obtain the molecular mass, the amino acids sequence and the purity degree. Wistar rats (*Rattus norvegicus*) underwent a procedure for implantation of a cannula in the lateral ventricle, for i.c.v. injection. To evaluate the anticonvulsant activity, the model of acute seizures induced by pentylentetrazole was used (subcutaneous, 105 mg/kg). Occurrence and latency of the maximum seizure were recorded in the bioassays. To evaluate possible changes in spontaneous general activity of rats, the open field bioassay was performed, and to evaluate the possible motor impairment, the rotarod bioassay was used. The Ppnp7 isolated from the neuroactive fraction was sequenced, and the primary structure contains nine amino acid residues. Curves of protection against the maximum seizure were obtained with three different doses of the LMWC-Pp (350, 210 e 70 µg/animal) and of the Ppnp7 (4.5, 3 e 1.5 µg/animal) (p<0.05). There was also a significant increase in the latency to seizure onset (p<0.05). The Ppnp7 did not cause changes in spontaneous general activity and did not cause also motor impairment. Therefore, this study demonstrated how compounds isolated from wasps' venom, little explored until now, may be important resources in the search for new drugs and in understanding of neurological disorders.

Keywords: social wasp *Polybia paulista*, anticonvulsant activity, pentylentetrazole, open field, rotarod, low molecular weight compounds, neuropeptide.

# 1. Introdução

## 1.1. Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio neurológico complexo, caracterizado pela atividade elétrica cerebral espontânea e recorrente bastante sincronizada e por todas as manifestações resultantes desta atividade excessiva (Scorza e Cavalheiro, 2004). Este distúrbio pode se manifestar tanto devido à predisposição genética quanto devido a circunstâncias especiais, como infecções, convulsões febris na infância e lesões locais. A suscetibilidade à epilepsia também está relacionada à fase da vida do indivíduo e é maior em crianças e idosos (Guerrini, 2006). Além disso, problemas psicológicos e sociais podem surgir devido a este distúrbio, pois muitas vezes o portador é desprezado e sofre humilhações devido à sua condição (Scorza e Cavalheiro, 2004; Gagliardi *et al*, 2011).

O tema epilepsia é bastante estudado, e por isso existem vários conceitos e classificações relacionados. Uma classificação bastante importante atualmente descreve as crises epiléticas como focais, quando envolvem apenas uma região cerebral, ou generalizadas, quando envolvem várias regiões cerebrais (Guerrini, 2006). As regiões do cérebro mais comumente envolvidas nestas crises são o lobo temporal e o lobo frontal (Scorza e Cavalheiro, 2004). Algumas microdeleções geralmente relacionadas à epilepsia generalizada ocorrem nos cromossomos 15 e 16 (Mulley e Mefford, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 50 milhões de pessoas são portadoras deste distúrbio no mundo, e, destas, 90% estão em países considerados em desenvolvimento (*World Health Organization*, 2009).

Nestes países, são bastante comuns problemas como a deficiência nas assistências pré-natal e maternal, o acesso reduzido aos atendimentos médicos, a má nutrição, as doenças infecto-parasitárias, entre outros, os quais podem desencadear as crises epiléticas (Medcel, 2011). Assim, a epilepsia tem sido considerada uma questão de saúde pública (Scorza e Cavalheiro, 2004), e, por isso, é cada vez mais necessário desenvolver estudos sobre este distúrbio neurológico.

#### 1.1.1. Mecanismos de ação e fármacos antiepiléticos

A epilepsia é decorrente de uma atividade irregular de células do sistema nervoso. Em situações normais, existe uma integração entre as atividades de canais iônicos, receptores, neurotransmissores e demais elementos destas células, e isto estabelece um equilíbrio (Berne *et al*, 2004). Quando estes elementos não exercem suas funções apropriadamente, este equilíbrio não é mantido, e uma atividade cerebral excessiva pode levar ao desenvolvimento da epilepsia (Guerrini, 2006). Os mecanismos de ação de fármacos antiepiléticos devem restituir esta condição de equilíbrio.

De maneira geral, este equilíbrio é mantido por meio da integração entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias. Enquanto a neurotransmissão excitatória está relacionada à ocorrência de despolarizações na região pós-sináptica e a consequente propagação de potenciais de ação, a neurotransmissão inibitória promove hiperpolarizações responsáveis por inibir esta propagação (Berne *et al*, 2004). A atividade dos elementos celulares citados anteriormente é essencial para estas neurotransmissões.

Neste contexto, os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) dependentes de voltagem são bastante importantes, pois estão diretamente relacionados à produção de despolarizações e à condução de potenciais de ação. Já os canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) dependentes de voltagem promovem a repolarização de células após uma despolarização e também são responsáveis por provocar hiperpolarizações (Kwan *et al*, 2001). Por fim, os canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependentes de voltagem estão envolvidos diretamente com a liberação de neurotransmissores nas sinapses (Stefani *et al*, 1997). Em geral, os canais iônicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) são importantes alvos de fármacos antiepilépticos (Kwan *et al*, 2001; Stefani *et al*, 1997).

Na mediação excitatória, o glutamato é considerado o principal neurotransmissor. Os principais receptores relacionados à neurotransmissão glutamatérgica são os receptores ionotrópicos cainato, AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato), os quais são condutores geralmente de  $\text{Na}^+$ , e desta maneira são promovidas despolarizações nos neurônios pós-sinápticos. Também são importantes os receptores metabotrópicos tipos I-VIII, os quais comumente são ligados à proteína G, pré-sinápticos e relacionados ao controle da liberação de neurotransmissores (Meldrum *et al*, 1999).

Já nas neurotransmissões inibitórias, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico, GABA, é considerado o principal mediador. Existem dois receptores principais envolvidos na neurotransmissão GABAérgica, o  $\text{GABA}_A$ , o qual é ionotrópico, condutor de  $\text{Cl}^-$ , e o  $\text{GABA}_B$ , metabotrópico, o qual é ligado à proteína G e promove o aumento da condutância de  $\text{K}^+$ , e portanto ambos são responsáveis por promover hiperpolarizações (Kwan *et al*, 2001; Berne *et al*, 2004).

Além disso, existe também um importante processo de recaptação de neurotransmissores das sinapses, uma vez que, até o momento, não foram descritos processos de metabolismo do glutamato e do GABA em meio extracelular (Danbolt, 2001). Assim, estes neurotransmissores são removidos das regiões sinápticas por meio de transportadores específicos localizados principalmente na neuroglia (Meldrum *et al*, 1999; Berne *et al*, 2004; Olsen e Avoli, 1997).

A Figura 1 é uma representação da região sináptica, com ênfase nos principais elementos relacionados às neurotransmissões (adaptada de Mortari *et al*, 2007a e Berne *et al*, 2004). Conforme já foi mencionado anteriormente, existe um equilíbrio entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias, garantido por meio do funcionamento apropriado dos elementos celulares. Quando alguns destes elementos atuam de maneira irregular, podem ocasionar alterações como o aumento da liberação de glutamato, a diminuição da liberação de GABA, o aumento das correntes iônicas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , entre outras, e estas alterações podem levar ao surgimento da epilepsia. Para o tratamento deste distúrbio neurológico, os fármacos antiepilépticos utilizados devem atuar no sentido de antagonizar a condição patológica e estabelecer novamente o equilíbrio.

Na década de 1910, foi descoberto o fenobarbital, o primeiro fármaco antiepiléptico. Posteriormente, a partir da década de 1970, muitos outros fármacos foram descobertos, como a fenitoína, a carbamazepina, o valproato de sódio, a etosuximida e os benzodiazepínicos (Kwan *et al*, 2001; Löscher, 1998).

Atualmente, estão disponíveis no mercado fármacos para o tratamento dos mais variados tipos de epilepsia. Alguns exemplos destes fármacos e seus mecanismos de ação estão relacionados a seguir: oxcarbazepina, a qual bloqueia canais de  $\text{Na}^+$  de neurônios excitatórios; lamotrigina, por meio do bloqueio de canais

de  $\text{Ca}^{2+}$  de neurônios excitatórios; tiagabina, a qual potencializa a atividade GABAérgica de neurônios inibitórios; e felbamato, por meio da redução da atividade glutamatérgica de neurônios excitatórios (LaRoche e Helmers, 2004a; Bergin e Connolly, 2002; Stefani *et al*, 1997; Beleboni *et al*, 2004b).



**Figura 1.** Representação de uma região sináptica com os principais elementos celulares (adaptada de Mortari *et al*, 2007a e Berne *et al*, 2004). O funcionamento inadequado destes elementos pode levar ao desenvolvimento da epilepsia, e, neste contexto, os fármacos antiepilépticos devem antagonizar a condição patológica e estabelecer novamente o equilíbrio.

Porém, muitos destes fármacos antiepilépticos, principalmente os de nova geração, apresentam um valor comercial expressivo, não são tão eficientes e podem até provocar problemas como interações com outros medicamentos e efeitos colaterais incômodos, como sedação, queda de cabelo, ganho de massa corpórea e hepatotoxicidade. Estes fatores tendem a reduzir a qualidade de vida do portador de epilepsia (LaRoche e Helmers, 2004b). Além disso, cerca de 30% dos portadores deste distúrbio são fármaco-resistentes, ou seja, estes portadores não são satisfatoriamente tratados com os fármacos existentes (Löscher, 1998; Bergin e Connolly, 2002).

Portanto, é importante desenvolver novos fármacos para o tratamento da epilepsia, e, neste contexto, a peçonha de artrópodes é um recurso em potencial, pois apresenta compostos os quais atuam com afinidade e especificidade em elementos das transmissões sinápticas de mamíferos (Monteiro *et al*, 2009).

## 1.2. Venenos e peçonhas de animais

Frutos de um processo evolutivo intenso e elaborado, venenos e peçonhas produzidos por animais apresentam um repertório bastante complexo de moléculas biologicamente ativas. Este recurso é utilizado tanto por predadores, para aumentar sua eficiência na captura de alimentos, quanto por presas, para aumentar suas chances de fuga e sobrevivência (Pimenta e Lima, 2005).

Atualmente, um grupo de animais produtores destas moléculas bastante considerado é o dos artrópodes. Muitos destes são classificados como peçonhentos, pois desenvolveram um aparato para inocular esta mistura complexa de moléculas, a peçonha. Neste grupo estão incluídas as vespas, cujas peçonhas são pouco

estudadas mas representam um grande potencial para utilização em estudos na área de bioprospecção (Beleboni *et al*, 2004a).

Em geral, a peçonha de artrópodes apresenta uma grande variedade de compostos, como proteínas, alcalóides, sais inorgânicos, aminas biogênicas, peptídeos e poliaminas (Pimenta e Lima, 2005; Theakston e Kamiguti, 2002), e estes dois últimos são bastante representativos de vespas (Beleboni *et al*, 2004a). Estes compostos podem produzir diversos efeitos biológicos, em especial citolíticos, necróticos, alérgicos, analgésicos, anti-inflamatórios, antitumorais e antimicrobianos (Santos *et al*, 2010; Theakston e Kamiguti, 2002; Souza *et al*, 2009), além dos vários efeitos provocados pelas neurotoxinas, as quais são muito comuns na peçonha de vespas (Mortari *et al*, 2007a).

Estas neurotoxinas encontradas na peçonha de vespas são predominantemente poliaminas ou peptídeos, e geralmente atuam com afinidade e especificidade nas funções sinápticas excitatórias ou inibitórias das células do sistema nervoso de mamíferos e insetos. Estas toxinas podem interagir com canais iônicos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, e também podem atuar como agonistas ou antagonistas de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, como por exemplo o do neurotransmissor excitatório glutamato (Mellor e Usherwood, 2004; Beleboni *et al*, 2004a; Pimenta e Lima, 2005; Mortari *et al*, 2007a).

Devido a estes mecanismos de ação descritos, estas neurotoxinas podem ser utilizadas em pesquisas na área de neurociências, tanto para melhorar a compreensão dos eventos relacionados às transmissões sinápticas, quanto para proporcionar a busca por novos fármacos para o tratamento de distúrbios neurológicos, em particular a epilepsia (Mortari *et al*, 2007a; Beleboni *et al*, 2004a). Além disso, o surgimento e o aperfeiçoamento de novas abordagens, como a

proteômica, tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas sobre estes temas, pois proporcionam a identificação de moléculas a partir de quantidades muito pequenas de material (Mortari *et al*, 2007a; Pimenta e Lima, 2005).

### 1.2.1. A peçonha de vespas

Vespas, eventualmente, são agressivas e podem atacar indivíduos da espécie humana. Nestas situações, a peçonha inoculada, por apresentar vários tipos de compostos biologicamente ativos, provoca diversos efeitos, os quais podem variar quanto à gravidade (Oliveira e Palma, 1998; Santos *et al*, 2007).

Com base em características ecológicas, as vespas tem sido divididas em dois grandes grupos, solitárias e sociais. Ambas são predadoras, porém, enquanto as solitárias utilizam a peçonha para paralisar a presa de maneira não letal e duradoura, as sociais provocam a morte da presa com a utilização da peçonha. São esperadas, então, diferenças na quantidade e na variedade das moléculas biologicamente ativas presentes nestas peçonhas (Baek e Lee, 2010a e 2010b).

Mesmo com estas diferenças, é possível identificar na peçonha de vespas compostos de alta massa molecular, os quais geralmente são proteínas relacionadas às reações alérgicas. Deste grupo, são bastante estudados os antígenos 5 (Hoffman, 1993; Pirpignani *et al*, 2002), as hialuronidases (Kolarich *et al*, 2005) e as fosfolipases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>α</sub> e B<sub>β</sub> (Soldatova *et al*, 1993; Abe *et al*, 2000; Costa e Palma, 2000). Alguns exemplos de compostos de alta massa molecular identificados a partir desta peçonha de acordo com a espécie podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Exemplos de compostos de alta massa molecular já identificados a partir da peçonha de vespas, de acordo com a espécie.

<b>Compostos</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referências</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ antígenos 5</li> <li>✓ hialuronidases</li> <li>✓ quitinases</li> </ul>	<i>Chelonus inanitus</i>	Vincent <i>et al</i> , 2010
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ hialuronidases</li> <li>✓ fosfolipases A<sub>2</sub></li> <li>✓ arginino-quinases</li> <li>✓ antioxidantes</li> </ul>	<i>Eumenes pomiformis</i>	Baek e Lee, 2010b Baek e Lee, 2010c
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ arginino-quinases</li> <li>✓ antioxidantes</li> <li>✓ além de peptídeos com atividade antifúngica</li> </ul>	<i>Orancistrocerus drewseni</i>	Baek e Lee, 2010c Baek e Lee, 2010a
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ calreticulina</li> <li>✓ arginino-quinase</li> <li>✓ serino-protease</li> <li>✓ fosfatase alcalina</li> </ul>	<i>Pteromalus puparum</i>	Zhu, 2010 Zhu <i>et al</i> , 2010
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ metaloprotease</li> <li>✓ serino-protease</li> <li>✓ fosfatase ácida</li> <li>✓ antígeno 5</li> </ul>	<i>Nasonia vitripennis</i>	Graaf <i>et al</i> , 2010
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ antígeno 5</li> </ul>	<i>Polybia scutellaris</i>	Pirpignani <i>et al</i> , 2002
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ fosfolipase A<sub>2</sub></li> </ul>	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	Costa e Palma, 2000

Em especial, esta peçonha apresenta também um grupo de compostos de baixa massa molecular, representado principalmente por peptídeos. Os grupos de peptídeos mais estudados são as cininas e os mastoparanos (Piek, 1991; Monteiro *et al*, 2009). Atualmente, a peçonha de vespas tem sido muito estudada, por meio de ferramentas como a proteômica e a construção de bibliotecas de cDNA.

Com relação a estes compostos de baixa massa molecular, o neurotransmissor GABA e dois agonistas de receptores de GABA, a  $\beta$ -alanina e a taurina (Moore *et al*, 2006), e também a dopamina (Libersat, 2003), foram identificados na peçonha de *Ampulex compressa*. Estes compostos estão relacionados à paralisia de presas provocada pela peçonha de vespas solitárias (Moore *et al*, 2006; Libersat, 2003).

Além destes compostos, diversas poliaminas foram isoladas da peçonha de *Philanthus triangulum*. Existem, nesta peçonha, pelo menos quatro poliaminas diferentes,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -filantotoxina (Piek, 1982). Esta última bloqueia, na região pós-sináptica, a neurotransmissão glutamatérgica, por meio da atuação nos receptores AMPA e cainato (Jones *et al*, 1990; Piek, 1982).

As pompilidotoxinas  $\alpha$  e  $\beta$  são peptídeos com atuação na região pré-sináptica e potencializam a neurotransmissão, pois atrasam a inativação de canais de  $\text{Na}^+$  (Schiavon *et al*, 2010; Magloire *et al*, 2011). Enquanto a  $\alpha$ -pompilidotoxina está presente na peçonha de *Anoplius samariensis* e *Batozonellus maculifrons*, a  $\beta$ - foi encontrada apenas na peçonha de *B. maculifrons* (Konno *et al*, 1998).

A peçonha de vespas apresenta também peptídeos antimicrobianos. A anoplina, obtida a partir da peçonha de *Anoplius samariensis*, estimula a degranulação de mastócitos e apresenta atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Konno *et al*, 2001b). A defensina-NV, encontrada

na peçonha de *Nasonia vitripennis*, apresenta potente atividade antimicrobiana em fungos e bactérias (Ye *et al*, 2010). A eumenitina, isolada da peçonha de *Eumenes rubronotatus*, exerce atividade antibacteriana e promove significativa degranulação de mastócitos (Konno *et al*, 2006). Peptídeos antimicrobianos também foram isolados da peçonha de *Vespa magnifica* (Xu *et al*, 2006).

Peptídeos quimiotáticos foram identificados na peçonha de *Agelaia pallipes pallipes*. A agelaia-MP é hemolítica e promove a degranulação de mastócitos. A protonectina, também isolada desta peçonha, promove esta degranulação, apresenta quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleados e é um potente antibacteriano (Mendes *et al*, 2004). A protonectina(1-6) apresenta apenas esta quimiotaxia. Porém, curiosamente, quando estão presentes as duas protonectinas na razão molar 1:1, a degranulação e a atividade antibacteriana são potencializadas, enquanto a quimiotaxia é reduzida (Baptista-Saidemberg *et al*, 2010).

Peptídeos do grupo das cininas são recorrentemente encontrados na peçonha de vespas, os quais estão relacionados a muitas funções biológicas distintas. Na peçonha de *Cyphononyx fulvognathus*, quatro peptídeos bradiginina-like foram observados: treonina<sup>6</sup>-bradiginina, cifocinina, fulvonina e Cd-146. Os dois primeiros promovem contração de musculatura lisa, e todos provocam hiperalgesia no teste de pressão na pata de ratos e provavelmente atuam nos receptores de bradiginina (Konno *et al*, 2001a; Picolo *et al*, 2010). A treonina<sup>6</sup>-bradiginina foi identificada na peçonha de *Colpa interrupta* e bloqueia, na região pré-sináptica, a neurotransmissão colinérgica nicotínica de insetos (Piek *et al*, 1990). No sistema nervoso central de insetos, a treonina<sup>6</sup>-bradiginina promove o bloqueio da recaptção de colina, e assim provoca uma paralisia irreversível neste tipo de presa (Piek *et al*, 1991). Portanto, a treonina<sup>6</sup>-bradiginina é uma das principais cininas e também a mais encontrada na

peçonha de vespas. Recentemente, este peptídeo foi isolado da peçonha de *Polybia occidentalis* e, quando injetado via i.c.v. em ratos, produz efeitos antinociceptivos, observados nos testes *hot plate* e *tail flick*, e atua basicamente nos receptores de bradicinina do tipo B<sub>2</sub> (Mortari *et al*, 2007b).

Mastoparanos são peptídeos bastante encontrados na peçonha de vespas e são responsáveis geralmente por promover a degranulação de mastócitos. Na peçonha de *Anterhynchium flavomarginatum micado*, foi identificado o mastoparano EMP-AF, o qual, além de provocar a degranulação de mastócitos, também apresenta atividade hemolítica e bloqueia, possivelmente na região pós-sináptica, a transmissão neuromuscular (Konno *et al*, 2000). Na peçonha de *Pimpla hypochondriaca* foram identificados peptídeos com atividade imunossupressora (Dani e Richards, 2010).

As protopolybias MP1, MP2 e MP3, isoladas da peçonha de *Protopolybia exigua*, são mastoparanos com efeitos biológicos distintos. A primeira citada é hemolítica e promove a degranulação de mastócitos, possivelmente por meio da formação de poros na membrana celular. Já as protopolybias MP2 e MP3 também provocam esta degranulação, porém provavelmente por meio da atuação em receptores ligados à proteína G (Mendes *et al*, 2005). Da peçonha de *Protonectarina sylveirae* foram identificados dois peptídeos mastoparanos, a protonectarina-MP-NH<sub>2</sub> e a protonectarina-MP-OH, as quais produzem hiperalgesia e edema quando injetadas na pata de camundongos (Brigatte *et al*, 2011).

Além destes grupos de peptídeos descritos acima, o interesse pela peçonha de vespas tem aumentado devido à presença de compostos neuroativos. Neste sentido, Mortari e colaboradores (2005) mostraram que a peçonha bruta desnaturada de *Polybia occidentalis*, injetada via i.c.v. em ratos, protege contra

crises epilépticas induzidas pelos convulsivantes bicuculina, picrotoxina, ácido caínico e pentilenotetrazol. Porém, esta peçonha também provoca algumas alterações na atividade geral espontânea dos ratos, avaliadas no bioensaio do campo aberto, mas não houve comprometimento motor, verificado no teste *rotarod* (Mortari *et al*, 2005).

Em outro estudo, com a peçonha desnaturada de *Polybia ignobilis*, também foi verificada a proteção contra crises epilépticas induzidas pelos três primeiros convulsivantes citados anteriormente, quando esta peçonha foi injetada via i.c.v. em ratos. Alterações na atividade geral espontânea dos ratos também foram observadas no bioensaio do campo aberto. Além disso, foram constatadas interações desta peçonha desnaturada com receptores de GABA e de glutamato. Apesar de haver GABA e glutamato na peçonha, estes neurotransmissores estão presentes em pequenas quantidades e, portanto, não são os únicos compostos responsáveis pelas interações observadas (Cunha *et al*, 2005).

Nesta pesquisa, foi utilizada a peçonha da espécie *Polybia paulista* (Figura 2), uma vespa social bastante agressiva e endêmica da região neotropical (Santos *et al*, 2007). Esta espécie é encontrada facilmente na região do Distrito Federal, e a coleta de ninhos com exemplares de *P. paulista* é bem simples.



**Figura 2.** Exemplar de *Polybia paulista*.

### 1.2.1.1. Peçonha da vespa social *Polybia paulista*

Alguns estudos já foram realizados com a peçonha da vespa social *Polybia paulista*. Foi verificada a presença de compostos de alta massa molecular, como por exemplo hialuronidases, fosfolipases A<sub>1</sub>, fosfolipases A<sub>2</sub> (polybitoxinas), antígenos 5, serino-proteases, arginino-quinases (Oliveira e Palma, 1998; Santos *et al*, 2007 e 2010). Além dos compostos de alta massa molecular já descritos para esta peçonha, existem também muitos peptídeos, como os mastoparanos polybia-CP, polybias MP1, MP2 e MP3 e polybinas 1 e 2.

Polybia-CP apresenta atividade antibacteriana e quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleados. Já o peptídeo polybia-MP1 apresenta estas duas atividades e também promove a lise de mastócitos mas não afeta eritrócitos (Souza *et al*, 2005; Cabrera *et al*, 2008). Além disso, quando injetado na pata de camundongos, provoca hiperalgesia e formação de edema (Brigatte *et al*, 2011). Este peptídeo, e também um análogo, polybia-MP1-1, exercem atividade antitumoral. Este análogo foi sintetizado com apenas uma modificação, a substituição da amida C-terminal por uma tioamida, e foi mais eficiente do que polybia-MP1, o peptídeo original (Zhang *et al*, 2010). Esta atividade provavelmente está relacionada à perturbação da membrana plasmática das células tumorais e à formação de poros nesta membrana (Wang *et al*, 2008 e 2009). A seletividade exibida por polybia-MP1 é possivelmente devida à estrutura anfipática em  $\alpha$ -hélice do peptídeo e à posição dos dois resíduos de aspartato (Cabrera *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008).

Os mastoparanos polybia-MP2 e polybia-MP3 são peptídeos amidados de 14 resíduos de aminoácidos. São hemolíticos, apresentam atividade antibacteriana e provocam o rompimento de mastócitos (Souza *et al*, 2004 e 2009). Polybia-MP2

também provoca inflamação e induz apoptose em células musculares esqueléticas, e, apesar destas injúrias, a capacidade de regeneração do tecido muscular persiste (Rocha *et al*, 2007 e 2010). Além disso, este peptídeo apresenta neurotoxicidade baixa e passageira, pois, apesar de provocar a diminuição do volume e da densidade de vesículas sinápticas, não produz danos significativos na região (Rocha *et al*, 2009). As polybinas 1 e 2 são mastoparanos também identificados na peçonha de *P. paulista*, os quais apresentam quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleados e provocam a degranulação de mastócitos (Ribeiro *et al*, 2004).

Além dos mastoparanos, Saidemberg e colaboradores (2010) demonstraram a presença de um glicosídeo nesta peçonha. Este composto, chamado de polybiosida, apresentou atividade convulsivante quando injetado tanto via i.c.v. quanto via intravenosa em ratos. Apesar de ter sido realizada a identificação de vários peptídeos na peçonha de *Polybia paulista* e de outras vespas, muitos outros ainda permanecem desconhecidos, devido à falta de pesquisas com o objetivo de identificar compostos com neuroatividade.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

A partir das considerações feitas anteriormente, o objetivo geral desta pesquisa foi encontrar na peçonha da vespa social *Polybia paulista* um peptídeo com atividade anticonvulsivante.

#### 2.1.1. Objetivos específicos

Sendo assim, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

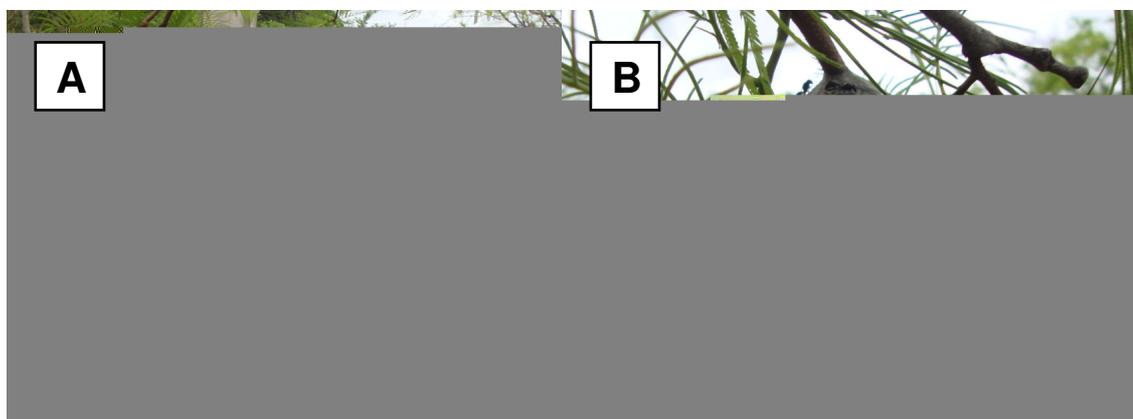
- ✓ Avaliar a atividade anticonvulsivante dos compostos de baixa massa molecular desta peçonha e obter a dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>), por meio da utilização do modelo de indução química aguda de crises epiléticas em ratos.
- ✓ Isolar e caracterizar o neuropeptídeo, por meio de ultrafiltração, cromatografia líquida e espectrometria de massa.
- ✓ Avaliar a atividade anticonvulsivante do neuropeptídeo e obter a dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>).
- ✓ Avaliar, após a injeção do neuropeptídeo, as possíveis alterações na atividade geral espontânea dos ratos, por meio do bioensaio do campo aberto, e avaliar também o possível comprometimento motor, por meio do bioensaio do *rotarod*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Isolamento e caracterização do neuropeptídeo a partir da peçonha da vespa social *Polybia paulista*

##### 3.1.1. Coleta e primeiros procedimentos

Quatro ninhos com exemplares da vespa social *P. paulista* foram coletados (Figura 3) no *campus* universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Distrito Federal, após a obtenção da licença para coleta e manutenção ICMBio SISBIO número 21723-1. As coletas aconteceram de 2009 a 2011, sempre entre os meses de outubro e dezembro.



**Figura 3.** (A) Coleta de um ninho com exemplares da vespa social *Polybia paulista*. (B) Ninho com exemplares desta vespa.

Os exemplares coletados foram eutanasiados por congelamento imediatamente após a coleta, e a espécie foi confirmada após a análise realizada pelo pesquisador Fernando Barbosa Noll, da Universidade Estadual de São Paulo.

As glândulas e os reservatórios da peçonha de aproximadamente 8000 vespas foram extraídos manualmente e mantidos em um freezer a uma temperatura média de -20°C. Posteriormente, glândulas e reservatórios foram homogeneizados em água deionizada e acetonitrila na proporção 1:1 e em seguida centrifugados a 10000 x g por 5 min. O sobrenadante foi retirado e depois ultrafiltrado a 10000 x g por 30 min com um filtro Microcon (Millipore) de até 3000 Da.

O material resultante, por apresentar apenas os compostos de baixa massa molecular da peçonha da vespa social *P. paulista*, foi denominado CBMM-Pp. Os CBMM-Pp foram secos a vácuo e quantificados por meio de uma balança de precisão. Em seguida, este material foi ressuscendido em solução salina (0,9%) em três diferentes concentrações: 350, 210 e 70 µg/µL.

### 3.1.2. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência

Os CBMM-Pp foram submetidos também à separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC). Para isso, este material foi ressuscendido em água deionizada com 5% de acetonitrila.

Para a separação dos compostos, foi utilizada uma coluna de fase reversa semipreparativa (C18, 218TP510, 5 µm, 250 x 10 mm, Vydac®, USA) com os solventes A (água deionizada com 0,1% de ácido trifluoracético) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoracético), eluição com 5% do solvente B por 20 min e em seguida com 5% até 60% do solvente B em 40 min, e fluxo de 2 mL/min. A absorbância foi monitorada a 214 e a 280 nm. As frações obtidas nesta separação foram coletadas e secas a vácuo.

A fração com neuroatividade foi recromatografada em coluna de fase reversa analítica (C18 Synergi 4  $\mu\text{m}$ , Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, Phenomenex®, Torrance, CA, USA) com os mesmos solventes descritos anteriormente, eluição com 5% até 45% do solvente B em 80 min, e fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi novamente monitorada a 214 e a 280 nm. As novas frações obtidas nesta etapa foram coletadas e secas a vácuo. A quantificação do neuropeptídeo foi realizada por meio de um espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare®), a partir da razão entre as absorbâncias obtidas a 260 e 280 nm, e assim, foram obtidas as concentrações 17, 4,5, 3 e 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.1.3. Análise por meio de espectrometria de massa

O neuropeptídeo foi submetido à espectrometria de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics®, Alemanha), do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*, para a obtenção da massa molecular, a identificação da sequência de aminoácidos e a verificação do grau de pureza. Para isso, uma alíquota do neuropeptídeo foi ressuspensa em água deionizada e misturada a uma matriz pronta de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila/água deionizada/3% de ácido trifluoracético, 5/4/1, v/v/v, e posteriormente esta mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384. As aplicações secaram à temperatura ambiente e então foram analisadas.

O espectrômetro de massa estava equipado com laser *SmartBeam* e foi utilizado em dois modos de operação, o refletido positivo, para a obtenção de espectros de MS, e o LIFT, para a obtenção de espectros de MS/MS. A faixa de

detecção da razão massa/carga ( $m/z$ ) foi de 600 a 3000. A calibração foi realizada com a mistura *Peptide Calibration Standard I* (Bruker Daltonics®, Alemanha). O *software* utilizado nestas análises foi o FlexControl 3.0.

A interpretação dos espectros de massa obtidos e o sequenciamento *de novo* foram realizados manualmente e com o auxílio do *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha), e foram consideradas as séries de íons produzidos a partir do neuropeptídeo. Buscas por similaridades foram realizadas por meio do Fasta3 (disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>>) e do BLASTP (disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>).

Para diferenciar os resíduos de lisina (K) e glutamina (Q), o neuropeptídeo foi submetido à digestão enzimática por tripsina. Inicialmente, a tripsina imobilizada TPCK (Pierce) foi lavada cinco vezes com uma solução tampão de bicarbonato de amônio 50 mM (Merc®). Em seguida, o neuropeptídeo foi incubado com esta enzima a 37°C por oito horas. Alíquotas dos tempos 0, 2, 4 e 8 h foram submetidas à espectrometria de massa conforme descrito anteriormente.

### 3.2. Bioensaios

Todos os bioensaios descritos a seguir foram realizados com ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de 180 a 240 g. Os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, 1991) e o *Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings* (Sociedade de Fisiologia Americana - APS, 2000) foram seguidos. Além disso, esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, homologada e aprovada, e o número do protocolo é UnBDoc 45810/2009. Uma

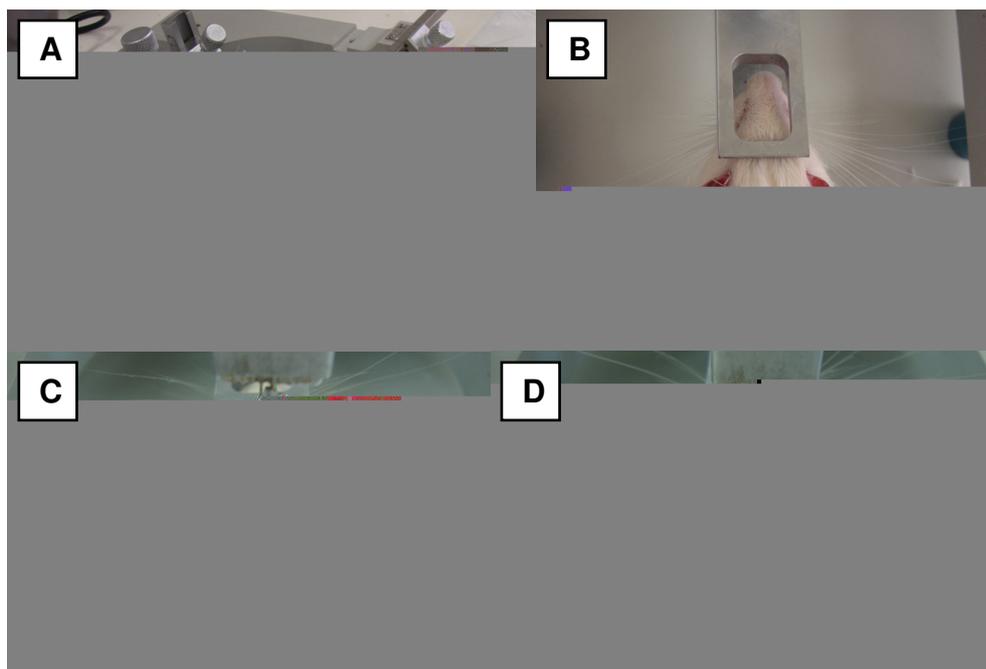
cópia deste documento está em anexo.

### 3.2.1. Manutenção dos animais

O biotério da Universidade de Brasília forneceu os ratos, os quais foram mantidos dentro de caixas (quatro em cada uma), em uma sala com as seguintes condições: ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, temperatura de 25°C, umidade de 55%. Água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*.

### 3.2.2. Procedimento para a implantação de uma cânula guia em ratos

Nos bioensaios, os compostos obtidos a partir da peçonha da vespa social *P. paulista* foram injetados nos ratos via intracerebroventricular (i.c.v.), e, para isto, foi necessária a realização de um procedimento para a implantação de uma cânula guia. Inicialmente, o rato foi anestesiado com quetamina (Syntec®, 75 mg/kg, intraperitoneal - i.p.) e xilazina (Syntec®, 10 mg/kg, i.p.) e depois fixo em um estereotáxico (Insight Equipamentos®), como pode ser observado na Figura 4 A. Em seguida, foi injetada lidocaína 3% localmente, o crânio do rato foi exposto (Figura 4 B), e a cânula foi implantada no ventrículo lateral (Figura 4 C) com base na linha do bregma (AP: 0,8 mm / ML: 1,6 mm / DV: 3,4 mm), de acordo com um atlas específico (Paxinos e Watson, 1986). Esta cânula, de 10 mm, foi confeccionada previamente a partir de uma agulha hipodérmica BD 0,70 x 25 22G. Por fim, a cânula foi fixa com acrílico dental (Figura 4 D) e depois foi selada com um fio de aço inoxidável para evitar obstrução. Quatro a sete dias depois deste procedimento, cada rato foi submetido a apenas um bioensaio.



**Figura 4.** Etapas do procedimento para a implantação de uma cânula guia em ratos. (A) Após a anestesia, o rato foi fixo em um estereotáxico. (B) O crânio foi exposto para a implantação da cânula no ventrículo lateral (C) com base na linha do bregma. (D) No fim do procedimento, a cânula foi fixa com acrílico dental.

### 3.2.3. Avaliação da atividade anticonvulsivante

Neste bioensaio, foi utilizado o modelo de indução química aguda de crises epilépticas. De acordo com este modelo, primeiramente deve ser injetado no rato o composto cuja atividade está sendo avaliada. No caso deste bioensaio, os ratos receberam a injeção de 1  $\mu\text{L}$  via i.c.v. ou de uma das três doses dos CBMM-Pp (350, 210 ou 70  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou de uma das três doses do neuropeptídeo (4,5, 3 ou 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Nos ratos de cada um destes grupos experimentais ( $n = 5-8$ ), esta injeção foi realizada por meio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Compact Infusion Pump®, fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

Posteriormente, deve ser injetado no rato um convulsivante químico em uma dose capaz de provocar crises epiléticas máximas em 100% dos ratos. Neste bioensaio, o convulsivante químico utilizado foi o pentilenotetrazol (PTZ, Sigma®, 105 mg/kg, subcutânea - s.c.), o qual foi injetado nos ratos 15 min após a primeira injeção. Além disso, dois grupos controles foram feitos (n = 8): um grupo no qual os ratos receberam uma injeção via i.c.v. de 1 µL de solução salina (0,9%) e após 15 min foi injetado o PTZ, denominado então grupo controle veículo, e outro grupo no qual os ratos receberam uma injeção do anticonvulsivante convencional Diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.) e após 30 min foi injetado o PTZ, denominado grupo controle DZP.

Por fim, imediatamente após a injeção do PTZ, cada rato foi colocado em uma arena de acrílico e filmado durante 30 min. O índice de Racine (1972), modificado por Lüttjohann e colaboradores (2009), foi utilizado para classificar as crises epiléticas, como pode ser observado na Tabela 2. Neste bioensaio, foram registrados: (a) quantos ratos não apresentaram a crise máxima (crise de classe número 6), ou seja, se houve proteção contra esta crise, (b) a latência para o início desta crise, (c) quantos ratos não sobreviveram ao bioensaio, (d) o tempo de sobrevivência dos ratos ao bioensaio, (e) a duração da crise máxima.

Os valores obtidos quanto à ocorrência da crise epilética máxima foram utilizados para o cálculo da dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>), ou seja, a dose com a qual 50% dos ratos devem ser protegidos contra esta crise máxima (crise de classe número 6).

**Tabela 2.** Classificação das crises epiléticas, de acordo com Racine (1972), e modificada por Lüttjohann e colaboradores (2009).

<b>Classe</b>	<b>Manifestação do rato</b>
1	Imobilidade e/ou redução comportamental súbita
2	Movimentos faciais com focinho ou com focinho e olhos
3	Movimentos do pescoço
4	Crises clônicas na posição sentada
5	Convulsões com crises clônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada de barriga e/ou crises tônicas
6	Convulsões com crises clônicas e/ou tônico-clônicas na posição deitada de lado e/ou saltos violentos

#### 3.2.4. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos

Para avaliar as possíveis alterações provocadas pelos compostos na atividade geral espontânea dos ratos, foi realizado o bioensaio ( $n = 5-7$ ) do campo aberto, do inglês *open field*. Após a injeção de 1  $\mu\text{L}$  via i.c.v. ou de uma das três doses dos CBMM-Pp (350, 210 ou 70  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou de uma das três doses do neuropeptídeo (4,5, 3 ou 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), cada rato foi colocado no centro de uma arena de acrílico de 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, dividida em 12 quadrantes, e então foi filmado por 30 min (Figura 5). Neste bioensaio, foi considerado o tempo total gasto por cada rato em cada um dos seguintes comportamentos, modificados a partir de Speller e Westby (1996): imobilidade, exploratório, autolimpeza e elevação, de acordo com a Tabela 3.



**Figura 5.** Arena para o bioensaio do campo aberto, para a avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos.

No sentido de complementar a avaliação do comportamento exploratório, possíveis alterações na atividade locomotora foram avaliadas por meio do registro da quantidade de linhas cruzadas completamente pelo rato na arena em seis períodos de 5 min, totalizando assim os 30 min do bioensaio. Os vídeos obtidos foram analisados com o auxílio do *software* X-Plor-Rat 2005, versão 1.1.0.

**Tabela 3.** Descrição dos comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto (modificados a partir de Speller e Westby, 1996).

<b>Comportamento</b>	<b>Atitude do rato</b>
Imobilidade	Ficar imóvel
Exploratório	Cheirar, caminhar
Autolimpeza	Limpar focinho, patas anteriores ou posteriores, genitais, cauda, cabeça, dorso, ventre
Elevação	Permanecer equilibrado nas duas patas posteriores, apoiado ou não nas paredes da arena

Três grupos controles foram feitos: (a) um grupo controle no qual nenhum procedimento foi realizado nos ratos, para a observação da atividade espontânea, denominado grupo controle, (b) um grupo controle veículo, no qual os ratos foram submetidos ao procedimento para a implantação da cânula e posteriormente receberam a injeção de 1 µL de solução salina (0,9%) via i.c.v., para a avaliação das possíveis alterações provocadas por este procedimento, (c) um grupo controle DZP, no qual os ratos receberam uma injeção de DZP (2 mg/kg, i.p.), também para a verificação de possíveis alterações.

### 3.2.5. Avaliação do comprometimento motor

Para esta avaliação, foi utilizado o bioensaio do *rotarod* (Insight Equipamentos®). Este equipamento (Figura 6) consiste em uma barra cilíndrica giratória de 5 cm de diâmetro, a qual se movimenta a uma velocidade de aproximadamente 7 voltas/min e apresenta raias de 8 cm para ratos. Este bioensaio era realizado em quatro dias. Em cada um dos três primeiros dias, cada rato foi treinado a permanecer na barra cilíndrica do equipamento em três sessões completas de 60 s. No quarto dia, houve um pré teste, e cada rato foi colocado no equipamento por 60 s. Todos os que conseguiram permanecer durante todo o tempo foram utilizados no bioensaio. Então cada rato recebeu a injeção de 1 µL via i.c.v. de uma das três doses (n = 5) do neuropeptídeo (17, 4,5 ou 1,5 µg/µL) e depois foi colocado novamente no equipamento nos tempos 20, 40, 60, 80, 100 e 120 min após esta injeção para sessões de também 60 s. Foram registrados quantos ratos não conseguiram permanecer no equipamento e caíram, e também a latência de cada rato para esta queda.

Também neste bioensaio foram feitos três grupos controles: um grupo denominado apenas controle, no qual nenhum procedimento foi realizado nos ratos, um grupo controle veículo, no qual os ratos foram submetidos ao procedimento para a implantação da cânula e posteriormente receberam a injeção de 1  $\mu$ L de solução salina (0,9%) via i.c.v., e um grupo controle DZP, no qual os ratos receberam uma injeção de DZP (2 mg/kg, i.p.).



**Figura 6.** Bioensaio do *rotarod*, para a avaliação do comprometimento motor.

### 3.3. Análises histológicas

Após cada bioensaio dependente de injeção via i.c.v., foi necessário verificar se a cânula foi posicionada corretamente durante o procedimento. Para isto, estes ratos foram eutanasiados com uma overdose de tiopental sódico (Cristália®), depois foi feita a injeção via i.c.v. de azul de metileno (Anachemia®), e por fim os cérebros foram retirados e congelados. Posteriormente, o local da inserção da cânula foi verificado manualmente por meio de cortes histológicos, e foram desconsiderados os resultados dos ratos com a cânula posicionada incorretamente.

### 3.4. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente com o auxílio dos *softwares* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA) e BioStat. Os testes qui-quadrado e Fisher foram utilizados para verificar a significância dos valores obtidos quanto à proteção contra a crise epiléptica máxima e à sobrevivência dos ratos a este bioensaio.

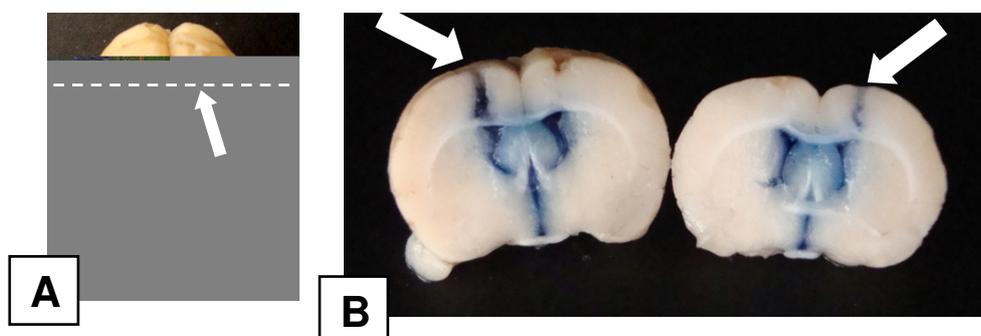
O teste ANOVA de uma via juntamente com o pós teste Tukey foram realizados para caracterizar as latências para o início da crise máxima, as durações desta crise, e os tempos totais gastos pelos ratos nos quatro comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto.

O teste ANOVA de duas vias e o pós teste Bonferroni foram utilizados para avaliar os resultados obtidos quanto à quantidade de linhas cruzadas pelos ratos na arena do campo aberto e também quanto aos tempos gastos nos quatro comportamentos considerados neste bioensaio, desta vez em intervalos de 5 min. A partir dos resultados observados quanto à latência para a queda do rato do equipamento *rotarod*, foram obtidos a média e o erro padrão da média (EPM) para cada tempo considerado. A análise de Probit foi utilizada para o cálculo da DE<sub>50</sub>. Em todas as estatísticas, foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Análises histológicas

Para verificar se a cânula foi corretamente posicionada durante o procedimento para a sua implantação, foi injetado via i.c.v., após a eutanásia dos ratos, o corante azul de metileno, e depois os cérebros foram retirados. Como pode ser observado na Figura 7 A, em cada cérebro foi feito um corte sobre a marca da cânula (seta branca) de maneira perpendicular à linha divisória dos hemisférios (linha tracejada branca). Quando a cânula foi implantada corretamente, o corante injetado em apenas um ventrículo lateral pode ser observado em todo o ventrículo cerebral, como por exemplo o corte demonstrado na Figura 7 B (as setas brancas indicam o local de inserção da cânula). Os ratos com as cânulas incorretas foram excluídos das análises comportamentais e estatísticas.

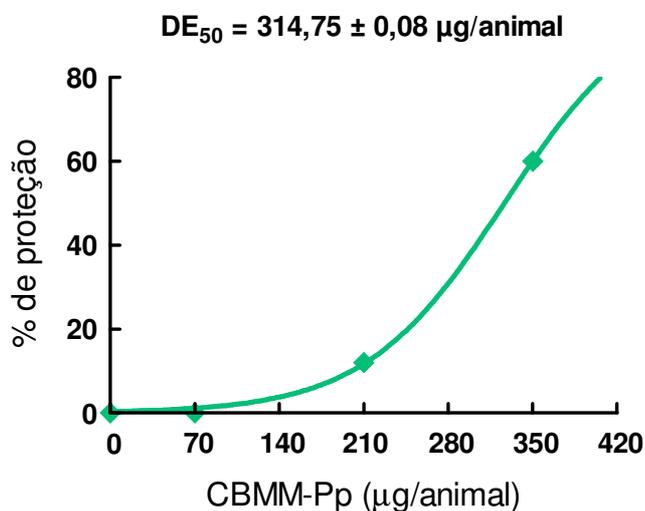


**Figura 7.** Análises histológicas. (A) Após a eutanásia dos ratos, cada cérebro foi retirado depois de uma injeção via i.c.v. do corante azul de metileno. A seta branca evidencia a marca da cânula, e a linha tracejada representa o local do corte. (B) Corte com um exemplo de uma cânula corretamente posicionada durante o procedimento para a sua implantação. O corante foi injetado apenas em um ventrículo lateral, mas todo o ventrículo cerebral foi corado.

## 4.2. Bioensaios realizados com os CBMM-Pp

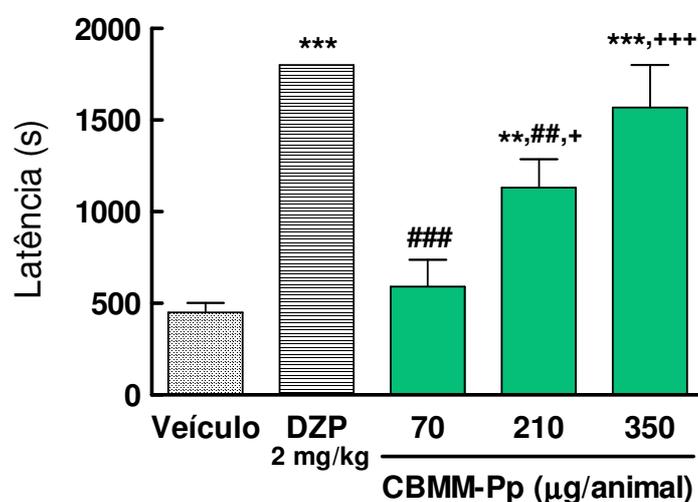
### 4.2.1. Avaliação da atividade anticonvulsivante

Os resultados obtidos quanto à proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nos experimentos com os CBMM-Pp estão apresentados na Figura 8. No grupo controle veículo, a porcentagem de proteção contra crises foi de 0%, ou seja, todos os ratos apresentaram a crise máxima, enquanto no grupo controle DZP, a proteção foi de 100%. A menor dose dos CBMM-Pp, 70 µg/animal, não protegeu os ratos, e a dose de 210 µg/animal protegeu apenas 12% deles. Somente a maior dose, 350 µg/animal, protegeu significativamente os ratos contra crises epilépticas máximas induzidas por PTZ ( $\chi^2 = 23,18$ ;  $p < 0,001$ ). O valor obtido no cálculo da dose efetiva 50%,  $DE_{50}$ , foi  $314,75 \pm 0,08$  µg/animal.



**Figura 8.** Curva de porcentagem de proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses (350, 210 e 70 µg/animal) dos CBMM-Pp (n = 5-8). Para o cálculo da  $DE_{50}$  foi feita a análise de Probit.

Com relação à latência para o início da crise epiléptica máxima nos experimentos com os CBMM-Pp, os resultados obtidos estão na Figura 9.



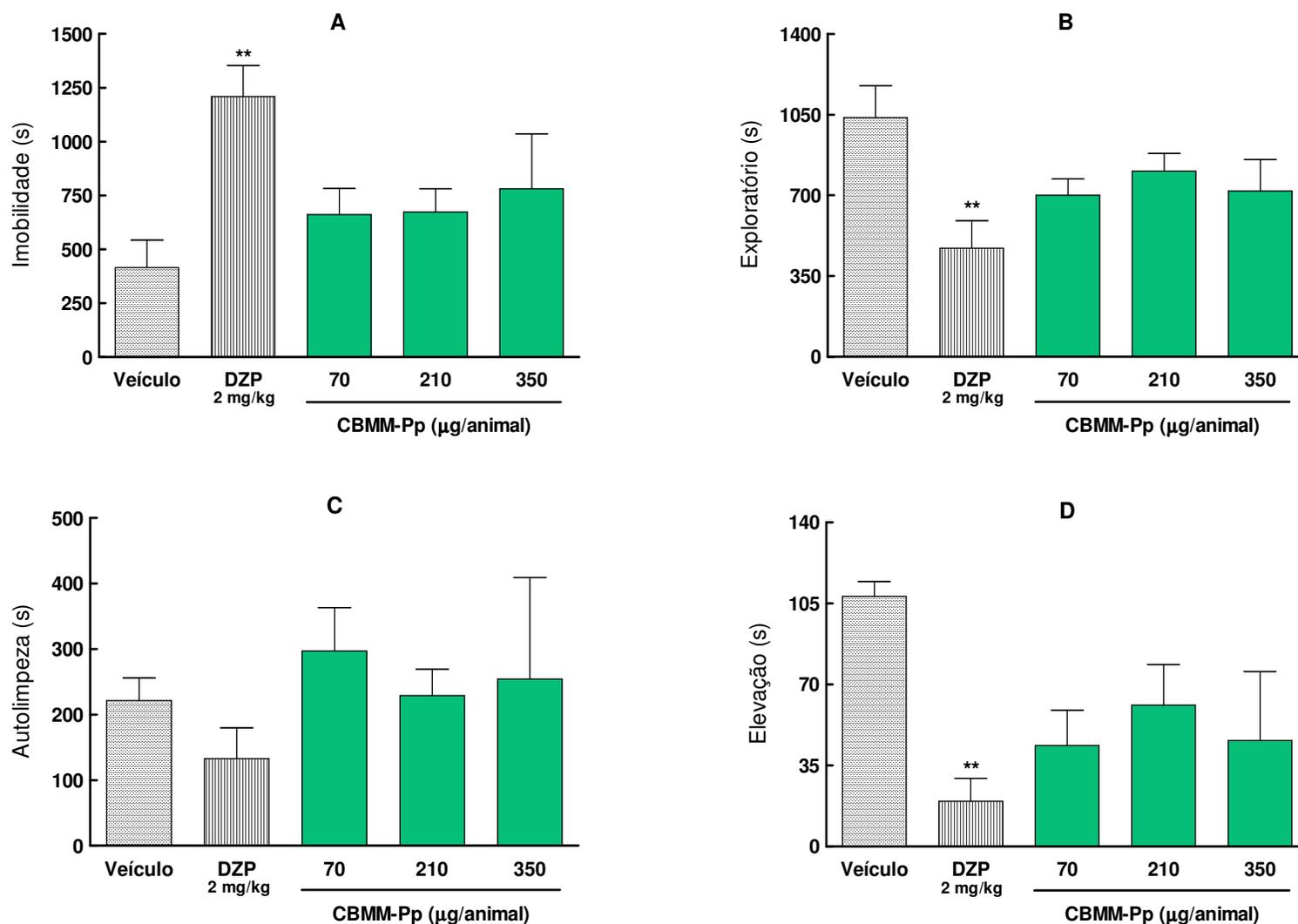
**Figura 9.** Latência para o início da crise máxima induzida pelo PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais ( $n = 5-8$ ) dos CBMM-Pp (350, 210 e 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey.  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  comparado ao grupo veículo;  $##p < 0,01$  e  $###p < 0,001$  comparado ao grupo DZP;  $+p < 0,05$  e  $+++p < 0,001$  comparado ao grupo CBMM-Pp 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$ .

Foi observado nesta avaliação um aumento dose-dependente da latência. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos envolvidos [ $F_{(4,26)} = 21,23$ ;  $p < 0,0001$ ]. Diferenças significativas foram obtidas entre o grupo veículo e os grupos DZP ( $p < 0,001$ ), 210  $\mu\text{g}/\text{animal}$  ( $p < 0,01$ ) e 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  ( $p < 0,001$ ). O grupo 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$  foi estatisticamente diferente dos grupos DZP ( $p < 0,001$ ), 210  $\mu\text{g}/\text{animal}$  ( $p < 0,05$ ) e 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  ( $p < 0,001$ ), enquanto o grupo 210  $\mu\text{g}/\text{animal}$  apresentou diferenças com relação também ao grupo DZP ( $p < 0,01$ ).

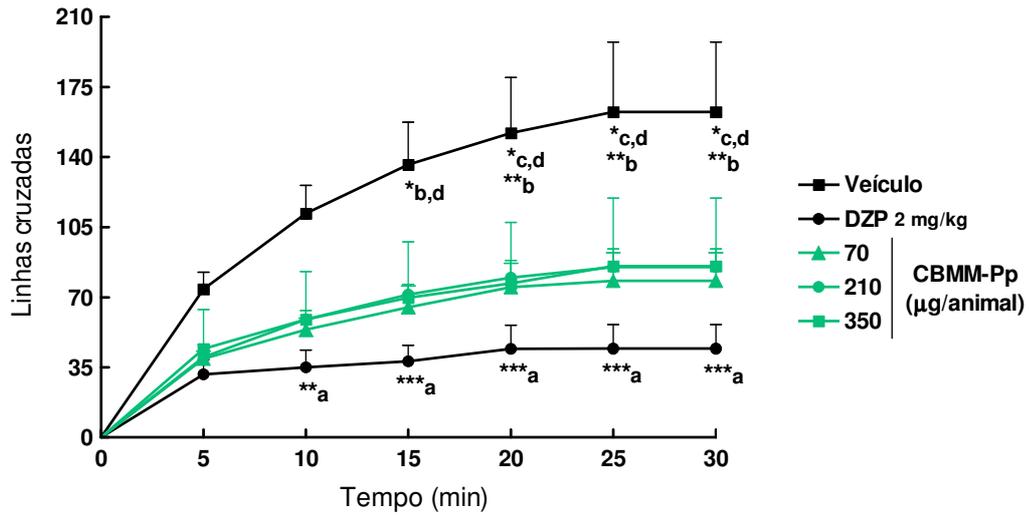
#### 4.2.2. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos

Quanto ao tempo gasto pelos ratos nos comportamentos no campo aberto descritos na Tabela 3, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10. Em três dos comportamentos analisados foram observadas diferenças significativas entre os grupos veículo e DZP: imobilidade [ $F_{(4,22)} = 4,135$ ;  $p = 0,012$ ], exploratório [ $F_{(4,22)} = 3,708$ ;  $p = 0,0187$ ] e elevação [ $F_{(4,18)} = 3,95$ ;  $p = 0,0179$ ], porém não houve diferença entre veículo e grupos experimentais. As análises do comportamento autolimpeza não revelaram diferenças entre os grupos.

Também referente ao teste do campo aberto, os resultados obtidos sobre a quantidade de linhas cruzadas pelos ratos na arena estão na Figura 11. O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas em relação ao tratamento [ $F_{(4,102)} = 22,94$ ;  $p < 0,0001$ ] e ao tempo [ $F_{(5,102)} = 5,23$ ;  $p = 0,0003$ ], mas não houve diferença na interação entre os dois [ $F_{(20,102)} = 0,37$ ;  $p = 0,9936$ ]. Os resultados obtidos no grupo DZP foram estatisticamente diferentes dos resultados do grupo veículo a partir do tempo 10 min ( $p < 0,01$ ). No grupo 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , houve diferenças significativas em relação ao grupo veículo a partir de 15 min ( $p < 0,05$ ). Também foram observadas diferenças entre o grupo veículo e o grupo 210  $\mu\text{g}/\text{animal}$  a partir de 20 min ( $p < 0,05$ ) e entre veículo e 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  a partir de 15 min ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Tempo total, em segundos, gasto pelos ratos ( $n = 5-6$ ) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto, após a injeção dos CBMM-Pp (350, 210 e 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ). As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey. \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo veículo.



**Figura 11.** Número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos (n = 5-6) na arena do bioensaio do campo aberto em 30 min, após a injeção dos CBMM-Pp (350, 210 e 70 µg/animal). Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo. a) DZP, b) 70 µg/animal, c) 210 µg/animal e d) 350 µg/animal.

Início da parte confidencial













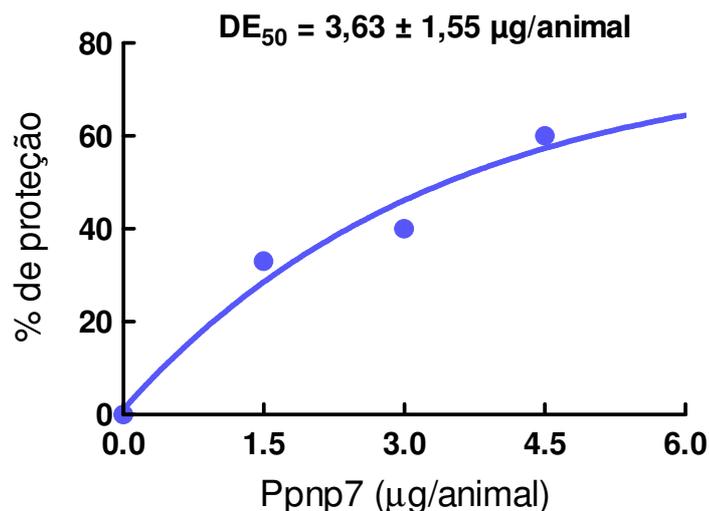


### Fim da parte confidencial

#### 4.5. Bioensaios realizados com o Ppnp7

##### 4.5.1. Avaliação da atividade anticonvulsivante

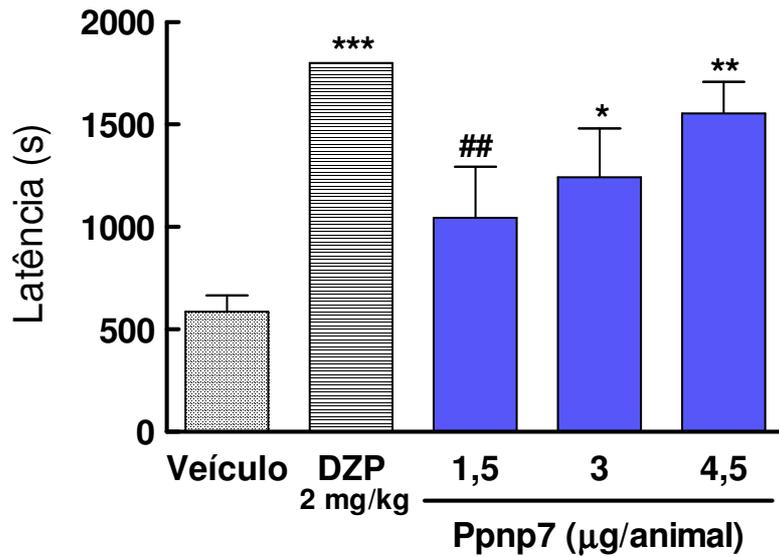
Os resultados obtidos quanto à proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nos bioensaios com o Ppnp7 estão apresentados na Figura 18. Novamente, no grupo controle veículo, a porcentagem de proteção contra esta crise foi de 0%, enquanto no grupo controle DZP, a proteção foi de 100%. A menor dose do Ppnp7, 1,5 µg/animal, protegeu 33% dos ratos, e a dose 3 µg/animal protegeu 40%. Mas somente a dose 4,5 µg/animal protegeu significativamente os ratos contra crises epilépticas máximas induzidas pelo PTZ ( $\chi^2 = 17,01$ ;  $p = 0,0019$ ). O valor obtido no cálculo da DE<sub>50</sub> foi  $3,63 \pm 1,55$  µg/animal.



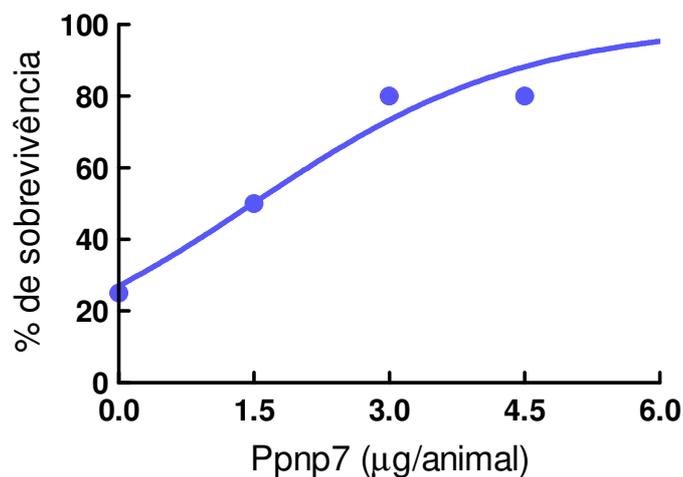
**Figura 18.** Curva de porcentagem de proteção contra a crise epiléptica máxima induzida pelo PTZ nas três diferentes doses (4,5, 3 e 1,5 µg/animal) do neuropeptídeo Ppnp7 (n = 5-8). Para o cálculo da DE<sub>50</sub> foi feita a análise de Probit.

Também houve um aumento dose-dependente da latência, como pode ser observado na Figura 19. Foram encontradas algumas diferenças significativas entre os grupos envolvidos [ $F_{(4,27)} = 11,62$ ;  $p < 0,0001$ ]. Houve diferença significativa na comparação entre o grupo veículo e os grupos DZP ( $p < 0,001$ ), 3 µg/animal ( $p < 0,05$ ) e 4,5 µg/animal ( $p < 0,01$ ), e também entre os grupos DZP e 1,5 µg/animal ( $p < 0,01$ ).

Na Figura 20, estão os resultados obtidos quanto à sobrevivência dos animais ao bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante. No teste qui-quadrado, foram obtidas diferenças significativas ( $\chi^2 = 11,61$ ;  $p = 0,0205$ ), mas, apesar disso, não houve diferença significativa entre o grupo veículo e os grupos experimentais do Ppnp7 no pós teste Fisher ( $p = 0,1026$ ). Neste pós teste, diferenças foram observadas apenas entre o grupo veículo e DZP.

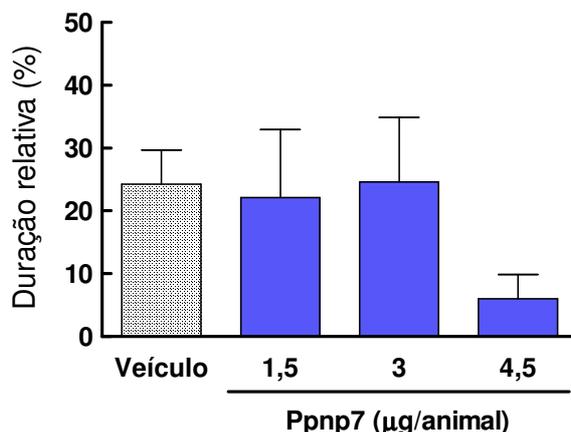


**Figura 19.** Latência para o início da crise máxima induzida pelo PTZ, em segundos, nos grupos controles e experimentais ( $n = 5-8$ ) do Ppnp7 (4,5, 3 e 1,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; ## $p < 0,01$  comparado ao grupo DZP.



**Figura 20.** Curva de porcentagem de sobrevivência durante o bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante do Ppnp7, nas doses 4,5, 3 e 1,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$  ( $n = 5-8$ ).

A duração da crise máxima foi registrada, assim como o tempo de sobrevivência dos animais, e por meio da razão entre duração e tempo total, a duração relativa da crise epiléptica máxima induzida por PTZ foi obtida. Os resultados estão na Figura 21.



**Figura 21.** Duração relativa da crise epiléptica máxima induzida por PTZ no bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante do Ppnp7, nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal (n = 5-8). Os testes realizados foram ANOVA de uma via e Tukey.

Nesta avaliação não foram observadas diferenças significativas em relação aos grupos veículo e experimentais.

#### 4.5.2. Avaliação de alterações na atividade geral espontânea dos ratos

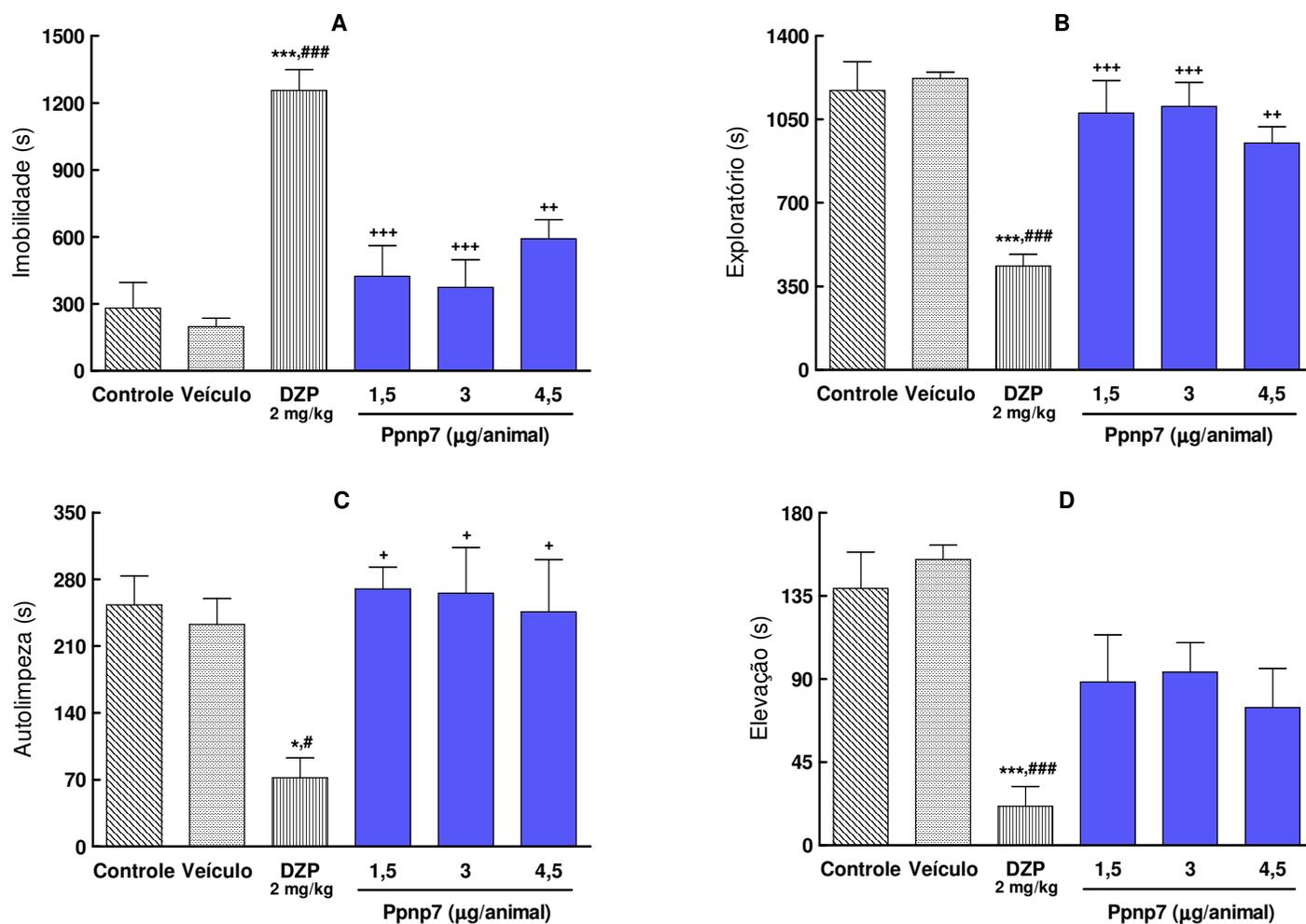
Quanto ao tempo total gasto pelos ratos nos quatro comportamentos considerados no bioensaio do campo aberto após a injeção do Ppnp7, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22. Nesta avaliação foram observadas diferenças significativas em todos os comportamentos. Houve diferença significativa entre o grupo DZP e todos os outros grupos na avaliação do tempo total gasto em

três comportamentos: imobilidade [ $F_{(5,25)} = 12,66$ ;  $p < 0,0001$ ], exploratório [ $F_{(5,25)} = 10,51$ ;  $p < 0,0001$ ] e autolimpeza [ $F_{(5,25)} = 3,943$ ;  $p = 0,009$ ]. Quanto ao comportamento elevação, foram observadas diferenças significativas apenas quando os grupos controle e veículo foram comparados ao grupo DZP [ $F_{(5,25)} = 7,087$ ;  $p = 0,003$ ].

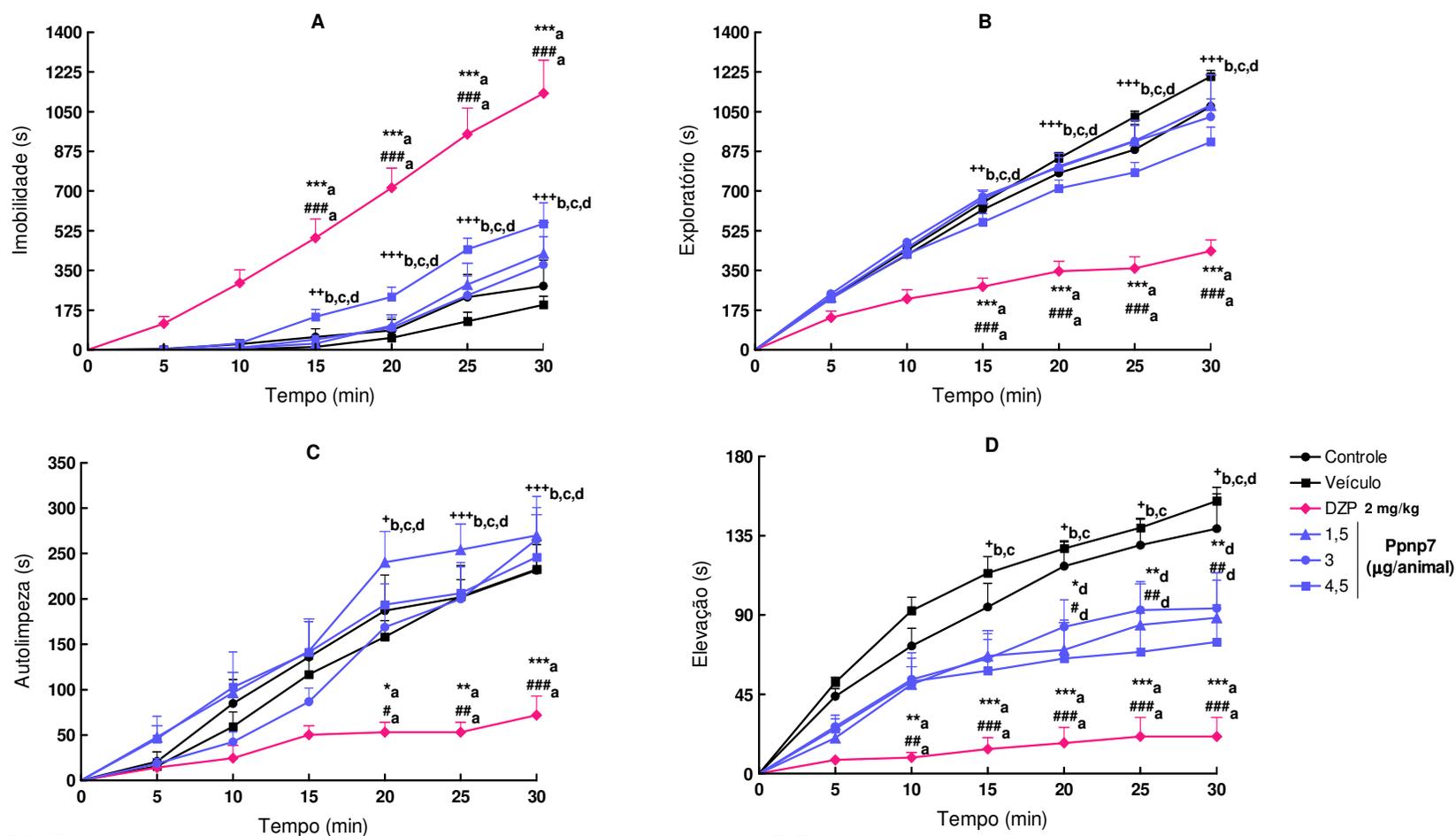
Na tentativa de observar possíveis padrões de comportamento durante os 30 min de bioensaio do campo aberto, os tempos totais dos quatro comportamentos foram divididos em intervalos de 5 min para uma análise mais detalhada. A Figura 23 mostra o tempo acumulado a cada 5 min dos quatro comportamentos considerados.

Para o comportamento imobilidade (Figura 23 A), houve diferenças significativas em relação ao tratamento [ $F_{(5,150)} = 57,87$ ;  $p < 0,0001$ ], ao tempo [ $F_{(5,150)} = 43,08$ ;  $p < 0,0001$ ] e também em relação à interação entre os dois [ $F_{(25,150)} = 2,96$ ;  $p < 0,0001$ ]. Foram observadas diferenças significativas entre o grupo DZP e todos os outros grupos a partir de 15 min ( $p < 0,01$ ). Enquanto os ratos do grupo DZP realizaram o comportamento imobilidade durante todo o período do bioensaio, os dos outros grupos começaram a apresentar este comportamento a partir do tempo 10 min.

Quanto ao comportamento exploratório (Figura 23 B), foram observadas diferenças significativas também em relação ao tratamento [ $F_{(5,150)} = 50,73$ ;  $p < 0,0001$ ], ao tempo [ $F_{(5,150)} = 148,97$ ;  $p < 0,0001$ ] e à interação entre os dois [ $F_{(25,150)} = 2,73$ ;  $p < 0,0001$ ]. Houve diferença significativa entre o grupo DZP e todos os outros grupos a partir do tempo 15 min ( $p < 0,01$ ). Todos os grupos realizaram este comportamento durante todo o período, porém a curva referente aos resultados do grupo DZP foi mais suave quando comparada à dos outros grupos.



**Figura 22.** Tempo total, em segundos, gasto pelos ratos ( $n = 5-7$ ) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . As análises estatísticas realizadas foram ANOVA de uma via e Tukey.  $*p < 0,05$  e  $***p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle;  $\#p < 0,05$  e  $###p < 0,001$  comparado ao grupo veículo;  $+p < 0,05$ ,  $++p < 0,01$  e  $+++p < 0,001$  comparado ao grupo DZP.

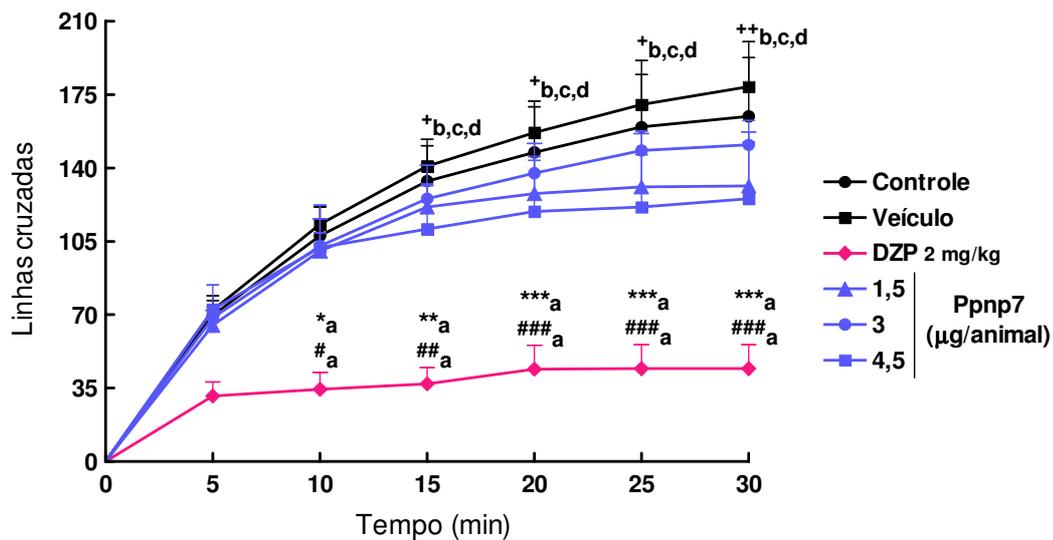


**Figura 23.** Tempo acumulado, em segundos, gasto pelos ratos (n = 5-7) nos comportamentos (A) imobilidade, (B) exploratório, (C) autolimpeza e (D) elevação no teste do campo aberto após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5 µg/animal. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo; + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$  e +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo DZP. a) DZP, b) 1,5 µg/animal, c) 3 µg/animal e d) 4,5 µg/animal.

No comportamento autolimpeza (Figura 23 C), foram obtidas diferenças significativas em relação ao tratamento [ $F_{(5,156)} = 16,38$ ;  $p < 0,0001$ ] e ao tempo [ $F_{(5,156)} = 46,27$ ;  $p < 0,0001$ ], mas não em relação à interação entre os dois [ $F_{(25,156)} = 1,23$ ;  $p = 0,223$ ]. Houve diferença significativa entre o grupo DZP e todos os outros grupos a partir do tempo 20 min ( $p < 0,05$ ). Com exceção do grupo DZP, todos os grupos realizaram este comportamento durante todo o período do bioensaio.

Por fim, para o comportamento elevação (Figura 23 D), também foram observadas diferenças significativas apenas em relação ao tratamento [ $F_{(5,150)} = 39,17$ ;  $p < 0,0001$ ] e ao tempo [ $F_{(5,150)} = 18,83$ ;  $p < 0,0001$ ], mas não em relação à interação entre os dois [ $F_{(25,150)} = 0,85$ ;  $p = 0,6773$ ]. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo DZP e todos os outros grupos: grupos controle e veículo a partir de 10 min ( $p < 0,01$ ), grupos 1,5 e 3  $\mu\text{g}/\text{animal}$  a partir de 15 min ( $p < 0,05$ ) e grupo 4,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$  no último tempo ( $p < 0,05$ ). Este último grupo foi estatisticamente diferente dos grupos controle e veículo a partir de 20 min ( $p < 0,05$ ). Novamente, todos os grupos, exceto DZP, realizaram este comportamento durante todo o período do bioensaio.

Com relação ao número de linhas cruzadas pelos animais no bioensaio do campo aberto após a injeção do Ppnp7 (Figura 24), foram obtidas diferenças significativas somente em relação ao tratamento [ $F_{(5,150)} = 26,51$ ;  $p < 0,0001$ ] e ao tempo [ $F_{(5,150)} = 13,79$ ;  $p < 0,0001$ ], mas não quanto à interação entre eles [ $F_{(25,150)} = 0,59$ ;  $p = 0,9385$ ]. Houve diferença entre o grupo DZP e todos os outros grupos: grupos controle e veículo a partir do tempo 10 min ( $p < 0,05$ ) e grupos experimentais a partir de 15 min ( $p < 0,05$ ). Quase todas as linhas cruzadas pelos ratos do grupo DZP aconteceram nos primeiros 5 min de bioensaio.



**Figura 24.** Número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos ( $n = 5-7$ ) durante os 30 min do bioensaio do campo aberto, após a injeção do Ppnp7 nas doses 4,5, 3 e 1,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e Bonferroni.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle;  $\#p < 0,05$   $##p < 0,01$  e  $###p < 0,001$  comparado ao grupo veículo;  $+p < 0,05$  e  $++p < 0,01$  comparado ao grupo DZP. a) DZP, b) 1,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , c) 3  $\mu\text{g}/\text{animal}$  e d) 4,5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ .

#### 4.5.3. Avaliação do comprometimento motor

Os resultados referentes ao bioensaio do *rotarod* estão na Tabela 4. Neste bioensaio, nenhum rato dos grupos experimentais do Ppnp7 caiu do equipamento durante as 2 h de teste, mesmo quando foi injetada a dose mais alta, 17  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Com relação aos grupos controles, também nenhum rato dos grupos controle e veículo caíram, e apenas um rato do grupo DZP caiu, nos tempos 20 e 80 min.

**Tabela 4.** Latências médias para a queda dos ratos do equipamento *rotarod* nos tempos considerados durante o bioensaio (média  $\pm$  EPM).

<b>Grupo</b>	<b>20 min</b>	<b>40 min</b>	<b>60 min</b>	<b>80 min</b>	<b>100 min</b>	<b>120 min</b>
Controle	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
Veículo	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
DZP	54,71 $\pm$ 5,29	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	56,57 $\pm$ 3,43	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
1,5 $\mu$ g/animal	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
4,5 $\mu$ g/animal	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
17 $\mu$ g/animal	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0

## 5. Discussão

O estudo de venenos e peçonhas produzidos por animais tem aumentado muito atualmente. Estes venenos representam um conjunto bastante complexo de moléculas com diversas atividades biológicas, e por isso podem ser úteis em várias áreas da ciência. Esta complexidade foi adquirida ao longo do tempo evolutivo e reflete as necessidades de captura de alimento ou de defesa contra predadores (Pimenta e Lima, 2005).

De fato, a peçonha de artrópodes apresenta grupos de compostos cujos alvos moleculares específicos são canais iônicos e receptores neuronais, e assim pode ser utilizada em pesquisas biotecnológicas e terapêuticas, em especial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de distúrbios neurológicos, como a epilepsia. Métodos e técnicas estão surgindo e sendo aperfeiçoados, e assim estão possibilitando o desenvolvimento deste tipo de pesquisa (Mortari *et al*, 2007a).

A epilepsia pode ser descrita como a ocorrência periódica de crises epilépticas espontâneas. Este distúrbio neurológico é bastante complexo, apresenta várias classificações distintas e pode ocorrer devido à herança genética ou a influências ambientais. A epilepsia tem sido vista como um problema de saúde pública, afeta predominantemente as pessoas dos países considerados subdesenvolvidos e emergentes, e, além disso, pode proporcionar aos portadores uma série de prejuízos psicológicos e sociais (Scorza e Cavalheiro, 2004; Guerrini, 2006).

Para o tratamento da epilepsia, existe, atualmente, uma grande variedade de fármacos disponíveis, mas muitos destes fármacos podem provocar efeitos

indesejados, como por exemplo as reações adversas e as interações medicamentosas, e isto pode provocar um impacto considerável na qualidade de vida do paciente (LaRoche e Helmers, 2004b). Sendo assim, a procura por novos fármacos para o tratamento deste distúrbio se mostra necessária, e a peçonha de vespas sociais pode ser um importante recurso nesta procura, devido às características observadas em moléculas presentes nesta peçonha.

Na procura pré-clínica por novos fármacos antiepilépticos, uma ferramenta essencial é a utilização de modelos animais. O modelo de indução química aguda de crises epilépticas é recorrentemente utilizado e eficiente, apesar de ser menos preciso quando comparado aos modelos crônicos (Löscher, 2002 e 1998). Esta indução de crises é realizada comumente por meio do convulsivante PTZ, o qual age predominantemente como um antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub> (Löscher, 2002). As crises epilépticas provocadas por PTZ, neste modelo, são eficientemente inibidas por benzodiazepínicos, como o DZP, pois estes fármacos são agonistas GABAérgicos (Löscher, 1998; Kwan *et al*, 2001).

Os testes de atividade anticonvulsivante foram realizados por meio de bioensaios com ratos Wistar, e foi utilizado o modelo de indução química aguda de crises epilépticas por meio do convulsivante PTZ. Nos testes com os CBMM-Pp, a dose 350 µg/animal protegeu 60% dos ratos contra a crise máxima. Esta atividade também foi observada em um estudo a partir da peçonha bruta desnaturada da vespa social *Polybia occidentalis*, no qual houve proteção contra crises epilépticas induzidas pelos convulsivantes bicuculina, picrotoxina, ácido caínico e PTZ, mas contra este último a proteção foi menos eficiente (Mortari *et al*, 2005). Em outro estudo, desta vez com a peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis*, os resultados foram semelhantes aos do trabalho citado acima, porém não houve

proteção significativa contra crises induzidas por PTZ (Cunha *et al*, 2005).

Ainda com relação aos testes de atividade anticonvulsivante realizados com os CBMM-Pp, a DE<sub>50</sub> calculada foi 314,75 ± 0,08 µg/animal. Curiosamente, no mesmo estudo com *P. occidentalis* descrito anteriormente, a DE<sub>50</sub> da peçonha bruta desnaturada foi 105 (67-120) µg/µL quando foram injetados 3 µL, então 315 µg/animal (Mortari *et al*, 2005). Por fim, foi observado também um aumento dose-dependente da latência para o início da crise epiléptica máxima induzida por PTZ, e este efeito também foi obtido no estudo já mencionado (Mortari *et al*, 2005). Quando são considerados os mecanismos já conhecidos de indução de crises epilépticas por PTZ e de inibição de crises por DZP, então os CBMM-Pp apresentam moléculas com atividade anticonvulsivante cuja atuação possivelmente está relacionada aos mesmos mecanismos da transmissão sináptica relacionados à atuação do DZP.

Com relação ao tempo gasto pelos ratos nos comportamentos considerados no teste do campo aberto, não houve diferenças significativas entre o grupo veículo e os grupos experimentais. Diferenças significativas foram constatadas apenas entre os grupos veículo e DZP nos comportamentos imobilidade, exploratório e elevação, e demonstram o forte efeito sedativo produzido por este anticonvulsivante. No estudo com *P. occidentalis*, porém, houve efeito dose-dependente da peçonha bruta desnaturada em todos os comportamentos, no sentido de ter diminuído o tempo gasto nos comportamentos exploratório, autolimpeza e elevação, e de ter aumentado o tempo gasto no comportamento imobilidade (Mortari *et al*, 2005). Já no estudo com *P. ignobilis*, foram encontradas diferenças significativas somente nos comportamentos imobilidade e exploratório, mas neste caso não houve dependência de dose (Cunha *et al*, 2005).

Quanto ao número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos na arena no teste do campo aberto com os CBMM-Pp, houve diferenças significativas em relação ao tratamento e ao tempo. As três doses dos CBMM-Pp reduziram significativamente o número de linhas cruzadas, de uma maneira independente de dose. Porém, este efeito não foi tão forte, quando comparado ao do grupo DZP. Nos outros estudos com peçonha de vespas sociais, foram observados resultados semelhantes, os quais foram dependentes (Mortari *et al*, 2005) ou independentes (Cunha *et al*, 2005) de dose.

Portanto, somente a dose de 350 µg/animal dos CBMM-Pp protegeu significativamente os ratos contra crises máximas, porém as três doses apresentaram apenas tendência sedativa, enquanto a dose de DZP aplicada protegeu todos os ratos, mas provocou significativa sedação. Estes resultados referentes aos testes com os CBMM-Pp são parte de um artigo já aceito para publicação (Apêndice).

Foram obtidas várias frações a partir da separação por cromatografia dos CBMM-Pp, os quais apresentam uma mistura complexa de aminas biogênicas, como histamina e serotonina, aminoácidos, sais inorgânicos, açúcares, peptídeos e proteínas (Beleboni *et al*, 2004a; Saidemberg *et al*, 2010). Estes compostos atuam nos sistemas biológicos, principalmente no sistema nervoso, e produzem uma grande variedade de efeitos nas transmissões sinápticas (Beleboni *et al*, 2004a; Saidemberg *et al*, 2010; Mortari *et al*, 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência foi uma ferramenta bastante adequada para a separação destes compostos, e, juntamente com a realização da espectrometria de massa, foi possível isolar e caracterizar o neuropeptídeo Ppnp7.

Este peptídeo apresenta nove resíduos de aminoácidos, e, apesar de não ter sido possível elucidar completamente a sequência, já que ainda restam duas ambiguidades, as comparações feitas em bancos de dados não revelaram similaridades com outras sequências peptídicas conhecidas. Além disso, quando é comparado aos outros peptídeos encontrados na peçonha de vespas, como cininas, peptídeos quimiotáticos e mastoparanos (Piek, 1991; Monteiro *et al*, 2009), o Ppnp7 não apresenta características semelhantes, nem quanto à função, nem quanto à estrutura. Desta maneira, este peptídeo não faz parte dos grupos de peptídeos já descritos para a peçonha de vespas, e, assim, um grupo novo de neuropeptídeos desta peçonha pode ser sugerido. Além disso, até o momento não foram relatados peptídeos anticonvulsivantes na peçonha de vespas, e, portanto, esta pesquisa é pioneira na identificação destes peptídeos.

A maior dose do Ppnp7 testada, 4,5 µg/animal, protegeu significativamente os ratos contra a crise epiléptica máxima induzida por PTZ, e, nesta avaliação, o valor obtido no cálculo da DE<sub>50</sub> foi 3,63 µg/animal. O aumento dose-dependente da latência também observado neste bioensaio reforça o potencial deste neuropeptídeo para ser anticonvulsivante.

Peptídeos com atividade anticonvulsivante tem sido encontrados com frequência na peçonha de animais do gênero *Conus*. Podem ser destacados principalmente dois destes peptídeos: a conantocina R, isolada da peçonha de *Conus radiatus*, e a conantocina G (também denominada CGX-1007), isolada de *C. geographus*. Estes peptídeos apresentaram potente atividade anticonvulsivante em bioensaios bastante semelhantes aos realizados nesta pesquisa, nos quais também foi utilizado o PTZ para a indução química aguda de crises epilépticas e a injeção dos peptídeos também foi via i.c.v. Porém, os valores obtidos das DE<sub>50</sub> foram

inferiores ao obtido nos testes com o Ppnp7: a DE<sub>50</sub> da conantocina R foi 0,31 µg/animal e a da conantocina G foi 0,065 µg/animal. Portanto, estas conantocinas são aproximadamente 12 e 56 vezes mais potentes do que o Ppnp7, respectivamente. As conantocinas atuam basicamente como antagonistas glutamatérgicos do receptor NMDA, e o aminoácido γ-carboxiglutamato, recorrentemente presente nestes peptídeos, provavelmente está relacionado à potente atividade anticonvulsivante observada (Armstrong *et al*, 1998; White *et al*, 2000; Alex *et al*, 2011).

Quanto aos resultados obtidos em relação à sobrevivência dos ratos no bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante com o Ppnp7, houve um aumento da porcentagem de ratos sobreviventes relacionado ao aumento da dose do Ppnp7, mas este resultado não foi estatisticamente significativo. Porém, este aumento sugere uma possível interferência deste neuropeptídeo neste aspecto da crise epiléptica. Quanto à duração relativa da crise máxima, não houve diferença significativa entre os grupos, assim, o Ppnp7 aparentemente não interfere nesta duração.

Ainda sobre a atividade anticonvulsivante do Ppnp7, é possível sugerir a sua atuação como modulador da neurotransmissão GABAérgica, pois, nesta avaliação, este peptídeo protegeu os ratos contra crises epilépticas máximas induzidas pelo convulsivante PTZ, um antagonista de GABA<sub>A</sub> (Löscher, 2002). Porém, esta atuação não está necessariamente relacionada a somente este mecanismo de ação, e, portanto, é preciso realizar outros experimentos para a obtenção de novos indícios quanto aos mecanismos de ação do Ppnp7.

Além disso, quanto aos CBMM-Pp, a atividade anticonvulsivante observada pode estar relacionada a mais de um composto e não exclusivamente ao Ppnp7,

pois nem todas as frações obtidas por meio da cromatografia foram testadas, e o potencial destes compostos ainda é grande.

Nos resultados relacionados ao bioensaio do campo aberto após a injeção do Ppnp7, de maneira geral, as análises do tempo total gasto pelos animais nos quatro comportamentos considerados (imobilidade, exploratório, autolimpeza e elevação) não revelaram diferenças significativas entre os grupos controle e veículo e os grupos experimentais do Ppnp7 (4,5, 3 e 1,5 µg/animal), mas apenas evidenciaram o efeito sedativo do DZP, pois os resultados foram estatisticamente diferentes apenas no sentido de reduzir o tempo total nos comportamentos exploratório, autolimpeza e elevação e de aumentar o tempo total no comportamento imobilidade nos animais do grupo DZP.

Quando foi realizada a análise do tempo gasto nestes comportamentos em intervalos acumulados de 5 min, novamente as diferenças significativas foram observadas apenas entre os grupos controle e veículo e o grupo DZP, e assim é reforçada mais uma vez a forte sedação produzida pelo DZP. Ainda assim, estes resultados avaliados em tempos acumulados permitiram uma melhor visualização de como os ratos realizaram os comportamentos ao longo do bioensaio.

Quanto ao número acumulado de linhas cruzadas pelos ratos na arena do campo aberto após a injeção do Ppnp7, também houve diferença significativa apenas entre o grupo DZP e todos os outros grupos. Assim, as três doses do Ppnp7 testadas (4,5, 3 e 1,5 µg/animal) não provocaram alterações na atividade geral espontânea dos ratos no bioensaio do campo aberto, pois os ratos destes grupos experimentais se comportaram de maneira semelhante aos ratos dos grupos controle e veículo.

O bioensaio do campo aberto pode ser utilizado para diversas finalidades, mas comumente é utilizado como nesta pesquisa, para avaliar possíveis alterações na atividade geral espontânea de animais. Neste bioensaio, o animal é confinado em um novo ambiente por um determinado período de tempo, e alguns comportamentos de interesse são registrados para avaliações posteriores. Destes registros, o número de linhas cruzadas é um dos mais considerados pela sua fácil mensuração (Xavier, 1999).

No bioensaio do *rotarod*, nenhum dos ratos testados com o Ppnp7 caiu do equipamento durante as 2 h de experimento, nem mesmo os ratos do grupo 17 µg/animal, a dose mais alta, a qual é cerca de 4 vezes mais alta do que a DE<sub>50</sub> de proteção contra a crise epiléptica máxima, obtida no bioensaio de avaliação da atividade anticonvulsivante. Assim, o Ppnp7 não provocou comprometimento motor nos ratos submetidos a este bioensaio.

Novos estudos devem ser realizados com o Ppnp7, no sentido de elucidar completamente a sua estrutura primária, possivelmente por meio da realização da degradação de Edman, de desvendar os mecanismos de ação relacionados à sua atividade anticonvulsivante, e também de verificar se este neuropeptídeo é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. A peçonha de *Polybia paulista* e também de outras vespas tem sido cada vez mais estudada, mas ainda assim vários compostos com potencial farmacológico permanecem desconhecidos.

## 6. Conclusões

- ✓ A fração com os compostos de baixa massa molecular da peçonha da vespa social *Polybia paulista* (CBMM-Pp) apresenta atividade anticonvulsivante, observada nos bioensaios com o modelo de indução química aguda de crises epiléticas por meio do convulsivante PTZ.
- ✓ Um dos compostos responsáveis por esta atividade, o Ppnp7 (neuropeptídeo 7 da *Polybia paulista*), foi isolado e caracterizado por meio de ferramentas da proteômica e apresenta nove resíduos de aminoácidos.
- ✓ O Ppnp7 protege ratos contra a crise epilética máxima induzida por PTZ, e a  $DE_{50}$  é  $3,63 \pm 1,55 \mu\text{g}/\text{animal}$ . Este peptídeo não provoca alterações na atividade geral espontânea dos ratos e também não provoca comprometimento motor quando é utilizado em doses próximas à  $DE_{50}$ .
- ✓ A peçonha de vespas e de outros animais é uma fonte bastante promissora de compostos com neuroatividade.

## 7. Anexo

Univer  
sília  
ológicas  
o Animal

VENOS  
Mortari,

Univer  
sília  
ológicas  
o Animal

DECLA  
ÇÃO DE F  
nº 45.8  
CEUA) d

of. Anton  
ordenado

e junho

ue o p  
CER  
pelo C



## 8. Referências Bibliográficas

- Abe T, Sugita M, Fujikura T, Hiyoshi J, Akasu M (2000) **Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by biscoclaurine alkaloids.** *Toxicon* 38 (12): 1803-1816.
- Alex AB, Saunders GW, Dalpé-Charron A, Reilly CA, Wilcox KS (2011) **CGX-1007 prevents excitotoxic cell death via actions at multiple types of NMDA receptors.** *NeuroToxicology* 32: 392-399.
- Armstrong H, Zhou L, Layer R, Nielson J, McCabe RT, White HS (1998) **Anticonvulsant profile of conantokin-G: a novel, broad-spectrum NMDA antagonist.** *Epilepsia* 39 (S6): 39-40.
- Baek JH, Lee SH (2010a) **Isolation and molecular cloning of venom peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae).** *Toxicon* 55: 711-718.
- Baek JH, Lee SH (2010b) **Differential gene expression profiles in the venom gland/sac of *Eumenes pomiformis* (Hymenoptera: Eumenidae).** *Toxicon* 55: 1147-1156.
- Baek JH, Lee SH (2010c) **Identification and characterization of venom proteins of two solitary wasps, *Eumenes pomiformis* and *Orancistrocerus drewseni*.** *Toxicon* 56: 554-562.
- Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM, Souza BM, César-Tognoli LMM, Ferreira VMR, Mendes MA, Cabrera MPS, Neto JR, Palma MS (2010) **Protonectin(1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*.** *Toxicon* 56: 880-889.

- Beleboni RO, Pizzo AB, Fontana ACK, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Santos WF (2004a) **Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects.** *Eur J Pharmacol* 493: 1-17.
- Beleboni RO, Carolino ROG, Pizzo AB, Castellan-Baldan L, Coutinho-Netto J, Santos WF, Coimbra NC (2004b) **Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships.** *Cell Mol Neurobiol* 24 (6): 707-728.
- Bergin AM, Connolly M (2002) **New antiepileptic drug therapies.** *Neurol Clin* 20: 1163-1182.
- Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA (2004) **Fisiologia.** Quinta edição. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Brigatte P, Cury Y, Souza BM, Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM, Gutierrez VP, Palma MS (2011) **Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*).** *Amino acids* 40: 101-111.
- Cabrera MPS, Costa STB, Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Neto JR (2008) **Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MPI.** *Eur Biophys J* 37: 879-891.
- Costa H, Palma MS (2000) **Agelotoxin: a phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera: Vespidae).** *Toxicon* 38 (10): 1367-1379.
- Cunha AO, Mortari MR, Oliveira L, Carolino RO, Coutinho-Netto J, dos Santos WF (2005) **Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate**

- receptors.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141 (1): 50-7.
- Danbolt NC (2001) **Glutamate uptake.** *Prog Neurobiol* 65 (1): 1-105.
- Dani MP, Richards EH (2010) **Identification, cloning and expression of a second gene (vpr1) from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca* that displays immunosuppressive activity.** *Journal of Insect Physiology* 56: 195-203.
- Gagliardi IC, Guimarães CA, Souza EAP, Schmutzler KMR, Guerreiro MM (2011) **Quality of life and epilepsy surgery in childhood and adolescence.** *Arq Neuropsiquiatr* 69 (1): 23-26.
- Graaf DC, Aerts M, Brunain M, Desjardins CA, Jacobs FJ, Werren JH, Devreese B (2010) **Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies.** *Insect Molecular Biology* 19 (1): 11-26.
- Guerrini R (2006). **Epilepsy in children.** *Lancet* 367: 499-524.
- Hoffman DR (1993) **Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity.** *J Allergy Clin Immunol* 92 (5): 707-716.
- Jones MG, Anis NA, Lodge D (1990) **Philanthotoxin blocks quisqualate-, AMPA- and kainate-, but not NMDA-, induced excitation of rat brainstem neurones in vivo.** *Br J Pharmacol* 101: 968-970.
- Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F (2005) **The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*.** *FEBS J* 272 (20): 5182-5190.
- Konno K, Hisada M, Itagaki Y, Naoki H, Kawai N, Miwa A, Yasuhara T, Takayama H (1998) **Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide**

- neurotoxins in solitary wasp venoms.** *Biochem Biophys Res Commun* 250: 612-616.
- Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N, Miwa A, Yasuhara T, Morimoto Y, Nakata Y (2000) **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* 38 (11): 1505-1515.
- Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Yasuhara T, Juliano MA, Juliano L, Palma MS, Yamane T, Nakajima T (2001a) **Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp *Cyphononyx dorsalis* guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.** *Toxicon* 39: 1257-1260.
- Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CC, Naoki H, Itagaki Y, Miwa A, Kawai N, Nakata Y, Yasuhara T, Ruggiero Neto J, Azevedo Jr WF, Palma MS, Nakajima T (2001b) **Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*.** *Biochim Biophys Acta* 1550 (1): 70-80.
- Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Fontana R, Rangel M, Oliveira JS, Cabrera MP, Neto JR, Hide I, Nakata Y, Yasuhara T, Nakajima T (2006) **Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*.** *Peptides* 27 (11): 2624-2631.
- Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ (2001) **The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs.** *Pharmacol Ther* 90 (1): 21-34.
- LaRoche SM, Helmers SL (2004a) **The new antiepileptic drugs: scientific review.** *JAMA* 291 (5): 605-14.

- LaRoche SM, Helmers SL (2004b) **The new antiepileptic drugs: clinical applications.** *JAMA* 291 (5): 615-20.
- Libersat F (2003) **Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey.** *J Comp Physiol A* 189: 497-508.
- Löscher W (1998) **New visions in the pharmacology of anticonvulsion.** *Eur J Pharmacol* 342: 1-13.
- Löscher W (2002) **Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.** *Epilepsy Res* 50: 105-123.
- Lüttjohann A, Fabene PF, Luijtelaar GV (2009) **A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats.** *Physiology & Behavior* 98: 579-586.
- Magloire V, Czarnecki A, Anwander H, Streit J (2011) **Beta-pompilidotoxin modulates spontaneous activity and persistent sodium currents in spinal networks.** *Neuroscience* 172: 129-138.
- Medcel (2011) **R3 Clínica Médica.** Neurologia.
- Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG (1999) **Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy.** *Epilepsy Res* 36 (2-3): 189-204.
- Mellor IR, Usherwood PNR (2004) **Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins.** *Toxicon* 43: 493-508.
- Mendes MA, Souza BM, Marques MR, Palma MS (2004) **Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*.** *Toxicon* 44: 67-74.

- Mendes MA, Souza BM, Palma MS (2005) **Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure).** *Toxicon* 45 (1): 101-106.
- Monteiro MC, Romão PRT, Soares AM (2009) **Pharmacological Perspectives of Wasp Venom.** *Protein & Peptide Letters* 16: 944-952.
- Moore EL, Haspel G, Libersat F, Adams ME (2006) **Parasitoid wasp sting: a cocktail of GABA, taurine, and beta-alanine opens chloride channels for central synaptic block and transient paralysis of a cockroach host.** *J Neurobiol* 66: 811-820.
- Mortari MR, Cunha AO, de Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, Ferreira dos Santos W (2005) **Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae).** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (5): 289-95.
- Mortari MR, Cunha AO, Ferreira LB, dos Santos WF (2007a) **Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application.** *Pharmacol Ther* 114 (2): 171-83.
- Mortari MR, Cunha AO, Carolino RO, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP, Coimbra NC, Santos WF (2007b) **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*.** *Br J Pharmacol* 151 (6): 860-869.
- Mulley JC, Mefford HC (2011) **Epilepsy and the new cytogenetics.** *Epilepsia* 52 (3): 423-432.
- Oliveira MR, Palma MS (1998) **Polybitoxins: a group of phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*).**

- Toxicon* 36 (1): 189-199.
- Olsen RW, Avoli M (1997) **GABA and epileptogenesis**. *Epilepsia* 38 (4): 399-407.
- Paxinos G, Watson C (1986) **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Inc, Sidney.
- Picolo G, Hisada M, Moura AB, Machado MFM, Sciani JM, Conceição IM, Melo RL, Oliveira V, Lima-Landman MTR, Cury Y, Konno K, Hayashi MAF (2010) **Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus***. *Biochemical Pharmacology* 79: 478-486.
- Piek T (1982) **Delta-philanthotoxin, a semi-irreversible blocker of ion-channels**. *Comp Biochem Physiol C* 72 (2): 311-315.
- Piek T, Hue B, Mantel P, Nakajima T, Pelhate M, Yasuhara T (1990) **Threonine<sup>6</sup>-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS**. *Comp Biochem Physiol C* 96: 157-162.
- Piek T (1991) **Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms**. *Toxicon* 29 (2): 139-49.
- Pimenta AMC, Lima ME (2005) **Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms**. *J Pept Sci* 11 (11): 670-6.
- Pirpignani ML, Rivera E, Hellman U, Bonino MBJ (2002) **Structural and immunological aspects of *Polybia scutellaris* Antigen 5**. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407: 224-230.
- Racine RJ (1972) **Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: Motor seizure**. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (3): 281-94.

- Ribeiro SP, Mendes MA, Santos LD, Souza BM, Marques MR, Azevedo Jr WF, Palma MS (2004) **Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista***. *Peptides* 25 (12): 2069-2078.
- Rocha T, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA (2007) **Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle**. *Toxicon* 50 (5): 589-599.
- Rocha T, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA, Harris JB (2009) **The neurotoxicological effects of mastoparan Polybia-MPII at the murine neuromuscular junction: an ultrastructural and immunocytochemical study**. *Histochem Cell Biol* 132: 395-404.
- Rocha T, Barros LLS, Fontana K, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA (2010) **Inflammation and apoptosis induced by mastoparan Polybia-MPII on skeletal muscle**. *Toxicon* 55: 1213-1221.
- Saidemberg DM, Silva-Filho LC, Cesar Tognoli LMM, Tormena CF, Palma MS (2010) **Polybioside, a neuroactive compound from the venom of the social wasp *Polybia paulista***. *J Nat Prod* 73 (4): 527-531.
- Santos LD, Santos KS, Arcuri HA, Cunha Neto E, Kalil JE, Castro FM, Palma MS (2007) **Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)**. *Toxicon* 50: 923-937.
- Santos LD, Santos KS, Pinto JRA, Dias NB, Souza BM, Santos MF, Perales J, Domont GB, Castro FM, Kalil JE, Palma MS (2010) **Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism**. *Journal of proteome research* 9: 3867-3877.

- Schiavon E, Stevens M, Zaharenko AJ, Konno K, Tytgat J, Wanke E (2010) **Voltage-gated sodium channel isoform-specific effects of pompilidotoxins.** *FEBS Journal* 277: 918-930.
- Scorza FA, Cavalheiro EA (2004) **Epilepsias: aspectos sociais e psicológicos.** *R Cult, R IMAE* 5 (11): 48-53.
- Soldatova L, Kochoumian L, King TP (1993) **Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases.** *FEBS Lett* 320 (2): 145-149.
- Souza BM, Marques MR, Tomazela DM, Eberlin MN, Mendes MA, Palma MS (2004) **Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 1095-1102.
- Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, César LM, Almeida RN, Pagnocca FC, Konno K, Palma MS (2005) **Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Peptides* 26 (11): 2157-2164.
- Souza BM, Silva AVR, Resende VMF, Arcuri HA, Cabrera MPS, Neto JR, Palma MS (2009) **Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*.** *Peptides* 30: 1387-1395.
- Speller JM, Westby GW (1996) **Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into the deep cerebellar nuclei.** *Exp Brain Res* 110 (3): 425-34.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G (1997) **Voltage-activated calcium channels: targets of antiepileptic drug therapy?** *Epilepsia* 38 (9): 959-965.

- Theakston RD, Kamiguti AS (2002) **A list of animal toxins and some other natural products with biological activity.** *Toxicon* 40 (5): 579-651.
- Vincent B, Kaeslin M, Roth T, Heller M, Poulain J, Cousserans F, Schaller J, Poirié M, Lanzrein B, Drezen JM, Moreau SJM (2010) **The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach.** *BMC Genomics* 11: 693, 15pp.
- Wang KR, Zhang BZ, Zhang W, Yan JX, Li J, Wang R (2008) **Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI.** *Peptides*, 29 (6): 963-968.
- Wang KR, Yan JX, Zhang BZ, Song JJ, Jia PF, Wang R (2009) **Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells.** *Cancer Letters* 278: 65-72.
- White HS, McCabe RT, Armstrong H, Donevan SD, Cruz LJ, Abogadie FC (2000) **In vitro and in vivo characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*.** *J Pharmacol Exp Ther* 292 (1): 425-432.
- World Health Organization (2009) **Epilepsy.** Fact sheet 999.
- Xavier GF (Org.) (1999) **Técnicas para o estudo do sistema nervoso.** São Paulo: Plêiade, v.1.
- Xu X, Li J, Lu Q, Yang H, Zhang Y, Lai R (2006) **Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom.** *Toxicon* 47 (2) 249-253.
- Ye J, Zhao H, Wang H, Bian J, Zheng R (2010) **A defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*.** *Toxicon* 56: 101-106.

Zhang W, Li J, Liu LW, Wang KR, Song JJ, Yan JX, Li ZY, Zhang BZ, Wang R (2010)

**A novel analog of antimicrobial peptide Polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice.** *Peptides* 31: 1832-1838.

Zhu JY (2010) **Proteomic analysis of the venom from the endoparasitoid wasp**

***Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae).** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 75 (1): 28-44.

Zhu JY, Ye GY, Fang Q, Hu C (2010) **Alkaline phosphatase from venom of the**

**endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*.** *Journal of Insect Science* 10:14, available online: [insectscience.org/10.14](http://insectscience.org/10.14).

## Apêndice

### Anticonvulsant and Anxiolytic Activity of the Peptide Fraction Isolated from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*

Lucianna Lopes do Couto<sup>a1</sup>, Lilian Carneiro dos Anjos<sup>a1</sup>, Maíra de Azevedo Feitosa Araujo<sup>b</sup>, Cecília Alves Mourão<sup>a</sup>, Carlos Alberto Schwartz<sup>a</sup>, Luzitano Brandão Ferreira<sup>b</sup>, Márcia Renata Mortari<sup>a\*</sup>

<sup>1</sup>These authors contributed equally to the work.

<sup>a</sup>Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil.

<sup>b</sup>Faculty of Health Sciences, University Center of Brasília, Brasília, Brazil.

\*Correspondence address:

Campus Universitário Darcy Ribeiro,  
University of Brasília, Institute of Biological Sciences,  
Department of Physiological Sciences  
Zip Code: 70910-900  
Brasília, Distrito Federal, Brazil

Phone: +55-61-3107-3107

Fax: +55-61-3107-2904

E-mail: mmortari@unb.br

Running title: Anticonvulsant and anxiolytic effects of the peptides from the wasp venom.

## **Abstract**

**Background:** Arthropod venoms have attracted interest because they represent a source of neuroactive compounds that can be useful tools in neuroscience and pharmacological investigations. **Objective:** The purpose of the present work was to evaluate the anticonvulsant, anxiolytic and behavioral effects of the peptide fraction separated from venom of the social wasp. **Materials and Methods:** The low molecular weight compounds of the venom were separated by ultrafiltration and the bioassays were performed to test anticonvulsant and anxiolytic effects, as well as alterations in the spontaneous behavior of the animals. **Results:** I.c.v. injections of the compounds induced dose-dependent anticonvulsant effects and a potent anxiolytic activity. Regarding behavioral effects, no significant differences were observed in relation to the saline control group. **Conclusion:** The low molecular weight compounds of the venom of *P. paulista* include neuroactive peptides that can be used as pharmacological resources for anticonvulsant and anxiolytic drug research.

Keywords: anticonvulsant, anxiolytic, neuroactive compounds, behavioural effects, peptides, wasp venom.

## Introduction

Neurological, mental, and behavioral disorders represent a huge burden to society, affecting more than 450 million people globally. <sup>[1]</sup> Furthermore, the data suggest that psychiatric and neurological disorders are a growing and important cause of morbidity. <sup>[2,3]</sup> Among the most common neurological disorders are depression, schizophrenia, Alzheimer's disease, anxiety disorders and epilepsy.

Epilepsy is the second most common neurological disease in the world, affecting approximately 1% of the population. <sup>[4]</sup> It is defined as a chronic disorder of the brain characterized by recurrent and spontaneous unpredictable seizure activity, which is triggered by an abnormal discharge of neurons, <sup>[5,6]</sup> and it has psychological, cognitive, neurobiological and social consequences for the patient. <sup>[7]</sup> Treatment for this disorder is based on the chronic administration of antiepileptic drugs. <sup>[5]</sup> These drugs often have strong side effects, which vary in frequency and severity after chronic treatment and may include chronic toxicity, cognitive impairment, sedation, teratogenesis and hepatic failure. <sup>[8-13]</sup>

A significant proportion of patients with epilepsy (30%) suffer from intractable, that is, drug-resistant types of seizures. <sup>[6]</sup> Interestingly, most of the newer drugs available are more efficient than conventional anticonvulsants but still induce strong side effects at therapeutic doses. <sup>[6,13]</sup> As a result the search continues for new drugs to treat the patients whose seizures are inadequately controlled by existing drugs, including adults with complex partial seizures and children with a variety of syndromes. <sup>[14,15]</sup>

Anxiety disorders, as a group, are the most prevalent mental health conditions in both developing and developed regions around the world. <sup>[16]</sup> To distinguish pathological anxiety from normal anxiety it is necessary to establish whether the anxiety reaction is of short, self-limiting duration and linked to the moment. The pathological anxiety disorders affect about

400 million people worldwide, and an estimated 20% of the population will be subject to these disorders later in life. In Brazil, anxiety disorders are considered to represent a major public health problem, affecting over 10 million people. <sup>[16]</sup>

Anxiety disorders are also enormously costly in terms of individual suffering and direct medical and indirect social cost. <sup>[17,18]</sup> Moreover, when first-line treatments are not effective, treatment-resistant anxiety disorders may be another serious problem. <sup>[19]</sup>

In this context, venoms of arthropods such as spiders, scorpions and wasps, due to their properties of specificity and affinity for neuroactive substances, may be useful in the design of novel drugs for the treatment of neurological disorders. <sup>[20-22]</sup>

Wasp venoms are complex mixtures of biochemically and pharmacologically active substances, which include amines, small peptides and high molecular weight proteins such as enzymes, allergens and toxins. <sup>[23-26]</sup> The venom of social wasps contains mainly low molecular weight compounds comprising peptides, <sup>[27,28]</sup> which are the most common compounds (about 70%) in this venom <sup>[28]</sup> and many of these have antimicrobial, myotoxic, hemolytic and neural activity. <sup>[26,29-31]</sup> In relation to the latter some peptides exert potent anticonvulsant, antinociceptive and antipanic activity when applied directly to the central nervous system (CNS) of rats. <sup>[30-33]</sup>

Very few studies have focused on the venoms of social wasps as sources of excitatory and inhibitory neuronal modulators. The purpose of this study was the investigation of the anticonvulsant and anxiolytic activity of the low molecular weight compounds isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polybia paulista*, as well as an analysis of the side-effects of these compounds on spontaneous behavior in Wistar rats.

## Materials and methods

### *Animals*

This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Use of the Institute of Biological Sciences, University of Brasília, under license number 45.810/2009. Animals were maintained in accordance with the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior ethical statements, which follow the guidelines for animal care prepared by the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA. Likewise, every effort was made to avoid unnecessary stress and pain to the experimental animals. Moreover, the collection of specimens of the wasps was authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation in Brazil (license number 21723-1, date of issue 27/10/2009).

### *Wasps*

*Polybia paulista* specimens were collected in Distrito Federal, Brazil. The wasps' nest was collected and immediately submitted to low temperature in a cooler with ice. In the lab, the nest was stored at -20°C for 5 h to euthanize the wasps. A total of 1500 venom sacs were dissected and macerated in a 1:1 acetonitrile/deionized water solution. The supernatant of the macerated material was centrifuged using an ultra filter (Millipore) with a 3 kDa cut-off for 30 min at 10000 x g. The resultant ultrafiltrate, characterized as low molecular weight compounds of the *Polybia paulista* venom (LMWC-Pp), was quantified and diluted in deionized water at concentrations of 70, 210 and 350 µg/µL.

### *Rats*

Male Wistar rats (220-250 g) from the animal house of the University of Brasília, Distrito Federal, Brazil were used in the assays. They were kept in wire-mesh cages in a room

with a dark/light cycle of 12 h (lights on at 7:00 a.m.), with water and food *ad libitum*. Conditions of luminosity and temperature (22°C) were kept constant in the housing and experiment rooms. Efforts were made to minimize the number and potential suffering of experimental subjects.

For surgical procedures all animals were anesthetized with ketamine (60 mg/kg, Syntec, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Syntec, Brazil) and fixed in a stereotactic frame (Insight, Brazil). A local injection of lidocaine was given, and the cranium was exposed for implantation of a stainless steel guide cannula (10 mm) in the right lateral ventricle. The coordinates used were 0.8 mm posterior to bregma, 1.6 mm lateral from the midline and 3.4 mm ventral from the surface of the skull according to the atlas of Paxinos & Watson.<sup>[34]</sup> The cannula was fixed to the skull with dental acrylate. Before performing the assays, all animals were allowed 5-7 days to recover from surgery.

### *Bioassays*

#### *Anticonvulsant activity*

Groups of rats (n = 5-8) were injected i.c.v. with LMWC-Pp at 70, 210, 350 µg/animal and saline, with the aid of a Hamilton syringe driven by an infusion pump (Harvard Apparatus) injecting a volume of 1 µL over 1 min. Ten minutes after the injection, the animals received a single dose of the convulsant pentylenetetrazole, PTZ (105 mg/kg, s.c., Sigma) and were placed in the arena and filmed for 30 min. The dose of the convulsant was based on previous experiments to find the dose that produced convulsions in 97% of the animals (CD<sub>97</sub>) (data not shown). A positive control was also employed, in which PTZ was injected 30 min after Diazepam, DZP (anticonvulsant, 2 mg/kg, i.p.). Seizures were evaluated using the score for seizure severity proposed by Lüttjohann et al.<sup>[35]</sup> The number of animals

that presented a score 6 seizure (maximum score) and the latency to onset of seizures were recorded.

#### *Anxiolytic activity*

Groups of rats (n = 5-8) were injected i.c.v. with LMWC-Pp (70, 210 and 350 µg/animal) and physiological saline, with the aid of a Hamilton syringe as described above. Ten minutes after treatment, the animals were placed in the center of an elevated plus maze (EPM), made of wood and consisting of four arms, each 50 cm in length and 10 cm in width. Two opposing arms were enclosed by walls 40 cm in height, while the two remaining (open) arms were surrounded by a raised lip to prevent falls from the apparatus. The maze was elevated 50 cm above the floor. The maze was cleaned with alcohol-soaked and dry cloths between animals. In addition to the saline group, two other control groups were employed: negative, in which the anxiogenic substance PTZ (30 mg/kg, s.c.) was injected and the rats were placed in the EPM 15 min later, and positive, in which the standard anxiolytic DZP (2 mg/kg, i.p.) was injected and the rats were placed in the EPM 30 min later. The behaviors of the experimental animals were recorded for 5 min by a video camera interfaced with a computer in an adjacent room. The following behavioral responses were analyzed: number of entries 1) in the open arms and 2) in the closed arms; time spent 3) in the open arms and 4) in the closed arms; and 5) number of head dips.

#### *Behavioral effects*

Adverse effects on the spontaneous behavior of animals were assessed using the open field test. Rats were placed in an acrylic arena (open field) 60 cm in diameter and 50 cm high, the floor of which was divided in 12 sections, after being injected as described before with LMWC-Pp at 70, 210 and 350 µg/animal, saline and DZP. The animals were filmed for 30

min. The time spent in each behavior and the numbers of lines crossed were recorded. Behavioral categories were grouped according to Speller & Westby<sup>[36]</sup> with modifications, as follows: exploratory and immobility, and lines crossed.

#### *Histological analysis*

To verify the correct positioning of the cannula, after the assays the animals received an overdose of sodium thiopental (Cristália, Brazil). Following euthanasia the animals were injected i.c.v. with toluidine blue to mark the exact site of injection. Then, the brains were removed and frozen. After freezing, incisions were made in the brain to visualize the ventricular system and confirm the injection site. Correctly located cannulas were considered to be those that would enable a complete blue coloration of the lateral ventricles. Data from rats with guide cannula tips located outside the lateral ventricle were not included in behavioral and statistical analyses.

#### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA). Differences were considered significant at values of  $p < 0.05$ . With regard to anticonvulsant activity, the numbers of animals protected from seizures were analyzed using the chi-square test, and  $ED_{50}$  values were calculated by the Probit method. To analyze the latency to onset of seizures in the anticonvulsant assays the data collected were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Regarding anxiolytic activity, to analyze the time spent on and number of entries into the open and closed arms of the EPM, as well as head dipping behavior, the results were subjected to ANOVA, followed by the Tukey test. The data obtained by the observation of exploratory and immobility behaviors were subjected to ANOVA followed by the Tukey test.

In addition, the number of lines crossed was subjected to two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test.

## **Results**

### *Anticonvulsant activity*

The results for protection against score 6 PTZ-induced seizures after administration of the LMWC-Pp are shown in Figure 1. Data from these experiments demonstrated that the administration of LMWC-Pp blocked PTZ-induced seizures in a dose-dependent manner. In experimental groups, the lower dose (70 µg/animal) did not protect any of the animals, while the medium dose (210 µg/animal) protected 12%. However, only the highest dose of LMWC-Pp, 350 µg/animal, gave significant protection against score 6 PTZ-induced seizures compared to the saline group and the lowest dose of LMWC-Pp, protecting 60% of the animals ( $\chi^2 = 23.18$ ,  $p < 0.001$ ). The ED<sub>50</sub> value was calculated at  $314.75 \pm 0.08$  µg/animal. In the saline group, all animals presented seizures. By contrast, in the DZP group no animals presented seizures.

The latencies to the onset of PTZ-induced seizures in control and experimental groups can be seen in Figure 2. ANOVA revealed significant differences in the various experimental treatments [ $F_{(4,26)} = 21.23$ ,  $p = 0.0001$ ]. Latencies in the saline and 70 and 210 µg/animal LMWC-Pp groups were significantly shorter than that of the DZP group. Moreover, significant differences were also observed between the 210 µg/animal dose of LMWC-Pp and the saline and 70 µg/animal groups. The latency in the 350 µg/animal dose was significantly longer than those of the saline and 70 µg/animal LMWC-Pp groups ( $p < 0.001$ ). Thus, a dose-dependent increase was observed in the latency to PTZ-induced seizure onset.

### *Anxiolytic activity*

The time spent in the open arms of the EPM can be seen in Figure 3A. In relation to this parameter, ANOVA revealed significant differences in the various experimental treatments [ $F_{(5,28)} = 6.261, p=0.0008$ ]. Animals treated with the highest dose of LMWC-Pp and DZP spent significantly more time in the open arms when compared with the groups treated with saline and PTZ. The number of entries in the open arms of the EPM was also significantly different [ $F_{(5,26)} = 5.939, p=0.0014$ ] between the different groups. These data are shown in Figure 3C, where an increase in the number of entries can be seen in the group treated with the highest dose of LMWC-Pp.

Figure 3B illustrates the time spent in the closed arms of the EPM. ANOVA did not detect a significant difference between the groups [ $F_{(5,35)} = 2.530, p=0.0502$ ]. Similar results were observed for the analysis of the number of entries in the closed arms (Figure 3D), where there was no significant difference [ $F_{(5,35)} = 1.286, p=0.2958$ ]. Also, there was a significant increase [ $F_{(5,30)} = 2.991, p=0.0299$ ] in the time spent engaged in head dipping behavior when rats were given the highest dose of LMWC-Pp, compared with control groups. These observations are illustrated in Figure 4.

### *Behavioral effects*

The effects of LMWC-Pp doses, saline and DZP on exploratory and immobility behaviors are shown in Figures 5A and 5B. A significant difference between saline and DZP was observed ( $p<0.01$ ), but not between saline and experimental groups, both for immobility [ $F_{(4,22)} = 4.135, p=0.012$ ] and also exploratory behaviors [ $F_{(4,22)} = 3.708, p=0.0187$ ].

Regarding the number of lines crossed by the animals in the arena, as shown in Figure 5C there were significant effects of treatment [ $F_{(4,102)} = 22.94, p<0.0001$ ] and time [ $F_{(5,102)} = 5.23, p=0.0003$ ], but there was no significant difference in the treatment-versus-time

interaction [ $F_{(20,102)} = 0.37$ ,  $p=0.9936$ ]. Post hoc analysis indicated that the number of lines crossed within 10 min by animals in the DZP group was significantly different from the saline group ( $p<0.01$ ), and this difference became more significant after this period of time ( $p<0.001$ ). At 15 min there was a significant difference between the number of lines crossed in 70 and 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  LMWC-Pp groups compared to the saline group ( $p<0.05$ ); after this period the number of lines crossed by animals in the saline group was significantly different from 70 ( $p<0.01$ ), 210 and 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  LMWC-Pp groups ( $p<0.05$ ).

## Discussion

Arthropod venoms have attracted interest from researchers because they represent a source of neuroactive compounds that can be useful tools in neuroscience and pharmacological investigations,<sup>[37]</sup> and, particularly, in this study, the low molecular weight compounds from the venom of *Polybia paulista* presented relevant anxiolytic and anticonvulsant activities.

In the present work, the low molecular weight compounds from the venom of the wasp *Polybia paulista* exerted an anticonvulsant effect in the bioassays with the 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$  dose group, in which 60% of animals were protected from score 6 PTZ-induced seizures. This effect was also found in a study with crude denatured venom of *Polybia occidentalis*,<sup>[32]</sup> in which the authors observed protection from seizures induced by four distinct convulsants: bicuculline, picrotoxin, kainic acid and PTZ, although protection against the latter was less effective. Another study<sup>[31]</sup> demonstrated similar effects of the denatured venom of *Polybia ignobilis*, with protection being observed from seizures induced by the same convulsants cited above, except PTZ. Compounds with anticonvulsant activity were found also in venom from other arthropods such as spiders.<sup>[38,39]</sup>

Also with regard to anticonvulsant activity, the obtained ED50 was  $314.75 \pm 0.08$   $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Interestingly, in the study with crude denatured venom of *P. occidentalis* cited above, <sup>[32]</sup> the ED50 was 315  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Finally, it was found a dose-dependent increase in the latency to onset of PTZ-induced seizures, which was also observed in the work with *P. occidentalis* mentioned above. <sup>[32]</sup>

Interestingly, the PTZ test has been employed to evaluate compounds during initial screening to discover the potential of the test material against myoclonic seizures and absence of seizures, <sup>[40,41]</sup> in which active compounds may raise the seizure threshold for excitation in the neural tissues and thereby suppress seizure activity. <sup>[42]</sup> Thus, the LMWC-Pp probably contains compounds that are effective in the treatment of myoclonic seizures. Since PTZ-induced seizures can be blocked by either drugs that reduce the t-type calcium currents or drugs that enhance GABAA receptor-mediated inhibition, <sup>[43]</sup> it can be suggested that the ultrafiltrate compounds, consisting mainly of peptides, tested in the present work may be acting on these mechanisms.

In this study, it was also used the elevated plus maze (EPM) to induce anxiety in animals, which are exposed to etiological aversive situations. <sup>[44]</sup> The EPM model is based on the innate fear of rodents for open spaces and heights, which is one of the factors that generate anxiety. <sup>[45]</sup> The most important parameters in evaluating the anxiolytic activity of the drug under study are the time spent on and the number of entries into the open arms. <sup>[44]</sup>

Benzodiazepines, such as DZP, have been used in the treatment of epilepsy and anxiety, but side effects, such as tolerance and sedation, are limitations that have restricted their use. <sup>[46]</sup> Meanwhile, in experimental models PTZ is commonly administered as a convulsant or anxiogenic agent; its effect depends on the dose injected, and DZP can provide protection from seizures induced by PTZ. <sup>[47]</sup> In the bioassays of anxiolytic activity, only the highest dose of LMWC-Pp, 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , reduced the anxiety in the animals significantly

compared to the saline group. Similar results were obtained in other studies, in which anxiolytic activity was demonstrated with the EPM model in compounds isolated from spider venom, although in this case the effect was dose-dependent. [38]

Another parameter used to assess anxiolytic activity is behavior which can be interpreted as assessing the potential risk involved in a situation: head dipping. [48] As can be seen in Figure 4, the highest dose of LMWC-Pp led to a significant increase in head dipping compared to PTZ given alone, with this increase being larger than that in the DZP group, suggesting the presence of a component with anxiolytic activity in this venom. Regarding the number of entries in the closed arms, there was no significant difference between the groups, which is quite interesting since some studies have shown that the frequency of closed arm entries may be an indicator of a change in overall motor activity. [38,48] Therefore, these results suggest that the anxiolytic compound present in the LMWC-Pp possesses minimal side effects.

The evaluation of behavioral effects demonstrated no significant differences between the doses of LMWC-Pp and saline groups in time spent in exploratory and immobility behaviors. However, in the study with crude denatured venom of *P. occidentalis* [32] cited above, the authors found a significant, dose-dependent increase in the time spent in immobility behavior and a decrease in the time spent in exploratory behavior. In the study with *P. ignobilis* [31] also mentioned above, the authors again found significant differences in immobility and exploratory behaviors, although these were not dose-dependent.

The number of lines crossed by the animals in the open-field arena provides evidence of changes in spontaneous locomotor activity. It was observed that the different doses of LMWC-Pp significantly reduced, in a manner independent of dose, the number of lines crossed by the animals, although this effect was moderate when compared to the DZP group.

Other authors have also demonstrated this effect of wasp venom on spontaneous locomotor activity, with reports suggesting it to be dependent<sup>[32]</sup> or independent<sup>[31]</sup> of the dose.

The results of this study demonstrated that the low molecular weight compounds isolated from the venom of *P. paulista* exerted anticonvulsant and anxiolytic effects. The DZP treatment protected all animals from PTZ-induced seizures, but caused significant sedation. By contrast, the experimental groups presented only a trend towards sedation, although only the highest dose offered substantial protection from seizures. These activities have been observed in other *Polybia* species and reveal the great potential for the study of anticonvulsant and anxiolytic compounds isolated from social wasps' venom.

Studies on the application of wasp venom in the treatment of anxiety and epilepsy are scarce. The results obtained indicate that wasp venom and its components are promising tools for experimental pharmacology, and further studies will be conducted in order to improve understanding of their effects and exploit their potential.

### ***Declaration of Interest***

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

This work received financial support from the Brazilian Research Foundations; National Council for Scientific and Technological Development - CNPq, Universal Grant (No. 479873/2008) and Foundation for Research Support from the Distrito Federal - FAPDF, Induced Demand Grant (No. 193.000.539/2009).

## References

- [1] Mathers CD, Lopez A, Stein C, Ma Fat D, Rao C, Inoue M, et al. Deaths and Disease Burden by Cause: Global Burden of Disease Estimates for 2001 by World Bank Country Groups. Working Paper 18. Bethesda, Md: Disease Control Priorities Project [serial on the Internet]. Accessed 03 may 2010. Available from: <http://www.dcp2.org/file/33/wp18.pdf>.
- [2] Sperling MR, Harris A, Nei M, Liporace JD, O'Connor MJ. Mortality after epilepsy surgery. *Epilepsia*. 2005; 46: 49-53.
- [3] World Health Organization: What are neurological disorders? Question and answer archives [serial on the Internet]. 2007 [cited 03 may 2010]; Available from: <http://www.who.int/features/qa/55/en/index.html>.
- [4] Blum DE. New drugs for persons with epilepsy. *Adv Neurol*. 1998; 76: 57-87.
- [5] Tunnicliff G. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen Pharmacol*. 1996; 27: 1091-97.
- [6] Löscher W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *Eur J Pharmacol*. 1998; 342:1-13.
- [7] Guerrini R. Epilepsy in children. *Lancet*. 2006; 367: 499-524.
- [8] Verity CM, Hosking G, Easter DJ. A multicentre comparative trial of sodium valproate and carbamazepine in paediatric epilepsy. *Dev Med Child Neurol*. 1995; 37: 97-108.
- [9] Silva M, MacArdle B, McGowan M, Hughes E, Stewart J, Neville BG, et al. Randomised comparative monotherapy trial of phenobarbitone, phenytoin, carbamazepine, or sodium valproate for newly diagnosed childhood epilepsy. *Lancet*. 1996; 347: 709-13.
- [10] Painter MJ, Scher MS, Stein AD, Armatti S, Wang Z, Gardiner JC, et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Engl J Med*. 1999; 341: 485-89.

- [11] Raza M, Shaheen F, Choudhary MI, Sombati S, Rafiq A, Suria A, et al. Anticonvulsant activities of ethanolic extract and aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *J Ethnopharmacol.* 2001; 78: 73-8.
- [12] Bergin AM, Connolly M. New antiepileptic drug therapies. *Neurol Clin.* 2002; 20: 1163-82.
- [13] LaRoche SM, Helmers SL. The new antiepileptic drugs: clinical applications. *JAMA.* 2004; 291: 615-620.
- [14] Meldrum BS. Identification and preclinical testing of novel antiepileptic compounds. *Epilepsia.* 1997; 38(9): 7-15.
- [15] Villetti G, Bregola G, Bassani F, Bergamaschi M, Rondelli I, Pietra C, et al. Preclinical evaluation of CHF3381 as a novel antiepileptic agent. *Neuropharmacol.* 2001; 40: 866-78.
- [16] Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, et al. WHO World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA* 2004; 291: 2581-90.
- [17] Greenberg PE, Sisitsky T, Kessler RC, Finkelstein SN, Berndt ER, Davidson JR, et al. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60: 427-35.
- [18] Mogotsi M, Kaminer D, Stein DJ. Quality of life in the anxiety disorders. *Harv Rev Psychiatry.* 2000; 8: 273-82.
- [19] Stein DJ, Seedat S. Unresolved questions about treatment-resistant anxiety disorders. *CNS Spectr.* 2004; 9: 715.
- [20] Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye.* 2004; 18: 1075-84.
- [21] Wang CZ, Chin CW. Conus peptides: a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2004; 36: 713-23.

- [22] Mortari MR, Cunha AO, Ferreira LB, dos Santos WF. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 2007; 114: 171-83.
- [23] Habermann E. Bee and wasp venom: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science.* 1972; 177: 314-22.
- [24] Piek T. Delta-Philanthotoxin, a semi-irreversible blocker of ion-channels. *Comp Biochem Physiol C.* 1982; 72: 311-15.
- [25] Nakajima T. Biochemistry of vespoid venoms. In: Tu AT. *Handbook of natural toxins.* Marcel Dekker, New York. 1984; 109-33.
- [26] Monteiro MC, Romão PR, Soares AM. Pharmacological perspectives of wasp venom. *Protein Pept Lett.* 2009; 16: 944-52.
- [27] Ho CL, Shih YP, Wang KT, Yu HM. Enhancing the hypotensive effect and diminishing the cytolytic activity of hornet mastoparan B by D-amino acid substitution. *Toxicon.* 2001; 39: 1561-66.
- [28] Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM, Palma MS. Profiling the peptidome of the venom from the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *J Prot.* 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.06.004.
- [29] Piek T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon.* 1991; 29: 139-49.
- [30] Oliveira L, Cunha AO, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, et al. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. *Brain Res.* 2005; 1031: 74-81.
- [31] Cunha AO, Mortari MR, Oliveira L, Carolino RO, Coutinho-Netto J, dos Santos WF: Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol C.* 2005; 141: 50-57.

- [32] Mortari MR, Cunha AO, Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, et al. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 97: 289-95.
- [33] Mortari MR, Cunha AO, Carolino RO, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP, 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*. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 860-69.
- [34] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney. 1986.
- [35] Lüttjohann A, Fabene PF, Luijtelaar GV. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* 2009; 98: 579-86.
- [36] Speller JM, Westby GW. Bicuculline-induced circling from the rat superior colliculus is blocked by GABA microinjection into deep cerebellar nuclei. *Exp Brain Res.* 1996; 110: 425-34.
- [37] Beleboni RO, Pizzo AB, Fontana ACK, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, dos Santos WF: Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol.* 2004; 493: 1-17.
- [38] Liberato JL, Cunha AO, Mortari MR, Gelfuso EA, Beleboni RO, Coutinho-Netto J, et al. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAII, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistrriata* (Araneidae: Araneae). *Brain Res.* 2006; 1124: 19-27.
- [39] Gelfuso EA, Cunha AO, Mortari MR, Liberato JL, Paraventi KH, Beleboni RO, et al. Neuropharmacological profile of FrPbAII, purified from the venom of the social spider *Parawixia bistrriata* (Araneae, Araneidae), in Wistar rats. *Life Sci.* 2007; 80: 566-72.

- [40] White HS, Woodhead JH, Wilcox KS, Stables JP, Kupferberg HJ, Wolf HH. Discovery and preclinical development of antiepileptic drugs. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E. Antiepileptic drugs. Lippincott, Philadelphia, 2002. 36-48.
- [41] White HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 1997; 38: S9-17.
- [42] Löscher W, Schmidt D. Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*. 1988; 2: 145-81.
- [43] Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther*. 2001; 90: 21-34.
- [44] Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16: 33-6.
- [45] Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1955; 48: 254-60.
- [46] Graeff FG, Brandão ML. Neurobiology of mental disorders. Lemos Editorial, São Paulo. 1997.
- [47] De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy and their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res*. 1992; 12: 87-110.
- [48] File SE. Behavioral detection of anxiolytic action. In: Elliott JM, Heal DJ, Marsden CA. Experimental approaches to anxiety and depression. John Wiley & Sons, New York, 1992. 25-44.

**Figure 1.** Anticonvulsant effect of low molecular weight compounds from the venom of *Polybia paulista* against score 6 PTZ-induced seizures. All data were subjected to chi-square test. ED<sub>50</sub> values were calculated by the *Probit* method.

**Figure 2.** Latency to PTZ-induced seizure onset in control and experimental groups. Values represent means, with error bars denoting SEM. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey as a post-test.

\*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 compared to saline group; ##p<0.01 and ###p<0.001 compared to DZP group; and <sup>+</sup>p<0.05 and <sup>+++</sup>p<0.001 compared to LMWC-Pp 70 µg/animal dose group.

**Figure 3.** Effects of different doses of the LMWC-Pp on anxiety-related parameters in the Elevated Plus Maze (EPM). Time spent by animals in open arms (A) and in the closed arms (B) of the EPM. Number of entries in the open arms (C) and in the closed arms (D). Values represent means, with error bars denoting SEM. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey as a post-test.

\*p<0.05 compared to saline; #p<0.05 and ##p<0.01 compared to PTZ.

**Figure 4.** Head dipping behavior of the animals in the EPM. Values represent means, with error bars denoting SEM. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey as a post-test.

#p<0.05 compared to PTZ.

**Figure 5.** Time spent by animals in exploratory (A) and immobility (B) behaviors. (C) Accumulated number of lines crossed by the animals in the arena in 30 min. Values represent means, with error bars denoting SEM. Data for A and B were subjected to one-way analysis

of variance (ANOVA) followed by Tukey as a post-test, while data for C were subjected to two-way analysis of variance (MANOVA) followed by Bonferroni as a post-test.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to saline. a) DZP, b) 70  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , c) 210  $\mu\text{g}/\text{animal}$  and d) 350  $\mu\text{g}/\text{animal}$ .

Figure 1

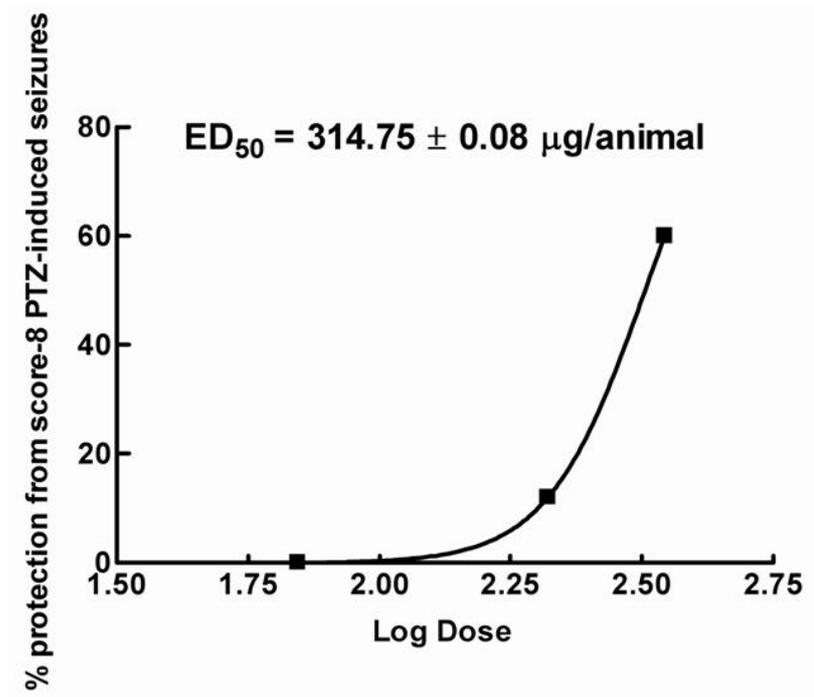
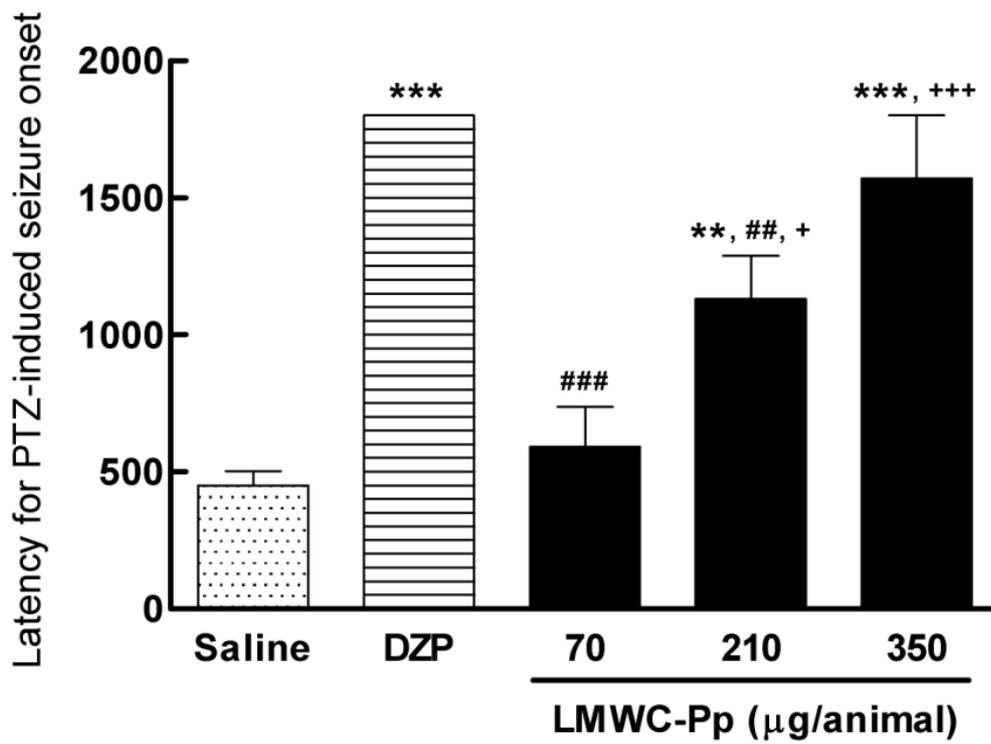
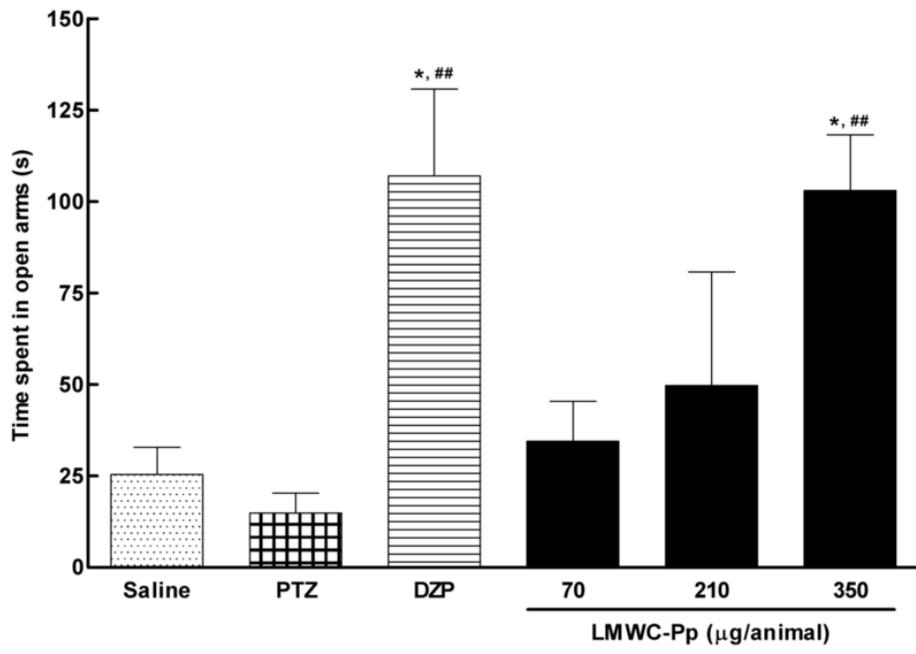


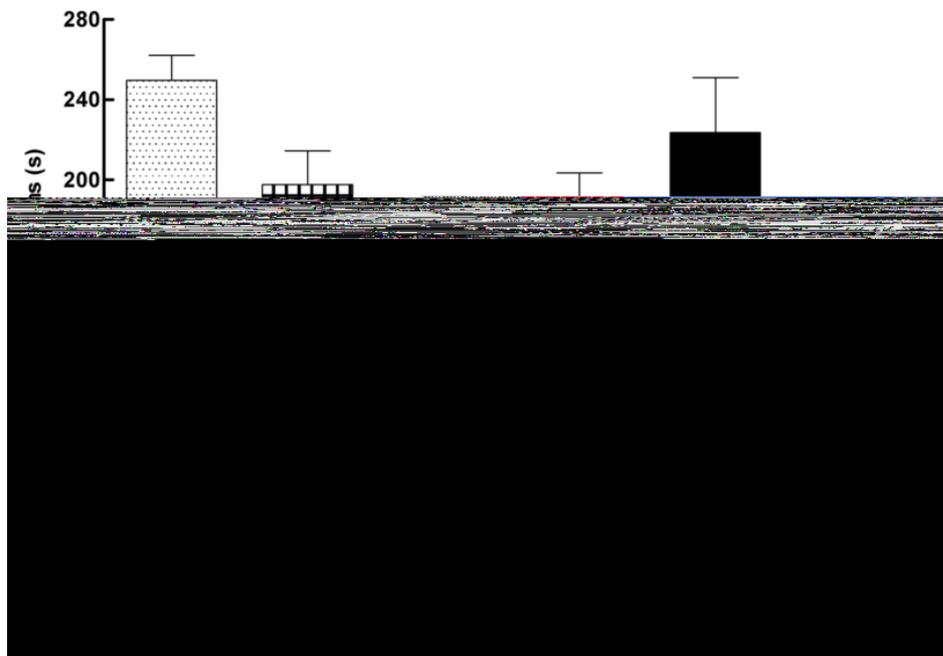
Figure 2



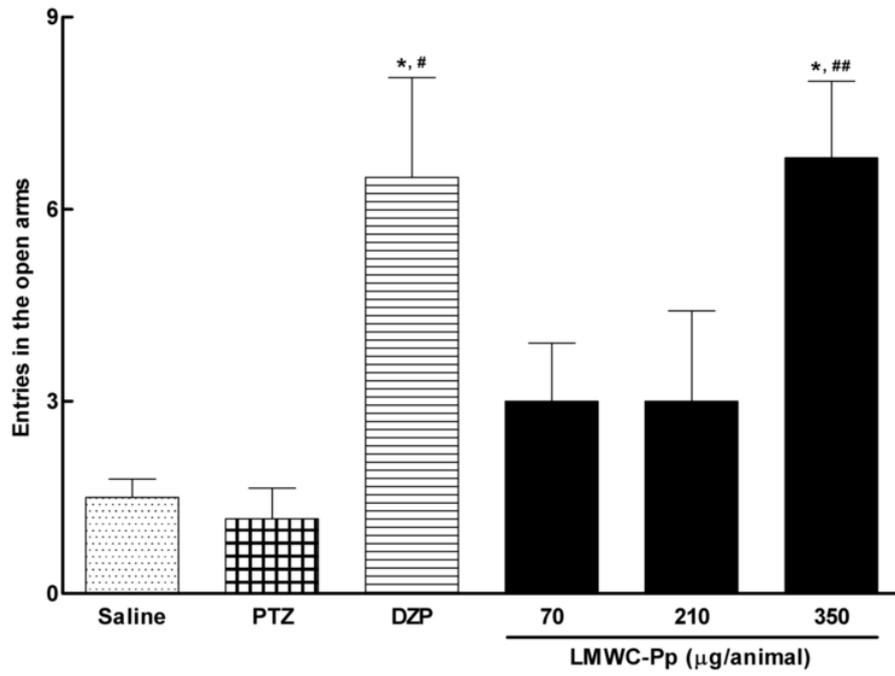
**Figure 3 A**



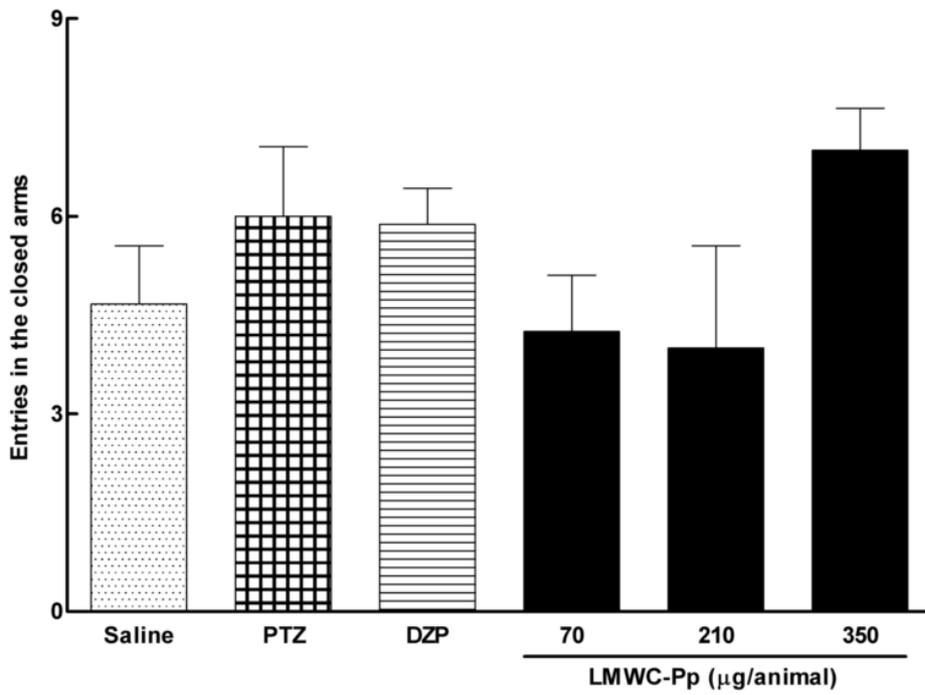
**Figure 3 B**



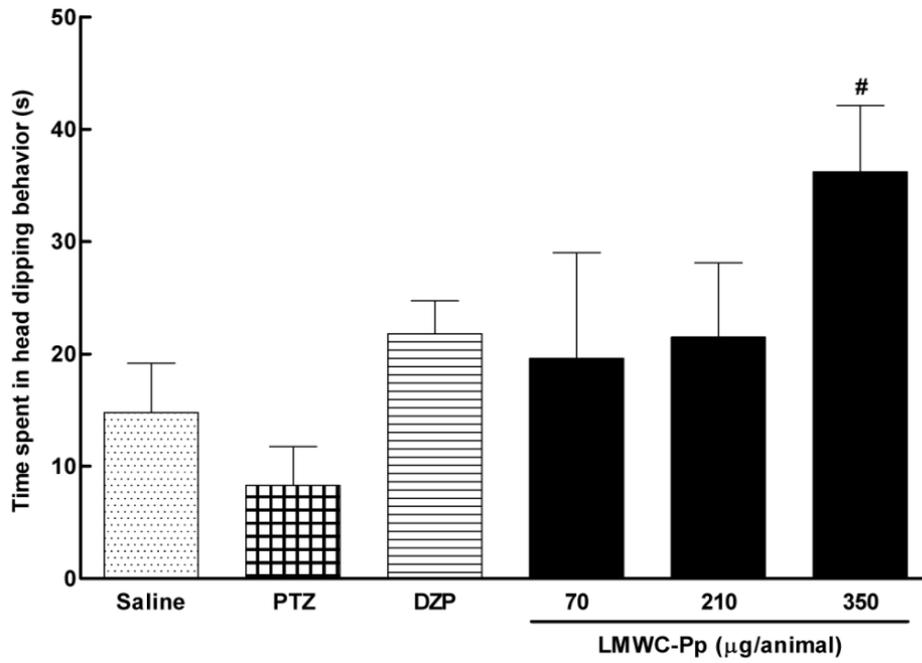
**Figure 3 C**



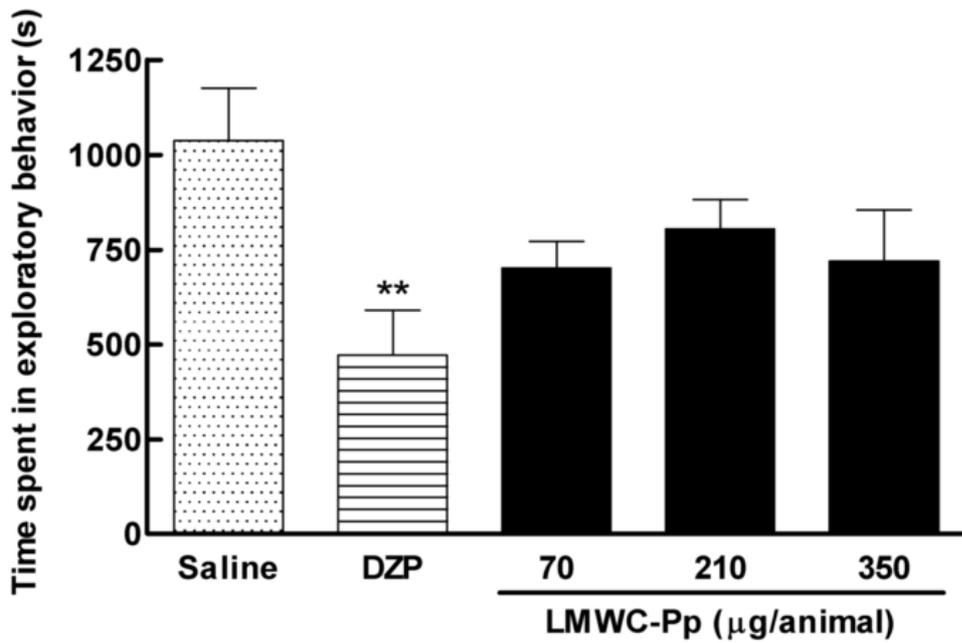
**Figure 3 D**



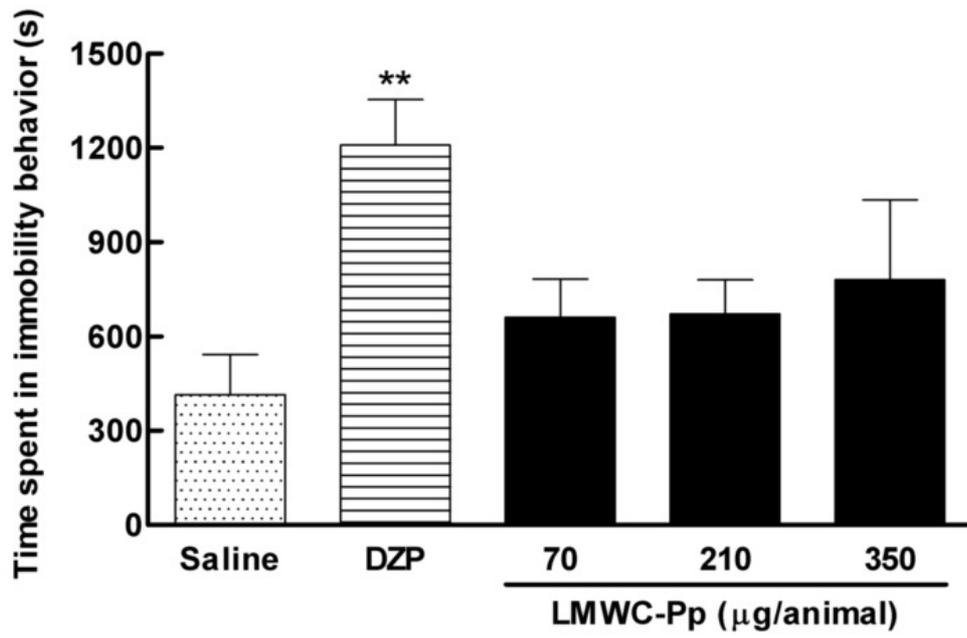
**Figure 4**



**Figure 5 A**



**Figure 5 B**



**Figure 5 C**

