



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



Investigação do mecanismo de ação e do alvo farmacológico do peptídeo neuroprotetor Neurovespina

Gabriel Avohay Alves Campos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

2020

Gabriel Avohay Alves Campos

**Investigação do mecanismo de ação e do alvo
farmacológico do peptídeo neuroprotetor Neurovespina**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Animal da Universidade
de Brasília para obtenção do título de Doutor
em Biologia Animal.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Renata
Mortari

Brasília, DF

2020

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Doenças Neurodegenerativas.....	1
1.1.1	Definição	1
1.1.2	Classificação	3
1.2	Doenças neurodegenerativas com maior prevalência.....	4
1.3	Mecanismos patológicos	6
1.3.1	Estresse oxidativo e mitocôndria	6
1.3.2	Morte celular.....	8
1.3.3	Má formação proteica	11
1.3.4	Neuroinflamação	13
1.4	Fármacos neuroprotetores.....	16
1.5	O peptídeo Neurovespina.....	19
1.5.1	Descoberta	19
1.5.2	Neurovespina e epilepsia.....	19
1.5.3	Neurovespina e Doença de Parkinson.....	20
2	Justificativa	21
3	Objetivos.....	22
3.1	Objetivo geral.....	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	Materiais e Métodos	22
4.1	Sujeitos	22
4.2	Ensaio de ligação em receptor	23
4.2.1	Extração de sinaptossomas.....	23
4.2.2	Quantificação de proteínas.....	24
4.2.3	Ensaio de competição.....	25

4.2.4	Captação de neurotransmissores.....	27
4.3	Quantificação intracelular de cálcio.....	28
4.3.1	Cultivo celular.....	28
4.3.2	Carreamento com Fura-2 e leitura.....	28
4.4	Ensaio de viabilidade celular.....	30
4.5	Ensaio de produção de ROS.....	30
4.6	Ensaio eletrofisiológicos em <i>patch clamp</i>	31
4.7	Análises estatísticas.....	32
5	Resultados e discussão.....	33
5.1	Ensaio de competição.....	33
5.2	Ensaio de captação.....	35
5.3	Quantificação de cálcio intracelular.....	37
5.4	Ensaio de viabilidade celular e produção de ROS.....	41
5.5	Ensaio eletrofisiológico em <i>patch clamp</i>	44
6	Conclusão.....	48
7	Referências Bibliográficas.....	49
8	Apêndice.....	59

Lista de abreviaturas

- DND: doenças neurodegenerativas
- PrP: proteína priônica
- BA: proteína beta amiloide
- AS: proteína α -sinucleína
- MAPT: proteína tau associada a microtúbulos
- TDP-43: proteína 43 ligante de DNA de resposta transativa
- FUS: proteínas da família fundida em sarcoma
- HTT: huntingtina
- DA: doença de Alzheimer
- DP:doença de Parkinson
- ELA: esclerose lateral amiotrófica
- DH: doença de Huntington
- APP: proteína precursora amiloide
- BACE1: enzima 1 de clivagem de APP no sítio beta
- SNpc: substancia negra *pars compacta*
- SOD1: superóxido dismutase 1
- HSP: proteínas de choque térmico
- UPS: sistema ubiquitina proteassoma
- MOMPpermeabilidade da membrana mitocondrial externa
- CytC: citocromo c
- AIF: fator indutor de apoptose
- TNF: fator de necrose tumoral
- PRP: receptores de reconhecimento de padrões
- PAMPs: padrões moleculares associados a patógeno
- DAMPs: padrões moleculares associados a dano

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Ensaio de competição entre o peptídeo Neurovespina e o neurotransmissor glutamato marcado com trício. Os resultados indicam ausência de ação da Neurovespina no modelo. A curva concentração-efeito de glutamato não marcado (em preto) exemplifica, para fins demonstrativos, a competição pelo sítio receptor. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

..... 34

Figura 2. Resultados dos ensaios de competição entre o peptídeo Neurovespina e o antagonista NMDA não-competitivo MK-801 marcado com trício. Dado que altas concentrações de Neurovespina não foram capazes de alterar a ligação do glutamato marcado ao seu sítio receptor, resultados indicam ausência de ação da Neurovespina. A curva concentração-efeito de MK-801 não marcado exemplifica a competição pelo sítio receptor. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

..... 35

Figura 3. Resultados dos ensaios de captação do neurotransmissor glutamato marcado com trício na presença de diferentes concentrações do peptídeo Neurovespina. Estes resultados indicam que a presença de Neurovespina não altera o processo de captação do glutamato, mesmo em altas concentrações. A curva de captação na presença de diferentes concentrações de glutamato não marcado exemplifica, para fins demonstrativos, a diminuição da captação de glutamato marcado. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes..... 36

Figura 4. Concentração intracelular média de cálcio após estímulo despolarizante com KCl a 90 mM. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neurovespina (100 μ M a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. A primeira seta indica o momento da adição da Neurovespina e a segunda seta indica a adição de solução despolarizante. Dados representando a média de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado..... 38

Figura 5. Concentração intracelular máxima de cálcio após estímulo despolarizante com KCl a 90 mM. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neurovespina (100 μ M a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. Dados

representando a média \pm desvio padrão de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado..... 39

Figura 6. Razão entre as emissões após excitação a 340 nm e 380 nm, com estímulo despolarizante de KCl a 90 mM após 360 s do início do experimento. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neurovespina (100 μ M a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. A primeira seta indica o momento da adição da Neurovespina e a segunda seta indica a adição de solução despolarizante. Dados representando a média de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado. 40

Figura 7. Razão 340/380 máxima observada em cada grupo experimental, indicando não haver alteração nas médias após o tratamento com diferentes concentrações de Neurovespina. Dados representando a média \pm desvio padrão de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado. 40

Figura 8. Viabilidade celular após insulto tóxico com glutamato a 200 mM em ensaio fluorescente com resazurina. Valores representam porcentagem em relação ao controle positivo que não foi submetido a insulto tóxico (média \pm desvio padrão). Os dados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, não revelando diferença significativa entre os grupos. 41

Figura 9. Viabilidade celular após insulto tóxico com 6-OHDA a 100 μ M em ensaio fluorescente com resazurina. Valores representam porcentagem em relação ao controle positivo que não foi submetido a insulto tóxico (média \pm desvio padrão). Os dados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, não revelando diferença significativa entre os grupos. 42

Figura 10. Fluorescência total após incubação com o corante fluorescente DCFH-DA (média \pm desvio padrão) em células tratadas com 6-OHDA e tratadas com Neurovespina. Os resultados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis seguida de pós teste de Dunn em comparação com o controle 6-OHDA. $*=p<0,05$ 43

Figura 11. Traço representativo das correntes de cálcio geradas após aplicação de voltagem máxima ($V_{m\acute{a}x}$), demonstrando a diminuição da corrente em decorrência da aplicação de 50 μ M de Neurovespina. Tal diminuição foi revertida após lavagem das células com solução externa. 44

Figura 12. Dados representativos de corrente máxima obtida ao longo de um experimento, demonstrando também o valor de corrente estimada no momento em que foi aplicada a Neurovespina e a reversão do efeito bloqueador após a lavagem. . 45

Tabela 1. Principais características biomoleculares das doenças neurodegenerativas mais estudadas 3

Tabela 2. Principais características dos canais de cálcio dependentes de voltagem presentes (adaptado de (96)). 45

Resumo

As doenças neurodegenerativas englobam uma diversa gama de doenças caracterizadas pela progressiva perda de função e morte de neurônios, muitas vezes levando à morte do indivíduo afetado. Ainda que algumas das doenças neurodegenerativas se apresentem com forte componente genético, muitas delas são resultado da interação de predisposições genéticas e fatores ambientais, sendo que para esses casos a etiologia ainda é desconhecida. Ainda assim, esses fatores geradores das doenças neurodegenerativas convergem muitas vezes em cascatas neurodegenerativas comuns que podem ser exploradas para abordagens neuroprotetoras. Mesmo com esse imenso potencial, esse objetivo farmacológico ainda não foi alcançado. Este trabalho tem como foco de estudo um peptídeo sintético de nove resíduos de aminoácidos bioinspirado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. Este peptídeo, chamado Neurovespina, já foi explorado em outros trabalhos, exibindo potente ação antiepiléptica e ação neuroprotetora em um modelo animal de parkinsonismo induzido pela neurotoxina 6-OHDA. Tendo em vista a grande necessidade de fármacos neuroprotetores no tratamento de doenças neurodegenerativas, esse trabalho tem por objetivo elucidar o mecanismo de ação que confere à Neurovespina seu efeito neuroprotetor, valendo-se de ensaios de ligação em receptores, de medição das concentrações de cálcio intracelular, de viabilidade celular e de eletrofisiologia de canais de cálcio. Os resultados mostraram que a Neurovespina não foi capaz de alterar a ligação do neurotransmissor excitatório glutamato em sinaptossoma de córtices de ratos, assim como não foram observadas alterações na captação desse neurotransmissor. Além disso, não foram observadas alterações na viabilidade celular após insulto tóxico com glutamato e 6-OHDA ou alteração no influxo celular de cálcio após despolarização, ainda que o tratamento tenha causado diminuição na produção de espécies reativas. Finalmente, ensaios eletrofisiológicos revelaram efeito inibitório da Neurovespina em canais de cálcio voltagem dependentes do tipo Ca_v 1.2. Os peptídeos de vespas têm revelado um imenso potencial na geração de moléculas altamente seletivas e efetivas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, e o estudo dos mecanismos de ação desses peptídeos pode contribuir para o desenvolvimento de um novo fármaco, assim como para o entendimento do processo degenerativo presente nessas doenças.

Palavras-chave: doenças neurodegenerativas, Neurovespina, neuroproteção, peptídeos bioinspirados

Abstract

Neurodegenerative diseases are a diverse group of diseases characterized by the progressive loss of function and death of neurons, often leading to the death of the patients. Even though some neurodegenerative diseases present a strong genetic component, many of them result from the interaction of genetic predispositions and environmental factors, in which case the etiology of the diseases is unknown. Nevertheless, these factors that generate neurodegenerative diseases often converge into common neurodegenerative cascades that might be explored for new neuroprotective therapies, a pharmacological goal that has not yet been achieved. This work aims to study a synthetic peptide with nine amino acid residues that was bioinspired in a peptide isolated from the venom of the social wasp *Polybia occidentalis*. This peptide, called Neurovespina, has been studied previously, exhibiting a potent anticonvulsant effect and also a neuroprotective effect in an animal model of parkinsonism induced by the neurotoxin 6-OHDA. Considering the great necessity for neuroprotective drugs aiming neurodegenerative diseases, this work aims to elucidate the mechanism of action responsible for Neurovespina neuroprotective effect by performing receptor binding assays, measurement of intracellular calcium concentrations, cell viability assays and patch clamp calcium current assays. The results indicated that Neurovespina was not able to alter glutamate binding to synaptosomes, nor was there any alteration on the uptake of this neurotransmitter. Likewise, no effect on calcium influx after depolarization was observed. Treatment with Neurovespina showed no effect on cell viability with cells treated with either 6-OHDA or glutamate, although a reduction on reactive species production was detected. Lastly, the peptide reduced nearly 30 % of calcium currents in cells expressing $Ca_v 1.2$ channels. Both results are compatible with the neuroprotective effect previously observed. The study of the mechanism of action of these peptides may contribute to the development of a new drug, as well as to the understanding of the degenerative process typical of these diseases.

Key words: neurodegenerative diseases, Neurovespina, neuroprotection, bioinspired peptides

1 Introdução

1.1 Doenças Neurodegenerativas

1.1.1 Definição

As doenças neurodegenerativas (DND) têm despertado bastante interesse dos pesquisadores nas últimas décadas, sendo encontrados mais de 100 000 resultados de pesquisa pela palavra *neurodegenerative* (do inglês, neurodegenerativo (a)) no portal PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, acessado em 6/03/2020). Esse grupo de doenças tem adquirido especial importância principalmente pelo aumento da expectativa de vida da população mundial, dado que grande parte das DND aumenta sua incidência de acordo com o avanço da idade. Além disso, a maioria delas também gera grandes impactos socioeconômicos ao diminuir a independência e a produtividade dos indivíduos afetados e incorrer em grandes gastos diretos e indiretos (1).

Apesar de sua importância, são poucos os artigos científicos que discorrem de forma objetiva sobre uma definição ou classificação das doenças neurodegenerativas, com o termo sendo geralmente utilizado para classificar uma grande diversidade de doenças. Assim, é importante notar que nem todo processo neurodegenerativo (com morte ou perda de função de neurônios) é considerado em uma doença neurodegenerativa. É o caso, por exemplo, da degeneração diretamente associada a acidente vascular encefálico.

De forma geral, considera-se como DND quando ocorre a perda progressiva da função neuronal incorrendo eventualmente em morte, sendo que as manifestações clínicas observadas dependem dos sistemas neurais/tipos celulares afetados. Além disso, observa-se na grande maioria das DND a deposição intra ou extracelular de proteínas específicas com alterações conformacionais. Ainda que não ocorra em todas as DND, o enovelamento aberrante de proteínas e o consequente surgimento de depósitos proteicos no tecido nervoso são tidos como características fundamentais das DND, ao ponto de alguns autores considerarem as DND como doenças conformacionais (2–5).

Outra característica muito importante de diversas DND é a capacidade das proteínas mal formadas de serem transmitidas célula a célula e, assim, induzir um fenótipo patológico em células saudáveis, um fenômeno similar ao observado em proteínas priônicas (6–8). Além disso, em algumas doenças essa transmissão ocorre de forma definida, de acordo com as conexões do sistema neural afetado, originando assim estágios patológicos associados à progressão das manifestações clínicas da doença (9–11). Importante notar que a transmissão célula a célula não implica na transmissão de proteínas aberrantes entre indivíduos, circunstância encontrada somente em encefalopatias espongiformes transmissíveis causadas pela proteína priônica (PrP) (12,13).

Ainda que a presença de proteínas mal formadas seja marco comum à maioria das DND, ainda não foi estabelecido se essas proteínas apresentam papel causativo ou se são reflexo do colapso da maquinaria responsável pela homeostase proteica. Também é importante observar que a patologia das DND, ainda que seja focada em neurônios, também está associada a células não neuronais, como as células da glia, e a alterações vasculares e metabólicas, reforçando a complexidade dessas doenças (14,15).

A maioria dos casos de DND é esporádica, sem causa definida, sendo que as manifestações clínicas se dão por uma complexa interação entre o estado funcional dos neurônios afetados, as predisposições genéticas individuais, a capacidade de compensação do circuito neuronal, a capacidade de compensação comportamental e as comorbidades associadas (16). Além disso, devido ao perfil progressivo das DND, é possível observar em muitas delas um estágio chamado de pré-clínico, no qual ocorre morte celular antes de surgirem os primeiros sinais, um estágio de grande interesse terapêutico (17).

Ainda que representem um grupo diverso e razoavelmente heterogêneo, as DND também compartilham uma série de características em comum, em especial aquelas associadas à proteinopatia e aos mecanismos de morte celular. Nesse sentido, o entendimento adquirido para uma doença específica pode ser de grande valia para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas aplicáveis para outras DND.

1.1.2 Classificação

Uma das maneiras de se classificar as DND envolve as manifestações clínicas observadas (18), que são reflexo direto do tipo celular e do sistema neural afetado (tabela 1). Nesse sentido, o primeiro grupo de DND é caracterizado principalmente por distúrbios comportamentais, declínio cognitivo, demência e alterações em funções cerebrais superiores. Nesse grupo, as regiões cerebrais tipicamente afetadas compreendem o córtex cerebral e entorrinal, o sistema límbico e a formação hipocampal. O segundo grupo está associado a distúrbios motores, com comprometimento de áreas motoras corticais, núcleos da base, tálamo e cerebelo, além de neurônios motores inferiores. O terceiro grupo engloba as doenças com manifestações mistas, tanto motoras quanto cognitivas.

Outra maneira de classificar as DND, ainda segundo o autor, envolve o tipo de proteína aberrante encontrada nas regiões cerebrais afetadas. As principais delas são a proteína β -amiloide (AB), a proteína α -sinucleína (AS), a proteína tau associada a microtúbulos (MAPT), a proteína priônica (PrP), a proteína 43 ligante de DNA de resposta transativa (TDP-43), proteínas da família fundida em sarcoma (FUS) e proteínas com repetições de poliglutamina como a huntingtina (HTT). Além disso, a presença ou ausência de inclusões em células da glia e a localização intracelular (dendritos, citoplasma ou núcleo) ou extracelular são de grande importância para a diferenciação histopatológica das DND.

Tabela 1. Principais características biomoleculares das doenças neurodegenerativas mais estudadas

<i>Doença neurodegenerativa</i>	<i>Proteína tóxica</i>	<i>Depósito proteico</i>	<i>Genes mutados</i>	<i>Principais células/regiões afetadas</i>
<i>Doença de Alzheimer</i>	β -amiloide Tau	Placas senis Emaranhados neurofibrilares	APP, PS1 e PS2 MAPT	Neurônios corticais e do lobo temporal
<i>Doença de Parkinson</i>	α -sinucleína	Corpos de Lewy	SNCA	Neurônios dopaminérgicos da substância negra
<i>Doença de Huntington</i>	Huntingtina	Inclusões citoplasmáticas e nucleares	HD	Neurônios GABAérgicos do estriado

<i>Esclerose Lateral Amiotrófica</i>	Superóxido dismutase	Inclusões hialinas	SOD1	Neurônios motores superiores e inferiores
--------------------------------------	----------------------	--------------------	------	---

1.2 Doenças neurodegenerativas com maior prevalência

São exemplos de DND a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH), demência do lobo temporal, demência com corpos de Lewy, encefalopatia traumática crônica, paralisia supranuclear, atrofia múltipla sistêmica e outras. As mais abordadas em periódicos da área, de forma geral, são as quatro com maior prevalência (DA, DP, ELA e DH), sendo que grande parte da literatura disponível está associada a essas doenças.

A DA é a causa mais comum de demência, afetando cerca de 9 a cada 1000 indivíduos (19). Esta doença está associada à presença de placas amiloides extracelulares e emaranhados fibrilares intracelulares, resultando em morte neuronal, atrofia do tecido nervoso e distúrbios sinápticos, levando à perda de memória e distúrbios em funções cognitivas (20). As placas amiloides são agregados da proteína β -amiloide, que por sua vez deriva da clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) pela enzima 1 de clivagem de APP no sítio beta (BACE1) e pela gama secretase. Os monômeros de BA são solúveis, entretanto apresentam tendência à agregação, formando oligômeros, fibrilas e placas. Estudos ligam diretamente a BA ao desenvolvimento de DA, sendo que mutações em APP e presilina (uma subunidade da gama secretase) são responsáveis pelas formas familiares e de início precoce da DA. Já os emaranhados neurofibrilares são agregados insolúveis da proteína tau associada a microtúbulos hiperfosforilada. A fosforilação dissocia a tau dos microtúbulos e resulta na sua tendência à agregação, gerando assim desestabilização da rede de transporte via microtúbulos, além de contribuir para a disfunção e morte neuronal. Atualmente a terapia disponível para a DA consiste na administração de inibidores da acetilcolinesterase e na administração da memantina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA; ambas abordagens são somente sintomáticas (21).

A DP é a segunda DND mais comum e a desordem de movimento com maior prevalência, sendo caracterizada primariamente pela morte de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc), resultando

tipicamente em tremor, lentidão no movimento, instabilidade postural e rigidez muscular (22). Esta doença chega a afetar cerca de 3 pessoas a cada 1000 (23), sendo que pacientes com DP podem ainda desenvolver demência e prejuízo cognitivo como resultado do agravamento da doença (24). Além da morte dos neurônios da SNpc, a DP também é caracterizada pela deposição intracelular de agregados proteicos de α -sinucleína (chamados corpos de Lewy). A maioria dos casos de DP não possui causa definida, resultando de uma interação pouco elucidada entre fatores ambientais e predisposições genéticas. Várias vias patológicas já foram implicadas na doença de Parkinson, tal como estresse oxidativo pela produção de radicais livres, disfunção mitocondrial, perda de fatores tróficos, distúrbio na homeostase de cálcio, e neuroinflamação. O tratamento da DP se dá primariamente pela administração de L-DOPA de forma a reequilibrar a neurotransmissão dopaminérgica (25).

A DH é uma DND hereditária associada a degeneração de neurônios corticais e estriatais, resultando em sinais motores como corea, rigidez muscular, distonia e alterações no equilíbrio e na marcha. A prevalência chega a 5,7 casos a cada 100 000 habitantes em meta análise considerando populações da América do Norte, Europa e Austrália (26). A DH é causada por uma mutação autossômica dominante no gene que codifica a proteína Huntingtina, resultando na repetição do códon CAG que gera uma sequência alongada de poli-glutamina na HTT mutada. Esse aumento de glutamina na HTT gera alterações conformacionais e agregação em corpos de inclusão intracelulares. A HTT mutada possivelmente sofre ganho de função tóxica, gerando ativação microglial, alteração transcricional, disfunção mitocondrial e excitotoxicidade glutamatérgica. O tratamento da DH se dá principalmente pelo alívio dos sinais motores, utilizando antipsicóticos atípicos ou antiepilépticos (27).

A ELA é uma DND caracterizada pela morte de neurônios motores superiores e inferiores, resultando em sinais como fasciculações e enfraquecimento de braços e pernas, dificuldades de deglutição e perda das funções musculares. É uma doença bastante debilitante na qual os pacientes morrem 2-5 anos após o diagnóstico, com prevalência de cerca de 5 casos a cada 100 000 indivíduos (28). Na maioria dos casos há má formação e agregação da proteína TDP-43 em neurônios motores; essa proteína é tipicamente nuclear e está envolvida na transcrição. Nos casos familiares de ELA já

foram encontradas mutações no gene de TDP-43 (TARDBP) e em genes da proteína FUS, que tem funções similares. Outra proteína importante é a superóxido dismutase 1 (SOD1), que catalisa a redução de superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio; a SOD1 mutada na ELA também apresenta tendência de agregação. Nos dias atuais, o único tratamento disponível para a ELA é o Riluzole, um composto bloqueador de canais iônicos para sódio capaz de diminuir a atividade neuronal gerando pequeno aumento na sobrevivência dos pacientes (29).

1.3 Mecanismos patológicos

1.3.1 Estresse oxidativo e mitocôndria

A mitocôndria é uma organela intracelular composta de dupla camada lipídica: uma membrana externa e uma membrana interna. Entre ambas camadas existe o espaço intermembranar e envolta pela membrana interna está a matriz. A principal função das mitocôndrias é gerar energia para as células através de fosforilação oxidativa e transferência de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons, uma sequência de proteínas carreadoras de elétrons presentes na membrana mitocondrial interna, em um processo que produz ATP.

Além da função metabólica de produção de energia, a mitocôndria atua no controle das concentrações de ferro e da homeostase de cálcio. Ela também participa do ciclo de Krebs e do metabolismo de ácidos graxos. Como resultado do processo bioenergético mitocondrial, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais hidroxila e ânions superóxido. Essas espécies são chamadas reativas por reagirem com moléculas celulares sem a necessidade de ação enzimática, podendo causar a destruição e perda de função de proteínas e lipídios. A associação entre a função mitocondrial e a produção de ROS é de extrema importância para as DND. As principais fontes de ROS são a ação das NADPH oxidases e a ação dos complexos mitocondriais I e III. O superóxido produzido de forma geral é neutralizado pela ação da enzima superóxido dismutase, gerando peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em H₂O pela glutatona peroxidase (30).

Considerando a grande gama de atividades desempenhadas pela mitocôndria, a disfunção mitocondrial pode gerar uma série de efeitos deletérios como desregulação

do cálcio, perda de energia e estresse oxidativo. Nesse contexto, as mitocôndrias estão submetidas a um constante processo de ciclagem de forma a manter a homeostase celular, passando por fusões e fissões que controlam seu tamanho. Além disso, as mitocôndrias defeituosas precisam ser identificadas, separadas e eliminadas, depois substituídas por novas. Mitocôndrias defeituosas são segregadas e eliminadas por autofagia, um processo chamado especificamente de mitofagia (31).

Não sendo possível a reversão do dano mitocondrial, também existem mecanismos que causam a morte celular em decorrência de disfunção mitocondrial. A chamada morte acidental pode ocorrer em decorrência de dano físico, químico ou mecânico extremo, com conseqüente liberação de cálcio intracelular ativação de enzimas catabólicas dependentes de cálcio. A morte programada é uma forma regulada de morte que ocorre no desenvolvimento embrionário ou para preservar a homeostase tecidual, apresenta morfologia apoptótica e se dá pela ativação de vias intrínsecas de morte (32).

A apoptose intrínseca (ou seja, não mediada por receptores da membrana celular) pode ser iniciada por uma série de estímulos que levam à ativação da caspase iniciadora 9, resultando na maturação proteolítica da caspase executora 3. Esse processo acontece por meio da permeabilidade da membrana mitocondrial externa (MOMP) de forma dependente das proteínas BAX e BAK, levando à liberação da proteína citocromo C (CytC) presente no espaço intermembranar. O CytC forma um complexo multiproteico chamado apoptossoma, que ativa a caspase iniciador 9 que por sua vez ativa a caspase efetora 3, resultando na expressão DNases e outras proteínas apoptóticas (33).

Outra forma de morte associada à mitocôndria se dá por estresse oxidativo ou excesso de cálcio, que podem permeabilizar a membrana interna mitocondrial através da abertura do complexo de poro de transição de permeabilidade, causando a transição de permeabilidade mitocondrial (MPT). A MPT pode gerar edema osmótico e ruptura das membranas mitocondriais, gerando liberação de proteínas como CytC, fator indutor de apoptose (AIF) e endonuclease G matricial. Diferente de MOMP, MPT não é dependente da ativação de caspases. O poro de transição é composto por diversas

proteínas, sendo de especial importância a ciclofilina D, sendo que o imunossupressor ciclosporina A se liga à ciclofilina D e impede a formação de MPT (33).

A excitotoxicidade glutamatérgica é um fenômeno associado a diversas DND (34), sendo mediada por altas concentrações de glutamato com consequente ativação de receptores NMDA, em especial os extrasinápticos. O receptor NMDA possui permeabilidade ao íon cálcio, sendo que sua ativação exacerbada pode aumentar a concentração de cálcio intracelular e gerar assim tanto MOMP quanto MPT, além de contribuir para a produção de ROS. Além disso, mutações nos genes que codificam cinase putativa induzida por PTEN (PINK1) e parkina estão associados a formas autossômicas recessivas da DP (35). Ambas participam do processo de mitofagia, responsável pela reciclagem de mitocôndrias defeituosas, podendo assim contribuir para o acúmulo de mitocôndrias com alta produção de ROS.

1.3.2 Morte celular

A homeostase tecidual depende de um equilíbrio dinâmico entre morte e sobrevivência/proliferação celular. Existem várias formas de morte neuronal, muitas delas com características em comum e vias de sinalização convergentes, além da participação muitas vezes de células vizinhas. A forma de morte celular varia dependendo do tipo de estímulo causador da morte e do mecanismo acionado para executar a morte.

Nesse contexto, a apoptose é uma forma de morte celular programada necessária para o bom funcionamento do organismo, sendo uma das mais estudadas. O termo apoptose geralmente descreve um fenômeno morfológico de morte celular que inclui condensação da cromatina, fragmentação nuclear e encolhimento celular, levando à fragmentação da célula em pequenas vesículas membranares chamadas de corpos apoptóticos, que serão posteriormente eliminados por fagocitose de células vizinhas. Em contraste, a necrose é um processo caracterizado pela perda de integridade da membrana celular e desintegração de organelas celulares, gerando liberação de componentes intracelulares no meio extracelular levando a uma resposta inflamatória.

Todas as vias de sinalização que induzem apoptose convergem em uma maquinaria comum de destruição celular associada a uma família de proteases

chamadas caspases (aspartato proteases dependentes de cisteína). Elas se apresentam como pró-caspases com dois domínios que são clivadas e formam tetrâmeros derivados de duas pró-caspases. Geralmente as iniciadoras são ativadas por alguma sinalização de morte e levam à ativação de caspases executoras responsáveis diretamente pela ativação da maquinaria de destruição celular. As Caspases 2, 8, 9 e 10 são caspases iniciadoras, as caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 13 são caspases associadas a ativação de citocinas e as efetoras são 3, 6 e 7 (36).

As principais vias de iniciação da apoptose podem ser divididas em intrínsecas e extrínsecas, com quatro vias de sinalização básicas associadas ao seu controle: cinase c-Jun N-terminal (via JNK), fator nuclear kappa B (via NFkB), proteína associada a tumor p53 (via TP53) e fator de necrose tumoral (via TNF).

A via extrínseca se dá pela ativação de receptores de morte transmembrânicos da família TNF, tais como FasR, TNFR1 e APO3L. A ativação desses receptores gera recrutamento de proteínas adaptadores (FADD- domínio proteico de morte associado a Fas) e consequente formação do complexo multiproteico de sinalização indutor de morte (DISC), o qual por sua vez gera ativação proteolítica da caspase 8. Essa caspase gera clivagem de caspases efetoras como a caspase 3 e a caspase 7, responsáveis pela execução do processo de morte em si (37).

A via intrínseca é acionada em resposta a uma série de estímulos como insultos químicos, geração de radicais livres, dano ao DNA e hipóxia, ou ainda em resposta a supressão da atividade de vias de sinalização pró-sobrevivência como hormônios e fatores de crescimento. Esses vários estímulos geram alterações em proteínas da família Bcl-2, diretamente associadas à permeabilidade da membrana mitocondrial. Alguns membros dessa família são: proteína X associada a Bcl-2 (BAX), promotor de morte associada a Bcl-2 (BAD), agonista de morte que interage com BH3 (BID). A proteína Bax geralmente se apresenta na forma de monômeros citosólicos que, após estímulo apoptótico, transloca para a membrana mitocondrial, formando um complexo proteico que gera permeabilidade da membrana externa. O aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial resulta na liberação de proteínas pró-apoptóticas no citosol, em especial o citocromo c (Cyt-c), endonuclease G e fator indutor de apoptose (AIF). O Cyt-c, uma vez no citosol, ativa o fator 1 ativador de peptidase apoptótica (APAF-1) e

recruta a pró-caspase 9, formando assim um complexo multiproteico chamado apoptossoma. Esse complexo resulta na ativação proteolítica da caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3 e induz a execução da apoptose. Importante notar que o AIF, o qual também é liberado pela mitocôndria para o citosol, pode translocar para o núcleo e induzir fragmentação de DNA de uma forma independente de caspase (38)

As vias intrínsecas e extrínsecas podem se comunicar entre si, ampliando a cascata apoptótica. Um exemplo é a ação da caspase 8 que, após ser ativada pelo complexo DISC na via extrínseca, pode ativar a proteína BID, responsável por alterar a permeabilidade mitocondrial na via intrínseca (33).

Como foi dito, tanto vias intrínsecas quanto vias extrínsecas convergem na ativação das caspases 3 e 7, as quais são fatores efetores da morte celular e, portanto, promovem fragmentação cromossomal, degradação do citoesqueleto, degradação de proteínas celulares e inativação de proteínas pela formação de ligações cruzadas. Essas alterações se traduzem morfológicamente no encolhimento celular, formação de protuberâncias na membrana e condensação do material nuclear, resultando ao fim na formação dos corpos apoptóticos e na fagocitose por células vizinhas (37).

No que concerne às vias de ativação, tem-se que a ativação de proteínas da família JNK pode resultar tanto em proliferação quanto em apoptose, a depender do estímulo. Na apoptose, JNK pode ser ativada por TNF α , contribuindo para a via extrínseca. Pode também induzir a transcrição de fatores pro apoptóticos como c-Jun ou ainda mediar a expressão de proteínas da família Bcl-2, agindo assim na via intrínseca. Já a via NF κ B está mais associada à supressão da apoptose. Fisiologicamente, o NF κ B está ligado a uma proteína inibitória I κ B, porém em situação de estresse essa proteína é degradada, levando à translocação do NF κ B ao núcleo e consequente transcrição de fatores antiapoptóticos como a proteína inibidora da apoptose (IAP). Na via da p53, uma série de insultos como dano ao DNA e expressão de oncogenes pode levar a fosforilação ou acetilação de p53, aumentando sua estabilidade. A p53 estável por sua vez promove a expressão de genes apoptóticos como APAF-1, BAX e BID, além de interagir diretamente com membros da família Bcl-2, induzindo a apoptose (39).

A forma como ocorre a morte celular nas DND provavelmente não envolve uma única via de sinalização mas provavelmente resulta de várias formas de morte celular ocorrendo associadamente. Diversos marcadores de morte celular já foram implicados em diversas DND, tais como caspase 1 (40), caspase 2 (41), caspase 3 (42) caspase 6 (43), caspase 9 (44), AIF (45,46), Bax (47), endonuclease g (48) e MPT (49).

1.3.3 Má formação proteica

O surgimento de proteínas com alterações físico-químicas e propriedades neurotóxicas é um fator chave na maioria das DND. As alterações físico-químicas observadas nessas proteínas podem ser resultado de uma grande gama de alterações em diversos processos celulares associados ao manejo de proteínas. Tais alterações incluem fatores genéticos e epigenéticos, alterações pós-translacionais de RNA, modificações relacionadas ao retículo endoplasmático como fosforilação e ubiquitinação, ação de chaperonas e vias de depuração proteica. Essas alterações lhes confere uma tendência à agregação, levando à perda de solubilidade e deposição em compartimentos intra e extracelulares, resultando por fim em disfunção e morte neuronal. A descoberta e caracterização dessas proteínas revolucionou o estudo das DND, sendo que elas atualmente são exploradas como plataforma tanto para o diagnóstico como para tratamento das DND, além de trazerem notáveis avanços no desenvolvimento de novos modelos experimentais dessas doenças. Mais ainda, o entendimento da toxicidade associada às proteínas em cada doença traz informações sobre todo o espectro das DND, já que muitas delas apresentam características em comum.

De forma geral essas proteínas são sintetizadas na forma de monômeros que, devido a alguma alteração, exibem uma superfície hidrofóbica altamente interativa que aumenta sua tendência à agregação, um fenômeno que não é tipicamente observado em situações fisiológicas (50). A partir desses monômeros formam-se oligômeros, fibrilas e placas insolúveis ou corpos de inclusão. Por muito tempo se acreditou que os grandes agregados insolúveis apresentavam maior toxicidade, entretanto dados mais recentes indicam que na verdade os monômeros e oligômeros solúveis são mais tóxicos, sendo que a formação de grandes agregados insolúveis poderia representar na verdade uma forma de proteção celular, neutralizando a capacidade tóxica dos monômeros e

oligômeros (51–53). Nesse sentido, já foi demonstrado não haver relação direta entre grandes agregados de BA e a gravidade dos sintomas na DA (9,52).

Outra característica importante dessas proteínas envolve sua transmissibilidade para células saudáveis, induzindo nelas a má formação de proteínas e consequentemente um fenótipo patológico (54). Tal fenômeno já foi observado para BA, AS, Tau, TDP-43 e SOD1, com demonstrações que essas proteínas são capazes de serem transmitidas de célula a célula e induzir proteinopatia em células saudáveis (8). Além disso, na DA e na DP podem ser descritos diferentes estágios clínicos da doença associados a padrões específicos de transmissão do fenótipo degenerativo entre diferentes regiões cerebrais (9).

A disfunção observada nessas proteinopatias pode ser associada tanto a um ganho de função tóxica quanto a uma perda da função nativa daquela proteína nos processos celulares. De especial importância é a função tóxica que essas proteínas adquirem, toxicidade essa que inclui por exemplo indução de disfunção mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas, alterações na produção e processamento de outras proteínas, neuroinflamação, alterações na homeostase de cálcio, deficiência na liberação de neurotransmissores e disfunção sináptica (3).

As células possuem uma maquinaria endógena dedicada ao controle de qualidade da síntese e do enovelamento proteico, entretanto essa capacidade diminui com a idade do indivíduo, um fator que pode favorecer o acúmulo dessas formas tóxicas ao longo do tempo. Mais ainda, características neuronais como a alta atividade e baixa taxa de renovação podem contribuir para esse acúmulo de forma dependente da idade. Uma dessas formas de controle se dá pela ação de chaperonas, como por exemplo, as proteínas de choque térmico (HSP), que reconhecem proteínas mal formadas no citoplasma ou no retículo endoplasmático e auxiliam no seu processo de enovelamento. Caso não seja possível o correto enovelamento da proteína, as chaperonas a encaminham a uma via de depuração, na qual a proteína é degradada e seus constituintes são reciclados (55).

Os dois principais processos de degradação de proteínas mal formadas englobam o sistema ubiquitina proteassoma (UPS) e a via de autofagia por lisossomo. No UPS,

processo geralmente associado à degradação de pequenas proteínas, a proteína alvo é ligada a uma cadeia de ubiquitina que serve como sinal para a ação do proteossoma 26S, que reconhece a cadeia de ubiquitina e degrada a proteína em polipeptídeos. Já a autofagia por lisossomo, em especial a macrofagia, está associada à eliminação de grandes agregados ou organelas celulares defeituosas. Os substratos são sequestrados em autofagossomos, os quais por sua vez se fundem a lisossomos carregados de hidrolases responsáveis pela degradação proteica (56).

A relevância da má formação proteica fica clara ao se observar que a maioria das formas familiares das DND estão associadas a mutações em genes que codificam essas proteínas ou que codificam parte da maquinaria de controle de qualidade proteico. Tem-se por exemplo que mutações no gene SNCA, que codifica a α -sinucleína, resultam em formas familiares de DP, sendo que duplicações e triplicações desse gene causam formas mais graves da doença (57,58). De forma similar, mutações nas proteínas APP e presilina, ambas associadas ao processamento de BA (59), geram formas familiares de DA e estão associadas a aumento na produção de BA. A própria DH é causada por uma mutação em um único gene que codifica a proteína Htt, resultando em ganho de função tóxica e consequente morte celular. O mesmo é verdadeiro para a ALS, na qual mutações nos genes que codificam as proteínas SOD1, FUS e TDP-43 também estão associadas às formas familiares da doença (29).

Além do envolvimento direto na formação de proteínas, outras mutações associadas a DND causam alterações em processos de depuração. Mutações no alelo 4 da apolipoproteína E (APOE4), por exemplo, gera diminuição de BA e geral alterações no sistema endossomo-lisossomo, sendo que essas mutações estão associadas a um maior risco de desenvolver a DA (60). De forma similar, a mutação no gene que codifica a enzima lisossomal chamada glucocerebrosidase representa o maior fator de risco para a DP esporádica, sendo que essa mutação está associada a um maior acúmulo de AS (61).

1.3.4 Neuroinflamação

O sistema imune (SI) representa uma essencial linha de defesa do organismo, sendo responsável pelo monitoramento e pela eliminação de diversas ameaças. Além

do combate a patógenos, o SI também é responsável pela ciclagem celular, promovendo a remoção de fragmentos celulares e permitindo assim o remodelamento tecidual. Nesse contexto, o sistema nervoso central (SNC) é muitas vezes considerado imunologicamente privilegiado devido à existência da barreira hematoencefálica, a qual promove grande controle sob a entrada de células e macromoléculas no SNC.

O SNC possui sistema imune próprio composto pela micróglia e astrócitos. A micróglia prove suporte trófico para neurônios, elimina fragmentos celulares e mantém a homeostase do ambiente extracelular, além de promover a resposta inflamatória pela liberação de citocinas, moléculas de sinalização solúveis liberadas após a ativação do sistema imune inato. Monócitos periféricos também podem ser recrutados para o local da inflamação mediado pela liberação de quimiocinas pela micróglia residente, sendo que ao entrarem no tecido eles se diferenciam em macrófagos similares a micróglia. Os astrócitos, por sua vez, são essenciais para a formação, manutenção e eliminação de sinapses, liberam substâncias vasoativas que aumentam o fluxo sanguíneo regional de acordo com a demanda neuronal, fornecem metabolitos vitais aos neurônios e de controlar as concentrações de água, íons e glutamato no meio extracelular.

As células de monitoramento do SI expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRR), responsáveis por reconhecer os chamados padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs), tais como polissacarídeos, proteínas e dsRNA que não são normalmente expressos pelas células. A ligação entre PAMPs e PRR induz a liberação de fatores inflamatórios, desencadeando assim a resposta imune. Células que sofreram danos ou que foram submetidas a estresse expressam em sua membrana moléculas chamadas de padrões moleculares associados a dano (DAMPs), tais como lipídios de membrana, proteínas e componentes intracelulares, os quais normalmente não seriam expressos. A ligação entre DAMPs e PRR também induz as células do SI a liberarem mediadores inflamatórios (62).

Em situação fisiológica, a micróglia se apresenta como uma célula com ramificações arbóreas que são responsáveis por monitorar o tecido, respondendo rapidamente a eventuais danos ou agentes infecciosos. Elas possuem, em sua membrana, receptores de reconhecimento de padrão, tais como receptores da família tipo Toll. A ativação desses receptores leva a uma mudança no fenótipo microglial, que

assume um formato ameboide responsável por liberar uma série de mediadores inflamatórios. Alguns desses mediadores são quimiocinas responsáveis por recrutar leucócitos periféricos para o local da inflamação (63).

Micróglia e astrócitos liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, gerando estresse oxidativo nos neurônios. A resposta dos astrócitos a danos ao SNC é chamada astrogliose e esses astrócitos reativos liberam mediadores inflamatórios, quimiocinas e citocinas, além de fatores tróficos. As ações dessas moléculas podem ser tanto neuroprotetoras (como no caso de IL-6 e TGF- β) ou neurotóxicas (como no caso de IL-1 β e TNF- α). A cicatriz formada pela astrogliose também representa uma forma de isolar a área danificada e restringir o espalhamento do dano após a infiltração inflamatória (64). Após a eliminação da fonte de dano, é necessário que ocorra o fim do processo inflamatório. Isso se dá por meio de uma retroalimentação negativa de citocinas: a ativação de receptores pró inflamatórios diminui a produção de citocinas e a atividade celular. Mais ainda, também ocorre a produção de citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para o reestabelecimento da homeostase.

Na inflamação crônica, fenômeno associado às DND, a exposição contínua a um estímulo imune leva a uma resposta exacerbada do SI, além de diminuir a capacidade de as células imunes de responder ao estímulo inflamatório, um processo de senescência decorrente do estímulo contínuo (65).

Uma das formas pela qual a micróglia pode causar morte neuronal é pela ação da enzima NADPH oxidase. Essa enzima aumenta sua atividade após estímulo de DAMPS, produzindo em consequência superóxido no meio extracelular, o qual pode gerar estresse oxidativo em neurônios vizinhos (66). A micróglia também apresenta uma isoforma da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que produz óxido nítrico em resposta a mediadores inflamatórios como citocinas. A NOS microglial, diferentemente da NOS encontrada em neurônios, produz óxido nítrico de forma sustentada e em maior quantidade, podendo causar toxicidade crônica (67).

Alterações na atividade mitocondrial e liberação de componentes mitocondriais para o meio extracelular também ativam a resposta imune, gerando liberação de fatores inflamatórios e um processo de morte celular chamada piroptose. Proteínas sensores

da família NLRP formam oligômeros que se ligam a PAMPS, recrutando a proteína adaptadora ASC, que por sua vez recruta e ativa a pró-caspase 1, gerando caspase 1 ativa. A caspase 1 cliva e ativa a IL-1 β e a IL-18, citocinas pró-inflamatórias que induzem morte celular (68). O acúmulo de mitocôndrias produzindo ROS pode levar a vias inflamatórias dependentes de inflamassoma, resultando em produção de IL-1 β . Por outro lado, a IL-1 β pode causar perda do potencial mitocondrial e disfunção mitocondrial/produção de ROS, estabelecendo o ciclo de retroalimentação característico da inflamação crônica.

A modulação da resposta imune como terapia apresenta duas faces: quando se considera uma resposta benéfica mas insuficiente, a imunização e potencialização da resposta é uma abordagem adequada. Quando a inflamação apresenta-se de forma crônica e destrutiva, é necessário suprimir a inflamação e aumentar a sinalização anti-inflamatória.

Diversos estudos já associaram a ativação microglial e o processo neuroinflamatório às DND. Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, já foram encontrados no cérebro e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA e DP, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (69). Mutações no gene que codifica TREM2, um receptor imune presente na micróglia, representa o segundo maior fator de risco para a DA, sendo que esse receptor pode estar associado ao reconhecimento da proteína BA pela micróglia (70). Em um modelo de DP, a deleção da NADPH oxidase diminuiu a morte celular na substância negra (71), resultado similar a outro encontrado relacionando a NADPH oxidase a ELA (72). Deleção de NLRP1 ou caspase 1, por sua vez, reduz morte neuronal em modelo de DA (73). De forma similar, a deleção do receptor Cx3cr1, um receptor microglial que promove a comunicação entre a micróglia e neurônios, promove diminuição da morte neuronal em modelos de DA (74).

1.4 Fármacos neuroprotetores

Seguindo a definição mais comum de DND, um composto neuroprotetor deve inibir ou desacelerar a perda de função ou morte neuronal. É importante notar que as próprias células apresentam uma série de mecanismos de proteção celular, sendo muitos deles explorados como alvos farmacológicos na busca de tratamentos

neuroprotetores. Essas abordagens podem incluir: expressão de proteínas protetoras como Bcl-2 e HSP70, suprarregulação de fatores neurotróficos como BDNF e IGF-1, potencialização da atividade de enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase e superóxido dismutase, diminuição da excitotoxicidade, ativação de fatores de transcrição como CREB ou ação na atividade neuroinflamatória.

Uma das abordagens mais intuitivas envolve diminuir a concentração de formas tóxicas de proteínas aberrantes. Esse tipo de abordagem enfrenta desafios como a incerteza sobre qual forma proteica (monômeros, oligômeros e agregados insolúveis) são responsáveis pela citotoxicidade ou qual defeito no sistema de degradação é responsável pela formação e acúmulo desses compostos. Ainda assim, supõe-se que é possível diminuir a toxicidade prevenindo a síntese, a má formação ou a agregação das proteínas. Exemplos desse tipo de abordagem incluem inibidores da BACE ou inibição da fosforilação de tau, por exemplo.

Nesse mesmo sentido, também é possível buscar aumentar a depuração proteica. Existem mais de 200 tipos de chaperonas e mais de 20 já se mostraram com potencial neuroprotetor, entretanto HSP70 e HSP 90 são as mais estudadas. A primeira promove degradação via UPS e a segunda inibe a ubiquitinação das proteínas. Inibidores de HSP90 ativam HSF1 e induzem HSP70. Os problemas das drogas que tem esse sistema como alvo são a baixa penetração no tecido cerebral e a toxicidade periférica (75).

Outro mecanismo também bastante estudado é a via associada a mTOR, a qual participa da degradação de proteínas. mTOR é uma serina/treonina cinase que integra sinalização de sobrevivência e gera supra ou infrarregulação da síntese proteica e da degradação. Quando há sinalização de crescimento, mTOR inibe a autofagia ao inibir o complexo ULK1, que é necessário para a biogênese de autofagossomos. Os inibidores de mTOR, assim, liberam a maquinaria autofágica. A rapamicina é um conhecido inibidor mTOR. Alguns outros inibidores mTOR são curcumina e resveratrol, componentes naturais que estão em estudos clínicos. Uma das maiores dificuldades dessa abordagem é que essa proteína regula diversos processos celulares, resultando em muitos efeitos adversos (75).

Na DA, uma forma de abordar a produção de proteínas mal formadas é inibir as enzimas que dão origem à β -amiloide, como a enzima BACE1. Um inibidor que está sendo testado com esse mecanismo é o verubecestat (NCT01953601), que demonstrou grande redução nos níveis de BA em cérebro de roedores e primatas (76). Outra abordagem terapêutica bastante estudada envolve o uso de anticorpos para combater a proteinopatia associada às DND. Uma das formas que os anticorpos podem contribuir é por facilitar a depuração das formas proteicas no tecido cerebral ou ainda impedir a agregação. Alguns anticorpos anti-BA, visando neutralizar as proteínas e facilitar sua eliminação, estão em fase 3 de ensaios clínicos, incluindo aducanumab (NCT02484547) e crenezumab (NCT03114657). Quanto a DP, vários testes também estão sendo feitos utilizando a mesma estratégia de anticorpos contra α -sinucleína de forma a diminuir a toxicidade de proteínas mal formadas, tal como o Prasinezumab (NCT03100149).

Quanto a DH, um dos tratamentos atualmente testados envolve o uso de laquinimod, um imunomodulador que reduz a ativação de NF-kb em astrócitos (NCT02215616). Alguns testes envolvendo creatina (NCT00026988) e coenzima q10 (NCT00608881), tendo como alvo o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, apesar de promissores, tiveram resultados negativos em ensaios clínicos. Testes utilizando resveratrol para tratamento da DH estão em andamento (NCT02336633). Outra linha importante de tratamento da DH envolve a diminuição de HTT mutante por silenciamento gênico com oligonucleotídeos anti senso para o mRNA de HTT.

Por último, um peptídeo de 39 aminoácidos isolado do veneno do réptil *Haloderma suspectum* tem se mostrado bastante promissor para o tratamento de DND. Esse peptídeo se liga ao receptor de GLP-1, causando aumento da secreção de insulina, fato que o levou a ser aprovado para o tratamento de diabetes do tipo 2. Esse peptídeo já foi avaliado tanto para a DA quanto para a doença de Alzheimer (77), sendo que análogos estão sendo estudados atualmente em ensaios clínicos em ambas as doenças (NCT02953665; NCT01843075).

1.5 O peptídeo Neurovespina

1.5.1 Descoberta

Os primeiros passos para o desenvolvimento do peptídeo Neurovespina se deram em 2005, quando Mortari e colaboradores iniciaram estudos farmacológicos com a peçonha da vespa eusocial neotropical *Polibia occidentalis* (78). Sabe-se que a peçonha de animais é composta por um coquetel de compostos dotados de alta potência e alta especificidade, dado que animais peçonhentos estão sobre constante pressão evolutiva devido a interações presa-predador. Mais ainda, o uso da peçonha de vespas com fins medicinais data de 2000 a.C, sendo que o potencial farmacológico de seus componentes para estudo distúrbios do sistema nervoso já foi amplamente demonstrado (79).

Nesse sentido, os pesquisadores investigaram o efeito da peçonha bruta desnaturada de *Polibia occidentalis* na proteção contra crises convulsivas, demonstrando que a peçonha bruta desnaturada promoveu a proteção dos animais contra crises induzidas por picrotoxina, bicuculina e ácido caínico. Posteriormente os componentes da peçonha foram isolados por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo um peptídeo de 1202 Da identificado como um dos responsáveis pela proteção contra crises. Tal peptídeo, denominado Occidentalina-1202, se mostrou protetor contra crises induzidas por ácido caínico ($DE_{50}=0,6\mu\text{g}/\text{rato}$, via i.c.v) e contra crises induzidas por pentilenotetrazol ($DE_{50}=4,5\mu\text{g}/\text{rato}$, via i.c.v).

1.5.2 Neurovespina e epilepsia

Considerando o efeito protetor observado, foi desenvolvido um novo peptídeo com base na sequência da Occidentalina-1202, com modificações almejando o aumento de sua potência e de sua biodisponibilidade. Enquanto a Occidentalina-1202 é composta por Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂, o novo peptídeo desenvolvido apresenta a seguinte sequência: PyrGlu-Gln-Met-Trp-Ala-Val-Phe-Trp-Met-NH₂. Este novo peptídeo bioinspirado na Occidentalina-1202 foi chamado de Neurovespina (80).

A administração de Neurovespina por via i.c.v. demonstrou potente efeito neuroprotetor contra crises induzidas por ácido caínico, efeito esse que se demonstrou dependente da dose com $DE_{50}=0,09\text{ ug}/\text{animal}$, um efeito quase 6 vezes mais potente

que o encontrado por Mortari em 2005. Além disso, a Neurovespina também se mostrou protetora contra crises induzidas por ácido cáinico após ser injetada por via intraperitoneal, alcançando aproximadamente 100% de proteção contra crises máximas quando administrada na dose de 4 mg/kg de animal. Mais ainda, observou-se que o tratamento com Neurovespina resultou em drástica diminuição da expressão hipocampal da proteína c-Fos, tipicamente associada a excitabilidade mediada por glutamato, indicando um possível efeito neuroprotetor do tratamento (80).

A avaliação da atividade da Neurovespina em modelos de epilepsia foi aprofundada utilizando-se um modelo crônico de Epilepsia do lobo temporal por indução de status epilépticos após insulto por pilocarpina. A ação do peptídeo foi testada tanto durante a fase latente na qual ocorre a epileptogênese, período marcado por acentuada degeneração hipocampal, quanto durante a fase crônica, na qual há um quadro epiléptico estabelecido e com surgimento de crises espontâneas e recorrentes. O tratamento diário com Neurovespina se mostrou protetor nas duas fases do modelo (81). Esse resultado reforçou mais uma vez a capacidade da Neurovespina não só de proteger os animais de crises epilépticas como também de proteger os neurônios de insultos tóxicos. Ainda neste trabalho, foi constatado que o tratamento em dose única de Neurovespina não causou citotoxicidade, genotoxicidade ou hemotoxicidade em camundongos, mesmo na dose de 12 mg/kg (dose três vezes superior à dose efetiva).

1.5.3 Neurovespina e Doença de Parkinson

Considerando seu potente efeito protetor em modelos de crises epilépticas, a ausência de efeitos tóxicos observados e a capacidade de agir por via intraperitoneal, novos estudos foram conduzidos em um modelo de parkinsonismo. Para tal, foram utilizados camundongos submetidos a infusão unilateral intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA, causando assim a morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra. Os animais foram então tratados 24, 48 e 72 horas com três doses de Neurovespina, sendo observada melhora no desempenho motor dos animais tratados em relação ao controle, em especial com o tratamento com Neurovespina na dose de 4 mg/kg de animal. Importante ressaltar que a melhora no comportamento motor persistiu mesmo 17 dias após a última administração de Neurovespina. Também foi realizada a marcação imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase, um marcador de neurônios

catecolaminérgicos, mostrando que o tratamento com Neurovespina a 4 mg/kg de animal foi capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da substância negra, evidenciando seu efeito neuroprotetor em consonância com os resultados prévios (82). Em vista do seu efeito neuroprotetor em dois modelos diferentes de degeneração, fica evidente a importância do estudo do mecanismo de ação e dos alvos responsáveis pelo efeito neuroprotetor da Neurovespina.

2 Justificativa

Considerando-se as constantes pressões seletivas nas interações entre predador e presa, as toxinas se tornaram importantes ferramentas com grande potencial farmacológico, se mostrando altamente potentes e seletivas, agindo em especial no sistema nervoso (83). Nesse sentido, a peçonha de artrópodes se mostra uma grande fonte de compostos potencialmente neuroativos, podendo apresentar efeitos analgésico, ansiolítico, antiepilético e ainda neuroprotetor (84).

Nesse contexto, a peçonha de himenópteras apresenta uma série de compostos como peptídeos, enzimas e aminas biogênicas com múltiplas ações farmacológicas, sendo usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças como artrite e dor (85). O uso da peçonha de *Apis mellifera* (apitoxina), associado a acupuntura, também se mostrou capaz de proteger neurônios da SN em camundongos tratados com a neurotoxina MPTP, além de induzir uma menor expressão de mediadores inflamatórios nesta região e também proteger os neurônios dopaminérgicos quando injetada por via subcutânea (86). Mais ainda, ensaios *in vitro* mostraram a capacidade da apitoxina de proteger células de neuroblastoma humano contra MPP+, aumentando a viabilidade das células e agindo de forma anti-apoptótica (87).

Por fim, dado o potencial farmacológico das toxinas de artrópodes e o efeito neuroprotetor citado da apitoxina, fica clara a importância de estudos que explorem o potencial destas substâncias naturais no desenvolvimento de fármacos que auxiliem no tratamento de doenças neurodegenerativas, como no caso da DP. Dentro desse contexto, o peptídeo Neurovespina surge como uma destas substâncias, dado que, além de apresentar comprovada atividade antiparkinsoniana, é uma substância altamente

eficaz e que não exibe efeitos tóxicos tanto em modelos agudos quanto em modelos crônicos de administração por via parental. A Neurovespina representa, portanto, uma interessantíssima ferramenta de estudos para o tratamento de DND e a elucidação de seu mecanismo de ação se mostra extremamente relevante para o entendimento dos mecanismos da doença e para o desenvolvimento de novos fármacos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Considerando a atividade neuroprotetora da Neurovespina demonstrada em modelo de DP e em um modelo crônico de epilepsia, este trabalho visa a elucidar o mecanismo de ação ou o alvo farmacológico que confere a esse peptídeo capacidade neuroprotetora.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da Neurovespina na neurotransmissão glutamatérgica por ensaios de ligação e captação em sinaptossomas.
- Avaliar a atividade da Neurovespina na homeostase de cálcio intracelular após despolarização por KCl.
- Avaliar o efeito da Neurovespina na viabilidade celular após insulto tóxico com glutamato e 6-hidroxidopamina.
- Avaliar o efeito da Neurovespina na produção celular de espécies reativas de oxigênio após insulto tóxico com 6-hidroxidopamina.
- Avaliar o efeito da Neurovespina em correntes de cálcio de canais $Ca_v 1.2$.

4 Materiais e Métodos

4.1 Sujeitos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Conselho Nacional de Controle na

Experimentação Animal - CONCEA, 2008) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e somente foram executados mediante aprovação do projeto pelo Comitê de Experimentação e Uso Animal (protocolo nº 30/2017, CEUA-UnB- apêndice).

Para os ensaios envolvendo uso de sinaptossomas, foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* e da linhagem Wistar obtidos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Todos os animais foram mantidos neste biotério em ciclo de claro e escuro de 12h/12h com acesso livre a água e comida. Foram utilizados ratos com três a seis semanas de idade e massa corporal média de 250g.

4.2 Ensaios de ligação em receptor

4.2.1 Extração de sinaptossomas

Para a extração de sinaptossomas e membranas sinápticas foi desenvolvido um protocolo em nosso laboratório baseado em Emanuelli et al, 1998 (88). No dia dos experimentos, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de deslocamento cervical seguido por decapitação, dado que fármacos sedativos e anestésicos se acumulam no tecido nervoso, podendo interferir nos resultados. Tais procedimentos são amplamente utilizados e indicados para esse tipo de estudo envolvendo receptores cerebrais. Após eutanásia e decapitação, o encéfalo dos animais foi exposto com auxílio de pinça e tesoura. A partir desse momento, todas as soluções e instrumentos utilizados foram refrigerados a 4 °C de forma a minimizar a morte neuronal no tecido. O encéfalo é transferido para placa de petri e o córtex é dissecado e posteriormente transferido para 9mL de solução de homogeneização (sacarose 0,32 M em tampão tris 5 mM e pH 7,4) em tubo de vidro borossilicato. Em seguida, o córtex foi homogeneizado com auxílio de homogeneizador de tecidos (NT 136, Novatécnica, Brasil) com pistão de Teflon acoplado e a 900 rpm, realizando-se 12 movimentos de subida e descida. A solução resultante foi transferida para tubos de policarbonato de 10mL e em seguida submetida a 10 minutos de centrifugação a 1000 x g em rotor de ângulo fixo (JA-30.50 Ti, Beckman Coulter, EUA) e centrifuga refrigerada a 4 °C (Avanti J-26S XPI, Beckman Coulter, EUA).

Segundo dados da literatura, após está centrifugação de baixa velocidade, o precipitado formado é composto por núcleos e grandes fragmentos celulares, com os

sinaptossomas permanecendo no sobrenadante. O precipitado é descartado e o sobrenadante transferido para um novo tubo, sendo posteriormente submetido a 20 minutos de centrifugação a 15000 x *g*. Tipicamente após essa centrifugação o precipitado, detentor dos sinaptossomas, é mantido e o sobrenadante composto por pequenas vesículas sinápticas e retículo endoplasmático é descartado. Assim, o precipitado P2 é ressuspenso em 2 mL de solução de homogeneização e aplicado a um tubo contendo o gradiente descontínuo de sacarose. Este último é composto por uma camada inferior com 4 mL de sacarose a 1,2 M e uma camada superior de 4 mL de sacarose 0,8 M, sendo os 2 mL de P2 aplicados acima desta camada. Ao final, o tubo é centrifugado a 55000 x *g* por duas horas.

Após a centrifugação, os componentes presentes no precipitado P2 estão separados por sua densidade, sendo que entre a fase de 0,32 M e a de 0,8 M estão presentes fragmentos de mielina e pequenos fragmentos de membrana, entre a fase de 0,8 M e a de 1,2 M estão presentes sinaptossomas e no precipitado estão presentes mitocôndrias. A camada contendo sinaptossomas foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo, sendo diluída com 8 mL de solução de homogeneização e submetida a 20 minutos de centrifugação a 20000 x *g*. O sobrenadante desta última centrifugação é descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de solução de homogeneização, sendo então estocado a -80 °C até a data do experimento, não sendo armazenado por mais de trinta dias.

4.2.2 Quantificação de proteínas

Para avaliar a quantidade de proteína presente nas amostras de sinaptossomas, foi utilizado o método colorimétrico de quantificação de proteínas desenvolvido por Lowry e modificado por Hartree (89), utilizando-se albumina sérica bovina (ASB) para a curva de calibração.

Inicialmente, 20 e 10 µL da solução de sinaptossomas foram individualmente dispensados a microtubos de plástico de 2 mL. Para a curva de calibração, foram utilizados tubos com 2, 4, 10, 20 e 40 µg de ASB. Todos os tubos foram levados a um volume final de 400 µL com água deionizada. Além disso, foi utilizado como controle branco para a curva de ASB um tubo contendo água deionizada e para as amostras de

sinaptossomas foi utilizado como controle tubos com 20 e 10 μL de solução de homogeneização.

Após ajustados os volumes finais de 400 μL , foi adicionado a cada tubo 360 μL da solução A e em seguida os mesmos foram incubados a 50 °C por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram resfriados até alcançarem a temperatura ambiente, adicionados 40 μL de solução B e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, foram adicionados 1200 μL da solução e incubados a 50 °C por mais 10 minutos. Após alcançarem novamente a temperatura ambiente, 300 μL de cada solução foram transferidos para uma placa de microtitulação de 96 poços. A absorbância de cada amostra a 650 nm foi medida em espectrômetro (Flexstation3, Molecular Devices, EUA). Os resultados obtidos da curva de calibração foram submetidos a regressão linear e a concentração das amostras de sinaptossomas foi extrapolada a partir da reta gerada.

4.2.3 Ensaio de competição

Os ensaios de competição consistem basicamente em avaliar se um determinado composto compete com uma molécula radioativamente marcada pelo seu sítio de ligação, promovendo assim uma diminuição da formação do complexo molécula-sítio de forma proporcional à concentração do composto testado. Desta forma, está sendo avaliada a competição da Neurovespina pelos sítios de ligação do ácido glutâmico (GLU) e do MK-801. Para tal, são utilizadas moléculas marcadas com o isótopo de hidrogênio trício (^3H), um emissor de radiação beta, sendo elas: L-[3,4- ^3H] ácido glutâmico (47,5 Ci/mmol) e (+)-[3- ^3H]-MK-801 (26,4 Ci/mmol), ambas adquiridas da empresa PerkinElmer, EUA.

Para os ensaios de competição, as amostras de sinaptossomas foram descongeladas a temperatura ambiente e submetidas a centrifugação a 15000 x g por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de tampão tris-acetato (a 50 mM para GLU e a 5 mM para MK-801), sendo então incubado a 37 °C por 30 minutos. Este processo de incubação a 37 °C tem como objetivo gerar ruptura dos sinaptossomas e liberação das vesículas sinápticas. Após a incubação, a amostra é lavada por 5 vezes mediante sucessivas centrifugações a 15000 x g por 5 minutos e troca da solução tampão Tris.

Ao fim do processo de lavagem, sinaptossomas contendo 100 µg de proteína são adicionados a microtúbos contendo diferentes concentrações de Neurovespina solubilizada no mesmo tampão Tris e uma concentração fixa de uma das moléculas radioativamente marcadas, também em tampão Tris. As concentrações finais de Neurovespina utilizadas foram entre 1 nM e 1 mM e a concentração final dos ligantes radioativos foi, para os quatro citados, 10 nM. A presença dos três componentes (sinaptossomas, ligante radioativo e Neurovespina) na mesma solução demarca o início do ensaio. Essa solução foi incubada a 37 °C por 10 minutos para GLU e a 25 °C por 30 minutos para MK-801. Além dos tubos contendo Neurovespina, foram realizados dois controles: um demonstrando o máximo de ligação, no qual estão presentes somente sinaptossomas e o ligante radioativo, e um demonstrando o mínimo de ligação, contendo sinaptossomas, ligante radioativo e um competidor conhecido não marcado e em concentração saturante de 1 mM. Para os quatro ligantes radioativos foi utilizado como competidor não marcado a mesma molécula em questão (competição homóloga).

Ao fim do período de incubação, os microtubos são centrifugados por 5 minutos a 21000 x *g* a 4 °C, sendo que o sobrenadante desta centrifugação é descartado e o precipitado, contendo sinaptossomas e ligantes radioativos, é lavado duas vezes com água destilada gelada, de forma a retirar ligante radioativo que possa estar presente na superfície dos tubos. Em seguida, o precipitado é solubilizado em 200 µL de líquido de cintilação (MicroScintO, PerkinElmer, EUA), o qual é responsável por absorver a radiação beta emitida e convertê-la em emissão de fótons. A solução resultante foi incubada a temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente transferida para placa de microtitulação branca de 96 poços e analisada em leitor de cintilação e luminescência TopCount (PerkinElmer, EUA) por um minuto.

O resultado fornecido pelo leitor é expresso em contagens por minuto (CPM). As contagens obtidas a partir das diferentes concentrações de Neurovespina e a partir do controle de ligação máxima foram subtraídas do CPM obtido do controle de ligação mínima, tipicamente considerado como o valor de ligação não específica alcançado no ensaio. Em seguida os valores obtidos são convertidos em porcentagem relativa ao valor de ligação máxima, expressando-se assim quanto da ligação máxima possível no experimento foi inibida pela ação da Neurovespina, caso haja competição.

4.2.4 Captação de neurotransmissores

Sinaptossomas, enquanto íntegros, mantêm sua capacidade de transportar neurotransmissores para seu interior. Assim, foi avaliada também a atividade da Neurovespina na captação de GLU. Para estes ensaios, a extração de sinaptossomas foi realizada de forma similar à utilizada para os ensaios de ligação, entretanto a solução tampão utilizada é composta por: NaCl 136 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 2,5 mM, CaCl_2 2 mM, MgSO_4 1 mM, Tris-HCl 25 mM e D- glicose 5 mM (pH 7,4). Além disso, os sinaptossomas foram utilizados no mesmo dia do experimento, excluindo-se assim a etapa de congelamento e estocagem.

Assim, após o preparo dos sinaptossomas, foi realizada a quantificação de proteínas presentes na solução, nos mesmos moldes do item 4.2.3. O equivalente a 100 μg de proteína de sinaptossomas foi adicionado a microtubos contendo diferentes concentrações de Neurovespina (concentrações finais entre 1 mM e 1 nM) e uma concentração fixa de ligante radioativo (concentração final de 10 nM). Também foram realizados controles de captação máxima (somente com sinaptossomas e o ligante radioativo) e de ligação não específica (realizada com sinaptossomas e ligante radioativo na ausência de sódio, com substituição equimolar de NaCl por cloreto de colina).

A solução foi incubada por 10 minutos a 37 °C e em seguida os tubos foram centrifugados a 3000 x *g* por três minutos a 4 °C, separando-se o ligante livre dos sinaptossomas carregados com ligante radioativo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 200 μL de líquido de cintilação, sendo em seguida incubado a temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente transferida para placa de microtitulação branca de 96 poços e analisada em leitor de cintilação. Tal como nos ensaios de cintilação, os valores de contagem por minuto obtidos para o controle de ligação não específica foram subtraídos dos valores obtidos para as concentrações de Neurovespina e o resultado foi convertido a porcentagem em relação aos valores de ligação máxima.

4.3 Quantificação intracelular de cálcio

4.3.1 Cultivo celular

Para a quantificação de cálcio intracelular foram utilizadas células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y, dado que é possível encontrar diversos estudos em canais de cálcio utilizando tal linhagem. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² a 37 °C e 5% de CO₂ em meio DMEM com adição de 10 % de soro-fetal bovino e 2 mM de glutamina em garrafas de 75 cm². Após atingida confluência entre 80% e 90%, as células foram removidas das garrafas por meio da adição de solução de tripsina/EDTA (0,25%) e transferidas para tubo cônico graduado, sendo em seguida submetidas a centrifugação a 400 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. A concentração de células foi estimada pelo método de coloração com azul de tripan (0,2 % m/v, diluídos em PBS) e contagem manual em hemocitômetro de Neubauer.

As células foram semeadas em microplaca de cultivo de 96 poços com fundo transparente e paredes âmbar a um volume de 100 µL por poço, resultando em aproximadamente 50000 células em cada poço. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, alcançando 90% de confluência em cada poço. Ao fim do período de incubação, o meio de cultivo foi removido de cada poço e substituído por 100 µL de solução contendo 5 µM do corante Fura 2-acetoximetil ester (Fura-2 AM; Invitrogen, Fisher Scientific) em tampão PSS (NaCl 140 mM, KCl 5,9 mM, MgCl₂ 1,4 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glicose 11,5 mM, HEPES 10 mM) com pH 7,4 e 0,3% de albumina sérica bovina. As células foram incubadas com o corante e abrigadas da luz por 30 minutos a uma temperatura de 37 °C. Ao fim da incubação, a solução de corante foi retirada e as células foram lavadas com solução tampão PSS, sendo em seguida incubadas com tampão por mais 30 minutos para possibilitar a desesterificação do corante e consequente imobilização no meio intracelular.

4.3.2 Carreamento com Fura-2 e leitura

Ao fim do processo de desesterificação, as células estão carregadas com o corante no meio intracelular e prontas para a realização do ensaio, o qual foi realizado em leitor de fluorescência FlexStation3 (Molecular Devices, EUA). O corante Fura-2 AM é um

marcador fluorescente que se comporta de forma que sua excitação ocorre a 380 nm quando o corante se encontra ligado ao íon cálcio e a 340 nm quando não se encontra ligado, sendo que a emissão ocorre a 510 nm em ambos os casos. Assim, tal corante permite a estimativa da concentração de cálcio por meio da razão entre a fluorescência a 340 nm e a fluorescência a 380 nm.

O protocolo de leitura é constituído de 60 segundos de leitura basal seguida pela adição do peptídeo Neurovespina em diferentes concentrações (concentrações finais entre 100 µM e 10 nM) e leitura por mais 300 segundos. Em seguida, as células foram despolarizadas pela adição de solução despolarizante com KCl a 90 mM e CaCl₂ a 5 mM, promovendo assim a abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e consequente entrada de cálcio no meio intracelular. A leitura após a adição de solução despolarizante continua por mais 300 segundos, dando fim ao experimento. Em ensaios controles foram realizados os mesmos procedimentos, porém no lugar da Neurovespina foi adicionado volume igual de tampão PSS. A adição de todas as soluções às células foi realizada de forma automatizada pelo próprio equipamento e a temperatura constante de 37 °C.

Os resultados de fluorescência foram expressos pela razão entre a fluorescência emitida a 340 nm e a fluorescência emitida a 380 nm, sendo em seguida subtraídos da média das dez primeiras leituras da linha de base. Essa razão R pode ser convertida aos valores da concentração intracelular de cálcio a partir da seguinte fórmula:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{R - R_{min}}{(R_{max} - R) \left(\frac{F_{380 \max}}{F_{380 \min}} \right)}, \text{ na qual } K_d \text{ é a constante de dissociação do fura-}$$

2 com cálcio, R_{min} e R_{max} são as razões 340/380 para o corante respectivamente livre ou saturado de cálcio, $F_{380 \max}$ é a fluorescência a 380 nm na circunstância de saturação e $F_{380 \min}$ é a fluorescência a 380 nm quando o corante está livre de cálcio. De acordo com a literatura, a constante de dissociação Fura-2 para o cálcio a 37 °C é de 255 nM. Já a condição de fluorescência máxima (R_{max} e $F_{380 \max}$) pode ser obtida pela adição 0,1% de Triton X-100 à solução contendo as células carregadas com Fura-2. A subsequente adição de 100 mM de MnCl₂ promove a condição do corante livre de cálcio (R_{min} e $F_{380 \min}$), dado que o manganês possui maior afinidade pelo sítio de ligação do Fura-2.

Este ensaio permite tanto avaliar se a Neurovespina induz espontaneamente a mobilização de cálcio para o meio intracelular quanto se sua presença altera o processo de influxo de cálcio após a depolarização da membrana plasmática. No segundo caso é computado, para cada concentração avaliada, o valor máximo de concentração intracelular de cálcio obtida após a adição de KCl.

4.4 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a capacidade protetora da Neurovespina em um modelo *in vitro* de toxicidade celular, foram cultivadas células SH-SY5Y nos mesmos moldes do item 4.3.1 e semeadas em microplaca de cultivo transparente a uma densidade de 20000 células por poço e volume final de 100 μ L de meio de cultivo DMEM sem adição de soro fetal bovino. As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas para permitir aderência na placa. Após a incubação o meio foi substituído por meio fresco contendo Neurovespina em concentrações de 100 μ M a 3,125 μ M (em meio DMEM e DMSO a 0.1 %) e foram incubadas por mais 15 minutos. Após o tratamento com o peptídeo, as células foram submetidas a insulto tóxico com ácido glutâmico a 200 mM ou hidrocloreto de 6-hidroxidopamina a 100 μ M por mais 24 horas.

Em seguida, o meio de cultivo das células foi trocado por meio fresco e foi adicionado o corante resazurina, sendo que o processo de respiração celular causa a conversão do corante em resorufina, um composto fluorescente com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. A fluorescência foi medida após duas horas de incubação com o corante no leitor FlexStation3, em dez leituras a cada 30 segundos.

Para controle positivo e negativo para os experimentos de viabilidade, as células foram incubadas, respectivamente, com o veículo do peptídeo (DMEM/DMSO a 0.1 %) e sem insulto tóxico e com o veículo e o insulto tóxico (ácido glutâmico a 200 mM ou 6-hidroxi-dopamina a 100 μ M). Os dados foram normalizados para porcentagem considerando o controle negativo como 0% e o controle positivo como 100%.

4.5 Ensaio de produção de ROS

Para avaliar se a Neurovespina causou alteração no metabolismo de espécies reativas de oxigênio, foi utilizado o corante fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), o qual é mobilizado no meio intracelular e convertido a

uma sua forma fluorescente pela ação de ROS presente no citoplasma. Para tanto, as células foram submetidas ao mesmo tratamento com Neurovespina e 6-OHDA descrito no item anterior, sendo que, ao final da incubação de 24 horas, o meio foi trocado por meio fresco e foi adicionado 5 μM de DCFH-DA. Em seguida, as células foram incubadas com o corante por 30 minutos a 37 °C. A fluorescência foi medida no leitor FlexStation3 em dez leituras a cada 30 segundos com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. Os dados obtidos foram transformados em porcentagem relativa ao controle tratado com veículo e 6-OHDA a 100 μM ,

4.6 Ensaios eletrofisiológicos em *patch clamp*

Para avaliar o efeito da Neurovespina em correntes de cálcio, foram utilizadas células HEK 293T (*Human Embryonic Kidney SV-40 T-antigen*; Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ), cultivadas em DMEM suplementado com 4,5% de Glicose, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de *Antibiotic-Antimycotic*[®] (Gibco). Estas células foram transfectadas no Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade de Brasília com sequências de plasmídeos obtidos do repositório Addgene (Estados Unidos), sendo utilizadas a subunidade alfa de Ca_v 1.2 (pcDNA6CaV1.2), a subunidade $\text{Ca}_v\beta_3$ (pcDNA3.1- β_3) e a subunidade $\alpha_2\delta$ (pcDNA3.1- $\alpha_2\delta_1$).

Para a obtenção de macrocorrentes dos canais Ca_v 1.2 as células transfectadas foi utilizada a técnica de Patch Clamp em modo Whole Cell, com estímulo e registro utilizando o amplificador HEKA EPC 10, sendo as células mantidas em banho de solução externa composta por 5 mM de BaCl_2 , 135 mM de Colina-Cl, 10 mM de HEPES e 4 mM de MgCl_2 (pH 7,4 ajustado com CsOH). Mais ainda, foram utilizadas pipetas de vidro borossilicato com resistência de 2,5 e 4 $\text{M}\Omega$ e solução interna composta por 126 mM de CsCl_2 , 10 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 10 mM de HEPES e 4 mM de MgATP (pH 7,3 ajustado com CsOH).

Inicialmente, foi utilizado um protocolo de estímulo do tipo I/V (corrente/voltagem) no qual foi estimada a corrente gerada por voltagens entre -50 mV e 30 mV, com acréscimos de 5 mV para cada varredura, determinando-se assim a voltagem geradora de corrente máxima (V_{max}). Em seguida, foi estabelecida uma linha de base para cada célula, com estímulos de 200 ms em V_{max} e com intervalo de 30

segundos entre cada estímulo. Após 5-7 estímulos da linha de base, foi injetada Neurovespina a 50 μ M solubilizada em solução externa e 0.1% de DMSO, sendo registradas em média mais cinco correntes de cálcio após injeção do peptídeo. Ao fim do experimento foi realizada a lavagem das células com troca da solução externa e novamente as correntes foram registradas com estímulos de 200 ms em V_{max} .

Os experimentos eletrofisiológicos foram realizados no Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade de Brasília em colaboração com os pesquisadores Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz e Me. Diogo Vieira Tibery.

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos de competição e captação foram submetidos a regressão não linear sigmoideal para determinação da concentração inibitória média em cada ensaio (CI_{50}). Os dados de viabilidade celular e produção de ROS, assim como máximo alcançado de fluorescência e concentração intracelular de cálcio dos ensaios com Fura-2 AM, foram submetidos a análise de variância não-paramétrica (Kuskal-Wallis) seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunn (comparação com o grupo controle). Os dados obtidos foram considerados significativos com valores de p menores que 0,05 e foram apresentados graficamente pela média e pelo desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, La Jolla California, EUA).

Nos ensaios eletrofisiológicos com macrocorrentes de canais $Ca_v 1.2$ é necessária uma correção dos controles dado que tais correntes sofrem uma diminuição linear ao longo do tempo, o que pode levar a um falso positivo para o efeito do peptídeo. Nesse sentido, foi calculada a corrente estimada caso o peptídeo não houvesse sido injetado ($I_{estimada}$) seguindo a seguinte fórmula:

$$I_{estimada} = \frac{I_{lavagem} - I_{controle}}{(\#SW_{lavagem} - \#SW_{controle})(\#SW_{peptídeo} - \#SW_{controle})} + I_{controle}$$

Onde $I_{lavagem}$ é a corrente registrada após o último estímulo no período de lavagem, $I_{controle}$ é a corrente registrada antes da aplicação do peptídeo, $\#SW_{lavagem}$ é o número da varredura na qual a corrente após lavagem foi medida, $\#SW_{controle}$ é o número da varredura na qual a corrente controle foi medida e $\#SW_{peptídeo}$ é o número da

varredura na qual a corrente após aplicação do peptídeo foi medida. Após o cálculo da corrente estimada, a porcentagem de inibição foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{I_{\text{peptídeo}} \times 100}{I_{\text{estimada}}} - 100$$

5 Resultados e discussão

5.1 Ensaio de competição

Considerando-se que a Neurovespina apresentou potente efeito antiepilético em modelos agudos de crise, pode-se inferir que um dos possíveis mecanismos de ação da Neurovespina envolve modulação de elementos sinápticos. Sabe-se, por exemplo, que diversos fármacos antiepiléticos agem alterando a excitabilidade celular, muitos deles capazes de modular a neurotransmissão glutamatérgica ou GABAérgica (90). Além disso, ensaios com administração de Neurovespina em fatias hipocámpais mostraram que ela inibe o potencial excitatório pós-sináptico detectado na região CA1, reforçando a ideia de uma ação a nível sináptico, em especial pela modulação glutamatérgica (dados não publicados). Além disso, estudos não publicados de ancoragem molecular *in silico* indicaram afinidade da Neurovespina pelo sítio de ligação de receptores glutamatérgicos do tipo cainato.

Nesse sentido, escolhemos como modelo os ensaios de competição em membranas sinaptossomais com neurotransmissores marcados com trício, um isótopo radioativo de hidrogênio. Esse método permite avaliar diretamente se o composto estudado é capaz de deslocar um neurotransmissor específico do seu sítio receptor e determinar assim sua constante de inibição para tal sítio receptor.

Foram realizados ensaios para avaliar a competição entre a Neurovespina e o neurotransmissor glutamato, demonstrados na figura 1. O resultado de três ensaios independentes indica não haver competição entre os dois ($r^2=0.0136$), dado que as diferentes concentrações de Neurovespina não alteraram a ligação entre o glutamato marcado e os receptores sinaptossomais. Na figura 1 também é mostrada a inibição exercida por diferentes concentrações de glutamato não marcado.

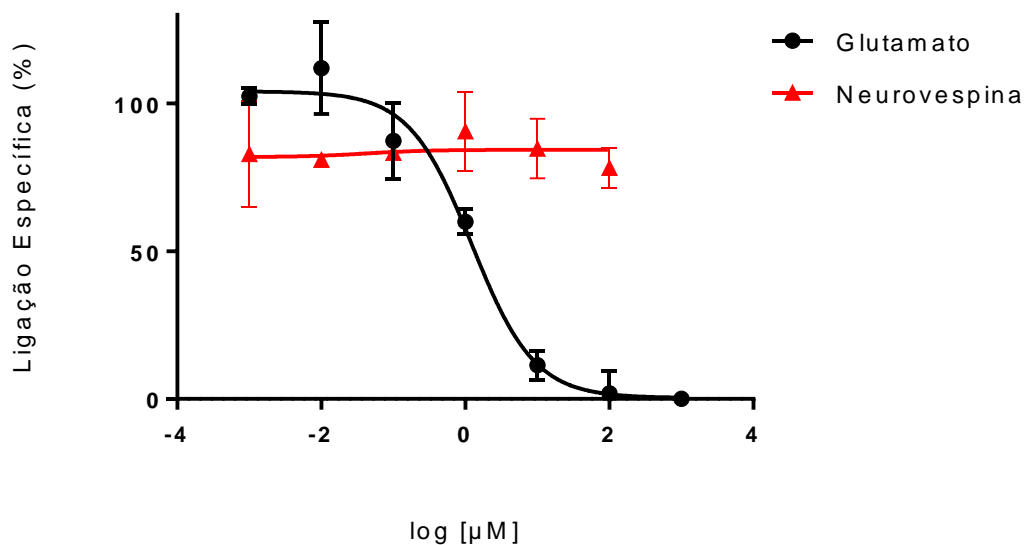


Figura 1. Ensaio de competição entre o peptídeo Neurovespina e o neurotransmissor glutamato marcado com trício. Os resultados indicam ausência de ação da Neurovespina no modelo. A curva concentração-efeito de glutamato não marcado (em preto) exemplifica, para fins demonstrativos, a competição pelo sítio receptor. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

É importante ressaltar, entretanto, que este experimento não permite a diferenciação entre subtipos de receptores, sendo que a ligação receptor-radioligante observada é resultado da ligação em todos os subtipos de receptores glutamatérgicos. Nesse sentido, receptores que apresentam baixa densidade ou baixa afinidade podem ter sua ligação camuflada nesse ensaio. Além disso, experimentos realizados em nosso laboratório utilizando-se como competidores o N-metil-D-aspartato (NMDA) e o ácido cáinico indicam baixa ligação do radioligante a receptores do tipo cáinico em comparação com NMDA (dados não publicados). Essa última observação é importante ao se considerar que a Neurovespina demonstrou efeito antiepiléptico contra crises induzidas por ácido cáinico. Assim, não é possível excluir a possibilidade de ação da Neurovespina em algum subtipo específico de receptores glutamatérgicos tais como receptores do tipo cainato ou receptores metabotrópicos, por exemplo.

De forma similar aos resultados obtidos de competição com glutamato, o resultado de três ensaios independentes também não revelou afinidade entre a Neurovespina e o sítio de ligação de MK-801 ($r^2 = 0.0528$), como demonstrado na figura 2. O MK-801 é um antagonista não competitivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, se ligando a um sítio no poro iônico do receptor de forma

voltagem e uso dependente. Este ligante foi utilizado devido à contribuição dos receptores NMDA no processo de excitotoxicidade, dado que os receptores NMDA também permitem a passagem de íons de cálcio para o meio intracelular, podendo desencadear processos apoptóticos. Dentro deste contexto, os antagonistas NMDA são bastante estudados como possíveis tratamentos para doenças neurodegenerativas com indícios de excitotoxicidade tais como DA e DP. Além disso, o fármaco amantadina, que é utilizado para o tratamento de discinias em pacientes com DP, age justamente como antagonista NMDA não competitivo.

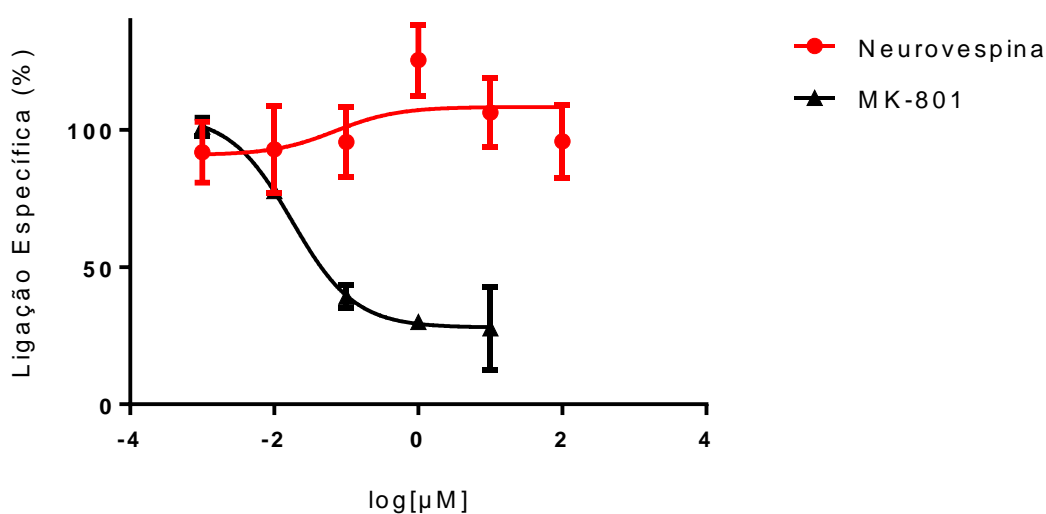


Figura 2. Resultados dos ensaios de competição entre o peptídeo Neurovespina e o antagonista NMDA não-competitivo MK-801 marcado com trício. Dado que altas concentrações de Neurovespina não foram capazes de alterar a ligação do glutamato marcado ao seu sítio receptor, resultados indicam ausência de ação da Neurovespina. A curva concentração-efeito de MK-801 não marcado exemplifica a competição pelo sítio receptor. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

5.2 Ensaio de captação

A modulação da neurotransmissão não se limita à competição pelo mesmo sítio receptor, incluindo também a modulação dos processos de captação de neurotransmissores e de liberação de neurotransmissores. Nesse sentido, o aumento da captação de glutamato diminui seu tempo de permanência na fenda sináptica, diminuindo também sua ação excitatória pós-sináptica, um mecanismo que seria consistente com os achados antiepiléticos supracitados da Neurovespina.

Para avaliar esse possível mecanismo, também foram utilizadas moléculas de glutamato marcadas com trício e sinaptossomas íntegros, os quais mantêm funções fisiológicas como potencial de membrana, respiração e capacidade de captação/liberação de neurotransmissores. O resultado de três ensaios independentes, demonstrado na figura 3, mostra que a Neurovespina não alterou a captação de glutamato no experimento. Na figura também é possível observar o efeito da adição de glutamato não marcado, o qual em altas concentrações é captado no lugar do glutamato marcado, diminuindo o sinal observado. Ainda que não tenha sido demonstrada ação na captação de glutamato, é importante notar que tal mecanismo é bastante raro, sedo que existem poucos agonistas de transportadores de aminoácidos excitatórios (91).

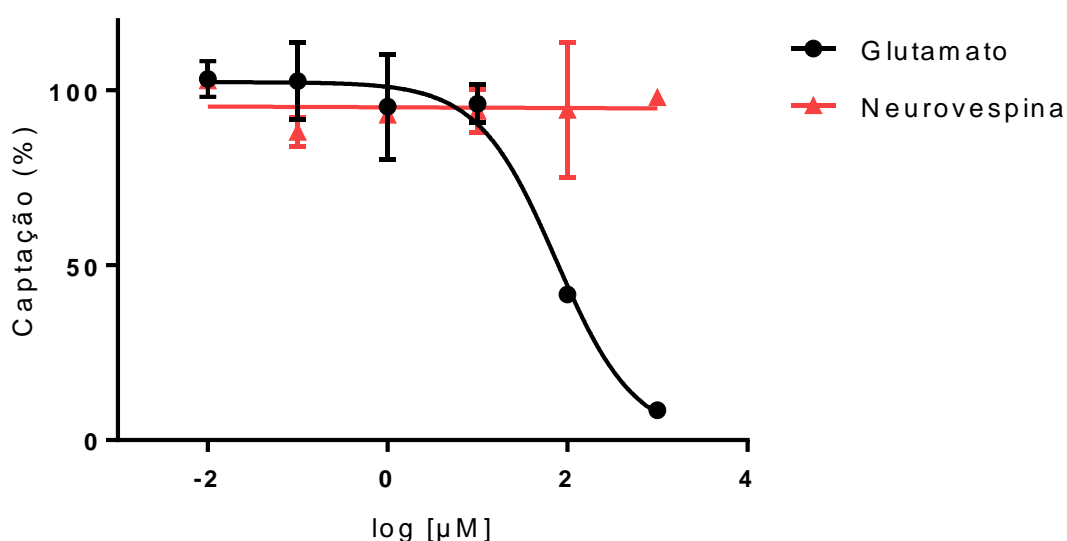


Figura 3. Resultados dos ensaios de captação do neurotransmissor glutamato marcado com trício na presença de diferentes concentrações do peptídeo Neurovespina. Estes resultados indicam que a presença de Neurovespina não altera o processo de captação do glutamato, mesmo em altas concentrações. A curva de captação na presença de diferentes concentrações de glutamato não marcado exemplifica, para fins demonstrativos, a diminuição da captação de glutamato marcado. Dados representando média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

Considerando os outros experimentos realizados utilizando-se sinaptossomas, outras investigações ainda podem ser realizadas no sentido de avaliar a possível ação da Neurovespina na neurotransmissão de glutamato. Outro experimento possível é o de liberação de neurotransmissores, avaliando se a Neurovespina diminui a liberação de

glutamato após despolarização da membrana sinaptossomal, outro mecanismo que seria compatível tanto com o efeito neuroprotetor quanto com o efeito antiepiléptico. A diminuição da liberação pode ser mediada tanto por ação em canais de cálcio voltagem dependentes quanto por ativação de autoreceptores pré-sinápticos (92).

5.3 Quantificação de cálcio intracelular

O cálcio é um íon essencial para o bom funcionamento da célula, estando associado a diversos processos neuronais como mobilização de vesículas sinápticas, ativação de enzimas cálcio dependentes e ativação de diversas cascatas de morte celular. Nesse sentido, a concentração intracelular de cálcio é altamente regulada e alterações dessas concentrações são de extrema importância. Para avaliar a ação da Neurovespina nas concentrações intracelulares de cálcio, foram utilizadas células de neuroblastoma (SH-SY5Y) carregadas com o corante Fura-2 AM.

Esse corante utilizado apresenta em sua estrutura dois grupamentos éster que lhe confere permeabilidade à membrana celular. No meio intracelular, esterases promovem a remoção desses grupamentos, imobilizando o corante no meio intracelular e permitindo sua ligação ao íon cálcio. Mais ainda, esse corante é fluorescente, sendo que sua curva de absorção é diferente entre os estados ligado e livre de cálcio. Os ensaios foram realizados valendo-se de um estímulo despolarizante, no caso a adição de altas concentrações de cloreto de potássio, o qual torna o potencial de membrana da célula mais positivo e conseqüentemente ativa canais de cálcio voltagem dependentes, aumentando as concentrações intracelulares de cálcio.

Nos ensaios realizados, as células carregadas com corante foram submetidas a concentrações finais entre 100 μ M e 10 nM de Neurovespina e incubadas por cinco minutos. A adição de Neurovespina sozinha não alterou de forma perceptível as concentrações de cálcio (figura 4), indicando que a Neurovespina por si só não gera entrada de cálcio ou mobilização de reservas intracelulares. Após o período de incubação, as células foram submetidas ao estímulo despolarizante de KCl, causando assim abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes e um intenso aumento nas concentrações intracelulares.

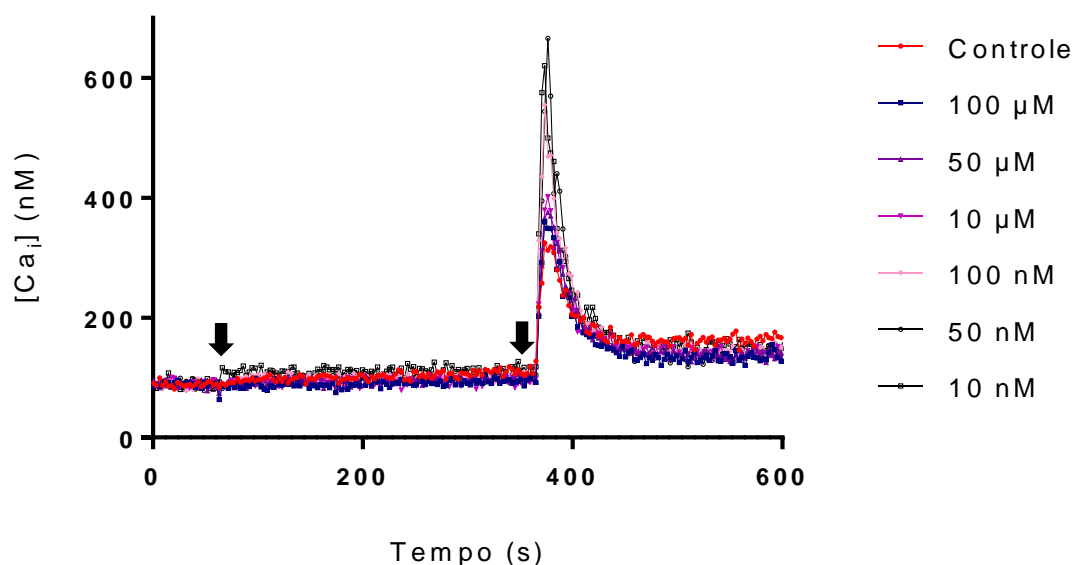


Figura 4. Concentração intracelular média de cálcio após estímulo despolarizante com KCl a 90 mM. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neurovespina (100 µM a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. A primeira seta indica o momento da adição da Neurovespina e a segunda seta indica a adição de solução despolarizante. Dados representando a média de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado.

Ainda que alguns traços indiquem visualmente um aumento do influxo de cálcio mediante o tratamento com Neurovespina, a análise dos picos máximos de cada grupo mostra que esse efeito se deve a alguns pontos fora da curva em dois grupos (figura 4), sendo que não houve diferença significativa entre os grupos (teste de Kruskall-Wallis; $p=0,7976$). Outro aspecto importante deste experimento é que ele permite observar também se a administração de Neurovespina age em algum reservatório intracelular de cálcio, efeito tal que não foi observado. Mais ainda, é sabido que as células SH-SY5Y também sofrem aumento do cálcio intracelular mediante ativação de canais colinérgicos nicotínicos (93), o que também não foi observado.

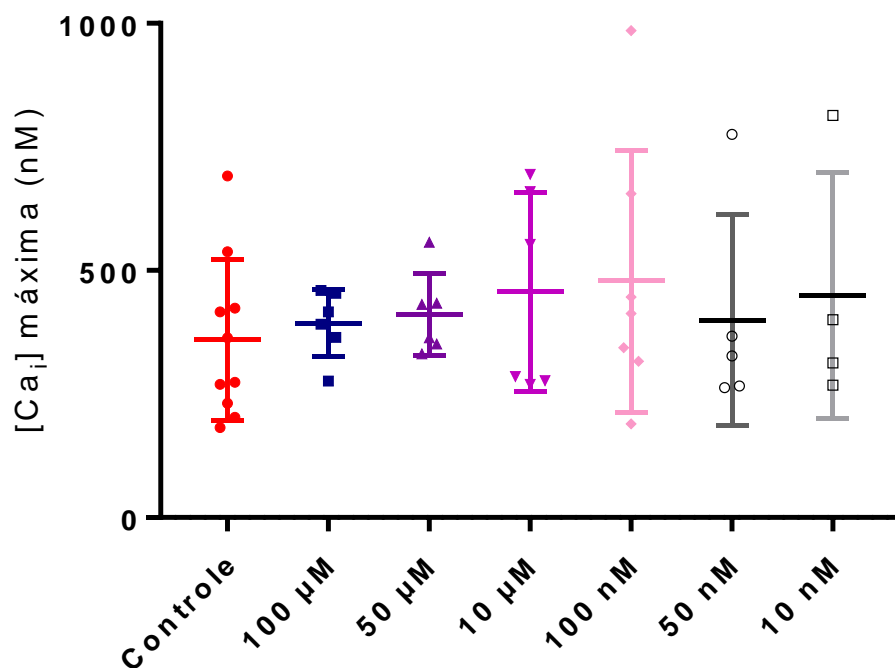


Figura 5. Concentração intracelular máxima de cálcio após estímulo despolarizante com KCl a 90 mM. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neurovespina (100 μM a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. Dados representando a média ± desvio padrão de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado.

Os resultados demonstrados nas figuras 4 e 5 foram ajustadas em uma fórmula que permite transformar os dados de fluorescência em concentração intracelular de cálcio a partir de controles estabelecidos independentemente. Também foi feita a análise dos dados de fluorescência antes da conversão em concentração, como mostrado nas figuras 6 e 7. A comparação entre os valores máximos de fluorescência (figura 7) gerou resultados similares aos observados na comparação dos valores máximos convertidos em concentração (figura 5). Entretanto, é possível observar que o ajuste na função gerou distorção em alguns dados, explicando a diferença visual das nos gráficos das figuras 4 e 6.

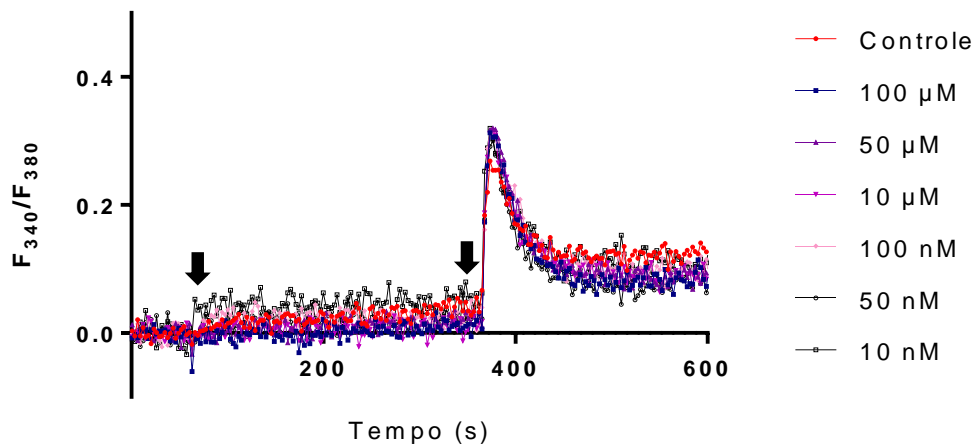


Figura 6. Razão entre as emissões após excitação a 340 nm e 380 nm, com estímulo despolarizante de KCl a 90 mM após 360 s do início do experimento. Os resultados indicam as concentrações testadas de Neuroespinina (100 µM a 10 nM) não alteraram o influxo de cálcio nas células. A primeira seta indica o momento da adição da Neuroespinina e a segunda seta indica a adição de solução despolarizante. Dados representando a média de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado.

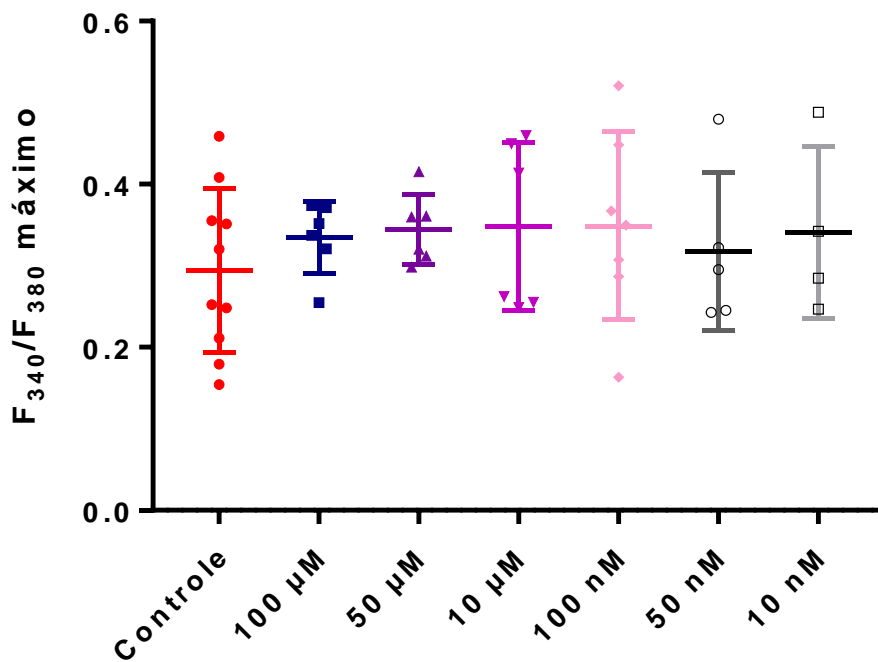


Figura 7. Razão 340/380 máxima observada em cada grupo experimental, indicando não haver alteração nas médias após o tratamento com diferentes concentrações de Neuroespinina. Dados representando a média \pm desvio padrão de 10 a 4 ensaios independentes em cada grupo tratado.

Ainda que esse seja um experimento bastante útil para avaliar o influxo de cálcio em células completamente funcionais, sua utilidade é limitada pela diversidade de

canais expressos pelas células SH-SY5Y. Assim, nessas células já foi encontrada a expressão de canais dos subtipos $Ca_v1.3$, $Ca_v2.2$ e $Ca_v3.1$ (94), sendo que a ação em outros subtipos ainda é possível, mesmo que não tenha sido observado inibição do influxo de cálcio nesse experimento.

5.4 Ensaio de viabilidade celular e produção de ROS

A ação da Neurovespina também foi avaliada em modelo celular utilizando-se como modelo a célula de neuroblastoma humano SH-SY5Y. As células tratadas com Neurovespina e submetidas a insulto tóxico de glutamato não demonstraram resultado estatisticamente significativo ($p=0,1948$). O mesmo foi observado quando as células, de forma similar, foram submetidas a insulto tóxico com 6-OHDA ($p=0,1229$), mesma neurotoxina utilizada em estudos prévios da Neurovespina em modelo animal de DP. Tais resultados indicam, inicialmente, que a Neurovespina não exerce seu efeito neuroprotetor de forma direta.

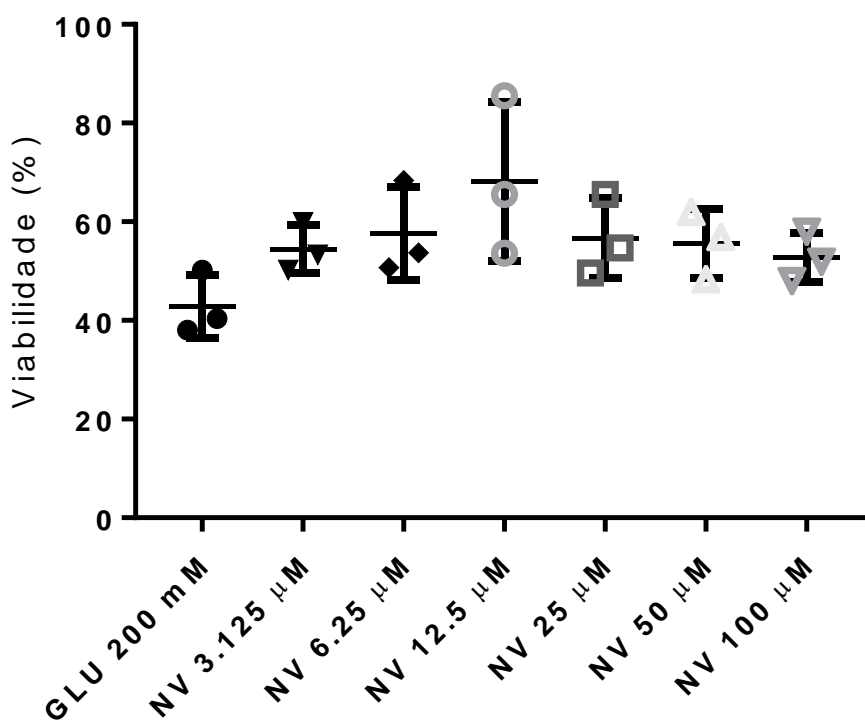


Figura 8. Viabilidade celular após insulto tóxico com glutamato a 200 mM em ensaio fluorescente com resazurina. Valores representam porcentagem em relação ao controle positivo que não foi submetido a insulto tóxico (média \pm desvio padrão). Os dados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, não revelando diferença significativa entre os grupos.

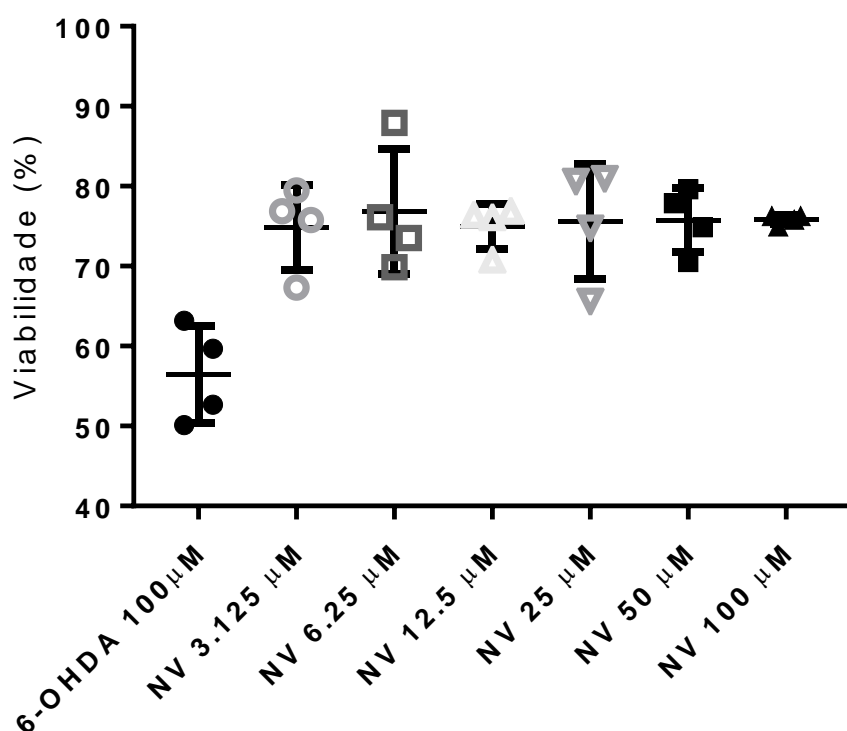


Figura 9. Viabilidade celular após insulto tóxico com 6-OHDA a 100 μM em ensaio fluorescente com resazurina. Valores representam porcentagem em relação ao controle positivo que não foi submetido a insulto tóxico (média ± desvio padrão). Os dados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, não revelando diferença significativa entre os grupos.

Nesse sentido, algumas considerações devem ser observadas. Primeiramente, os resultados observados anteriormente com a Neurovespina foram obtidos em modelos animais, os quais contam com maior complexidade fisiológica do que modelos celulares com um único tipo celular. Um efeito protetivo já observado em outras toxinas animais inclui a modulação de mediadores inflamatórios pela ação em células microgliais, mecanismo tal que não pode ser avaliado no modelo utilizado. Outra consideração importante é o padrão de expressão proteica das células SH-SY5Y. Esse tipo celular é considerado tipicamente indiferenciado, podendo mudar de padrão de expressão dependendo de certos tratamentos. Essa diferenciação leva as células a expressarem diferentes proteínas, podendo mudar a resposta das células tanto a Neurovespina quanto ao insulto tóxico (95).

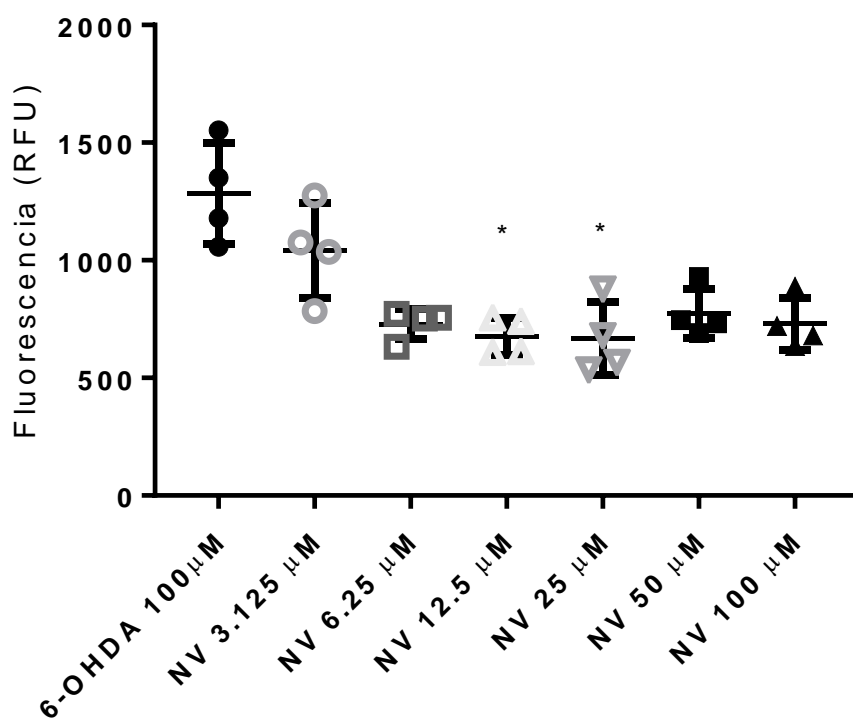


Figura 10. Fluorescência total após incubação com o corante fluorescente DCFH-DA (média \pm desvio padrão) em células tratadas com 6-OHDA e tratadas com Neurovespina. Os resultados foram submetidos a análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis seguida de pós teste de Dunn em comparação com o controle 6-OHDA. $*=p<0,05$.

Já nos ensaios com o corante fluorescente DCFH-DA (figura 10), utilizado para avaliar a produção de espécies reativas, houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Kruskall-Wallis $p<0,01$). Além disso, ao se comparar os grupos tratados com Neurovespina com o controle negativo, as células tratadas com 12,5 μ M e 25 μ M de Neurovespina produziram menos ROS do que as células sem tratamento ($p<0,05$ para ambos). Ainda que essa diminuição na produção de ROS não tenha resultado em um aumento de viabilidade celular, o resultado é bastante interessante, dado a importância dessas espécies reativas em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP.

Outra observação válida é que o ensaio realizado de viabilidade celular somente avalia a capacidade respiratória das células, dado que a conversão do corante em sua forma fluorescente resulta desse processo biológico. Ainda que a viabilidade esteja muitas vezes correlacionada com sobrevivência celular, é possível que haja aumento da sobrevivência celular em consequência do tratamento com Neurovespina.

5.5 Ensaio eletrofisiológico em *patch clamp*

O último experimento realizado com a Neurovespina consistiu na avaliação de sua ação em macrocorrentes de cálcio, utilizando-se células expressando somente canais de cálcio voltagem dependentes do subtipo 1.2 ($Ca_v1.2$). Os valores representativos de uma célula estão apresentados nas figuras 11 e 12. Foram realizados seis ensaios independentes, resultando em uma inibição média de 29.87 % (desvio padrão de ± 6.39) nas correntes de cálcio.

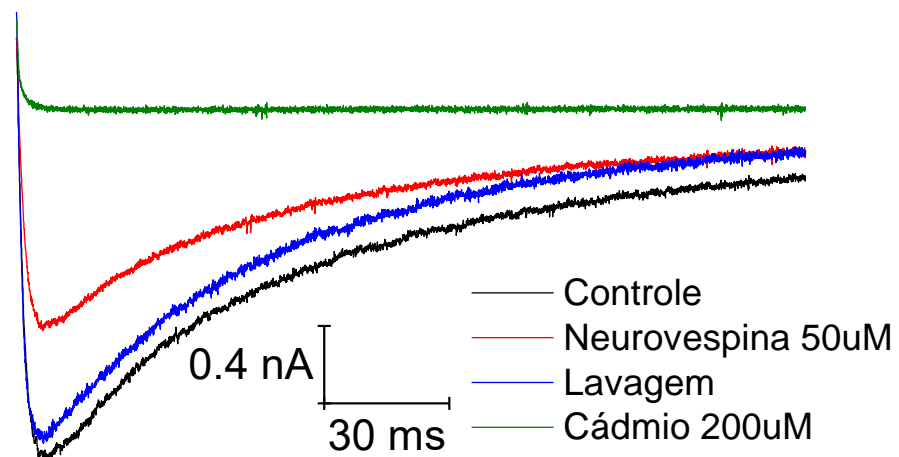


Figura 11. Traço representativo das correntes de cálcio geradas após aplicação de voltagem máxima ($V_{máx}$), demonstrando a diminuição da corrente em decorrência da aplicação de 50 μ M de Neurovespina. Tal diminuição foi revertida após lavagem das células com solução externa.

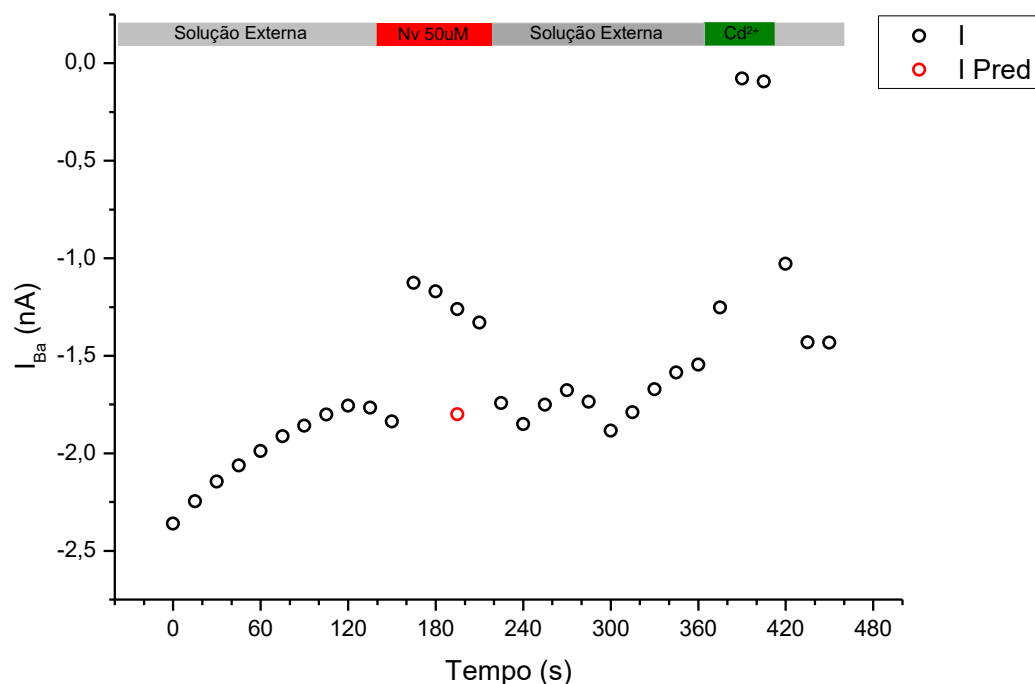


Figura 12. Dados representativos de corrente máxima obtida ao longo de um experimento, demonstrando também o valor de corrente estimada no momento em que foi aplicada a Neurovespina e a reversão do efeito bloqueador após a lavagem.

Os canais de cálcio voltagem dependentes são agrupados em canais do tipo L (subtipos 1.1 a 1.4), tipo P/Q (subtipo 2.1), tipo N (subtipo 2.2), tipo R (subtipo 2.3) e tipo T (subtipos 3.1 a 3.3). Esses canais apresentam as mais diversas funções celulares, tais como como ativação da contração muscular, estímulo a secreção de hormônios em células endócrinas, estímulo da transmissão sináptica e liberação de neurotransmissores e regulação da transcrição de genes (96).

Tabela 2. Principais características dos canais de cálcio dependentes de voltagem presentes (adaptado de (97)).

SUBTIPO	ANTAGONISTAS	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
CA _v 1.1	Dihidropiridinas	Músculo esquelético	Contração, transcrição
CA _v 1.2	Dihidropiridinas	Músculo liso e cardíaco, células endócrinas, neurônios	Contração, transcrição, secreção hormonal
CA _v 1.3	Dihidropiridinas	Células endócrinas, neurônios, músculo cardíaco	Marca-passo, secreção hormonal, audição
CA _v 1.4	Dihidropiridinas	Retina	Transdução visual

CA_v2.1	ω -Agatoxin IVA	Terminais nervosos	Liberação de neurotransmissores
CA_v2.2	ω -Conotoxin-GVIA	Terminais nervosos	Liberação de neurotransmissores
CA_v2.3	SNX-482	Neurônios	Liberação de neurotransmissores
CA_v3.1		Neurônio, músculo cardíaco	Disparo rítmico
CA_v3.2		Neurônio, músculo cardíaco	Disparo rítmico
CA_v3.3		Neurônio	Disparo rítmico

Desses subtipos, a maioria está presente em células neuronais, como demonstrado na tabela 2, mostrando como esses canais constituem alvos farmacológicos importantes para o estudo de doenças neurodegenerativas. Mais ainda, como demonstrado no item 1.3.1, o cálcio também participação importante no controle de cascatas de morte celular e em patologias como ataxia episódica e crises epiléticas de ausência (98). Esses canais apresentam grande relevância na epilepsia, sendo que diversas mutações associadas nesses canais estão diretamente relacionadas a essa doença (99). Mais ainda, vários fármacos antiepiléticos atualmente em uso apresentam alguma ação em canais de cálcio, ainda que não seja a única. Como exemplo desses fármacos temos a etosuximida, que reduz correntes de cálcio do tipo T e é usada no tratamento de crises de ausência (100), sendo que esse fármaco já demonstrou diminuição da epileptogênese em tratamentos crônicos (101). Não obstante, outros fármacos antiepiléticos como gabapentina, topiramato, valproato e lamotrigina apresentam em algum grau um efeito antagonista canais de cálcio voltagem dependentes (98).

Na DP, esses canais também são bastante estudados dado que neurônios da SNpc apresentam atividade autonômica rítmica em decorrência da presença de canais Ca_v1.3 e estão submetidos a altas concentrações intracelulares de cálcio, fator que pode contribuir para a vulnerabilidade dessas células na doença. Nesse sentido, estudos

epidemiológicos mostraram risco reduzido de desenvolvimento da DP em pacientes em tratamento crônico com isradipina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L utilizado para tratamento de condições cardiovasculares (102). Sua ação na DP se encontra atualmente em testes clínicos de fase 3 (NCT02168842). Outro bloqueador de canais tipo L, nimodipina, demonstrou proteção de neurônios dopaminérgicos por meio de diminuição da ativação microglial em camundongos submetidos a tratamento com lipopolissacarídeo (103), indicando um efeito imune dessa classe de moléculas. Outro trabalho com a mesma molécula também demonstrou proteção de neurônios da SNpc em modelo tóxico com MPTP, não havendo proteção de terminações estriatais (104), um resultado similar ao observado com a Neurovespina em modelo de DP.

No contexto apresentado, a inibição de correntes de cálcio observada pela aplicação de Neurovespina é um resultado extremamente relevante, pois concilia tanto seu efeito antiepiléptico quanto seu efeito neuroprotetor em modelo de DP. Por outro lado, é importante observar que o bloqueio de canais $Ca_v1.2$ está associado a tratamento de hipertensão, dado que esses canais estão muito presentes em miócitos cardíacos. Antagonistas de canais do tipo L pertencentes à família de dihidropiridinas, tais como isradipina e nifedipina, agem em células musculares cardíacas gerando hipotensão e bradicardia. Mesmo assim, os resultados obtidos em nosso laboratório não indicam efeitos adversos do uso da Neurovespina, mesmo em altas doses.

Também não é possível excluir, atualmente, a ação da Neurovespina em outros processos celulares que contribuam para sua ação neuroprotetora, entretanto esse resultado é bastante promissor considerando que é o primeiro resultado descrevendo um alvo farmacológico da mesma. Os próximos estudos com a Neurovespina devem incluir a avaliação da mesma em outros canais, afim de melhor entender sua ação no sistema nervoso.

6 Conclusão

Os resultados obtidos indicam que o alvo farmacológico da Neurovespina possivelmente não é um receptor glutamatérgico e sua ação também não altera a captação do neurotransmissor glutamato. Por outro lado, a Neurovespina demonstrou efeito inibitório em correntes de cálcio de canais do tipo $Ca_v1.2$, um mecanismo consistente com seu efeito neuroprotetor e antiepiléptico. Tais descobertas trazem novas ramificações importantes para o estudo da Neurovespina como ferramenta farmacológica.

7 Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. World report on ageing and health. 2015.
2. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* [Internet]. 1997 Jul 12 [cited 2019 Jan 30];350(9071):134–8.
3. Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R, et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener*. 2017 Mar;6:6.
4. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004 Jul;10:S10.
5. Surguchev A, Surguchov A. Conformational diseases: Looking into the eyes. *Brain Res Bull* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2019 Jan 30];81(1):12–24.
6. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Dec;11:155.
7. Gouras GK. Convergence of synapses, endosomes, and prions in the biology of neurodegenerative diseases. *Int J Cell Biol*. 2013/11/07. 2013;2013:141083.
8. Guo JL, Lee VMY. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med*. 2014 Feb;20:130.
9. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239–59.
10. Braak H, Tredici K Del, Rüb U, de Vos RA., Jansen Steur EN., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2019 Jan 30];24(2):197–211.
11. Choo ILH, Lee DY, Youn JC, Jhoo JH, Kim KW, Lee DS, et al. Topographic Patterns of Brain Functional Impairment Progression According to Clinical Severity Staging in 116 Alzheimer Disease Patients: FDG-PET Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2007;21(2).
12. Prusiner SB. Neurodegenerative Diseases and Prions. *N Engl J Med*. 2001

- May;344(20):1516–26.
13. Prusiner SB. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet.* 2013;47:601–23.
 14. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Nov;12:723.
 15. Mazon JN, de Mello AH, Ferreira GK, Rezin GT. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci [Internet].* 2017 Aug 1 [cited 2019 Feb 1];182:22–8.
 16. Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct;443:768.
 17. DeKosky ST, Marek K. Looking Backward to Move Forward: Early Detection of Neurodegenerative Disorders. *Science (80-).* 2003 Oct;302(5646):830 LP – 834.
 18. Kovacs GG. Chapter 21 - Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In: Kovacs GG, Alafuzoff IBT-H of CN, editors. *Neuropathology.* Elsevier; 2018. p. 301–7.
 19. Cova I, Markova A, Campini I, Grande G, Mariani C, Pomati S. Worldwide trends in the prevalence of dementia. *J Neurol Sci.* 2017 Aug;379:259–60.
 20. 2018 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s Dement [Internet].* 2018 Mar 1 [cited 2019 Feb 1];14(3):367–429.
 21. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer’s disease diagnosis and treatment [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research.* 2018;7(1161).
 22. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2017 Mar;3:17013.
 23. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29(13):1583–90.
 24. Aarsland D, Beyer MK, Kurz MW. Dementia in Parkinson’s disease. *Curr Opin*

- Neurol [Internet]. 2008;21(6):676–82.
25. Olanow CW, Kieburtz K, Katz R. Clinical approaches to the development of a neuroprotective therapy for PD. *Exp Neurol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2019 Feb 1];298:246–51.
 26. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2012 Aug;27(9):1083–91.
 27. Ghosh R, Tabrizi SJ. Huntington disease. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Feb 1];147:255–78.
 28. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118–30.
 29. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2017 Nov;390(10107):2084–98.
 30. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Lett*. 2018 Mar;592(5):728–42.
 31. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol*. 2018;28(4):R170–85.
 32. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr;36(1):489–517.
 33. Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial Mechanisms of Neuronal Cell Death: Potential Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017 Jan;57(1):437–54.
 34. Dong X, Wang Y, Qin Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 Apr;30:379.
 35. Pickrell AM, Youle RJ. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson’s Disease. *Neuron*. 2015 Jan;85(2):257–73.

36. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. Vol. 348, The New England journal of medicine. 2003. p. 1365–75.
37. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495–516.
38. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8:405.
39. Rager JE. The Role of Apoptosis-Associated Pathways as Responders to Contaminants and in Disease Progression. *Syst Biol Toxicol Environ Heal* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 Feb 1];187–205.
40. Cheng AL, Li S-H, Lam S, Li X-J. Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov;9(19):2859–67.
41. Zhao X, Kotilinek LA, Smith B, Hlynialuk C, Zahs K, Ramsden M, et al. Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. *Nat Med.* 2016 Oct;22:1268.
42. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature.* 2011 Mar;472:319.
43. Wang X-J, Cao Q, Zhang Y, Su X-D. Activation and Regulation of Caspase-6 and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015 Jan;55(1):553–72.
44. Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E. Caspase-9 Activation and Caspase Cleavage of tau in the Alzheimer's Disease Brain. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2019 Feb 1];11(2):341–54.
45. Burguillos MA, Hajji N, Englund E, Persson A, Cenci AM, Machado A, et al. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: Evidence in Parkinson's disease patients. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2019 Feb 1];41(1):177–88.
46. Lee J-H, Cheon Y-H, Woo R-S, Song D-Y, Moon C, Baik T-K. Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer

- brain. *Anat Cell Biol*. 2012/03/31. 2012 Mar;45(1):26–37.
47. Martínez-Vicente M, Dehay B, Perier C, Recasens A, Bombrun A, Antonsson B, et al. BAX channel activity mediates lysosomal disruption linked to Parkinson disease AU - Bové, Jordi. *Autophagy*. 2014 May;10(5):889–900.
 48. Büttner S, Habernig L, Broeskamp F, Ruli D, Vögtle FN, Vlachos M, et al. Endonuclease G mediates α -synuclein cytotoxicity during Parkinson's disease. *EMBO J*. 2013 Nov;32(23):3041 LP – 3054.
 49. Du H, Yan SS. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: Cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2019 Feb 1];1802(1):198–204.
 50. Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett*. 2001 Jun;498(2–3):204–7.
 51. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jul;8:499.
 52. Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2010;119(5):523–41.
 53. Gutekunst C-A, Li S-H, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, et al. Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington's Disease: Relationship to Neuropathology. *J Neurosci*. 1999 Apr;19(7):2522 LP – 2534.
 54. Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, Hallbeck M. Spreading of Neurodegenerative Pathology via Neuron-to-Neuron Transmission of β -Amyloid. *J Neurosci*. 2012 Jun;32(26):8767 LP – 8777.
 55. Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *J Biol Chem*. 2018;293(15):5414–24.
 56. Boland B, Yu WH, Corti O, Mollereau B, Henriques A, Bezard E, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Aug;17:660.

57. Singleton A, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* (80-). 2003;302(October):841.
58. Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364(9440):1169–71.
59. Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int*. 2017 Apr;67(4):185–93.
60. Nuriel T, Peng KY, Ashok A, Dillman AA, Figueroa HY, Apuzzo J, et al. The Endosomal-Lysosomal Pathway Is Dysregulated by APOE4 Expression in Vivo. *Front Neurosci*. 2017 Dec;11:702.
61. Halliday GM. Glucocerebrosidase deficits in sporadic Parkinson disease AU - Murphy, Karen E. *Autophagy*. 2014 Jul;10(7):1350–1.
62. Labzin LI, Heneka MT, Latz E. Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu Rev Med*. 2018 Jan;69(1):437–49.
63. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr;35(1):441–68.
64. Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009 Dec;32(12):638–47.
65. Luo X-G, Chen S-D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener*. 2012 Apr;1(1):9.
66. Chen S-H, Oyarzabal EA, Hong J-S. Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Curr Opin Pharmacol*. 2015/10/26. 2016 Feb;26:54–60.
67. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. *Exp*

- Neurol [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 Feb 2];263:235–43.
68. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 2012 Jul;3(7):e338–e338.
 69. Reale M, Greig NH, Kamal MA. Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Sep;9(10):1229–41.
 70. Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Feb;17:201.
 71. Hernandez MS, Santos GDR, Café-Mendes CC, Lima LS, Scavone C, Munhoz CD, et al. Microglial Cells Are Involved in the Susceptibility of NADPH Oxidase Knockout Mice to 6-Hydroxy-Dopamine-Induced Neurodegeneration. *PLoS One.* 2013 Sep;8(9):e75532.
 72. Wu D-C, Ré DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Aug;103(32):12132 LP – 12137.
 73. Tan M-S, Tan L, Jiang T, Zhu X-C, Wang H-F, Jia C-D, et al. Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death & Dis.* 2014 Aug;5:e1382.
 74. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CKE, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2010/03/21. 2010 Apr;13(4):411–3.
 75. Penke B, Bogár F, Crul T, Sántha M, Tóth EM, Víg L. Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: From Molecular Bases to Pharmacological Interventions. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences* . 2018.
 76. Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, et al. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Sci Transl Med.* 2016 Nov;8(363):363ra150 LP-363ra150.

77. Hölscher C. Drugs developed for treatment of diabetes show protective effects in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2014;66(5):497–510.
78. Mortari MR. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.; 2007.
79. Silva J, Monge-Fuentes V, Gomes F, Lopes K, dos Anjos L, Campos G, et al. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins (Basel)*. 2015;7(8):3179–209.
80. dos Anjos L. Avaliação da atividade antiepiléptica e neuroproteção do peptídeo Occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. Universidade de Brasília, UnB, Brasil.; 2013.
81. dos Anjos L. Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss. Universidade de Brasília, UnB, Brasil; 2017.
82. Campos GAA. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. Universidade de Brasília, UnB, Brasil; 2016.
83. King G. Venoms to Drugs: Translating Venom Peptides into Therapeutics. *Aust Biochem [Internet]*. 2013;44(3):13–6.
84. Mortari MR, Siqueira Cunha AO. New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods. *An Integr View Mol Recognit Toxinology - From Anal Proced to Biomed Appl*. 2013;91–117.
85. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther*. 2007;115(2):246–70.

86. Kim J-I, Yang EJ, Lee MS, Kim Y-S, Huh Y, Cho I-H, et al. Bee Venom Reduces Neuroinflammation in the MPTP-Induced Model of Parkinson's Disease. *Int J Neurosci*. 2011;121:209–17.
87. Doo AR, Kim SN, Kim ST, Park JY, Chung SH, Choe BY, et al. Bee venom protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death. *Brain Res [Internet]*. 2012;1429:106–15.
88. Emanuelli T, Antunes VF, Souza DOG. Characterisation of L-[3H]glutamate binding to fresh and frozen crude plasma membranes isolated from cerebral cortex of adult rats. *IUBMB Life [Internet]*. 1998 May 1;44(6):1265–72.
89. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem [Internet]*. 1972 Aug 1 [cited 2019 Feb 2];48(2):422–7.
90. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(7):553–64.
91. Fontana ACK. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem*. 2015 Sep;134(6):982–1007.
92. Nicholls DG. Synaptosomal Bioenergetics and Glutamate Release BT - Synaptosomes. In: Murphy KM, editor. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 109–29.
93. Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J Neurochem*. 2002 May;81(3):606–14.
94. Sousa SR, Vetter I, Ragnarsson L, Lewis RJ. Expression and Pharmacology of Endogenous Cav Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *PLoS One*. 2013;8(3).
95. Lopes FM, Schröder R, Júnior MLC da F, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro

- model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 2010;1337:85–94.
96. Catterall WA. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Aug;3(8).
 97. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005 Dec;57(4):411 LP – 425.
 98. Rajakulendran S, Hanna MG. The Role of Calcium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(1):a022723–a022723.
 99. Steinlein OK. Calcium signaling and epilepsy. *Cell Tissue Res.* 2014;357(2):385–93.
 100. Broicher T, Seidenbecher T, Meuth P, Munsch T, Meuth SG, Kanyshkova T, et al. T-current related effects of antiepileptic drugs and a Ca²⁺ channel antagonist on thalamic relay and local circuit interneurons in a rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology [Internet].* 2007 Sep 1 [cited 2019 Feb 2];53(3):431–46.
 101. Dezsi G, Ozturk E, Stanic D, Powell KL, Blumenfeld H, O'Brien TJ, et al. Ethosuximide reduces epileptogenesis and behavioral comorbidity in the GAERS model of genetic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2013/03/06. 2013 Apr;54(4):635–43.
 102. Zaichick S V, McGrath KM, Caraveo G. The role of Ca²⁺ signaling in Parkinson's disease. *Dis Model Mech.* 2017 May;10(5):519–35.
 103. Li Y, Hu X, Liu Y, Bao Y, An L. Nimodipine protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *Neuropharmacology.* 2009;56(3):580–9.
 104. Kupsch A, Gerlach M, Puppeter SC, Sautter J, Dirr A, Arnold G, et al. Pretreatment with nimodipine prevents MPTP-induced neurotoxicity at the nigral, but not at the striatal level in mice. *Neuroreport.* 1995;6(4):621–5.

8 Apêndice


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 9 de maio de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DA PEÇONHA DE ARTRÓPODES PELA TÉCNICA DE CONTAGEM EM CINTILAÇÃO LÍQUIDA.**”, Protocolo n.º 30/2017, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (72 machos e 72 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 09/05/2017 a 1º/03/2020.


UnB


Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB


CEUA

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