



**Universidade de Brasília**

**Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde**

**Laboratório de Neurofarmacologia**

**Gabriela Beserra Pinheiro**

**Segurança, Toxicidade e Alvos Farmacológicos da Occidentalina-1202, um  
Peptídeo Obtido da Peçonha da Vespa *Polybia occidentalis***

**Brasília, 2023**



**Universidade de Brasília**



**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Gabriela Beserra Pinheiro**

**Segurança, Toxicidade e Alvos Farmacológicos da Occidentalina-1202, um Peptídeo  
Obtido da Peçonha da Vespa *Polybia occidentalis***

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

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

**Brasília - DF**

**2023**

**GABRIELA BESERRA PINHEIRO**

**Segurança, Toxicidade e Alvos Farmacológicos da Occidentalina-1202, um Peptídeo  
Obtido da Peçonha da Vespa *Polybia occidentalis***

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari (presidente)**

**Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello**

**Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto**

**Universidade Federal de Goiás**

**Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior (Suplente)**

**Universidade de Brasília**

*Ao meu pai, Nivaldo*

*À minha orientadora, Márcia*

## **Agradecimentos**

Ao meu pai, Nivaldo, pelo amor incondicional e apoio pleno.

Ao meu namorado, Alexandre, pela paciência, carinho, cuidado, incentivo, e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À melhor orientadora do mundo, Márcia, pela oportunidade de me juntar à sua equipe, pelos momentos de acolhimento e aprendizado, pela paciência e confiança, e por acreditar em mim.

À minha família, que me apoiou, torceu e se orgulhou dessa conquista.

À minha sogra, Elizabete, por todo apoio, suporte e por acreditar em mim.

Aos meus amigos Matheus, George, Daniela e Gustavo pelo apoio incondicional e torcida.

Aos meus amigos do laboratório de Neurofarmacologia: Letícia, Larissa, Isabela, Rayanne, Valéria, Maria, Caio, Luana, Gabriel e Miguel pelo apoio e companhia.

Ao técnico Danilo Oliveira pela ajuda com o uso do criostato e com os procedimentos de histologia.

Às estagiárias, Isabela e Victória pela ajuda com todos os experimentos, cortes dos órgãos no criostato, análises de vídeos, histologia e fotografias das lâminas. Pelas risadas, cafés e aprendizados.

À Larissa pela ajuda com os cortes no criostato e à Jéssica pela ajuda com os ensaios de competição.

À toda equipe NeuropharmaLab pelos momentos de aprendizagem e confraternizações.

Aos professores Doutores Jair Trappé Goulart e Andrezza Fabro de Bem pelas colaborações.

A todos os professores do IB que me acompanharam e inspiraram durante a graduação.

À equipe do Hospital Veterinário da UnB pela colaboração nos exames de sangue.

Ao patologista Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana pela consulta na análise das lâminas histológicas.

Ao Jivago e Carina pelo cuidado com os animais do biotério.

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

À minha cachorra e minha gata, Maya e Arya, pelo amor e companhia.

Aos camundongos, pelo sacrifício.

*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda”.*

**Paulo Freire**

## Resumo

Atualmente, numerosos compostos têm ganhado atenção por seu potencial terapêutico para doenças neurológicas, uma vez que os medicamentos atualmente disponíveis para seu tratamento visam apenas o alívio sintomático e são incapazes de prevenir sua progressão. O estudo de peptídeos isolados de peçonhas de animais tem mostrado grande potencial. Em estudos anteriores, o peptídeo isolado da vespa *Polybia occidentalis* (Occidentalina-1202/Occ-1202) demonstrou um grande potencial antiepilético contra crises epiléticas induzidas quimicamente. Entretanto, apesar da Occ-1202 mostrar um imenso potencial terapêutico, como atividade anti-inflamatória e supressão do estresse oxidativo, seus alvos e segurança farmacológica permanecem desconhecidos, bem como a extensão de seus possíveis efeitos adversos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo a investigação da sua segurança e toxicidade do peptídeo, a elucidação de seus possíveis efeitos adversos, e a avaliação de seus potenciais alvos farmacológicos. Para a avaliação da segurança farmacológica do peptídeo, foram testadas três doses diferentes (4 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg) de Occ-1202 em protocolo de administração de dose única e protocolo de administração de doses repetidas em camundongos Swiss (*Mus musculus*) - machos e fêmeas. O teste comportamental de Campo aberto foi realizado ao longo do período de observação, após o qual os animais tiveram seus órgãos (cérebro, coração, pulmão, fígado e rim) coletados para análise histopatológica. Para avaliação de seus possíveis alvos farmacológicos foram realizados ensaios de competição e de captação com radioligantes <sup>3</sup>H-GABA e <sup>3</sup>H-Glutamato, a fim de se avaliar a atuação do peptídeo na neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica, respectivamente. Os resultados obtidos apontaram para a segurança do peptídeo Occ-1202. Os animais não apresentaram alterações fisiológicas e comportamentais e histopatológicas na dose terapêutica (4 mg/kg) e nas maiores doses do peptídeo (20 e 40 mg/kg). Nas avaliações morfológicas macroscópicas, as doses mais altas do peptídeo apresentaram alterações hepáticas que não foram detectadas em análise histopatológica posterior. Ainda, nos ensaios de competição foi possível constatar uma potente competição entre o peptídeo Occidentalina-1202 e o neurotransmissor glutamato. Estes resultados sugerem que o peptídeo é uma alternativa segura no tratamento de epilepsia refratária, embora seu alvo farmacológico permaneça desconhecido. Ademais, peptídeos neuroativos têm ganhado grande relevância como potenciais novos tratamentos de doenças neurodegenerativas, portanto, o estudo sobre sua segurança e toxicidade, e mecanismos de ação apresenta uma poderosa ferramenta tanto no estudo de doenças neurodegenerativas, quanto no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes.

**Palavras-Chave:** Epilepsia Refratária; Occidentalina-1202; Occ-1202; Peptídeo; Vespas sociais; *Polybia occidentalis*; Neurofarmacologia; Doenças neurodegenerativas.



## Abstract

Currently, numerous compounds have gained attention for their therapeutic potential in neurological diseases, as the medications currently available for their treatment aim only at symptomatic relief and are incapable of preventing their progression. The study of isolated peptides from animal venoms has shown significant potential. In previous studies, the isolated peptide from the wasp *Polybia occidentalis* (Occidentalina-1202/Occ-1202) demonstrated great antiepileptic potential against chemically induced epileptic seizures. However, despite Occ-1202 showing immense therapeutic potential, such as anti-inflammatory activity and suppression of oxidative stress, its targets and pharmacological safety remain unknown, as well as the extent of its possible adverse effects. In this context, this study aimed to investigate the safety and toxicity of the peptide, elucidate its potential adverse effects, and evaluate its potential pharmacological targets. For the assessment of the pharmacological safety of the peptide, three different doses (4 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg) of Occ-1202 were tested in a single-dose administration protocol and repeated-dose administration protocol in male and female Swiss mice (*Mus musculus*). The Open Field behavioral test was conducted throughout the observation period, after which the animals had their organs (brain, heart, lungs, liver, and kidneys) collected for histopathological analysis. To evaluate its potential pharmacological targets, competition and uptake assays were performed with radioligands  $^3\text{H}$ -GABA and  $^3\text{H}$ -Glutamate, respectively, to assess the peptide's action on GABAergic and glutamatergic neurotransmission, respectively. The results obtained pointed to the safety of the Occ-1202 peptide. Animals showed no physiological, behavioral, or histopathological changes at the therapeutic dose (4 mg/kg) and at higher doses of the peptide (20 and 40 mg/kg). In macroscopic morphological evaluations, the higher doses of the peptide exhibited hepatic changes that were not detected in subsequent histopathological analysis. Additionally, in competition assays, potent competition between the Occidentalina-1202 peptide and the neurotransmitter glutamate was observed. These results suggest that the peptide is a safe alternative in the treatment of refractory epilepsy, although its pharmacological target remains unknown. Furthermore, neuroactive peptides have gained significant relevance as potential new treatments for neurodegenerative diseases. Therefore, studying their safety and toxicity, as well as their mechanisms of action, presents a powerful tool in both the study of neurodegenerative diseases and the development of more effective therapies.

**Keywords:** Refractory Epilepsy; Occidentalina-1202; Occ-1202; Peptide; Social Wasps; *Polybia occidentalis*; Neuropharmacology; Neurodegenerative Diseases.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Categorização da Intervenção Terapêutica para Epilepsia. Fim das Crises (1) é definida como ausência de crises por um período mínimo de três vezes o intervalo entre crises, pré-intervenção, mais longo ou 12 meses, o que for mais longo; Falha no Tratamento (2) é definida como recorrência da crise(s) após a aplicação adequada da intervenção; e indeterminado (3) é definido quando o tratamento não foi aplicado de forma adequada ou quando faltam informações para realizar a avaliação. Adaptado de Kwan et al. (2010).

**Figura 2.** Exemplar da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/30677>.

**Figura 3.** Representação da fórmula estrutural da Occidentalina-1202.

**Figura 4.** Avaliação do ganho de massa corporal dos animais durante o PADU. (A) Machos. (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 5.** Avaliação do ganho de massa corporal dos animais durante o PADR. (A) Machos. (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 6.** Avaliação do ganho de massa corporal dos tratamentos entre as semanas 1 (S1) e 2 (S2) do PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística teste T. (\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $P < 0.05$ , \* DZP =  $P < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $P > 0.05$ . (B) \*\* Veículo =  $P < 0.01$ , \*\* DZP =  $P < 0.01$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $P < 0.05$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $P < 0.01$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 7.** Avaliação do ganho de massa corporal dos tratamentos entre as semanas 1 a 4 (S1, S2, S3 e S4) do PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. (\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.05$ ). (\*\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.01$ ). (\*\*\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.001$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 8.** Comparação do deslocamento total, em metros, dos animais no teste de campo aberto no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 9.** Comparação do deslocamento total, em metros, l entre os grupos nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 10.** Comparação do deslocamento total, em metros, dentro no mesmo grupo nos testes de Campo aberto no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo.

Diferenças significativas: (A) \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.001$ , \* Occ-1202 20 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2, e 1 e 3 =  $p < 0.01$ . (B) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 11.** Análise do período imóvel total dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas em relação ao DZP: (A) \* Veículo =  $p < 0.05$  ( $P=0.0252$ ). (B) \*\*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 12.** Comparação do período imóvel total dos animais entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \*\*\* Veículo =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . Open Field 2: \*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.001$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . (B) Open Field 1: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 13.** Comparação do período imóvel dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 2 e 3 =  $p < 0.05$ . (B) \*\* DZP entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 2 e 3 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 14.** Análise do tempo de autolimpeza dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 15.** Comparação do tempo de autolimpeza entre os grupos nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 16.** Comparação do tempo de autolimpeza dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Veículo entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.005$ . (B) \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2, e 2 e 3 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 17.** Análise do tempo de elevação dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós

teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B) \* Veículo =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 18.** Comparação da elevação entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 2: \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 3: \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . (B) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 19.** Comparação da elevação dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 20.** Análise do tempo de exploração dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $P < 0.05$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B). \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 21.** Comparação da exploração entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.001$ . Open Field 2: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B) Open Field 1: \*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.01$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 2: \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 22.** Comparação da exploração dentro do mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \*\* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.01$ . (B) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 23.** Análise da massa dos cérebros no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=6$  para todos os grupos.

**Figura 24.** Análise da massa dos cérebros no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 25.** Análise da massa dos fígados no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 26.** Análise da massa dos fígados no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 27.** Análise da massa dos pulmões no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 28.** Análise da massa dos pulmões no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 29.** Análise da massa dos rins no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 30.** Análise da massa dos rins no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 31.** Análise do volume dos cérebros no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=6$  para todos os grupos.

**Figura 32** Análise do volume dos cérebros no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 33.** Análise do volume dos fígados no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 34.** Análise do volume dos fígados no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 35.** Análise do volume dos pulmões no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. (#) Diferenças significativas em relação ao grupo veículo: (B) # Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 36.** Análise do volume dos pulmões no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 37.** Análise do volume dos rins no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 38.** Análise do volume dos rins no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (B) \* Veículo =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

**Figura 39.** Avaliação dos níveis de ALT no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

**Figura 40.** Avaliação dos níveis de AST no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $P > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

**Figura 41.** Avaliação dos níveis de Uréia no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

**Figura 42.** Avaliação dos níveis de Creatinina no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

**Figura 43.** Imagens representativas das alterações observadas nos fígados extraídos dos animais que receberam dose intermediária (20 mg/kg) e dose mais alta (40 mg/kg) do peptídeo Occ-1202 no PADR. A e B: Fêmeas Occ-1202 20 mg/kg ( $n=3$ ). C e D: Machos Occ-1202 20 mg/kg ( $n=2$ ). E e F: Fêmeas Occ-1202 40 mg/kg ( $n=3$ ). G e H: Machos Occ-1202 40 mg/kg ( $n=4$ ).

**Figura 44.** Imagens das secções coronais ( $50\mu\text{m}$ ) da formação hipocampal (aumento de 10x) no PADU, mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e

I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações. n=6 para todos os grupos.

**Figura 45.** Imagens das secções coronais (50µm) da formação hipocampal de camundongos (aumento de 10x) no PADR, mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações. n=8 para todos os grupos.

**Figura 46.** Imagens das secções dos fígados (50 µm) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

**Figura 47.** Imagens das secções dos fígados (50 µm) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos. n=8 para todos os grupos.

**Figura 48.** Imagens das secções dos pulmões (50 µm) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

**Figura 49.** Imagens das secções dos pulmões (50 µm) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

**Figura 50.** Imagens das secções dos rins (50 µm) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

**Figura 51.** Imagens das secções dos rins (50 µm) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

**Figura 52.** Ensaio de competição entre o peptídeo Occidentalina-1202 e o neurotransmissor GABA marcado com trício. Os resultados indicam ausência de ação do peptídeo no modelo. Dados representando média ± erro padrão da média de três ensaios independentes.

**Figura 53.** Ensaio de competição entre o peptídeo Occidentalina-1202 e o neurotransmissor glutamato marcado com trício. Os resultados indicam que há competição entre o peptídeo e o

neurotransmissor glutamato no modelo. Dados representando média  $\pm$  erro padrão da média de dois ensaios independentes.

**Figura 54.** Sítio de ligação no receptor Cainato (GluR6). (A) Cainato no sítio de ligação (seta indica a posição). (B) Occidentalina-1202 bloqueando a entrada do receptor. (C) Occidentalina-1202 com a superfície destacada, indicando o bloqueio total do sítio de ligação. (D) Occidentalina-1202 (amarelo) não ocupa o mesmo sítio de ligação do que o Cainato (seta indica a posição) no receptor GluR6. Imagem retirada de Mortari et. al., 2023.



## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Relação dos principais fármacos antiepilépticos utilizados no tratamento da Epilepsia, mecanismos de ação e efeitos adversos mais comuns.

**Tabela 2.** Parâmetros bioquímicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para machos.

**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para fêmeas.

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos obtidos após os tratamentos e valores de referência para camundongos Swiss machos.

**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para fêmeas.

## Lista de Abreviações e Siglas

ALT: Alanina Aminotransferase

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASB: Albumina Sérica Bovina

AST: Aspartato Aminotransferase

BHE: Barreira Hematoencefálica

BORIS: Behavioral Observation Research Interactive Software

BZD: Benzodiazepina

CBZ: Carbamazepina

CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal do IB/UnB

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPC: Estimulação Profunda do Cérebro

EMA: European Medicines Agency

EMG: Electromyography

EMT: Estimulação Magnética Transcraniana

ENT: Estimulação do Nervo Trigêmeo

ENV: Estimulação do Nervo Vago

ER: Epilepsia Refratária

ES: Estimulação Elétrica

FAE: Fármacos Antiepilépticos

FDA: Food and Drug Administration

GABA: Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico

GABA-A: Receptor GABA do tipo A

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

H.E.: Hematoxilina-Eosina

ILAE: International League Against Epilepsy

I.P.: Administração Intraperitoneal

I.C.V.: Administração Intracerebroventricular

I.T.: Índice Terapêutico

MALDI-TOF/TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Time Of Flight

NMDA: N-metil D-Aspartato

Occ-1202: Ocidentalina-1202

OF: Open Field

OMS: Organização Mundial de Saúde

PADU: Protocolo de Administração de Dose Única

PADR: Protocolo de Administração de Doses Repetidas

PBS: Solução Tampão Fosfato de Sódio

PTZ: Pentilenotetrazol

RNS: Neuroestimulação Responsiva

SD: Síndrome de Dravet

SLG: Síndrome de Lennox-Gastaut

SNC: Sistema Nervoso Central

SUDEP: Sudden Unexpected Death in Epilepsy

VCM: Volume Corpuscular Médio

VGB: Vigabatrina

VPA: Ácido Valpróico

VPM: Volume Plaquetário Médio

## Sumário

1. Introdução.....	22
1.1. Potencial da Occidentalina-1202 no tratamento da Epilepsia Refratária.....	22
1.2. A Epilepsia.....	22
1.3. Mecanismos de Refratariedade .....	25
1.4. Tratamentos da Epilepsia Refratária.....	27
1.5. Dificuldades no Tratamento da ER.....	33
1.6. Peptídeos neuroativos identificados na peçonha de animais .....	34
1.7. A Occidentalina-1202 como potencial tratamento para a Epilepsia Refratária.....	35
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivos Gerais: .....	37
2.2. Objetivos Específicos: .....	37
3. Metodologia.....	38
3.1. Peptídeo .....	38
3.2. Sujeitos Experimentais .....	38
3.3. Ensaio de Segurança e Toxicidade.....	39
3.3.1. Protocolo de Administração de Dose Única.....	39
3.3.2. Protocolo de Administração de Doses Repetidas .....	40
3.4. Avaliação comportamental em ensaio de Campo Aberto ( <i>Open Field</i> ).....	40
3.5. Análises Bioquímicas e Hematológicas.....	41
3.6. Eutanásia e coleta dos órgãos .....	42
3.7. Análises Histológicas.....	42
3.8. Ensaio de Radioligação Funcional .....	45
3.8.1. Sujeitos Experimentais. ....	45
3.8.2. Preparo dos sinaptossomas .....	45
3.8.3. Quantificação de Proteínas .....	46
3.8.4. Ensaio de Competição com os radioligantes GABA e Glutamato .....	47
3.9. Análise estatística .....	48
4. Resultados.....	48
4.1. Massa dos Animais .....	48
4.2. Análise dos comportamentos gerais espontâneos no teste de Campo aberto ( <i>Open Field</i> ).....	52
4.2.1. Deslocamento total .....	52
4.2.2. Período Imóvel .....	55

4.2.3. Autolimpeza .....	57
4.2.4. Elevação.....	60
4.2.5. Exploração .....	62
4.3. Massa e Volume dos Órgãos .....	65
4.3.1. Massa dos órgãos.....	65
4.3.2. Volume dos órgãos .....	70
4.4. Análise Bioquímica e Hematológica .....	75
4.4.1. Análises Bioquímicas .....	75
4.4.2. Hematotoxicidade .....	80
4.5. Análises Histopatológicas .....	81
4.6. Quantificação de Proteínas .....	92
4.7. Identificação do alvo farmacológico por ensaio de competição com radioativos .....	92
5. Discussão .....	94
6. Conclusões.....	103
7. Referências Bibliográficas.....	104
8. Anexos .....	114

## 1. Introdução

### 1.1. Potencial da Occidentalina-1202 no tratamento da Epilepsia Refratária

Atualmente, diversos Fármacos Antiepilépticos (FAEs) são utilizados no tratamento da Epilepsia. No entanto, estes FAEs comumente apresentam uma grande quantidade de efeitos adversos, que muitas vezes se sobrepõem aos benefícios do tratamento. Além disso, cerca de um terço dos pacientes com epilepsia apresentam resistência a terapia com os FAEs disponíveis (Löscher et al., 2013). Tendo em vista estas limitações e o grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, torna-se necessário que novas alternativas farmacológicas, com menos efeitos adversos associados, sejam desenvolvidas.

Peçonhas de animais, em especial de artrópodes, têm se destacado na busca de novos fármacos para doenças neurológicas, dentre elas a Epilepsia. Estas peçonhas possuem compostos neuroativos que apresentam grande potencial no desenvolvimento de novas terapias para estas doenças (Silva et al., 2015). A peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* vem sendo estudada desde 2005, quando Mortari e colaboradores isolaram seus componentes e identificaram o peptídeo Occidentalina-1202 (Occ-1202). Após ser testado em ensaios de indução aguda de crises e em modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), o peptídeo foi capaz de apresentar proteção significativa contra as crises máximas induzidas (Mortari et al., 2023).

Desta forma, a Occidentalina-1202 apresentou-se eficaz como antiepiléptico em estudos anteriores, não exibindo efeitos tóxicos tanto em modelos agudos quanto em modelos crônicos de administração por via parental (Mortari et al., 2023). Contudo, sendo a toxicidade, segurança farmacológica e mecanismo de ação do peptídeo desconhecidos, a elucidação destes parâmetros torna-se necessário, tendo em vista o potencial do composto como tratamento da Epilepsia.

### 1.2. A Epilepsia

A epilepsia é uma doença crônica do cérebro que afeta cerca de 50 milhões de pessoas globalmente, principalmente durante a infância ou a terceira idade. É estimado que 5 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com epilepsia anualmente. Nos países desenvolvidos, cerca de 49 em 100.000 pessoas recebem o diagnóstico a cada ano, sendo esse número ainda maior em

países em desenvolvimento (cerca de 139 por 100.000 pessoas), embora cerca de 80% dos pacientes residam em países de renda média a baixa (OMS, 2023).

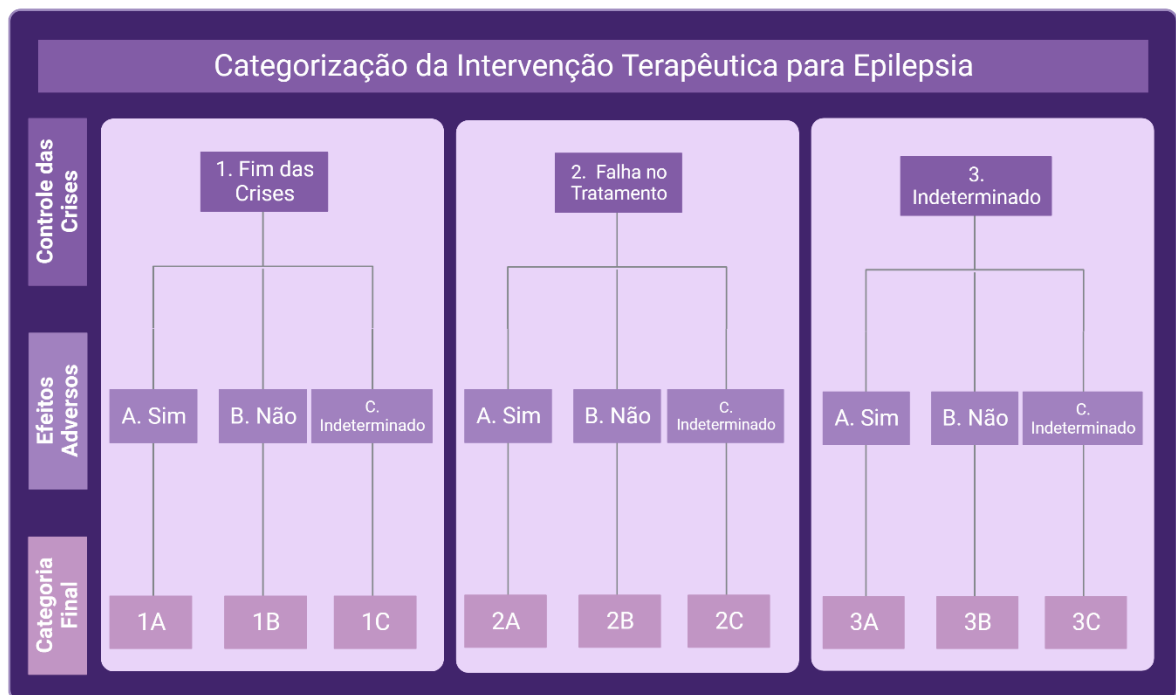
A epilepsia não é uma doença única, mas sim um conjunto de condições que apresentam patologias e etiologias diversas. Sua principal característica é a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal, excessiva ou síncrona do cérebro (Fisher et al., 2005). Estas crises epiléticas são, em grande parte, provocadas em pelo desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória, mediadas pelos neurotransmissores Glutamato e ácido gama-aminoburílico (GABA), respectivamente (Kwan and Sander, 2004). Este desbalanço químico culmina em um comprometimento da atividade cerebral, ocorrendo então as crises epiléticas.

No que diz respeito à sintomatologia da doença e aos padrões observados na eletroencefalografia (EEG), as crises podem ser categorizadas como focais (quando apenas um hemisfério cerebral é afetado), generalizadas (quando ambos os hemisférios são afetados) ou, ainda, de origem desconhecida (quando não é possível identificar um ponto focal ou generalizado (Scheffer et al., 2017). Ademais, baseando-se em dados de semiologia, EEG, histórico familiar e resposta aos tratamentos, a epilepsia também pode ser classificada em três grupos principais: epilepsias genéticas generalizadas (na qual sua origem se dá devido à fatores genéticos), sintomática (de origem infecciosa, metabólica ou imune conhecidas) ou criptogênica (presumivelmente sintomática, mas com uma anormalidade subjacente não identificada) (Scheffer et al., 2017).

Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), o diagnóstico de epilepsia acontece quando: há ocorrência de pelo menos duas crises não provocadas em um intervalo superior a 24 horas; há ocorrência de uma crise não provocada com uma probabilidade maior que 60% de apresentar novas crises nos próximos 10 anos devido a fatores de risco (como trauma, infecção, lesões estruturais, acidente vascular cerebral, entre outros); e/ou diagnóstico de síndrome epilética (Fisher et al., 2014a). Após o diagnóstico clínico, a maioria dos pacientes é encaminhada para o tratamento com fármacos antiepiléticos (FAEs), no entanto, mesmo com a terapia farmacológica, cerca de um terço dos pacientes seguem apresentando crises epiléticas não controladas (Kwan and Brodie, 2010, 2006). A esses pacientes, dispõe-se o diagnóstico de Epilepsia Refratária (ER) (ou resistente a medicamentos) (Faught et al., 2008). Ainda, os critérios para o diagnóstico de refratariedade levam em consideração: o número de FAEs previamente utilizados, a frequência mínima de convulsões ou o período mínimo de remissão,

e a duração dos ataques (podendo variar de um ano a uma década de crises epilépticas não controladas) (Beleza, 2009).

Tendo em vista a dificuldade no diagnóstico e identificação de perfil refratário nos pacientes, a ILAE estabeleceu uma estrutura geral para auxílio no diagnóstico clínico, compreendendo uma tabela com dois níveis hierárquicos (Figura 1). O nível 1 classifica o resultado de cada intervenção terapêutica (farmacológica ou não) como "ausência de crises" ou "falha no tratamento" (Kwan et al., 2010). Há também a classificação "não informativa", que abrange o tratamento inadequado com FAEs devido à baixa tolerabilidade do paciente ou a ocorrência de efeitos adversos intoleráveis (Kwan et al., 2010). O Nível 2 define a ER como uma falha no controle das crises epilépticas após a tentativa de uso de pelo menos dois FAEs escolhido em conformidade com o perfil das crises e utilizado em doses adequadas (seja como monoterapias ou em combinação) (Figura 1) (Beleza, 2009; Kwan et al., 2010; Kwan and Brodie, 2010).



**Figura 1.** Categorização da Intervenção Terapêutica para Epilepsia. Fim das Crises (1) é definida como ausência de crises por um período mínimo de três vezes o intervalo entre crises, pré-intervenção, mais longo ou 12 meses, o que for mais longo; Falha no Tratamento (2) é definida como recorrência da crise(s) após a aplicação adequada da intervenção; e indeterminado (3) é definido quando o tratamento não foi aplicado de forma adequada ou quando faltam informações para realizar a avaliação. Adaptado de Kwan et al. (2010).



Nesse contexto, essa definição busca servir como um guia no diagnóstico clínico e direcionamento da terapia mais adequada ao paciente, tendo em vista os impactos devastadores que a ER tem sobre aqueles acometidos com a doença. Dentre os principais impactos associados com a ER, destacam-se: os danos corporais, hospitalizações frequentes e expectativa de vida reduzida como resultado dos riscos associados a crises não controladas (French, 2007). Ademais, pacientes afetados pela ER podem apresentar comprometimentos neuropsicológicos, psiquiátricos e sociais relacionados não apenas à doença, mas também aos pronunciados efeitos adversos que acompanham a terapia com FAEs, prejudicando consideravelmente sua qualidade de vida (Gao et al., 2015; Laxer et al., 2014).

### **1.3. Mecanismos de Refratariedade**

Bem como ocorre na fisiopatologia da epilepsia, os mecanismos pelos quais a fármaco-resistência se estabelece são diversos e podem se manifestar clinicamente de diferentes formas. Os meios mais comuns pelos quais a refratariedade se apresenta incluem a (1) refratariedade de novo (na qual o paciente não entra em remissão); (2) refratariedade progressiva (na qual o paciente fica livre de crises epiléticas inicialmente, mas as crises retornam e se tornam recorrentes e incontroláveis ao longo do tempo); (3) refratariedade de aumento e diminuição (na qual a epilepsia alterna entre controlável e não-controlável) e (4) quando a epilepsia é inicialmente resistente a medicamentos, mas começa a responder ao tratamento com FAEs ao longo do tempo (Schmidt and Löscher, 2005). No entanto, os mecanismos biológicos pelos quais ocorre a fármaco-resistência ainda não são totalmente compreendidos, apesar de se saber que são multifatoriais. Portanto, algumas hipóteses foram formuladas a fim de responder tais questões, sendo as duas hipóteses mais estudadas: a hipótese do alvo (farmacodinâmica) e a hipótese do transportador (farmacocinética) (Kwan and Brodie, 2006).

Segundo a hipótese do alvo, a redução da sensibilidade - e conseqüente eficácia do tratamento - se dá em decorrência de alterações nos alvos farmacológicos de ligação dos FAEs (Kwan and Brodie, 2006). Remy e colaboradores demonstraram que pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) resistente a carbamazepina haviam perdido o bloqueio dos canais para sódio voltagem-dependentes (realizado pela carbamazepina) nas células granulares denteadas em comparação com pacientes responsivos a este mesmo fármaco (Remy et al., 2003). Ademais, em pacientes com TLE resistente, também foram observadas alterações na expressão dos receptores GABA<sub>A</sub> (Loup et al., 2000), embora não esteja estabelecido se a redução na expressão está relacionada à redução na sensibilidade dos FAEs que atuam nesse alvo (Kwan

and Brodie, 2006). Nesse contexto, a falta de elucidação a respeito do mecanismo de ação da maioria dos FAEs é a principal lacuna relacionada a hipótese farmacodinâmica. Além disso, o fato de a ER ser resistente a múltiplos FAEs - com mecanismos de ação distintos - sugere a existência de um possível mecanismo biológico intrínseco responsável pela fármaco-resistência (Kwan and Brodie, 2006).

De acordo com a hipótese do transportador (farmacocinética), há uma expressão exacerbada de transportadores de efluxo no endotélio capilar encefálico que constitui a barreira hematoencefálica (BHE) (especialmente de glicoproteína P) (Schinkel, 1997). Estes transportadores são responsáveis pela saída de diferentes compostos e moléculas pela BHE, culminando assim na diminuição da biodisponibilidade dos FAEs administrados e, portanto, reduzindo sua eficácia (Kwan and Brodie, 2005; Löscher and Potschka, 2002). Descobertas anteriores endossam esta hipótese. Foi observado, em tecidos cerebrais obtidos de pacientes com epilepsia fármaco-resistente, que há de fato um aumento na regulação da expressão desses transportadores. Ademais, estudos anteriores realizados em modelos animais, sugerem que os FAEs mais comumente usados são transportados por essas mesmas proteínas (Kwan and Brodie, 2005).

Além da hipótese do alvo e da hipótese do transportador, há também uma hipótese alternativa que busca explicar a refratariedade. Esta hipótese, proposta por Rogawski e Johnson (2008), refere-se à gravidade intrínseca da doença e propõe que existem diferentes fatores neurobiológicos associados à gravidade da epilepsia (Picot et al., 2008). Tais fatores refletiriam na frequência de crises desde o início do desenvolvimento da doença e poderiam levar à fármaco-resistência ao longo do tempo (Wong et al., 2005). Além disso, para uma melhor compreensão da epilepsia refratária e dos mecanismos responsáveis pela fármaco-resistência, bem como um tratamento mais orientado, esta hipótese aponta para a necessidade de se identificar biomarcadores que determinem as formas mais graves da doença. Por fim, a hipótese se endossa na falta de evidências que sugerem que os mecanismos de refratariedade estariam dissociados do desenvolvimento da própria condição epiléptica (Beleza, 2009; Wong et al., 2005).

Dentre os vários tipos de epilepsia refratária, alguns se destacam, como a ELT – sendo essa o tipo de epilepsia focal mais comum entre adultos – (van Vliet et al., 2014), a Síndrome de West, a Síndrome de Lennox-Gastaut (SLG) e a Síndrome de Dravet (SD), um tipo raro e grave de epilepsia, causada por uma variante patogênica (em mais de 80% dos pacientes) no gene

SCN1A (Cardenal-Muñoz et al., 2022). Portanto, é necessário que haja mais estudos para elucidação dos mecanismos de refratariedade nestas condições, bem como esforços para o desenvolvimento de tratamentos eficazes.

#### **1.4. Tratamentos da Epilepsia Refratária**

As terapias clássicas para a ER têm como principal objetivo o controle das crises epiléticas, que é alcançado em poucos casos devido à complexidade dos fatores envolvidos no tratamento (Kwan, 2000). O tratamento da ER pode ser dividido quatro categorias: farmacoterapia, tratamentos alternativos (dietas), neuroestimulação e neurocirurgia (Asadi-Pooya and Rostami, 2017).

Em alguns casos, a cirurgia é considerada a melhor opção de tratamento. A cirurgia em pacientes com ER tem como objetivo a remoção de zonas epileptogênicas focais, sem promover disfunção neurológica grave e irreversível (Rosenow and Lüders, 2001). Técnicas de imagem como ressonância magnética são empregadas para reconhecimento das regiões lesadas e das zonas epileptogênicas, tornando o procedimento cirúrgico possível quando focos epiléticos delimitados são bem identificados (Simasathien et al., 2013).

Os pacientes que se enquadram no procedimento cirúrgico podem alcançar cerca de 60-80% de supressão das crises quando encaminhados rapidamente para cirurgia ao invés de prosseguir com tratamento com FAEs (Fattorusso et al., 2021). Ainda, o tratamento cirúrgico pode ser mais econômico (aproximadamente US\$ 100.000) para pacientes com ELT, sendo mais eficaz do que intervenções com FAEs (Sheikh et al., 2020).

Alguns pacientes não se encaixam no perfil para se beneficiar do tratamento cirúrgico, em especial quando o foco das lesões não pode ser identificado. Outros não podem ter essas áreas removidas devido à importância funcional do local em questão (Fattorusso et al., 2021). Nesses casos, outra alternativa de tratamento é implementada, como FAEs ou neuroestimulação (Fattorusso et al., 2021).

A neuroestimulação pode ser categorizada em dois grupos principais: (1) Métodos invasivos, que requerem um procedimento de implantação cirúrgica para instalar o dispositivo de estimulação, como estimulação do nervo vago (ENV), estimulação profunda do cérebro (DPC) e neuroestimulação responsiva (RNS); (2) Métodos não invasivos, nos quais não é necessário realizar cirurgia para implantar os dispositivos, como estimulação magnética

transcraniana (EMT), estimulação do nervo trigêmeo (ENT) e a estimulação do nervo vago transcutânea (tVNS) (Boon et al., 2018; Dalkilic, 2017). Além disso, dois sistemas diferentes podem ser usados nos dispositivos de estimulação: "loop aberto" com estimulação contínua ou "loop fechado", quando o dispositivo detecta atividade epileptiforme e fornece estímulo na mesma área (Fattorusso et al., 2021; Kwan, 2000).

Dentre as terapias para ER, o tratamento com FAEs é o mais utilizado. O mecanismo de ação dos FAEs visa a atenuação da neurotransmissão excitatória por meio do bloqueio canais para sódio ou para cálcio voltagem-dependentes, e de vias glutamatérgicas; ou, ainda, o aumento da inibição por meio da modulação da ação GABAérgica. Embora os FAEs atuais sejam capazes de prolongar o intervalo entre as crises, diminuindo sua frequência diária, ou mesmo estendendo-o durante anos, o tratamento farmacológico continua sendo insuficiente no controle das crises em uma grande parcela de pacientes (Dalic and Cook, 2016; Hu et al., 2018; Simonato et al., 2012).

Apesar da disponibilidade e desenvolvimento contínuo de novos FAEs, estas terapias fornecem apenas alívio sintomático, não sendo capazes de impedir a progressão da doença, ou de promover neuro-regeneração ao dano causado pelas crises. Além disso, o tratamento com FAEs está comumente associado a efeitos adversos variados, muitas vezes severos e recorrentes, impactando negativamente na qualidade de vida dos pacientes (Hauser et al., 2018; Macleod and Appleton, 2007).

Nesse cenário, é de suma importância que novas possibilidades terapêuticas sejam exploradas. Atualmente, três abordagens distintas são adotadas no desenvolvimento FAEs: (1) ajustes químicos ou estruturais em fármacos já existentes, com o objetivo de ampliar sua eficácia ou minimizar seus efeitos adversos; (2) identificação de novas substâncias com potencial antiepiléptico por meio de testes experimentais *in vivo* e *in vitro*; (3) utilização de compostos que atuam em processos subjacentes às crises epiléticas, exercendo efeitos seletivos na inibição da excitação ou no aumento da transmissão inibitória (Łuszczki, 2009).

Os FAEs são temporalmente divididos em três gerações. A primeira geração surgiu após o brometo de potássio, sendo o próximo fármaco, fenobarbital, disponibilizado em 1912. Este FAE, anteriormente utilizado como sedativo, se mostrou menos tóxico que o brometo de potássio no tratamento de epilepsia, contudo, o composto apresenta vários efeitos adversos, como: depressão, hiperatividade e complicações respiratórias. O fenobarbital atua aumentando

a inibição sináptica mediada pelo GABA por meio da ligação em receptores do tipo GABA-A, prolongando assim seu tempo de abertura. Ainda hoje, este composto segue sendo um dos FAEs mais prescritos, tendo em vista o seu baixo custo (LaPenna and Tormoehlen, 2017).

A primeira geração de FAEs abrange também outros medicamentos que foram desenvolvidos até a década de 1970, como a primidona, fenitoína, etosuximida (ESM) e ácido valproico (VPA), os quais atuam por meio de mecanismos diversos, incluindo: a inibição de canais para sódio voltagem-dependente, o antagonismo de receptores para Glutamato do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) e o reforço da transmissão mediada por GABA (LaPenna and Tormoehlen, 2017).

A segunda geração de FAEs abrange os benzodiazepínicos, a carbamazepina (CBZ), felbamato, gabapentina, entre outros. Apesar de mais novos em comparação com a primeira geração, estes FAEs continuam associados à uma ampla gama de efeitos adversos, como comprometimento motor. A terceira geração dos FAEs teve início em 2008 com a aprovação da lacosamida. Dentre seus representantes, estão: vigabatrina (VBG), clobazam, rufinamida, acetato de eslicarbazepina, brivaracetam (Abou-Khalil, 2016; LaPenna and Tormoehlen, 2017). Vale ressaltar que, embora se mostrem mais toleráveis do que as gerações anteriores, as novas gerações de FAEs não estão isentas de apresentarem efeitos adversos (French and Gazzola, 2011).

**Tabela 1** - Relação dos principais fármacos antiepilépticos utilizados no tratamento da Epilepsia, mecanismos de ação e efeitos adversos mais comuns.

<b>Geração</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Efeitos Adversos Comuns</b>
<b>1<sup>a</sup></b>	Fenobarbital	Potencialização da neurotransmissão GABAérgica.	Sedação, depressão, hiperatividade e complicações respiratórias.
	Primidona	Desconhecido, sabe-se que diminui a excitabilidade neuronal.	Ataxia, vertigem, anorexia, sonolência, excitação, náuseas ou vômitos, fadiga, impotência, tonturas, alterações do humor, diplopia, nistagmo e erupções cutâneas.

	Fenitoína	Aumento do período refratário de canais para $\text{Na}^+$ voltagem-dependentes.	Nistagmo, vertigem, prurido, parestesia, cefaleia, sonolência e ataxia
	Etossuximida	Inibição de influxo de $\text{Ca}^{2+}$	Anorexia, ataxia, tontura, sonolência, cefaleia, soluço e distúrbios gastrointestinais (dor abdominal, diarreia, dor epigástrica, hipertrofia gengival, náusea, vômitos, perda de peso)
	Ácido Valpróico	Aumento da neurotransmissão GABAérgica pela ativação da enzima glutâmica descarboxilase, inibição de enzimas que degradam GABA, modulação de canais de $\text{Ca}^{2+}$ .	Sonolência, tontura, dor de cabeça, queda de cabelo, ganho de peso, náuseas e alterações das enzimas hepáticas
2 <sup>a</sup>	Carbamazepina	Estabilização da membrana, inibição da descarga neuronal repetitiva e redução da propagação sináptica de impulsos excitatórios, bloqueio de canais de $\text{Na}^+$ .	Edema, retenção de líquido, aumento de peso, hiponatremia e redução de osmolaridade do sangue
	Felbamato	Bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA	Anemia aplástica, insuficiência hepática, anorexia, náuseas e vômitos, sonolência, cefaléias e irritabilidade
	Gabapentina	Bloqueio de Canais para $\text{Ca}^{2+}$ voltagem-dependente	Sonolência, tonturas, ataxia, edema, angiodema, anafilaxia e infecção
3 <sup>a</sup>	Lacosamida	Aumento da inativação lenta de canais para $\text{Na}^+$ voltagem-dependentes	Tontura, dor de cabeça, diplopia, náusea e vômitos
	Rufinamida	Prolongamento da inativação de canais para $\text{Na}^+$ voltagem-dependentes	Sonolência, tontura, fadiga, dor de cabeça, vômitos, náusea, tremores, diminuição do apetite, constipação

Estiripentol	Modulação de receptores GABA-A	Sonolência, lentidão da função mental, ataxia, diplopia, perda de apetite, náuseas e dores abdominais
Vigabatrina	Potencialização da neurotransmissão GABAérgica.	Sonolência, fadiga, tontura, depressão, psicoses, hepatite, comprometimento respiratório, vertigem
Clobazam	Potencialização da neurotransmissão GABAérgica.	Sonolência, alterações comportamentais e de humor, hiperexcitabilidade psicomotora, ataxia e infecção do trato respiratório
Retigabina	Abertura de canais para K <sup>+</sup> voltagem-dependentes	Sonolência, tontura, ataxia, parestesia, amnésia, visão turva, náuseas, infecção do trato urinário, alucinações, ansiedade
Parampanel	Antagonista glutamatérgico (receptores tipo AMPA)	Sonolência, tontura, dor de cabeça, fadiga, irritabilidade, ideação suicida
Acetato de Eslicarbazepina	Bloqueio de canais de para Na <sup>+</sup> voltagem-dependentes	Tontura, visão turva, náuseas e vômitos, ataxia, dor de cabeça, sonolência e fadiga, problemas hepáticos
Brivaracetam	Inibição da liberação pré-sináptica de neurotransmissores excitatórios	Sonolência, dor de cabeça, tontura e fadiga

Fonte: LaPenna & Tormoehlen, 2017; Abou-Khalil, 2016;

<https://www.lecturio.com/pt/concepts/farmacos-anticonvulsionantes-de-segunda-geracao/>

Quando um paciente é diagnosticado com epilepsia, a intervenção é normalmente realizada com monoterapia de longo prazo com FAEs clássicos, como carbamazepina, etossuximida, fenobarbital, fenitoína e ácido valproico (Golyala and Kwan, 2017). No entanto, a partir do momento em que a fármaco-resistência é identificada, uma politerapia personalizada é introduzida. A politerapia combina medicamentos de acordo com o perfil individual do paciente, levando-se em consideração sua idade, gênero, hábitos, características das crises e

perfil do medicamento (Kwan, 2000). Entretanto, dados clínicos que comprovem a eficácia da politerapia com FAEs para a ER são escassos, tendo em vista a grande possibilidade de combinações de FAEs disponíveis, bem como de doses de tratamento (Patrick Kwan, M.D., Ph.D., Steven C. Schachter, M.D., and Martin J. Brodie, 2011). Ademais, ainda que haja estudos e dados acessíveis, a reprodutibilidade de tais circunstâncias é extremamente difícil, uma vez que a terapia ideal varia de acordo com o perfil diversificado de cada paciente.

A politerapia têm ganhado destaque devido ao aumento na aprovação de novos FAEs mais modernos com novos mecanismos de ação e toxicidades mais baixas (Kwan, 2000). Desde os anos 2000, entre as combinações mais comuns que resultam em efeito sinérgico benéfico para o tratamento da ER estão o ácido valpróico, a etossuximida, a lamotrigina, a vigabatrina e o topiramato. Ainda, estudos sugerem que a combinação mais eficiente e sinérgica seja de VPA e lamotrigina (LTG), apesar desta combinação estar comumente associada à alta toxicidade (Cuadrado et al., 2002; Poolos et al., 2017, 2012). Isso porque o VPA atua como um inibidor do metabolismo da de LTG, inibindo sua glucuronidação e aumentando sua concentração sérica (Koristkova et al., 2019; Pisani et al., 1999). Além disso, a associação entre diferentes mecanismos de ação é uma estratégia poderosa comumente utilizada no tratamento de ER. O LTG atua inibindo a liberação de glutamato por meio do bloqueio dos canais para sódio, enquanto o VPA, além de bloquear canais para sódio, modula a disponibilidade de GABA, aumentando os níveis pré-sinápticos deste neurotransmissor e, desta forma, a ativação pós-sináptica de seus receptores (Deckers et al., 2000; Pisani et al., 1999).

É válido mencionar que a combinação entre dois fármacos que possuem o mesmo mecanismo de ação, como CBZ e LTG, em que ambos são bloqueadores de canal para sódio, possui o efeito contrário ao uso de dois fármacos com mecanismos diferentes e sinérgicos. Isto porque há um aumento na incidência de efeitos adversos neurotóxicos e competição pelo mesmo alvo farmacológico, não induzindo sinergia dos compostos no tratamento da ER, culminando assim em uma menor eficácia e maior toxicidade (Koristkova et al., 2019; Perucca, 2002).

Por fim, a epilepsia é considerada resolvida apenas em dois casos: em pacientes com síndromes epilépticas idade-dependentes que já ultrapassaram a faixa etária em questão, ou em pacientes que estão livres de crises há mais de uma década e não fazem uso de FAEs há mais de cinco anos (Fisher et al., 2014b).



### 1.5. Dificuldades no Tratamento da ER

Apesar dos inúmeros FAEs atualmente disponíveis e dos esforços no desenvolvimento de novas terapias farmacológicas, um terço dos pacientes com epilepsia permanecem resistentes ao tratamento. Além disso, a quantidade substancial de efeitos adversos associados a essas terapias muitas vezes impossibilita sua aplicação clínica (Löscher et al., 2013).

Os efeitos adversos são pronunciados e se manifestam de diferentes maneiras. Na maioria das vezes, esta toxicidade está relacionada à (1) dose (recorrentes em FAEs como topiramato e levetiracetam); (2) reações de hipersensibilidade (geralmente ocorrendo no início do tratamento); (3) efeitos adversos de longo prazo; (4) interações medicamentosas adversas (mais comuns entre os FAEs de primeira geração); (5) efeitos adversos metabólicos e hormonais (Brodie et al., 2013); e (6) teratogenicidade (associada ao uso de VPA, fenitoína, carbamazepina, dentre outros) (Laxer et al., 2014). Dentre os efeitos adversos mais prevalentes, destacam-se: letargia, tontura, comprometimento comportamental e cognitivo, confusão mental, alergias, hipersensibilidade, atrofia cerebelar, disfunção retiniana, anemia aplástica, linfoma, efeitos cardiovasculares, acentuação da osteoporose e aceleração de doenças vasculares (Brodie et al., 2013; Laxer et al., 2014). Alguns desses efeitos podem se manifestar logo no início do tratamento, enquanto outros surgem ao longo do tempo. Além disso, o aparecimento de alguns desses efeitos adversos está associado ao uso de um FAE específico, embora todos os FAEs possam potencialmente apresentar efeitos adversos, sejam eles sutis ou graves.

Esses efeitos têm um impacto significativo na vida dos pacientes (Löscher et al., 2013), principalmente no que se refere à redução das capacidades cognitivas (Fonseca et al., 2018; Vajda and Eadie, 2014), danos ao sistema neural (Fonseca et al., 2018; Sutula, 2004; Vajda and Eadie, 2014) e alta mortalidade. De fato, indivíduos com epilepsia fármaco-resistente apresentam uma probabilidade maior de morte quando comparados com a população em geral (cerca de 2 a 10 vezes maior) (Chapell et al., 2003). Não obstante, a "morte súbita e inesperada na epilepsia" (*sudden unexpected death - SUDEP*) é a principal causa de morte em pacientes com ER (Laxer et al., 2014).

Portanto, levando-se em consideração todas as limitações impostas pelos FAEs atualmente disponíveis no mercado e o grande impacto na qualidade de vida dos pacientes com ER, o

desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, com efeitos adversos menos pronunciados e uma margem de segurança maior é essencial.

### **1.6. Peptídeos neuroativos identificados na peçonha de animais**

As peçonhas de animais têm ganhado destaque no desenvolvimento de novos fármacos para doenças neurodegenerativas, dentre elas a Epilepsia. Particularmente, a peçonha de artrópodes é bastante estudada por conter moléculas neuroativas com grandes potenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos que busca a restauração das funções normais do sistema nervoso (Silva et al., 2015).

Dentre as moléculas presentes na composição de peçonhas de animais, os peptídeos se sobressaem, compreendendo cerca de 70% do conteúdo total (Dohtsu et al., 1993). Ainda, esses peptídeos são comumente classificados de acordo com suas funções biológicas, podendo ser: antimicrobianos, quimiotáticos, inflamatórios e neuroativos.

Uma das toxinas mais estudadas é a conotoxina, isolada da peçonha do *Conus geographus*. Ela atua como antagonista glutamatérgico, inibindo receptores do tipo NMDA e modulando correntes pós-sinápticas excitatórias no córtex cerebral e no hipocampo (Gao et al., 2017), e é amplamente estudada no desenvolvimento de novos peptídeos sintéticos com atividade antiepiléptica (Beraud and Chandy, 2011).

O CII9, um peptídeo isolado da peçonha do escorpião *Centruroides limpidus limpidus*, foi capaz de suprimir crises convulsivas quando injetado diretamente no cérebro de ratos (Corona et al., 2003). Outros peptídeos isolados de escorpiões também já demonstraram ações antiepilépticas, sendo o BmK AEP, isolado do escorpião *Buthus martensii* Karsch, o primeiro peptídeo de escorpião a apresentar efeito contra crises epilépticas (Zhang et al., 2019). Ainda, peptídeos extraídos das peçonhas de aranhas, incluindo aquelas provenientes das espécies do gênero *Agelenopsis* e da aranha *Phoneutria nigriventer*, também foram capazes de demonstrar propriedades antiepilépticas (Jackson and Scheideler, 1996; Pinheiro et al., 2006).

Peçonhas de vespas também têm sido estudadas por seu potencial antiepiléptico. A peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis* foi capaz de proteger os animais contra crises induzidas pelos epilépticos padrões bicuculina, picrotoxina e ácido caínico (Siqueira Cunha et al., 2005). O peptídeo neuropolybina, isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista*, foi anteriormente testado em ratos e camundongos, em PADU de crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

(Do Couto et al., 2012; Silva et al., 2015), e em PADR de ELT induzido por pilocarpina (Gomes, 2016), também apresentando efeito neuroprotetor.

Em 2005, Mortari e colaboradores isolaram a peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*, e identificaram o peptídeo Occidentalina-1202 (Occ-1202). A neurovespina, um peptídeo sintético bioinspirado da Occ-1202, foi avaliada em PADU de crise epiléptica e apresentou potente atividade antiepiléptica dose-dependente quando administrada via i.c.v. e via intraperitoneal (i.p.) em crises epiléticas induzidas por ácido caínico. Ademais, o tratamento com neurovespina foi capaz de diminuir a expressão hipocampal da proteína c-Fos, associada a excitabilidade mediada por glutamato, indicando um possível efeito neuroprotetor do tratamento (Dos Anjos, 2013). A neurovespina também foi avaliada em PADR de ELT induzido por pilocarpina, no qual foi observado um efeito neuroprotetor do tratamento diário do peptídeo tanto na fase latente do modelo, quanto na fase crônica. Ainda, o tratamento em dose única do peptídeo não causou citotoxicidade, genotoxicidade ou hemotoxicidade em camundongos (dos Anjos, 2017).

Em vista do exposto, é possível compreender o potencial nítido do uso de peptídeos como ferramenta de estudo de doenças neurodegenerativas e no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, especialmente para Epilepsia Refratária. Por fim, a busca por novos antiepilépticos deve ser acompanhada de amplas investigações e levar em consideração os efeitos de toxicidade, visando à segurança farmacológica do composto.

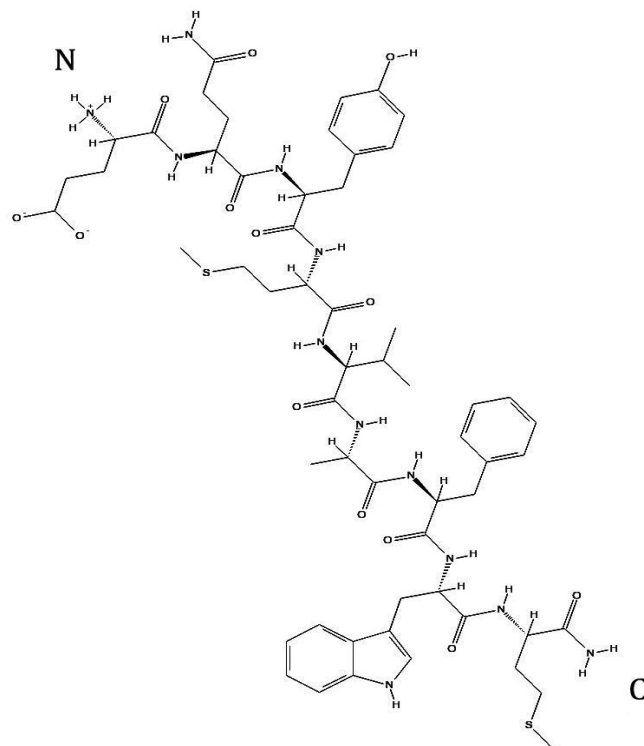
### **1.7. A Occidentalina-1202 como potencial tratamento para a Epilepsia Refratária**

Em 2005, Mortari e colaboradores isolaram os componentes da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Figura 2). Após testes de indução aguda de crises pelos epiléticos químicos padrões: bicuculina, picrotoxina, ácido caínico e pentilenotetrazol (PTZ), e subsequente tratamento em ratos via intracerebroventricular (i.c.v.), foi possível observar proteção significativa contra as crises máximas induzidas. Esta proteção se deu principalmente em crises induzidas por ácido caínico, seguido de bicuculina, picrotoxina e PTZ. É válido notar que, mesmo não havendo proteção significativa contra crises induzidas pelo PTZ, houve aumento significativo, dose-dependente, nas latências para o início das crises induzidas por esse agente (Mortari et al., 2023).



**Figura 2.** Exemplar da vespa social *Polybia occidentalis*. Disponível em: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metals/view/30677>.

A partir destes dados, foram feitos o isolamento e a caracterização estrutural de um novo peptídeo antiepiléptico, sendo denominado Occidentalina-1202 (Occ-1202), sendo formado por nove resíduos de aminoácidos (Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH<sub>2</sub>) (Mortari et al., 2023) (Figura 3).



**Figura 3.** Representação da fórmula estrutural da Occidentalina-1202.

Quando avaliada em modelos de crises epiléticas, a Occidentalina-1202 foi capaz de promover um potente efeito antiepilético no teste de indução aguda de crise contra ácido caínico e PTZ. Além disso, a latência para início das crises foi significativamente maior nas doses menores onde os animais apresentavam crises (Mortari et al., 2023).

Considerando-se o potencial das toxinas de artrópodes e os efeitos neuroprotetores observados em pesquisas anteriores, torna-se evidente a necessidade de novas pesquisas que explorem o potencial dessas substâncias naturais no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a ER.

Desta forma, o peptídeo Occidentalina-1202 surge como uma destas substâncias, sendo altamente eficaz e não exibindo efeitos tóxicos tanto em modelos agudos quanto em modelos crônicos de administração por via parental. No entanto, a segurança farmacológica e o mecanismo de ação do peptídeo permanecem desconhecidos. Assim, tendo em vista o potencial da Occ-1202 como ferramenta de estudos e tratamento da ER, a investigação de sua segurança farmacológica, toxicidade e elucidação de seus possíveis alvos farmacológicos torna-se essencial.

## **2.Objetivos**

### **2.1. Objetivos Gerais:**

Este trabalho tem como objetivo a avaliação da segurança e toxicidade aguda e crônica do peptídeo Occidentalina-1202 quando administrado por via intraperitoneal em camundongos, e a investigação do mecanismo de ação do peptídeo por meio da realização de ensaios de ligação competitiva com radioligantes.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Avaliar a segurança e a toxicidade do peptídeo Occidentalina-1202 quando administrado via intraperitoneal, em modelos agudo e crônico;
- Elucidar os possíveis efeitos adversos do peptídeo Occidentalina-1202;

- Avaliar a toxicidade bioquímica e hematológica do peptídeo Occidentalina-1202;
- Avaliar a atividade da Occidentalina-1202 na neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica por meio de ensaios de ligação e captação competitiva com radioligantes.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Peptídeo

O peptídeo Occidentalina-1202 (sequência Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH<sub>2</sub>) foi sintetizado pela empresa Biointech Soluções em Biotecnologia LTDA. A confirmação do grau de pureza, a inspeção da massa monoisotópica e a confirmação da sequência do peptídeo foram realizadas pela empresa responsável pela síntese antes do início dos experimentos e após a entrega do peptídeo por espectrometria de massas (MALDI/TOF) (massa molecular de 1203,43). Para a utilização nos ensaios experimentais, o peptídeo foi solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 20% de dimetilsufóxido (DMSO – Dinâmica®).

#### 3.2. Sujeitos Experimentais

Para avaliar a segurança e a toxicidade do peptídeo Occidentalina-1202, bem como conduzir ensaios de ligação e captação a fim de investigar seu mecanismo de ação, foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (*Mus musculus*). A manipulação dos sujeitos experimentais foi realizada de acordo com as normas estipuladas nos Princípios Éticos na Experimentação Animal, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008), que regulamenta o uso de animais no âmbito de pesquisa. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/IB) da Universidade de Brasília – UnB e deferido, protocolo nº 23106.125197/2021-49 (Anexo 1).

Os camundongos, com idade entre 21 e 30 dias (pesando entre 18-30g), foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, acondicionados em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm – comprimento x largura x altura), mantidos em estufas com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (22°C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período de experimento foram oferecidas água e ração específica para camundongos *ad libitum*.

### 3.3. Ensaios de Segurança e Toxicidade

Os ensaios de segurança e toxicidade foram realizados de acordo com o GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Versão 2 (Agência de Vigilância Sanitária, 2013).

Para a avaliação da segurança e toxicidade do peptídeo Occidentalina-1202, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo veículo (controle negativo, n=8): animais que receberam administração de solução fisiológica 0,9% adicionada de 20% de DMSO (300 µL; i.p.) (n=8).
- Grupo Diazepam (DZP) (controle positivo, n=8): animais que receberam administração de Diazepam (Compaz®) 4mg/kg (300 µL; i.p.), solubilizado em solução fisiológica 0,9%.
- Grupo Occ-1202 4 mg/kg (n=8): animais que receberam animais que receberam 4 mg/kg do peptídeo Occidentalina-1202 (300 µL; i.p.), solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 20% DMSO.
- Grupo Occ-1202 20 mg/kg (n=8): animais que receberam animais que receberam 20 mg/kg do peptídeo Occidentalina-1202 (300 µL; i.p.) (300 µL; i.p.), solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 20% DMSO.
- Grupo Occ-1202 40 mg/kg (n=8): animais que receberam 40 mg/kg do peptídeo Occidentalina-1202 (300 µL; i.p.), solubilizado em solução fisiológica 0,9% com adição de 20% DMSO.

Ainda, os animais foram avaliados em dois modelos distintos: no protocolo de administração de dose única (PADU) e no protocolo de administração de doses repetidas (PADR).

#### 3.3.1. Protocolo de Administração de Dose Única

No PADU a administração dos tratamentos se deu apenas uma vez, no primeiro dia de experimento, acompanhada da avaliação comportamental por meio do ensaio de Campo Aberto

(*Open Field*) e da observação dos animais durante 14 dias consecutivos, a fim de se monitorar a massa corporal dos sujeitos experimentais, bem como o surgimento de possíveis mudanças fisiológicas aparentes (como surgimento de tumores, piloereção, cianose e dificuldades para respirar e se locomover.).

### **3.3.2. Protocolo de Administração de Doses Repetidas**

No PADR, a administração dos tratamentos se deu diariamente ao longo de 28 dias consecutivos (podendo se estender até 30), uma vez ao dia, acompanhada pela avaliação comportamental por meio do ensaio de Campo Aberto no 1º, 14º e 28º dias. Os animais foram observados durante 28 dias (podendo se estender até o 30º dia), nos quais foram monitorados a massa corporal dos animais e possíveis alterações fisiológicas.

### **3.4. Avaliação comportamental em ensaio de Campo Aberto (*Open Field*)**

Para realização do teste de Campo Aberto foi utilizada uma arena circular preta de madeira com 60 centímetros de diâmetro, dividida em três zonas distintas. Os animais foram deixados na mesma sala em que a arena estava localizada durante 20 minutos antes de se iniciar o teste para habituação com o ambiente.

Para o teste, foi administrado o tratamento aos animais (veículo, Diazepam ou peptídeo) e, em seguida, os animais foram posicionados no centro da arena, onde permaneceram por vinte minutos sendo filmado por uma câmera digital (Intelbras). Os cinco primeiros minutos de permanência dentro da arena foram descontados durante a posterior avaliação das filmagens, levando-se em consideração apenas os 15 minutos finais de duração.

Foram selecionados para avaliação de comportamentos gerais espontâneos dos animais os seguintes parâmetros:

- Deslocamento total: locomoção na arena;
- Autolimpeza: limpar o focinho, as garras, as patas anteriores e posteriores, as genitais, a cauda, a cabeça, o dorso e o ventre;
- Exploração: cheirar, caminhar, esquadrinhar, tentar escalar a parede do aparato;
- Elevação, ficar sobre as patas traseiras, sem estar apoiado nas paredes da arena;
- Imobilidade: parado.



Ao final do teste os animais foram devolvidos às suas respectivas caixas e retornados ao biotério. A análise de todos os vídeos foi realizada no software Anymaze (Stoelting Co., USA) e Boris (Behavioral Observation Research Interactive Software – Universidade de Torino).

### **3.5. Análises Bioquímicas e Hematológicas**

Os animais tiveram amostras de sangue coletadas no dia da eutanásia para avaliação de possível hematotoxicidade. A coleta de sangue dos animais que tiveram seus corações removidos para outros testes não descritos neste trabalho foi feita removendo-se a cabeça do animal com auxílio de uma tesoura, rotacionando o corpo em posição vertical e coletando o sangue com auxílio de um funil para ser acondicionado em tubo próprio para coleta de sangue de 0,5mL contendo EDTA (FirstLab). Este método foi utilizado tendo em vista que não era possível realizar punção no coração sem comprometer os testes posteriores (não descritos neste estudo) neste órgão. Ainda, o volume de sangue obtido por outras vias de coleta (como pela cauda) mostrou-se insuficiente para execução dos testes, tornando inviável outro método de coleta. Para os animais que não tiveram o coração removido para outros testes (não descritos neste trabalho), o sangue foi coletado com uma seringa contendo heparina sódica (Hemofol®) através do ventrículo esquerdo cardíaco e acondicionado em tubo próprio para coleta de sangue de 0,5mL contendo EDTA.

Os tubos foram armazenados a 4°C e levados em caixas de isopor ao final de todas as coletas até o Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, onde as amostras foram submetidas à análise hematológica (BC-5000 vet, Myndray) para quantificação dos seguintes parâmetros:

- Porcentagem de Hematócritos (HCT);
- Volume de Hemácias;
- Concentração de Hemoglobina (Hb);
- Volume de Leucócitos;
- Porcentagem de Monócitos;
- Porcentagem de Linfócitos;
- Porcentagem de Eosinófilos;
- Porcentagem de Basófilos;

- Volume de Plaquetas.

Para os exames em que foram realizados testes bioquímicos, os seguintes parâmetros foram avaliados: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina (Cobas c111, Roche).

### **3.6. Eutanásia e coleta dos órgãos**

Ao final do período de observação (14 dias para o PADU e 30 dias para o PADR), os animais foram eutanasiados e tiveram encéfalo, pulmão, coração, fígado e rim retirados para análises histopatológicas e, para o coração, análise de RAR. Para tal, foi administrado Tiopental sódico (60 mg/kg, via i.p.). Os animais tiveram então sua caixa torácica aberta com auxílio de pinça e tesoura para exposição dos órgãos. Para os animais que teriam coração retirado para testes de respirometria, este órgão foi retirado primeiro, ainda apresentando batimento cardíaco, com auxílio de tesoura e pinça. Os demais animais tiveram encéfalo coletado primeiro, seguido de pulmão, fígado e rim. Os pulmões foram inflados com tampão PBS com auxílio de uma seringa e linha antes de serem retirados.

Após coletados, todos os órgãos foram pesados em uma balança analítica (Tecnal) e tiveram seu volume medido em um pletismômetro (Bonther). Em seguida, os órgãos foram colocados em tubos devidamente etiquetados contendo formaldeído 4% diluído em tampão PBS.

### **3.7. Análises Histológicas**

Após coleta, os órgãos foram mantidos em solução formaldeído 4% (feita com tampão PBS e formaldeído 36,6% - Vetec Química Fina LTDA) por pelo menos 24h para sua fixação. Após esse período, os mesmos foram transferidos para solução de sacarose 30%, na qual foram mantidos por 48h, a fim de se estabelecer crioproteção no tecido ao serem submetidos ao congelamento posteriormente.

O congelamento dos órgãos foi feito utilizando-se 2-metil-butano (Sigma-Aldrich) e gelo seco. Os órgãos foram retirados da solução sacarose 30% e depositados em um Becker envolto em gelo seco contendo 2-metil-butano (volume suficiente para cobrir os órgãos), no qual permaneceram por 20 segundos antes de serem embrulhados em papel alumínio previamente etiquetado e colocados no freezer a -80°C.

Após congelados, os órgãos foram cortados no criostato (Leica CM1850) em 50  $\mu$ M de espessura utilizando-se o meio de inclusão Tissue-Tek® (Sakura®). Os cortes foram coletados com auxílio de um pincel e colocados em placa de 24 poços contendo solução anti-freezing (30% de etilenoglicol + 30% de glicerina + 40% de água destilada).

As lâminas (Perfecta) foram previamente gelatinizadas com solução contendo gelatina em pó (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich) e cromo potássio sulfato (Divisione Chimica Industriale - Milano). Com auxílio de um pincel e cuba contendo tampão PBS, os cortes foram retirados dos poços das placas, selecionados e colocados sobre a lâmina. Foram colocados, em média, quatro cortes por lâmina. Após montadas, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C e deixadas por 24h para secagem.

A coloração de Hematoxilina-eosina (H.E.) foi empregada para tornar possível a observação geral dos diferentes tecidos em microscópio óptico (Leica DM2000, Leica Microsystems, São Paulo). Esta coloração foi empregada a fim de se avaliar anomalias morfológicas nos tecidos, como surgimento de tumores, necroses, hemorragias, e outras possíveis alterações estruturais anormais.

Após a secagem das lâminas em estufa, todo o procedimento da coloração H.E. ocorreu em uma capela de fluxo laminar. Foram colocadas doze lâminas por vez (do mesmo tecido) em um suporte de plástico próprio e imersas em uma cuba contendo água destilada durante 10 segundos. Em seguida as lâminas foram submersas em uma cuba contendo a solução do corante de Hematoxilina (Hematoxilina de Harris). O tempo pelo qual as lâminas de cada tecido permaneceram nas soluções corantes variou de acordo com cada tecido e com a degradação do corante, tendo em vista que o pigmento de Hematoxilina é fotossensível e se degrada com o tempo. Portanto, esta etapa foi realizada com cautela e atenção, embora não tenha sido possível estabelecer um tempo fixo, mesmo para um mesmo tecido, em todas as vezes que a coloração foi realizada.

Depois de imersas em corante de hematoxilina, as lâminas foram colocadas em água para retirada do excesso de corante e, em seguida, em água destilada por 10 segundos. Na sequência, as lâminas foram imersas em solução diferenciadora de água destilada com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) (300mL de água destilada para 3 gotas de NH<sub>4</sub>OH – 10 s), seguido de imersão em água destilada (10 s). O mesmo procedimento foi repetido em solução

diferenciadora de água destilada com ácido clorídrico (HCl) (300mL de água destilada para 3 gotas de HCl – 10 s), e novamente imersas em água destilada (10 s).

Posteriormente, as lâminas foram imersas em cuba contendo a solução do corante Eosina (Eosina-floxina) por aproximadamente 1 minuto, devido aos diferentes tipos de tecido e degradação do corante. É válido ressaltar que ambos os corantes foram submetidos à filtração em filtro de papel antes do início do procedimento para remoção de sujeiras e impurezas. Depois de imersas em corante eosina, as lâminas foram colocadas em água para retirada do excesso de corante e, em seguida, em água destilada por 10 segundos.

Na sequência, as lâminas foram imersas em solução de etanol (Dinâmica Química Contemporânea LTDA) nas diferentes concentrações: 50%, 70%, 90% e 100% (v/v, em água destilada), durante um minuto em cada concentração e dois minutos na concentração final (100%).

Por último, as lâminas foram submersas em duas soluções de xilol (Dinâmica®, Brasil) por 1 minuto e meio em cada e ao final, as lâminas foram deixadas na segunda solução de xilol até, uma a uma, serem recobertas com lamínula de vidro (Exacta, Brasil) empregando Entellan® (Merck KGaA®, Alemanha) como meio de montagem.

A análise morfológica dos tecidos foi realizada através de um sistema de captura de imagens de um microscópio óptico (Leica DM2000, Leica Microsystems, São Paulo) com uma câmera de vídeo digital (Leica DFC 310 FX, Leica Microsystems, São Paulo), conectados a um computador equipado com o software (Leica, Las V4.1.0, Leica Microsystems, São Paulo).

Foram obtidas, em média, 4 fotos por cada corte do encéfalo, duas fotos por cada corte de rim, 3 fotos por cada corte de fígado, 2 fotos por cada corte de pulmão e 2 fotos por cada corte de coração. Todas as fotos foram obtidas em aumento de 10x, no caso de anomalias observadas, o aumento de 20x foi utilizado para fotografar.

Após captura de imagens por meio de microscópio óptico, foi realizada uma análise qualitativa e quantitativa das fotografias obtidas para relatar anomalias morfológicas nos tecidos, como surgimento de tumores, necroses, hemorragias, e outras possíveis alterações estruturais.

### **3.8. Ensaio de Radioligação Funcional**

Para investigação do possível alvo farmacológico do peptídeo, foram realizados ensaios de ligação em receptor para se avaliar a interação fármaco/neurotransmissor e receptor.

#### **3.8.1. Sujeitos Experimentais.**

Foram utilizados camundongos fêmeas saudáveis, entre 21 e 30 dias de idade, da linhagem swiss (*Mus musculus*) pesando entre 20-30g. Foram utilizados apenas camundongos fêmeas em decorrência da disponibilidade do biotério na época em que os experimentos foram realizados. Os animais foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, acondicionados em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm – comprimento x largura x altura), mantidos em estufas com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (22°C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período de experimento foram oferecidas água e ração específica para camundongos ad libitum.

O manuseio dos animais experimentais procedeu em acordo com a Lei no 11.794/2008 (Lei Arouca), que regulamenta o uso de animais em pesquisa. Além disso, os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foram rigorosamente seguidos. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/IB) da Universidade de Brasília – UnB e deferido, protocolo nº 23106.125197/2021-49.

#### **3.8.2. Preparo dos sinaptossomas**

Para avaliar a expressão diferenciada de receptores foi seguido o protocolo desenvolvido no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília, baseado em Emanuelli, T. et al (1998) e descrito em Campos, G., (2020) e Janowsky (2022) (Campos, 2020; Emanuelli et al., 1998; Janowsky et al., 1998).

No dia do experimento foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical para retirada do encéfalo e extração dos córtex cerebrais. Os córtex foram transferidos para tubos de vidro borossilicato com 20 mL totais de solução de homogeneização (sacarose 0,32 M em tampão Trizma 5 mM e pH 7,4). Os córtex cerebrais foram homogeneizados a 900 rpm em homogeneizador próprio para tecidos (NT 136, Novatécnica, Brasil) com pistão de Teflon acoplado, realizando-se aproximadamente 20 movimentos de subida e descida.

Em seguida, a solução homogeneizada foi transferida para tubos de policarbonato de 50 mL, os quais foram submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1000 xg em rotor de ângulo fixo (JA-30.50 Ti, Beckman Coulter, EUA), refrigerada a 4 °C (Avanti J-26S XPI, Beckman Coulter, EUA). Ao final desta etapa de centrifugação, o pellet foi retirado e o sobrenadante transferido para novos tubos para realização de um segundo ciclo de centrifugação a 1000 xg por 10 minutos.

Após o segundo ciclo de centrifugação, os sobrenadantes foram unidos em novos tubos e submetidos a 20 minutos de centrifugação a 15000 xg. Depois desse ciclo, o sobrenadante foi descartado e o pellet mantido e homogeneizado em 10 mL totais de solução de sacarose 0,32 M. Essa solução foi adicionada a um tubo contendo um gradiente descontínuo de sacarose, com camada inferior contendo 10 mL de sacarose a 1,2 M e camada superior contendo 10 mL de sacarose a 0,8 M, sendo os 5 mL de pellet (de cada tubo) adicionados acima desta camada. Ao final, os tubos com o gradiente foram centrifugados a 55000 xg durante 3 horas.

Ao fim desta etapa de centrifugação, os componentes encontraram-se separados de acordo com a densidade, estando os sinaptossomas presentes dentre as fases de 0,8 M e 1,2 M. Os sinaptossomas foram cuidadosamente retirados e transferidos para novos tubos, em seguida diluídos com 10 mL de solução de homogeneização e centrifugados a 20000 xg por 20 minutos.

Em sequência, o sobrenadante desta última centrifugação foi descartado e o pellet homogeneizado em 8 mL de solução de sacarose 0,32 M, sendo armazenado a -80 °C até a data do experimento.

### **3.8.3. Quantificação de Proteínas**

Para avaliar a quantidade de proteína presente nas amostras de sinaptossomas, foi utilizado o método colorimétrico de quantificação de proteínas utilizando-se albumina sérica bovina (ASB) (Thermo Fisher Scientific) para a curva de calibração, seguindo o protocolo do kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit).

Para a curva de calibração, foram pipetados diferentes volumes da solução estoque de ASB em placa de 96 poços, de forma que a concentração final de ASB em cada poço (A até I) fosse de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL, respectivamente. Todos os poços tiveram seu volume final completado para 400 µL com água deionizada. Além disso, para as

amostras de sinaptossomas foi utilizado como controle tubos com 25 e 10  $\mu\text{L}$  de solução de homogeneização.

Foi adicionado a cada poço 200  $\mu\text{L}$  da solução A e 10  $\mu\text{L}$  da solução B em cada poço, em seguida a placa foi coberta com papel alumínio e incubada em estufa a 60 °C por 30 minutos. Após esse período, a absorbância de cada amostra a 452 nm foi medida em espectrômetro (Flexstation, 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.

#### **3.8.4. Ensaio de Competição com os radioligantes GABA e Glutamato**

Os ensaios de competição ocorreram baseados no protocolo definido por Campos, 2020. Esses tiveram como objetivo avaliar se o peptídeo Occidentalina-1202 era capaz de competir com os neurotransmissores GABA e Glutamato, por meio da diminuição da formação do complexo neurotransmissor-receptor na presença de diferentes concentrações do peptídeo (10  $\mu\text{M}$  a 100 pM).

Para esse ensaio, os neurotransmissores utilizados estavam marcados radioativamente com o isótopo de hidrogênio trício ( $^3\text{H}$ ), sendo eles:  $^3\text{H}$ -GABA e  $^3\text{H}$ -Glutamato, ambos adquiridos da empresa PerkinElmer, EUA. Os sinaptossomas, previamente preparados, foram descongelados e centrifugados a 22000 xg por 5 minutos. Logo após, os sobrenadantes foram descartados, os precipitados foram homogeneizados em 1 mL de tampão Trizma 50 mM e incubados por 30 minutos a 37°C com o objetivo de realizar a ruptura dos sinaptossomas para liberação de vesículas sinápticas. Após a incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes em sucessivas centrifugações por 5 minutos a 22000 xg e no fim ocorreu a ressuspensão das amostras com os respectivos tampões.

Para realização do ensaio, 40  $\mu\text{L}$  das amostras contendo os sinaptossomas foram pipetadas em microtubos de 1,5 mL contendo diferentes concentrações do peptídeo. Além disso, também foram realizados dois controles, o controle demonstrando a ligação máxima (com sinaptossomas, tampão e ligante radioativo) e o de ligação mínima (sinaptossomas, competidor não radioativo e ligante radioativo).

As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos (com exceção do controle Frio do glutamato, incubado a 0°C). Ao fim do período de incubação, os microtubos foram

centrifugados por 5 minutos a 22000 x g a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi descartado e o precipitado (contendo sinaptossomas e ligantes radioativos) lavado duas vezes com água destilada gelada. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em 200 µL de líquido de cintilação (MicroScintO, PerkinElmer, EUA). 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.

Os resultados, expressos em contagens por minuto (CPM), foram subtraídos das contagens obtidas do controle de ligação mínima alcançado no ensaio e, posteriormente, convertidos em porcentagem relativa ao valor de ligação máxima, resultando em valores possíveis de comparação.

### **3.9. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism® versão 8.4.2 (San Diego, EUA). Em ensaios com mais de duas variáveis, para distribuições normais de variância semelhante (avaliado com o teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) considerando-se  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Em testes com apenas uma variável, para distribuições normais de variância semelhante (avaliado com o teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) considerando-se  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , foi utilizada ANOVA de uma via ou teste T. Os resultados significativos apontados na ANOVA foram seguidos de pós-teste de Tukey. Para os resultados do hemograma foi realizada comparação com dados da literatura. Os resultados de captação foram submetidos ao teste ANOVA e foram considerados valores estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Massa dos Animais**

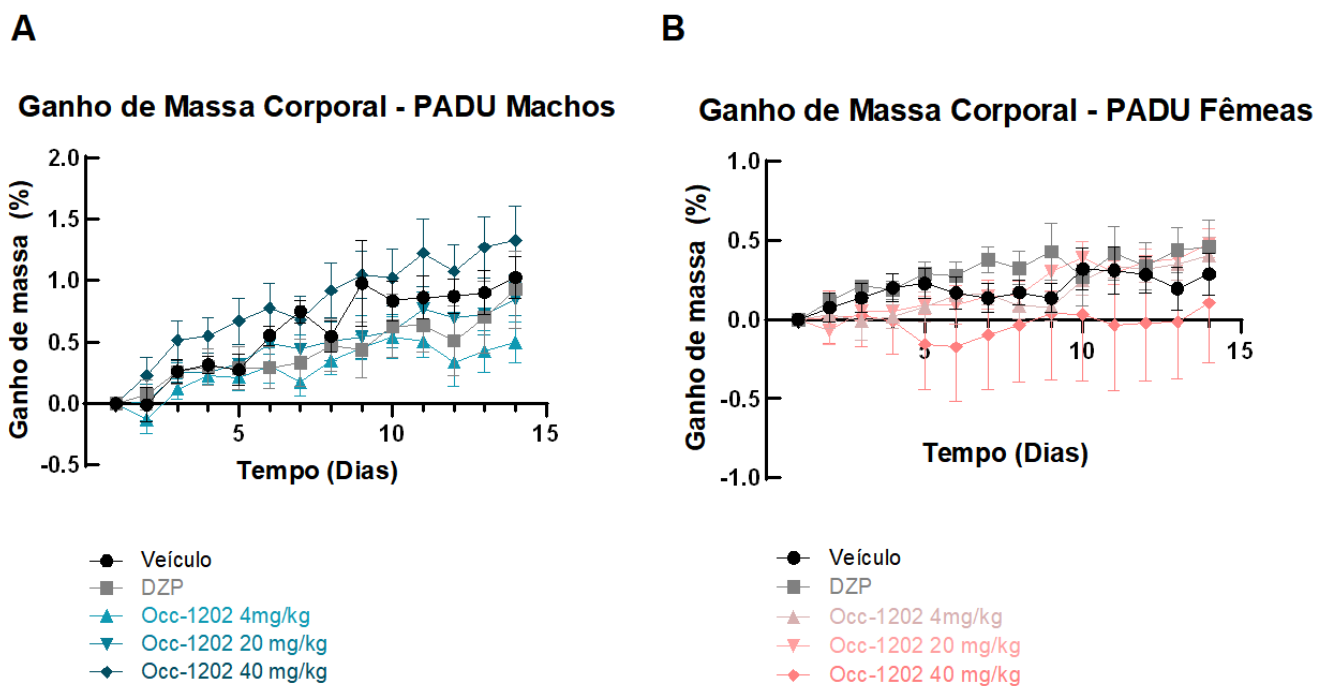
#### **4.1.1. Ganho de massa dos animais**

Em relação às alterações no ganho de massa corporal, os animais não apresentaram diferenças de ganho de massa corporal entre os tratamentos em ambos os modelos testados (agudo e crônico). Os dados das massas dos animais foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias, não apresentando diferenças significativas nem no PADU, em machos (interação de tratamento e tempo [ $F_{52, 455} = 1,217$ ;  $p > 0,05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 2,017$ ;  $p > 0,05$ ]) (Figura 4 A)

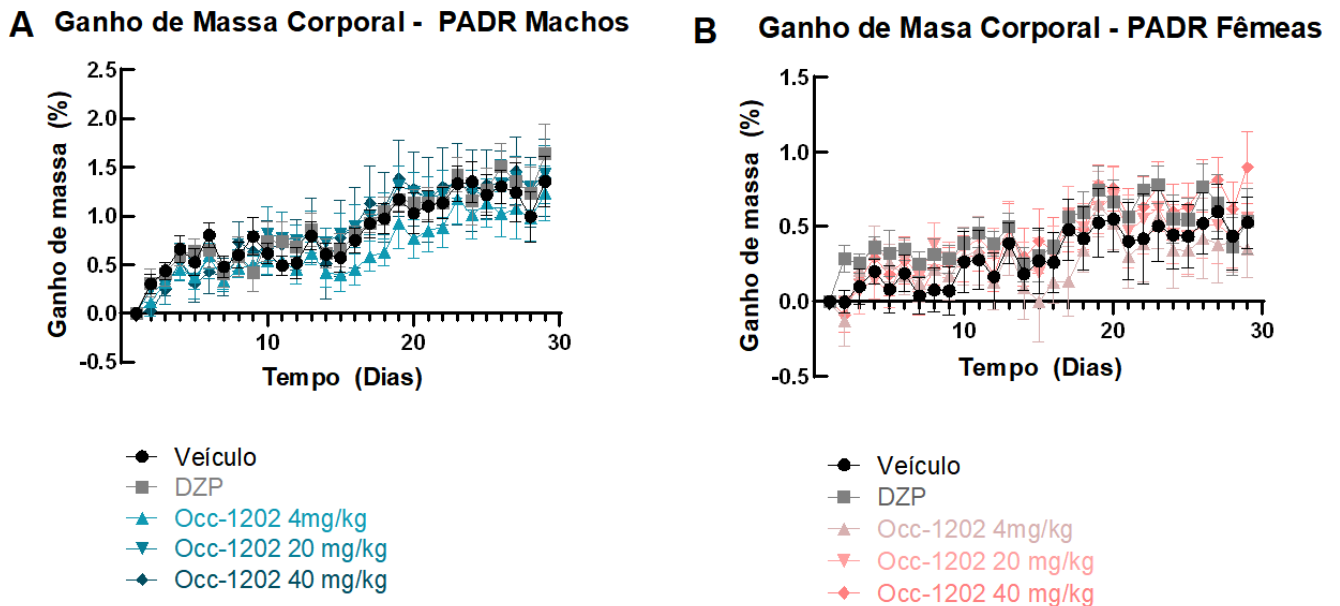


e fêmeas (interação de tratamento e tempo [ $F_{52, 455} = 0,6148$ ;  $p > 0,05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 0,7313$ ;  $p > 0,05$ ]) (Figura 4 B); nem no PADR em machos (interação de tratamento e tempo [ $F_{112, 952} = 0,6528$ ], tratamento [ $F_{4, 34} = 0,3156$ ;  $p > 0,05$ ]) (Figura 5 A) e fêmeas (interação de tratamento e tempo [ $F_{112, 952} = 0,7987$ ;  $p > 0,05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 0,3226$ ;  $p > 0,05$ ]) (Figura 5 B).

Ainda, no que diz respeito ao fator tempo, houve diferença significativa, os animais ganharam peso independente do tratamento, tanto nos machos ( $F_{3,931, 137,6} = 39,16$ ;  $p < 0,0001$ ) e fêmeas ( $F_{1,897, 66,41} = 4,444$ ;  $p < 0,0001$ ) do PADU (Figuras 6 A e B, respectivamente), quanto nos machos ( $F_{4,013, 136,4} = 44,56$ ;  $p < 0,0001$ ) e fêmeas ( $F_{4,956, 168,5} = 19,26$ ;  $p < 0,0001$ ) do PADR (Figuras 7 A e B, respectivamente), conforme detalhado no próximo item.



**Figura 4.** Avaliação do ganho de massa corporal dos animais durante o PADU. (A) Machos. (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.



**Figura 5.** Avaliação do ganho de massa corporal dos animais durante o PADR. (A) Machos. (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

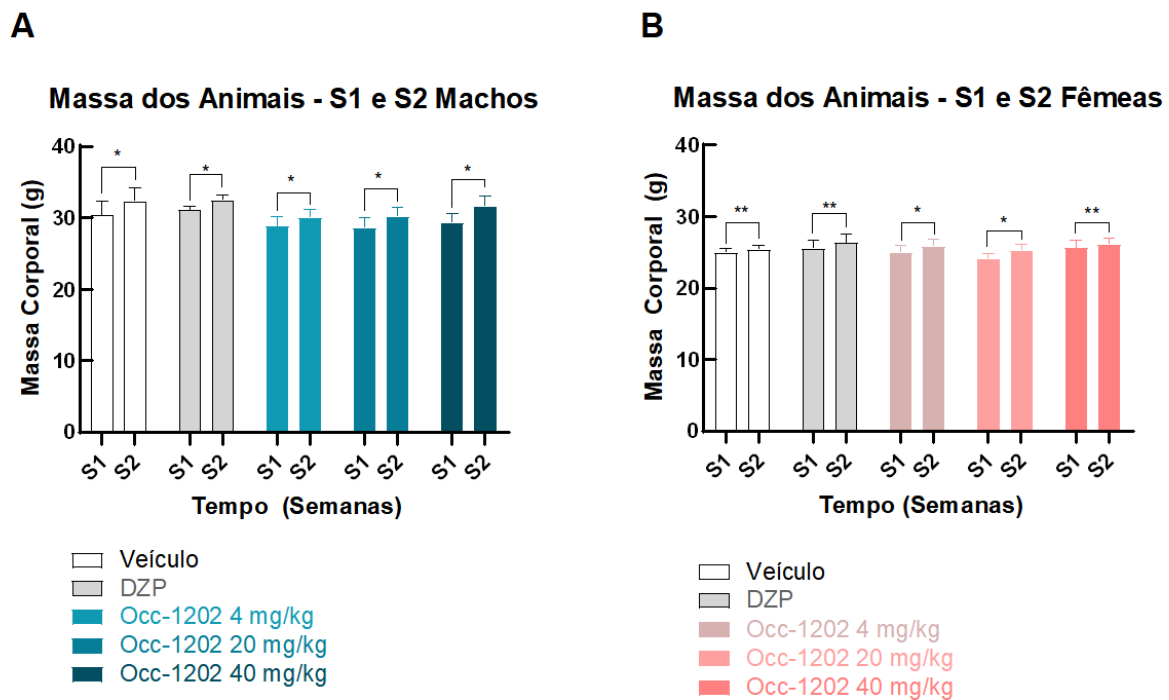
#### 4.1.2. Massa corporal dos animais ao longo das semanas

No que diz respeito ao ganho de massa dos animais ao longo do período de observação nos modelos agudo e crônico, houve diferença significativa como evidenciado pelo teste ANOVA de duas vias, no PADU e no PADR, descrito na sessão anterior. Desta forma, os dados da massa corporal de cada grupo foram submetidos ao teste T no PADU (Figura 6 A e B, machos e fêmeas, respectivamente) e à ANOVA de duas vias no PADR (Figura 7 A e B, machos e fêmeas, respectivamente), seguido de pós-teste de Tukey. Os resultados indicaram que houve ganho significativo de massa ao longo das semanas, tanto no PADU (Semana 1 e Semana 2), quanto no PADR (Semanas 1 a 4).

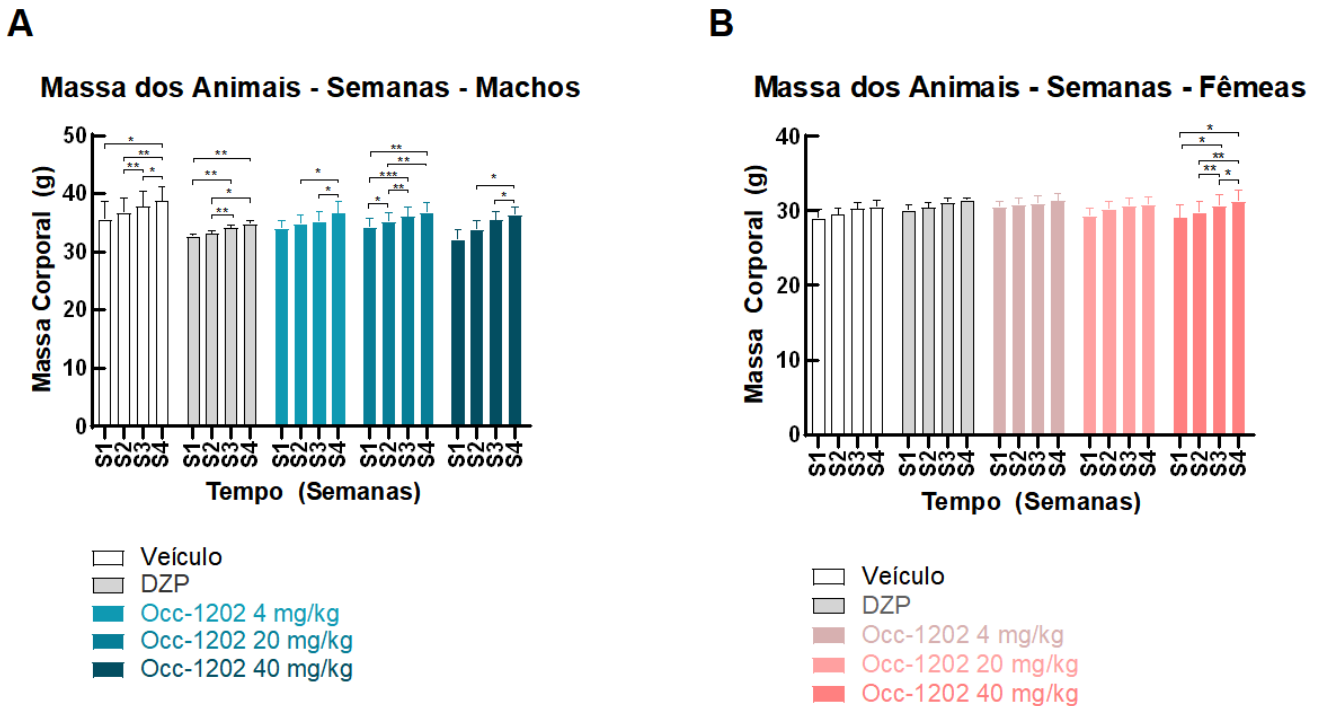
No PADU, os machos apresentaram diferenças significativas entre as semanas nos grupos Veículo ( $t=32,50$ ,  $df=1$ ), DZP ( $t=47,48$ ,  $df=1$ ), Occ-1202 4 mg/kg ( $t=47,75$ ,  $df=1$ ), Occ-1202 20 mg/kg ( $t=36,62$ ,  $df=1$ ) e Occ-1202 40 mg/kg ( $t=25,46$ ,  $df=1$ ) (Figura 6 A). Nas fêmeas, as diferenças observadas entre as semanas foram: Veículo ( $t=108,6$ ,  $df=1$ ), DZP ( $t=72,65$ ,

df=1), Occ-1202 4 mg/kg ( $t=63,22$ , df=1), Occ-1202 20 mg/kg ( $t=41,91$ , df=1) e Occ-1202 40 mg/kg ( $t=99,90$ , df=1) (Figura 6 B).

Nos machos e nas fêmeas do PADR, no que diz respeito ao fator tempo, houve diferença entre as semanas ( $F_{1,247, 43,64} = 50,31$ ;  $p<0.0001$ ) e ( $F_{1,328, 45,14} = 30,76$ ;  $p<0.0001$ ), respectivamente (Figura 7 A e B, machos e fêmeas, respectivamente).



**Figura 6.** Avaliação do ganho de massa corporal dos tratamentos entre as semanas 1 (S1) e 2 (S2) do PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística teste T. (\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $P<0.05$ , \* DZP =  $P<0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p<0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p<0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $P>0.05$ . (B) \*\* Veículo =  $P<0.01$ , \*\* DZP =  $P<0.01$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P<0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $P<0.05$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $P<0,01$ .  $n=8$  para todos os grupos.



**Figura 7.** Avaliação do ganho de massa corporal dos tratamentos entre as semanas 1 a 4 (S1, S2, S3 e S4) do PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. (\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.05$ ). (\*\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.01$ ). (\*\*\*) Diferença significativa dentro do mesmo grupo ( $p < 0.001$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.2. Análise dos comportamentos gerais espontâneos no teste de Campo aberto (Open Field)

Os animais foram submetidos ao ensaio comportamental para a avaliação dos comportamentos gerais espontâneos no Campo aberto - *Open Field* tanto nos modelos agudo e crônico. No PADU, o teste foi realizado apenas no primeiro dia, 30 min após a administração dos tratamentos. No PADR, o teste foi realizado nos dias 1, 14 e 28. Durante o teste, os seguintes parâmetros foram avaliados: deslocamento total, período imóvel, autolimpeza, elevação e exploração. Ainda, no PADR os dados foram comparados tanto entre os diferentes tratamentos, em cada Open Field, quanto entre os 3 Open Fields dentro do mesmo grupo.

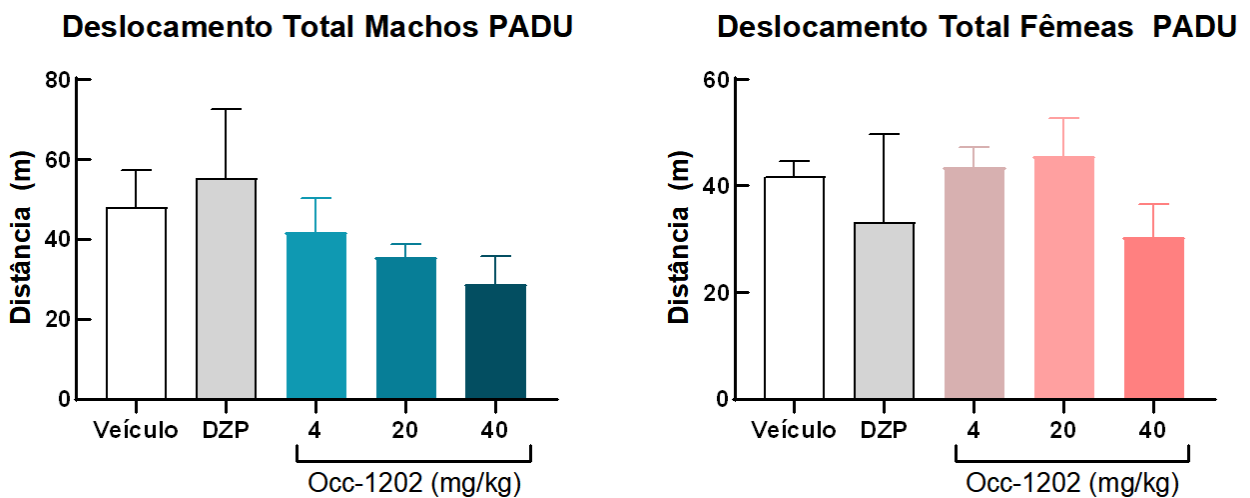
##### 4.2.1. Deslocamento total

Em relação ao deslocamento, não houve alterações no tempo total entre os grupos tratados no PADU. Sendo assim, os dados de deslocamento total no PADU foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, no qual não foram observadas diferenças significativas entre os

grupos tratados, tanto nos machos ( $F_{4, 35} = 1,039$ ;  $p > 0.05$ ) quanto nas fêmeas ( $F_{4, 35} = 0,5841$ ;  $p > 0.05$ ) (Figuras 8 A e B, respectivamente).

No PADR, não houve diferenças significativas no deslocamento total entre os grupos ao longo dos testes no Campo aberto (Figura 9 A e B, respectivamente). Os dados do deslocamento total foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Tukey, não havendo diferenças significativas tanto nos machos (interação tratamento e open field [ $F_{8, 70} = 0,9941$ ;  $p > 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 3,500$ ;  $p > 0.05$ ]) quanto nas fêmeas (interação tratamento e open field ( $F_{8, 68} = 1,884$ ;  $p > 0.05$ ), tratamento [ $F_{4, 34} = 0,69630$ ;  $p > 0.05$ ]).

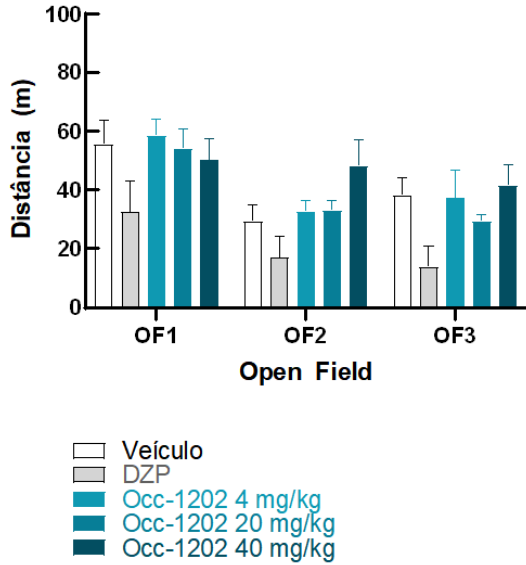
Dentro do mesmo grupo, houve diminuição no deslocamento total ao longo dos 3 Open Field's, nos machos, nos grupos Occ-1202 4 mg/kg (entre os desafios 1 e 2) e Occ-1202 20 mg/kg (entre os desafios 1 e 2, e 1 e 3) (tempo [ $F_{1,735, 60,73} = 18,42$ ;  $p < 0.0001$ ]) e nas fêmeas (tempo [ $F_{1,964, 66,78} = 5,866$ ;  $p < 0.01$ ]) (Figura 10 A e B, respectivamente).



**Figura 8.** Comparação do deslocamento total, em metros, dos animais no teste de campo aberto no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n = 8$  para todos os grupos.

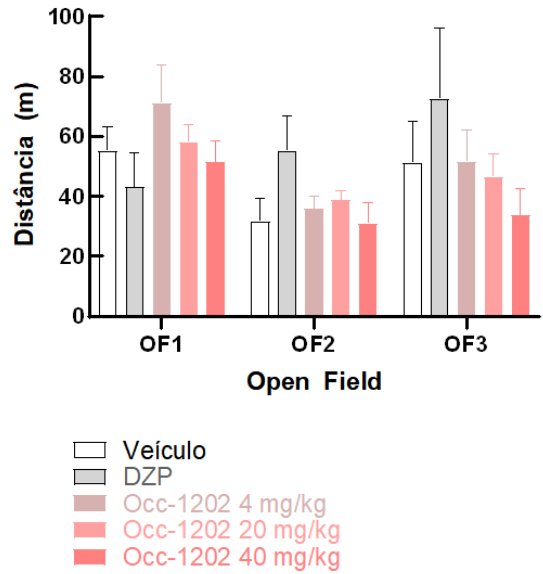
A

**Comparação do Deslocamento Total entre os grupos - PADR Machos**



B

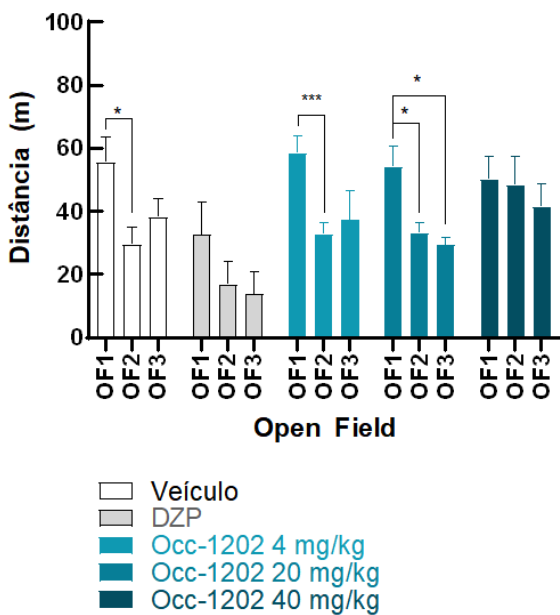
**Comparação do Deslocamento Total entre os grupos - PADR Fêmeas**



**Figura 9.** Comparação do deslocamento total, em metros, entre os grupos nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n = 8$  para todos os grupos.

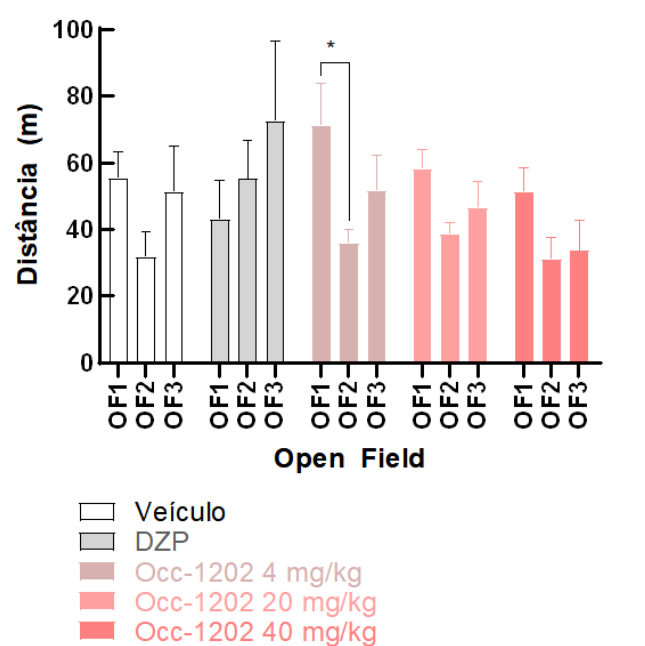
A

**Comparação do Deslocamento Total no mesmo grupo - PADR Machos**



B

**Comparação do Deslocamento Total no mesmo grupo - PADR Fêmeas**



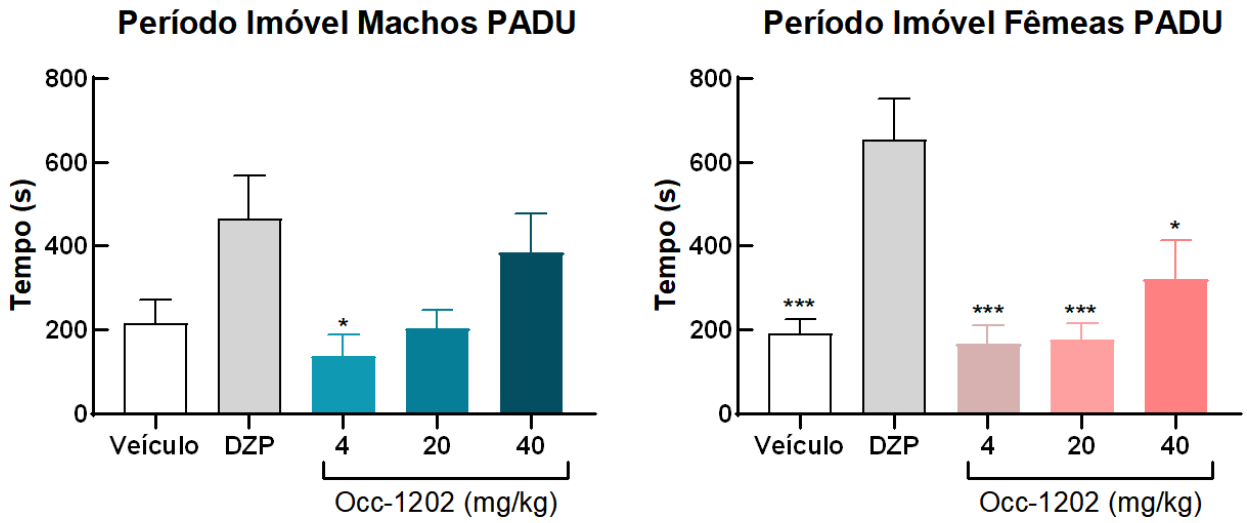
**Figura 10.** Comparação do deslocamento total, em metros, dentro no mesmo grupo nos testes de Campo aberto no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.001$ , \* Occ-1202 20 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2, e 1 e 3 =  $p < 0.01$ . (B) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.2.2. Período Imóvel

Em relação à imobilidade, apenas o grupo DZP permaneceu mais tempo imóvel no PADU. Os dados do período imóvel dos animais no PADU foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey para os machos ( $F_{4, 35} = 3,541$ ;  $p < 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 35} = 9,416$ ;  $p < 0.0001$ ). Nos machos, foram observadas diferenças significativas no grupo tratado com a menor dose de Occ-1202 (4 mg/kg) quando comparado ao Diazepam (4 mg/kg) ( $p < 0.05$ ) (Figura 11 A). Nas fêmeas, esta diferença ocorreu em todos os grupos, também em relação ao grupo Diazepam (4 mg/kg), sendo  $p < 0.01$  em todos os grupos, exceto o grupo tratado com a maior dose do peptídeo (40 mg/kg) ( $p < 0.05$ ) (Figura 11 B).

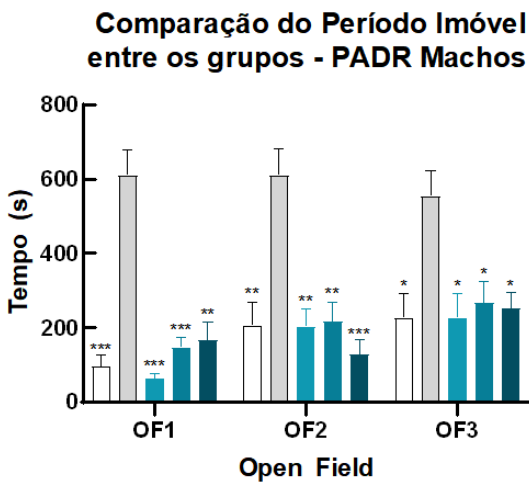
No PADR, houve diferenças significativas no período imóvel entre os grupos tratados ao longo dos dias de desafio no Campo aberto nos machos em relação ao grupo DZP e todos os outros grupos de tratamento. Em relação às fêmeas, o grupo DZP teve uma redução de imobilidade em relação a todos os grupos apenas no primeiro dia de desafio no *Open field* (OF1). Os dados do período imóvel dos animais ao longo dos dias de desafio no PADR foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias seguido por pós-teste de Tukey, tanto para os machos (interação do tratamento e dias de desafio [ $F_{8, 70} = 1,243$ ;  $p > 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 24,89$ ;  $p < 0.0001$ ]) quanto para as fêmeas (interação do tratamento e dias de desafio [ $F_{8, 68} = 3,464$ ;  $p < 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 34} = 0,6963$ ;  $p < 0.01$ ]) (Figura 12 A e B, respectivamente).

Ainda no PADR, houve diferença ao longo dos dias de desafio no Campo aberto para machos com aumento da imobilidade nas doses de 4 (entre os desafios 1 e 2) e 40 mg/Kg (entre os desafios 2 e 3) e para fêmeas com redução de imobilidade no grupo DZP (entre os desafios 1 e 3) e aumento na dose de 40 mg/Kg (entre os desafios 2 e 3). Os dados da comparação do período imóvel dentro de um mesmo grupo ao longo dos dias de desafio no Campo aberto foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Tukey nos machos (tempo [ $F_{1,772, 62,01} = 4,422$ ;  $p < 0.05$ ]) e nas fêmeas (tempo [ $F_{1,809, 61,52} = 3,473$ ;  $p < 0.05$ ]) (Figura 13 A e B, respectivamente).



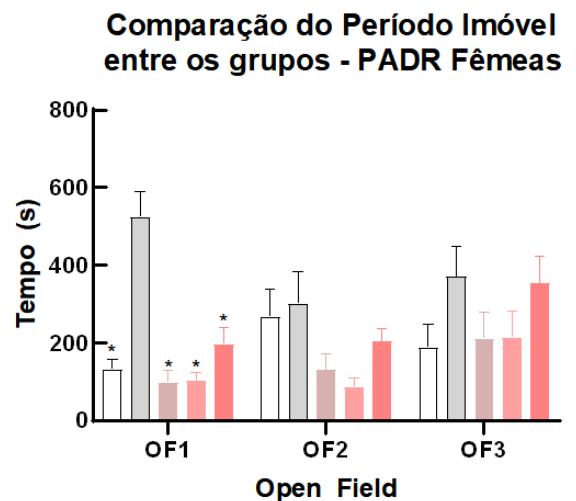
**Figura 11.** Análise do período imóvel total dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas em relação ao DZP: (A) \* Veículo =  $p < 0.05$  ( $P = 0.0252$ ). (B) \*\*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ .  $n = 8$  para todos os grupos.

**A**



□ Veículo  
 ■ DZP  
 ■ Occ-1202 4 mg/kg  
 ■ Occ-1202 20 mg/kg  
 ■ Occ-1202 40 mg/kg

**B**

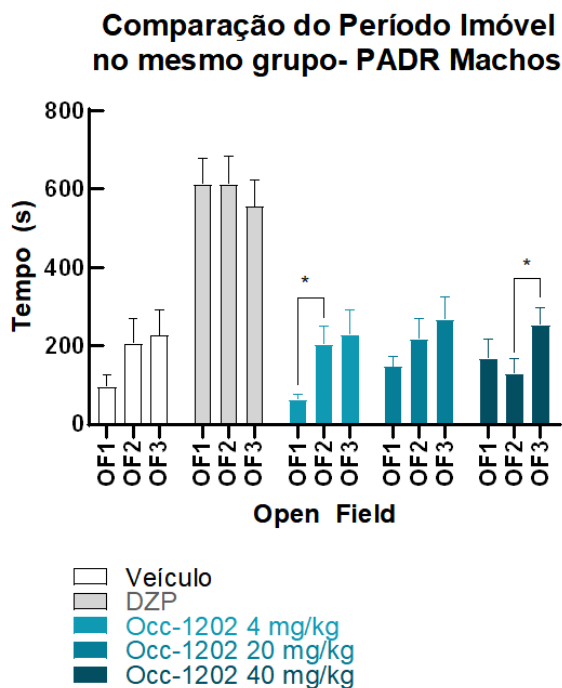


□ Veículo  
 ■ DZP  
 ■ Occ-1202 4 mg/kg  
 ■ Occ-1202 20 mg/kg  
 ■ Occ-1202 40 mg/kg

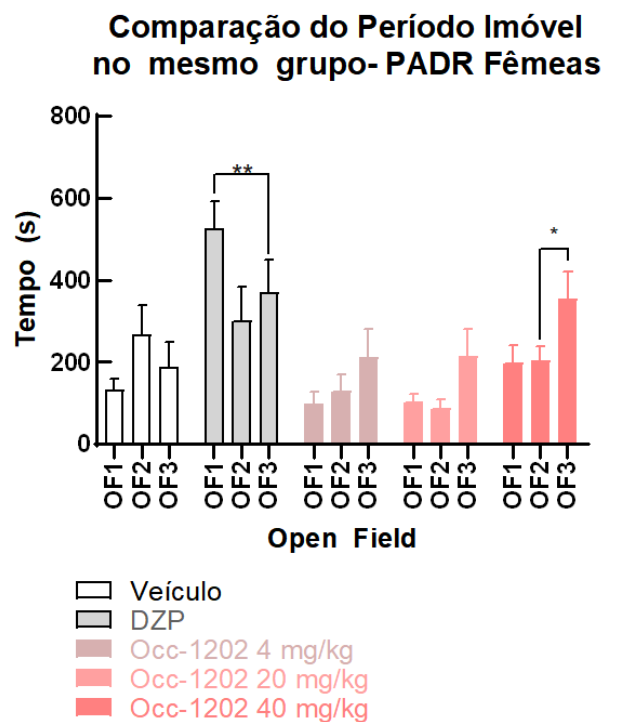


**Figura 12.** Comparação do período imóvel total dos animais entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \*\*\* Veículo =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . Open Field 2: \*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.001$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . (B) Open Field 1: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . n=8 para todos os grupos.

A



B



**Figura 13.** Comparação do período imóvel dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 2 e 3 =  $p < 0.05$ . (B) \*\* DZP entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 2 e 3 =  $p < 0.05$ . n=8 para todos os grupos.

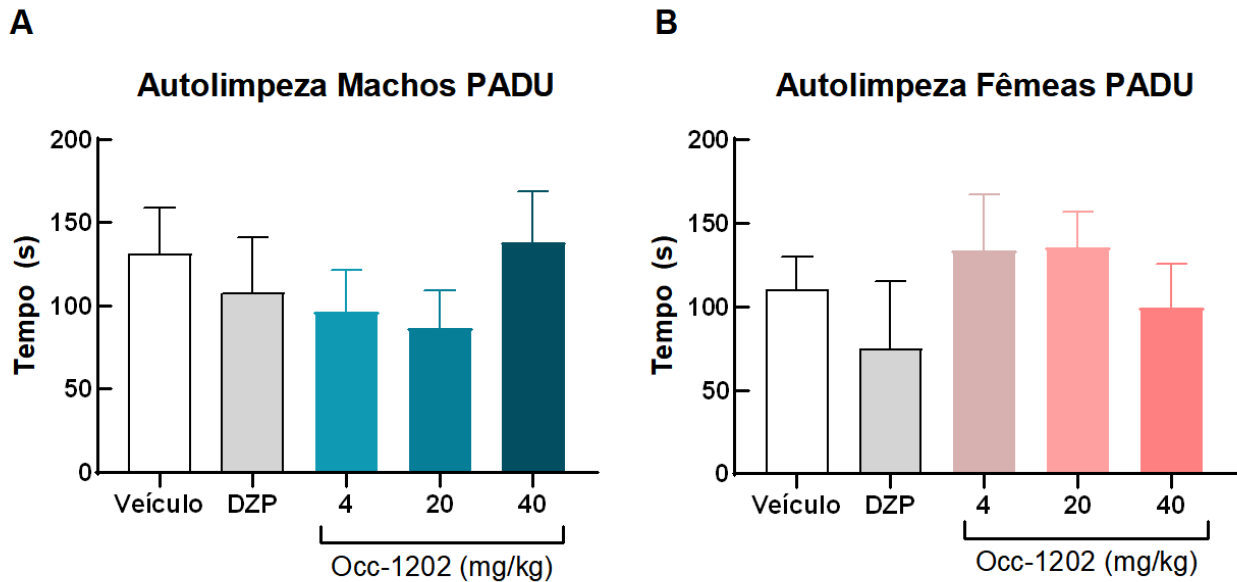
#### 4.2.3. Autolimpeza

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de autolimpeza entre os grupos, tanto nos machos, quanto nas fêmeas, no PADU. Os dados do tempo de autolimpeza

dos animais no PADU foram submetidos ao teste ANOVA de uma via nos machos ( $F_{4, 35} = 0,6126$ ;  $p > 0.05$ ) e nas fêmeas ( $F_{4, 35} = 0,7726$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 14 A e B, respectivamente).

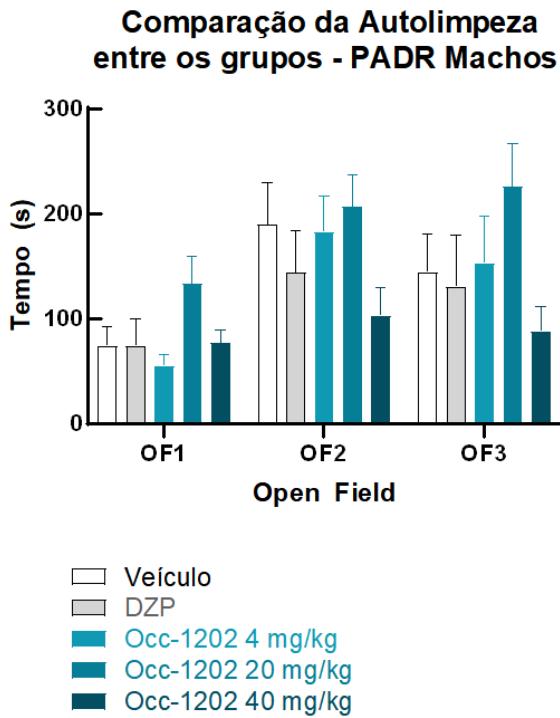
No PADR, no que diz respeito à comparação da autolimpeza entre os grupos, não houve diferenças significativas em ambos os sexos. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey nos machos (tratamento e open field [ $F_{8, 70} = 0,8343$ ;  $p > 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 35} = 2,170$ ;  $p > 0.05$ ]) e nas fêmeas (tratamento e open field [ $F_{8, 68} = 0,5470$ ;  $p > 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 34} = 2,033$ ;  $p > 0.05$ ]) (Figura 15 A e B, respectivamente).

Ainda, com relação à comparação da autolimpeza dentro de um mesmo grupo ao longo dos OFs, houve diferenças significativas nos machos (tempo [ $F_{1,890, 66,15} = 13,89$ ;  $p < 0.0001$ ]) e nas fêmeas (tempo [ $F_{1,907, 64,85} = 14,24$ ;  $p < 0.0001$ ]) (Figura 16 A e B, respectivamente). Nos machos, observou-se um aumento de tempo de autolimpeza no grupo veículo e na menor dose, ambos entre os desafios 1 e 2 de Campo Aberto. Nas fêmeas, a dose maior apresentou um aumento de autolimpeza no segundo dia de desafio e uma redução no terceiro dia de desafio do Campo aberto quando comparado ao segundo.

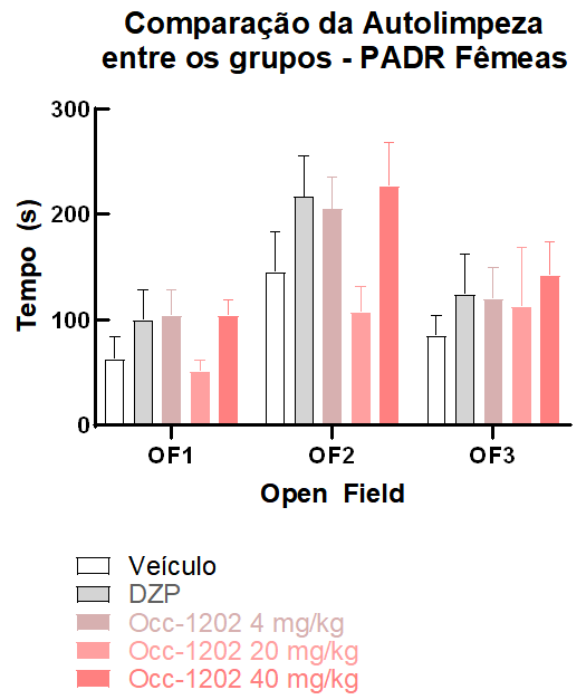


**Figura 14.** Análise do tempo de autolimpeza dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

A

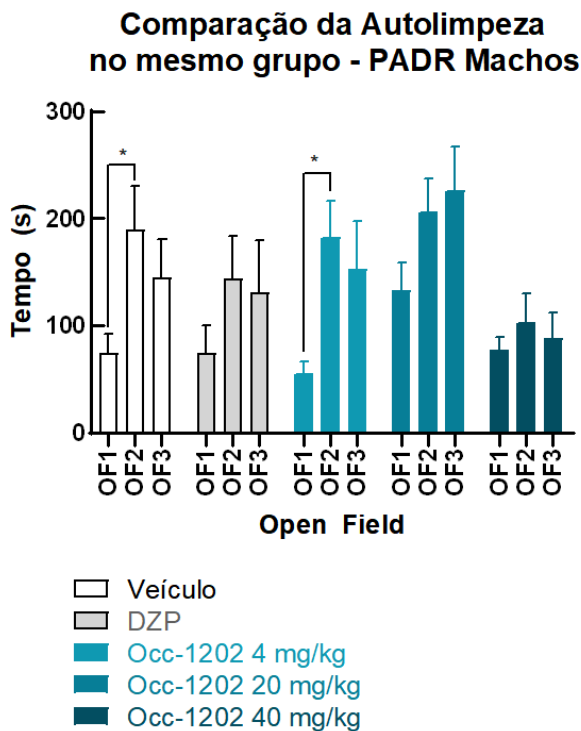


B

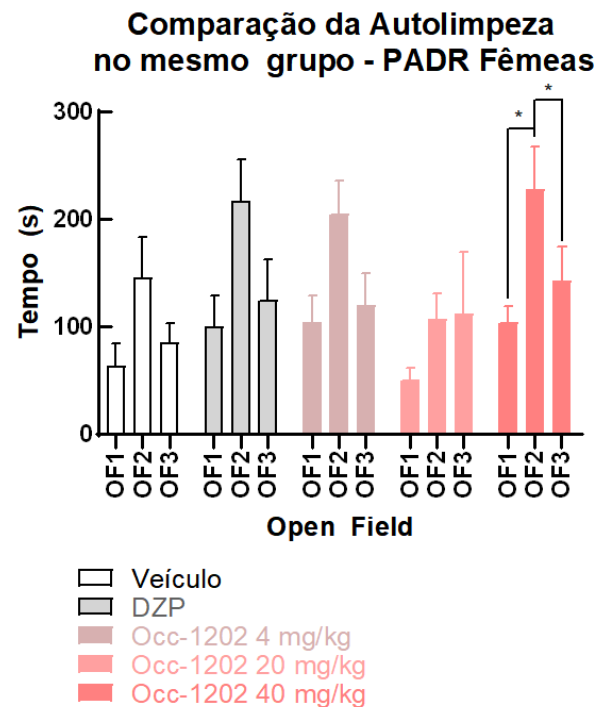


**Figura 15.** Comparação do tempo de autolimpeza entre os grupos nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n = 8$  para todos os grupos.

A



B



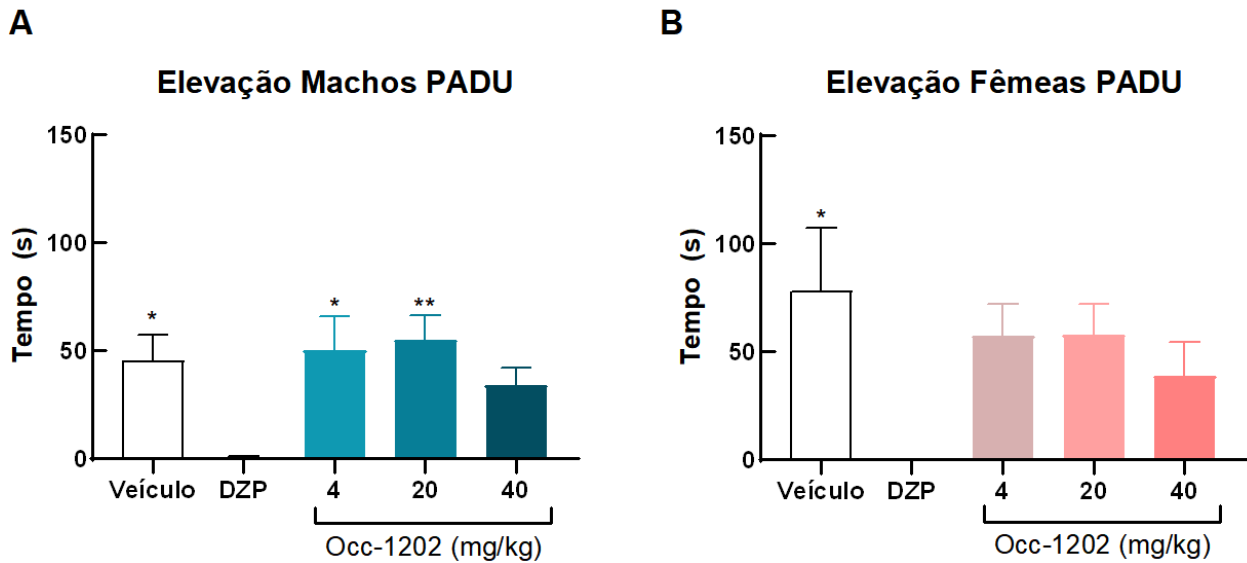
**Figura 16.** Comparação do tempo de autolimpeza dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \* Veículo entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.005$ . (B) \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2, e 2 e 3 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.2.4. Elevação

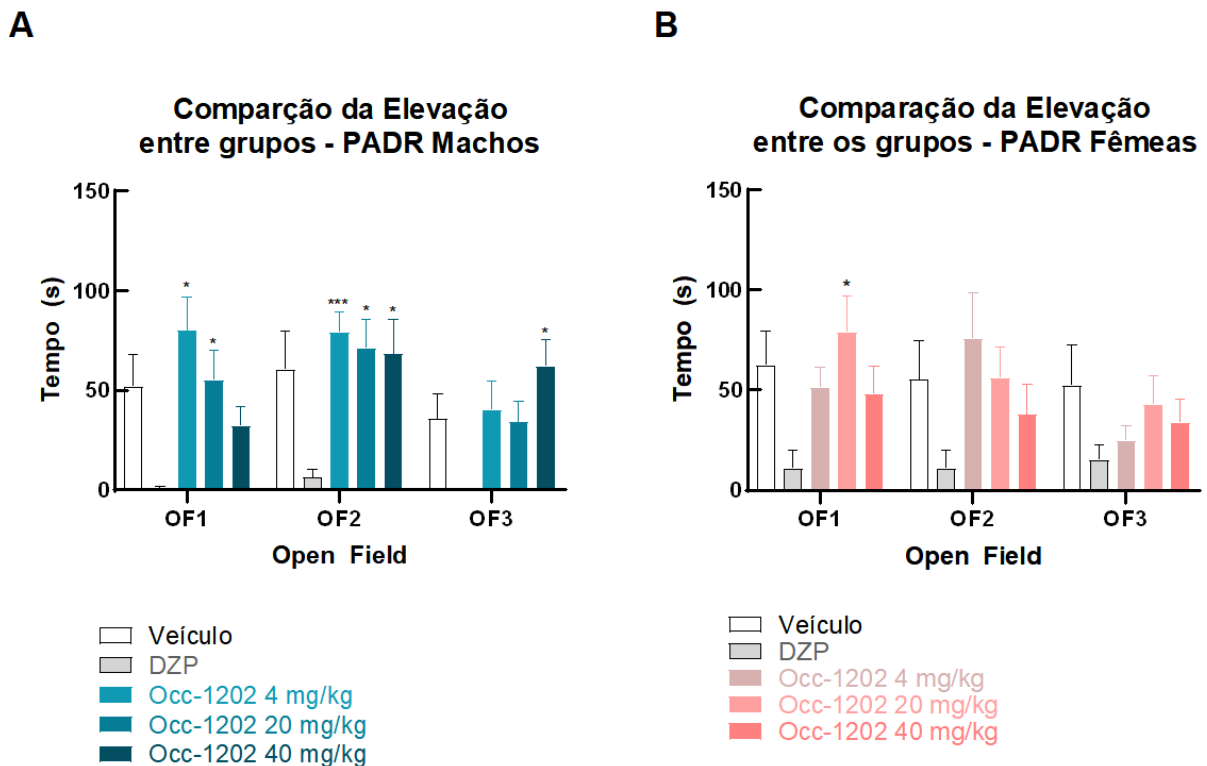
No PADU, houve diferença no tempo de elevação entre os grupos de tratamento e o grupo DZP. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey nos machos ( $F_{4, 35} = 4,083$ ;  $p < 0.01$ ) e nas fêmeas ( $F_{4, 35} = 2,877$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 17 A e B, respectivamente). Em machos, o grupo DZP teve uma redução da elevação em relação aos grupos veículo, e as doses de 4 e 20 mg/Kg. Em fêmeas, o grupo DZP teve uma redução de elevação em relação ao grupo veículo.

Houve diferença entre o tempo de elevação dos animais no PADR entre os tratamentos e o grupo DZP. Os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Tukey, nos machos (interação tratamento e open field [ $F_{8, 70} = 1,640$ ;  $p > 0.05$ ]), tratamento [ $F_{4, 35} = 6,569$ ;  $p < 0.001$ ] e nas fêmeas (interação tratamento e open field [ $F_{8, 68} = 1,122$ ;  $p > 0.05$ ]), tratamento [ $F_{4, 34} = 2,999$ ;  $p < 0.05$ ] (Figura 18 A e B, respectivamente). Nos machos, o grupo DZP teve uma redução de elevação em relação as doses de 4, 20 mg/Kg no OF1, no OF2, a redução foi significativa nas 3 doses do tratamento e no OF 3, a redução foi em relação a maior dose. Em fêmeas, o grupo DZP mostrou menos tempo de elevação em relação a dose de 20 mg/Kg no OF1.

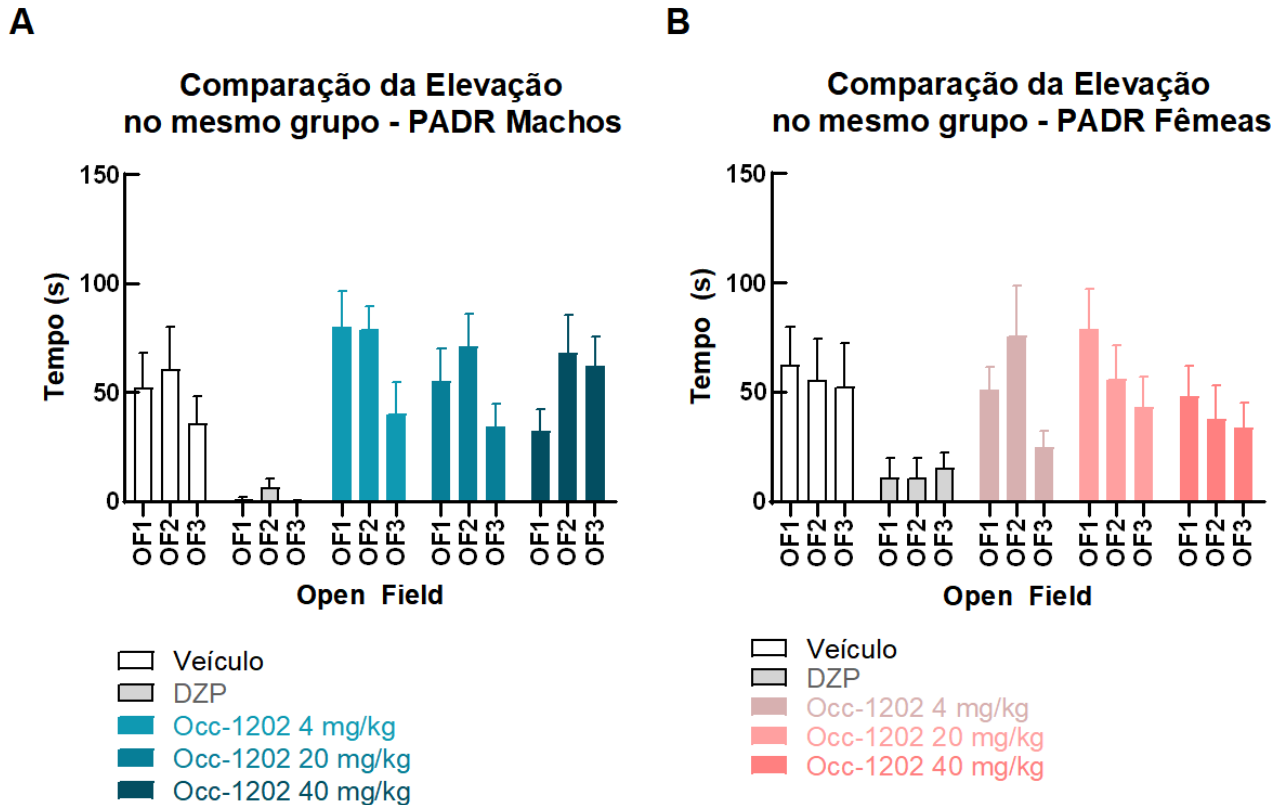
Com relação à comparação da elevação dentro do mesmo grupo ao longo dos Open Fields, não foram observadas diferenças. Os dados da elevação foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias para os machos (tempo [ $F_{1,890, 66,17} = 5,542$ ;  $p < 0.01$ ]) e para as fêmeas (tempo [ $F_{1,957, 66,53} = 2,631$ ;  $p > 0.05$ ]) (Figura 19 A e B, respectivamente).



**Figura 17.** Análise do tempo de elevação dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B) \* Veículo =  $p < 0.05$ .  $n = 8$  para todos os grupos.



**Figura 18.** Comparação da elevação entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 2: \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 3: \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . (B) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.



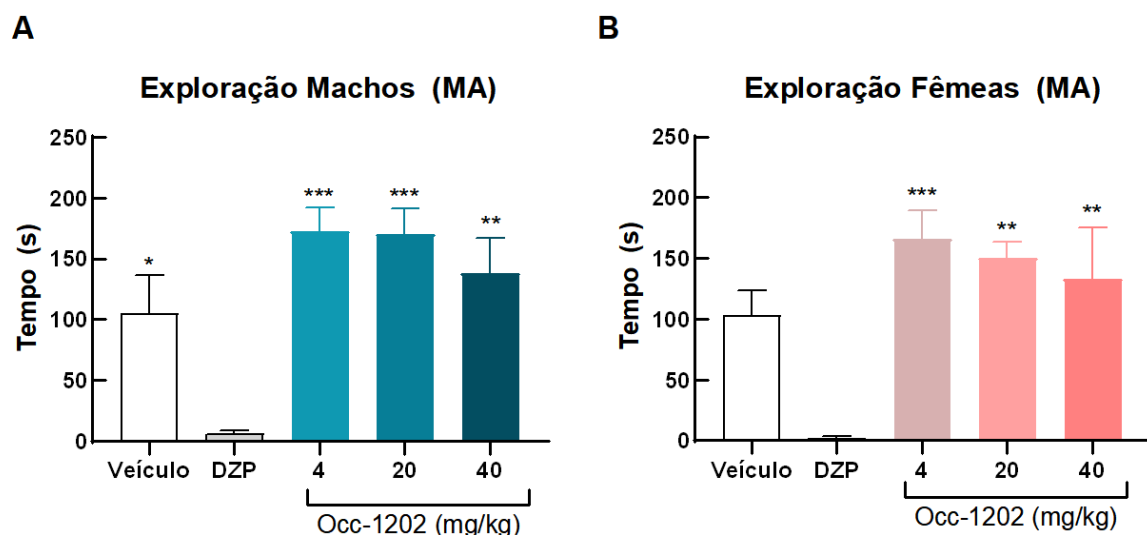
**Figura 19.** Comparação da elevação dentro no mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.2.5. Exploração

Houve diferença no tempo de exploração dos animais no PADU para o grupo DZP, que teve uma redução em relação a todos os outros grupos de tratamento em machos e fêmeas em relação as 3 doses de tratamento com Occ-1202. Os dados do tempo de exploração foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey nos machos ( $F_{4, 27} = 9,465$ ;  $p < 0.0001$ ) e nas fêmeas ( $F_{4, 24} = 7,517$ ;  $p < 0.01$ ) (Figura 20 A e B, respectivamente).

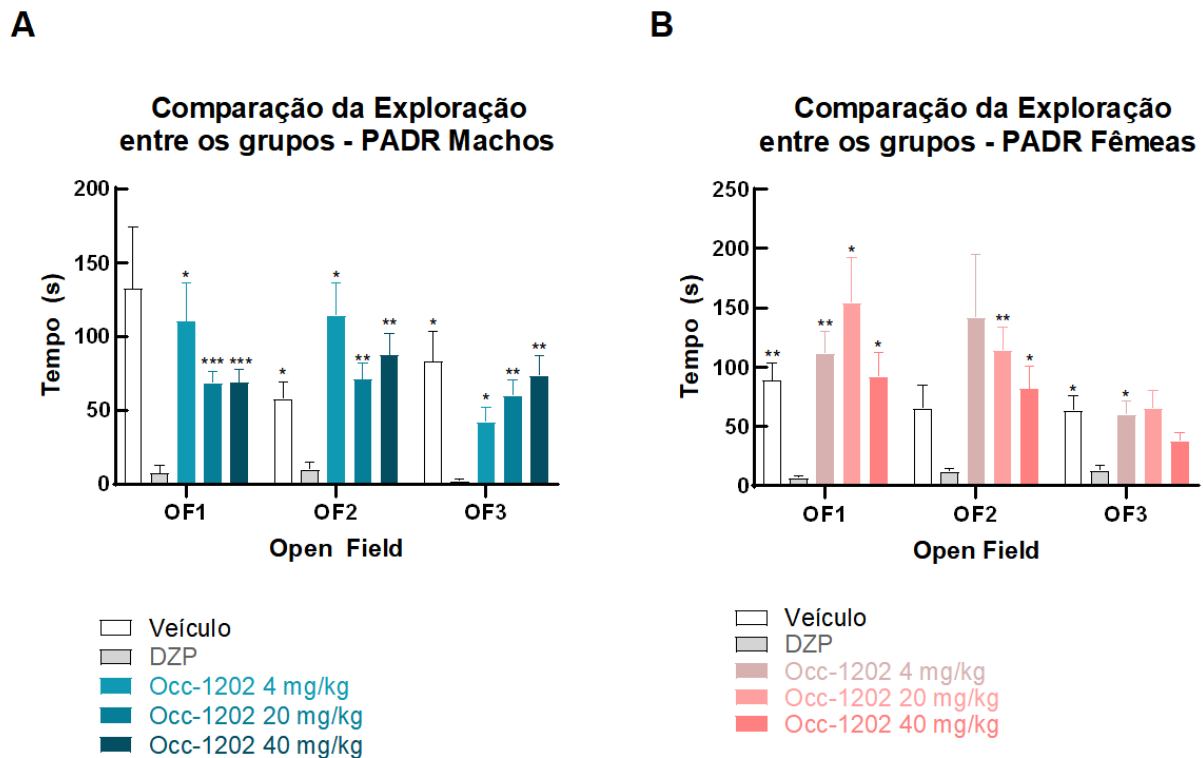
No PADR, houve diferença no tempo de exploração dos animais entre os tratamentos. O grupo DZP teve uma redução de exploração em todos os dias de desafio do OF e em relação a todas as doses do peptídeo em machos. Em fêmeas, o grupo DZP apresentou uma redução de exploração no OF1 com todos os outros grupos de tratamento, e no OF2 com os grupos de tratamento nas doses de 4 e 20 mg/Kg e no OF3 com veículo e a menor dose do peptídeo. Os dados do tempo de exploração foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Tukey, tanto nos machos (interação tratamento e open field [ $F_{8, 84} = 2,414$ ;  $p < 0.05$ ], tratamento [ $F_{2,352, 49,40} = 14,64$ ;  $p < 0.0001$ ]), quanto nas fêmeas (interação tratamento e open field [ $F_{8, 68} = 1,752$ ;  $p > 0.05$ ], tratamento [ $F_{4, 34} = 6,768$ ;  $p < 0.001$ ]), sendo constatado diferenças entre os tratamentos em ambos os sexos, e no fator tratamento ao longo dos Open Fields nos machos (Figura 21 A e B, respectivamente).

Por fim, houve diferença no tempo de exploração dentro do mesmo grupo ao longo dos Open Fields no PADR para as fêmeas. Nas fêmeas, nas doses de 4 mg/Kg e 40 mg/Kg, houve uma redução da exploração no OF1 e OF3 entre essas duas doses. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de duas vias, não sendo constatadas diferenças nos machos (tempo [ $F_{2, 21} = 1,683$ ;  $p > 0.05$ ]) e nas fêmeas (tempo [ $F_{1,783, 60,62} = 8,588$ ;  $p < 0.01$ ]) (Figura 22 A e B, respectivamente).



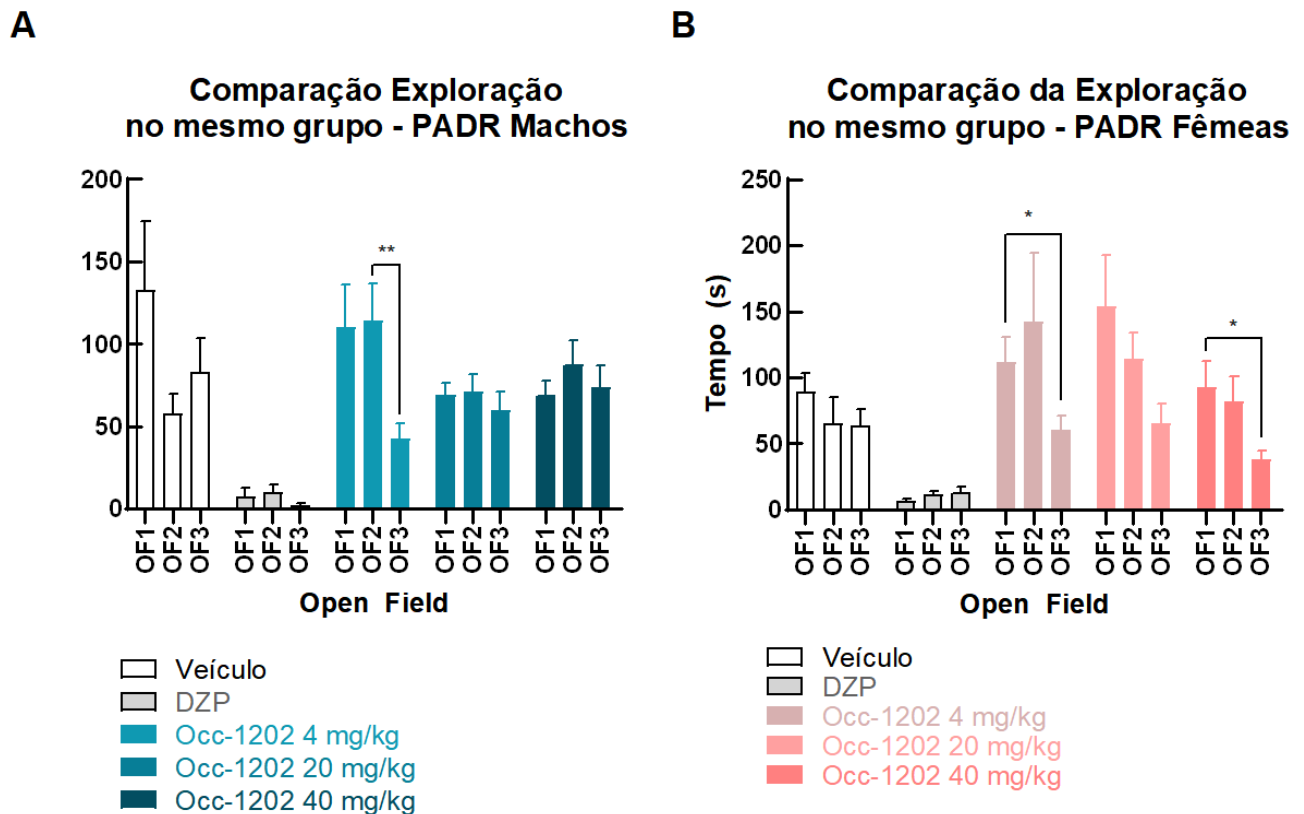
**Figura 20.** Análise do tempo de exploração dos animais em teste de campo aberto (Open Field) no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) \* Veículo =  $P < 0.05$ , \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =

$p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B). \*\*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . n=8 para todos os grupos.



**Figura 21.** Comparação da exploração entre os grupos em teste de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. (\*) Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (A) Open Field 1: \* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.05$ , \*\*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.001$ , \*\*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.001$ . Open Field 2: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.01$ . (B) Open Field 1: \*\* Veículo =  $p < 0.01$ , \*\* Occ-1202 4 mg/kg =  $P < 0.01$ , \* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 2: \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ , \* Occ-1202 40 mg/kg =  $p < 0.05$ . Open Field 3: \* Veículo =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0.05$ , \*\* Occ-1202 20 mg/kg =  $p < 0.01$ . n=8 para todos os grupos.





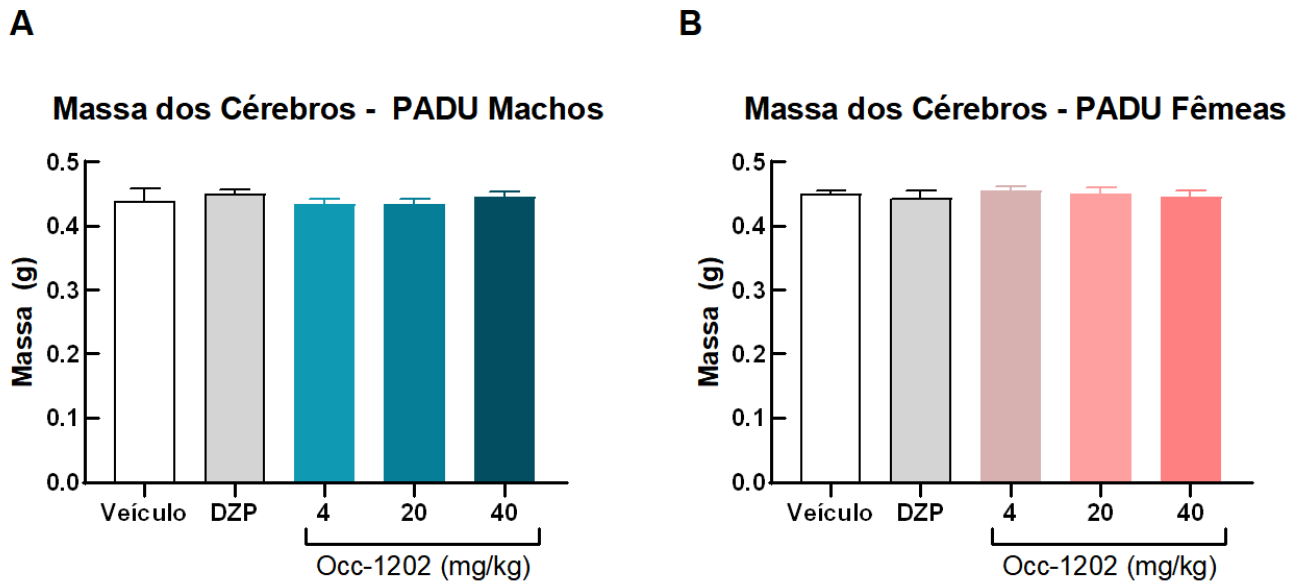
**Figura 22.** Comparação da exploração dentro do mesmo grupo nos testes de campo aberto (Open Field) no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. (\*) Diferenças significativas dentro do mesmo grupo. Diferenças significativas: (A) \*\* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 2 =  $p < 0.01$ . (B) \* Occ-1202 4 mg/kg entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.05$ , \* Occ-1202 40 mg/kg entre os Open Fields 1 e 3 =  $p < 0.05$ .  $n=8$  para todos os grupos.

### 4.3. Massa e Volume dos Órgãos

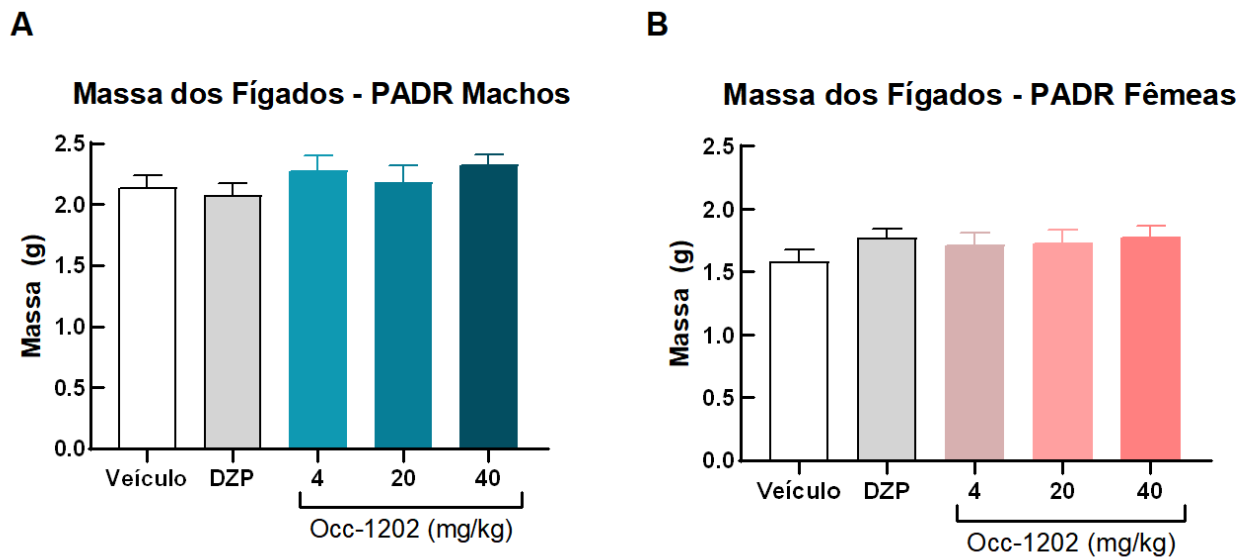
#### 4.3.1. Massa dos órgãos

##### 4.3.1.1. Cérebros

Com relação a massa dos cérebros dos animais, não foram observadas diferenças entre os grupos em ambos os modelos. Os dados sobre a massa (g) dos cérebros dos animais foram submetidos ao teste ANOVA de uma via em machos ( $F_{4, 35} = 0,3549$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 35} = 0,2610$ ;  $p > 0.05$ ) do PADU (Figura 23), e em machos ( $F_{4, 35} = 1,249$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 34} = 1,602$ ;  $p > 0.05$ ) do PADR (Figura 24 A e B, respectivamente).



**Figura 23.** Análise da massa dos cérebros no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=6$  para todos os grupos.

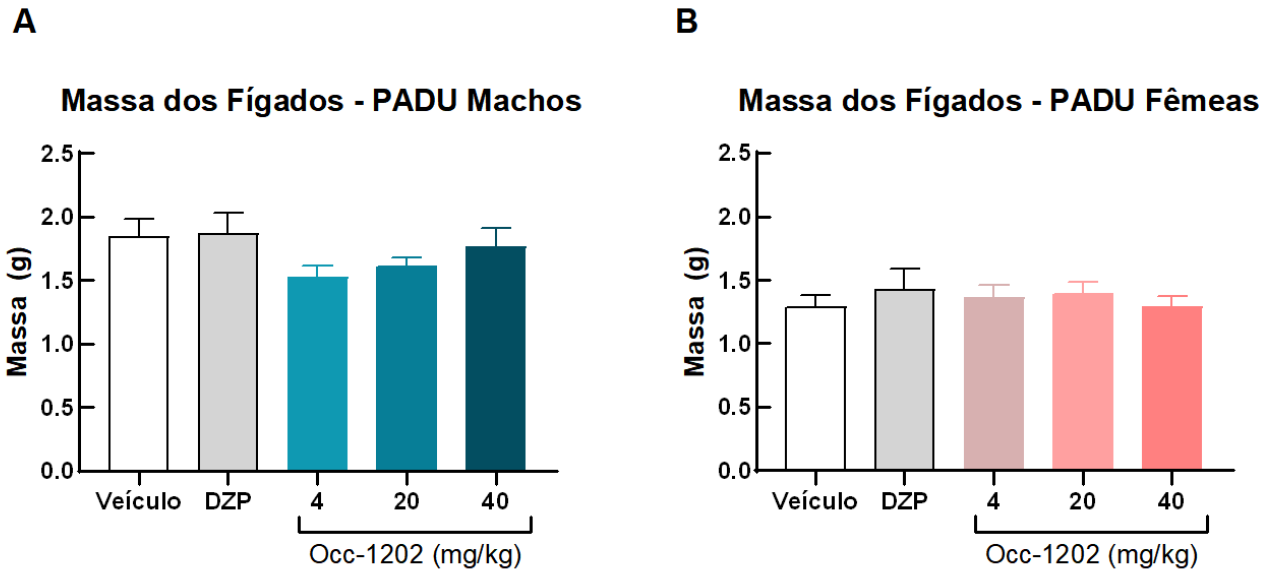


**Figura 24.** Análise da massa dos cérebros no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

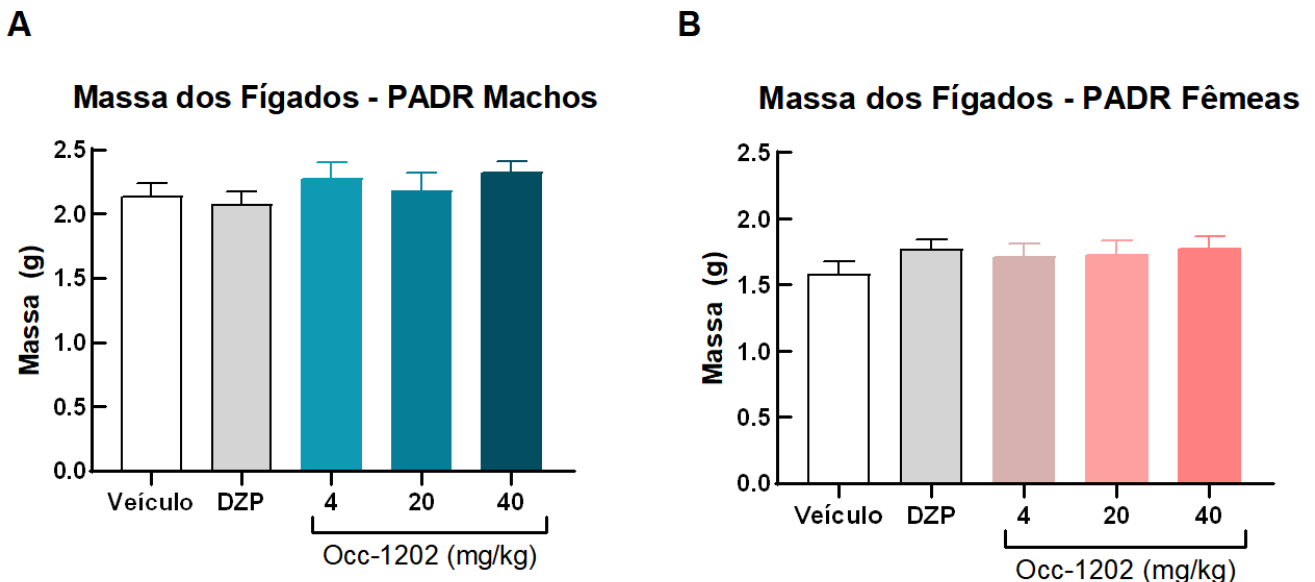
#### 4.3.1.2. Fígados

Quanto à massa dos fígados dos animais, não houve diferenças entre os grupos em ambos os modelos. Os dados sobre as massas (g) dos fígados dos animais foram submetidos ao

teste ANOVA de uma via em machos ( $F_{4,35} = 1,378$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4,35} = 0,3335$ ;  $p > 0.05$ ) do PADU (Figura 23 A e B, respectivamente), e em machos ( $F_{4,35} = 0,8734$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4,34} = 0,7987$ ;  $p > 0.05$ ) do PADR (Figura 25 A e B, respectivamente).



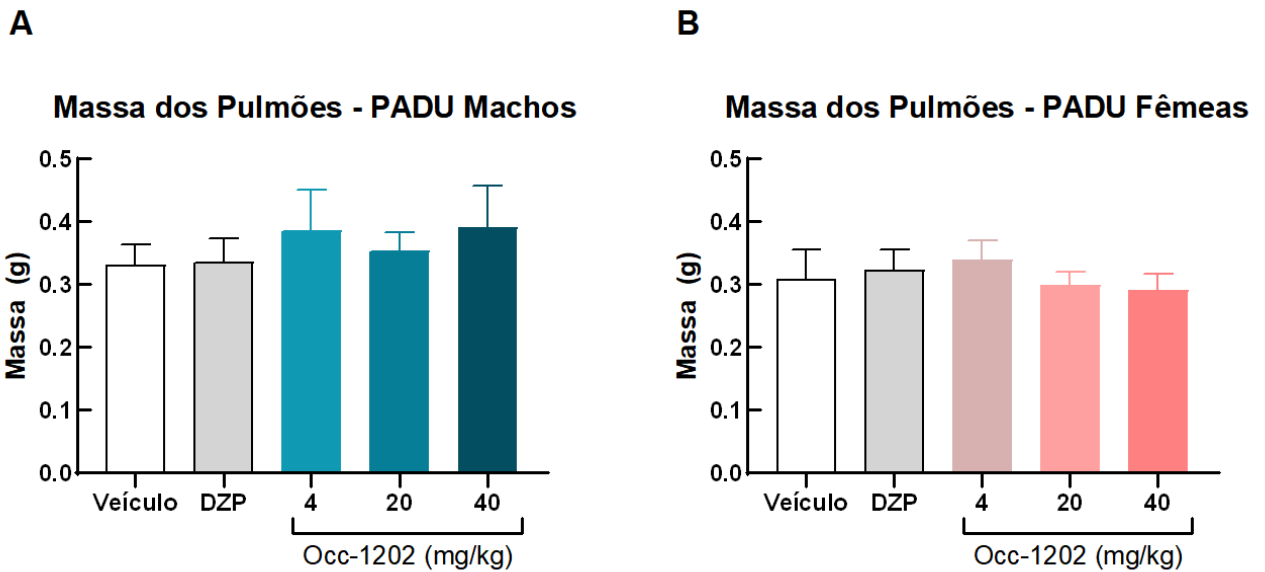
**Figura 25.** Análise da massa dos fígados no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.



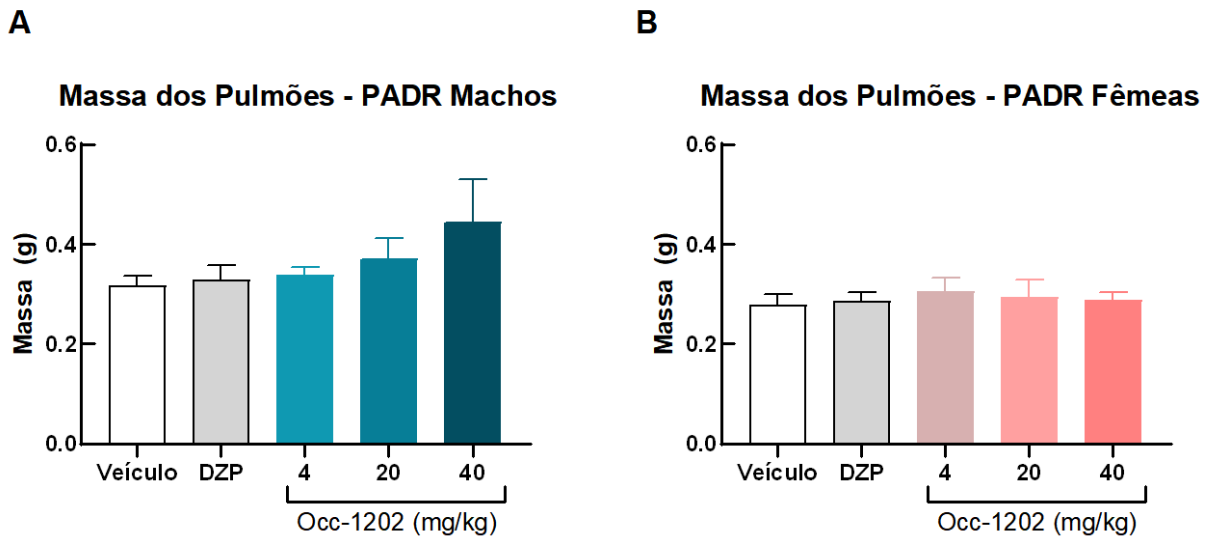
**Figura 26.** Análise da massa dos fígados no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

### 4.3.1.3. Pulmões

Não houve diferenças entre os grupos no que diz respeito à massa dos pulmões, em ambos os modelos. Os dados sobre a massa dos pulmões foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, em machos ( $F_{4,35} = 0,3360$ ;  $p > 0,05$ ) e fêmeas ( $F_{4,35} = 0,3442$ ;  $p > 0,05$ ) do PADU (Figura 27 A e B, respectivamente), e em machos ( $F_{4,35} = 1,233$ ;  $p > 0,05$ ) e fêmeas ( $F_{4,34} = 0,1437$ ;  $p > 0,05$ ) do PADR (Figura 28 A e B, respectivamente).



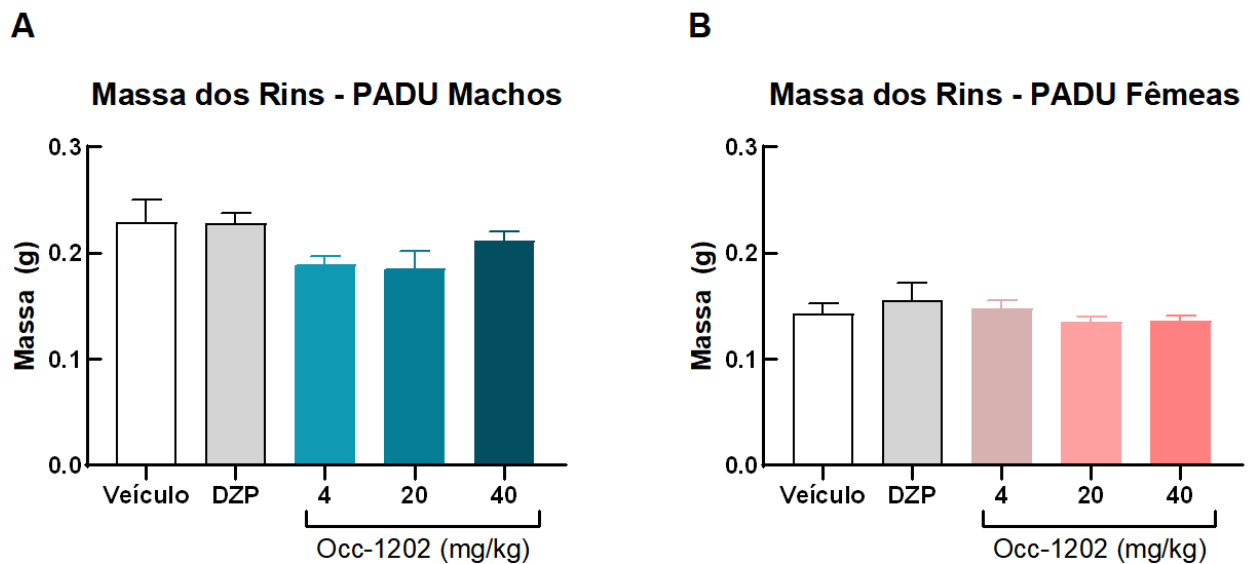
**Figura 27.** Análise da massa dos pulmões no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.



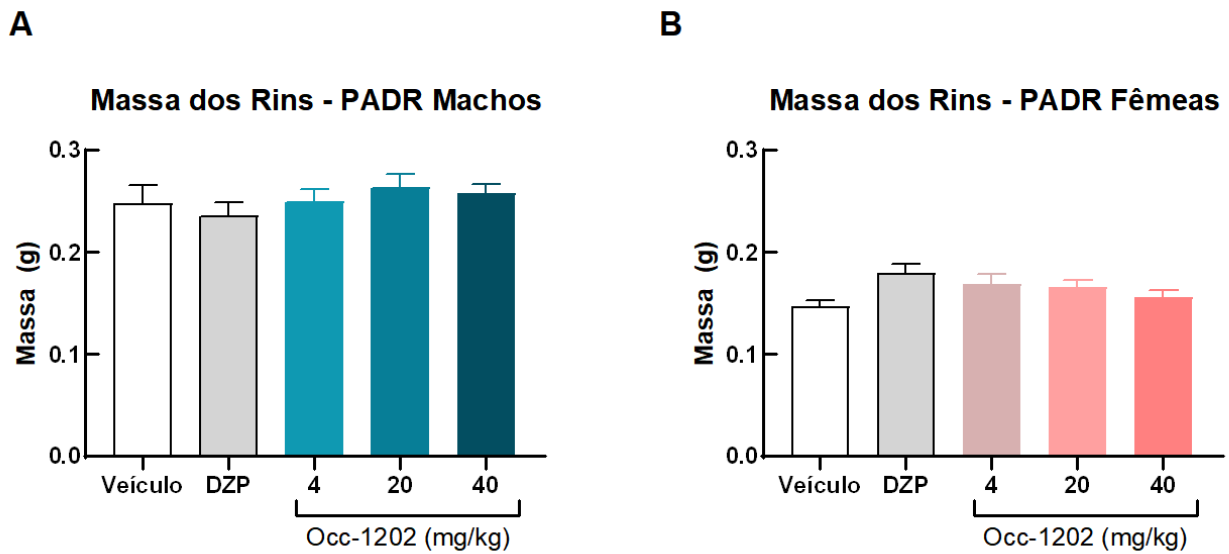
**Figura 28.** Análise da massa dos pulmões no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.3.1.4. Rins

Por fim, não foram observadas diferenças entre os grupos no que diz respeito à massa dos rins, em ambos os modelos. Os dados das massas dos rins foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, em machos ( $F_{4, 35} = 2,113$ ;  $p>0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 35} = 0,6774$ ;  $p>0.05$ ) do PADU (Figura 29 A e B, respectivamente), e em machos ( $F_{4, 35} = 0,6533$ ;  $p>0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 34} = 2,282$ ;  $p>0.05$ ) do PADR (Figura 30 A e B, respectivamente).



**Figura 29.** Análise da massa dos rins no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

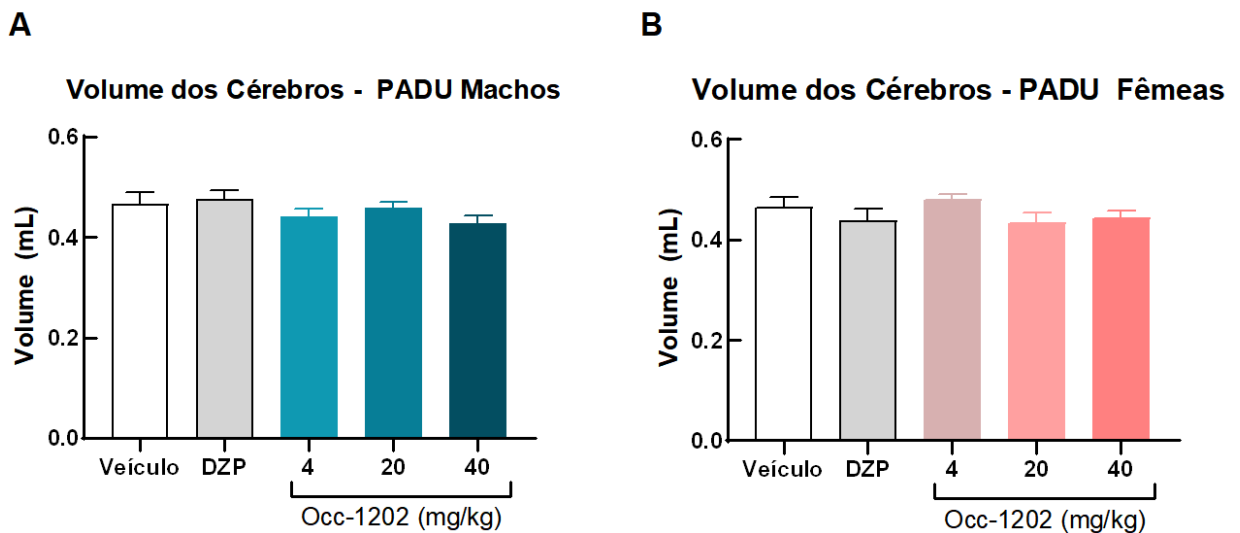


**Figura 30.** Análise da massa dos rins no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n = 8$  para todos os grupos.

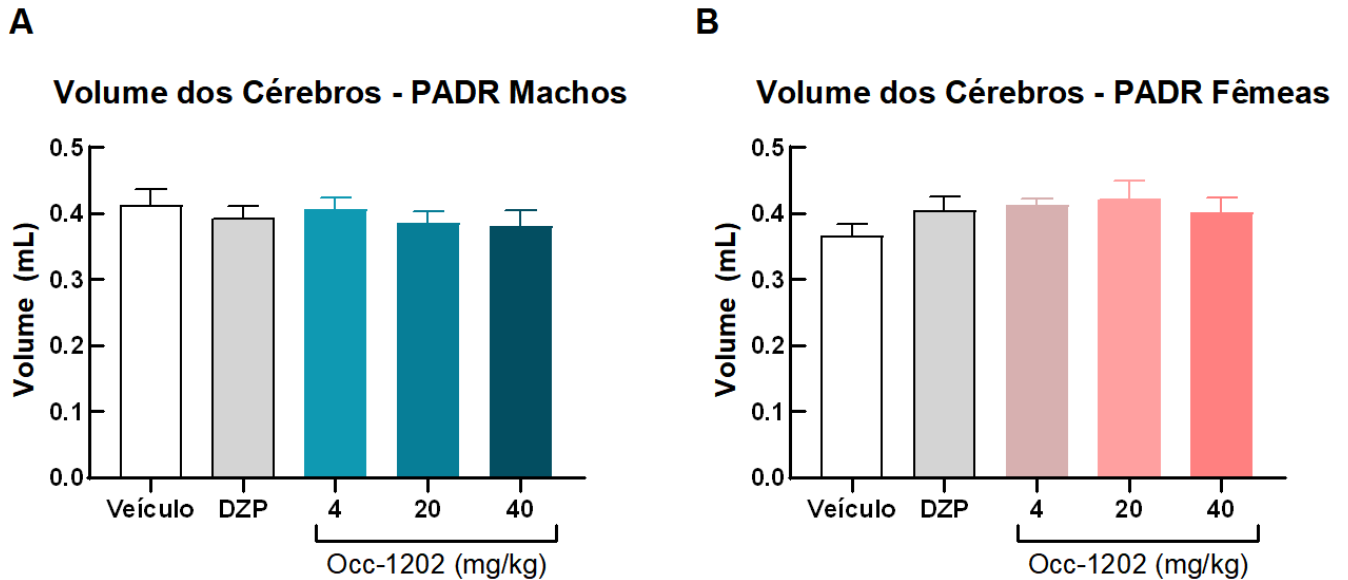
#### 4.3.2. Volume dos órgãos

##### 4.3.2.1. Cérebros

Quanto ao volume dos cérebros, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em ambos os modelos. Os dados dos volumes dos cérebros foram submetidos à ANOVA de uma via no PADU, em machos ( $F_{4, 25} = 1,326$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 24} = 1,264$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 31 A e B, respectivamente) e no PADR, em machos ( $F_{4, 35} = 0,4214$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 34} = 1,051$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 32 A e B, respectivamente).



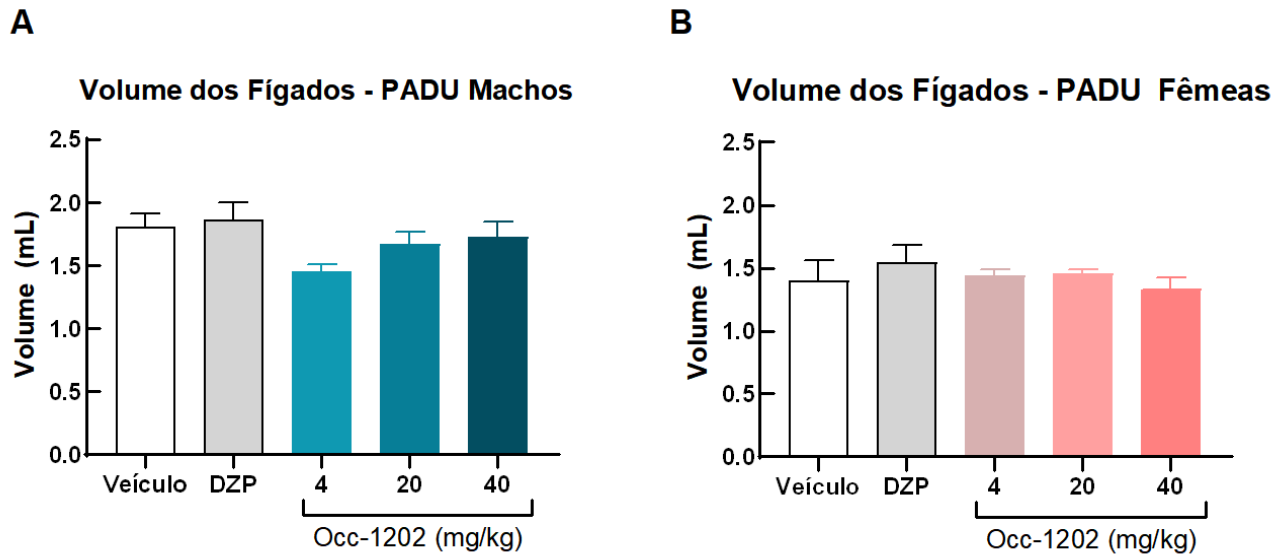
**Figura 31.** Análise do volume dos cérebros no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=6$  para todos os grupos.



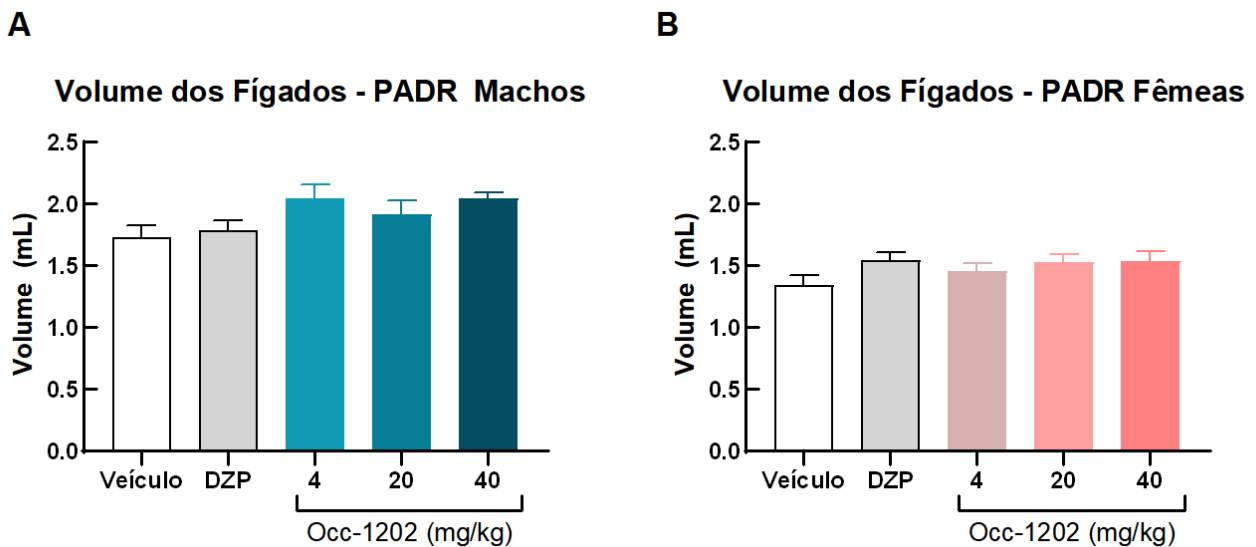
**Figura 32** Análise do volume dos cérebros no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p>0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.3.2.2. Fígados

Quanto ao volume dos fígados, não foram observadas diferenças entre os tratamentos no PADU e no PADR (Figuras 33 A e B; Figura 34 A e B; machos e fêmeas, respectivamente). Os dados sobre os volumes dos fígados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via no PADU, em machos ( $F_{4, 25} = 2,183$ ;  $p>0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 24} = 0,5479$ ;  $p>0.05$ ), e no PADR, em machos ( $F_{4, 35} = 2,404$ ;  $p>0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 34} = 1,325$ ;  $p>0.05$ ).



**Figura 33.** Análise do volume dos fígados no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.



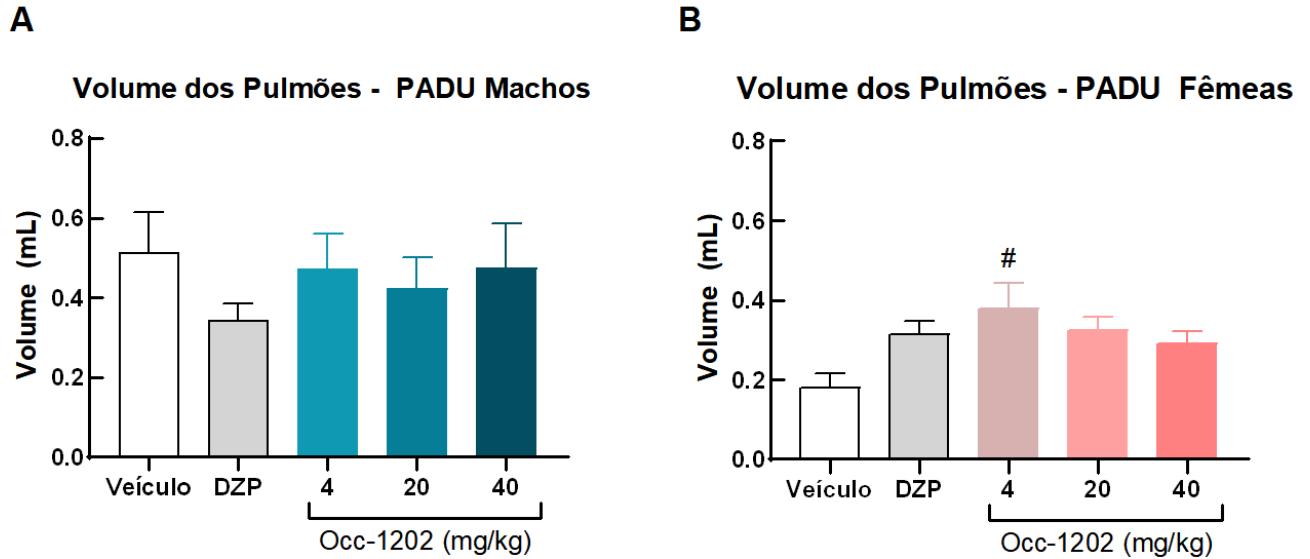
**Figura 34.** Análise do volume dos fígados no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.3.2.3. Pulmões

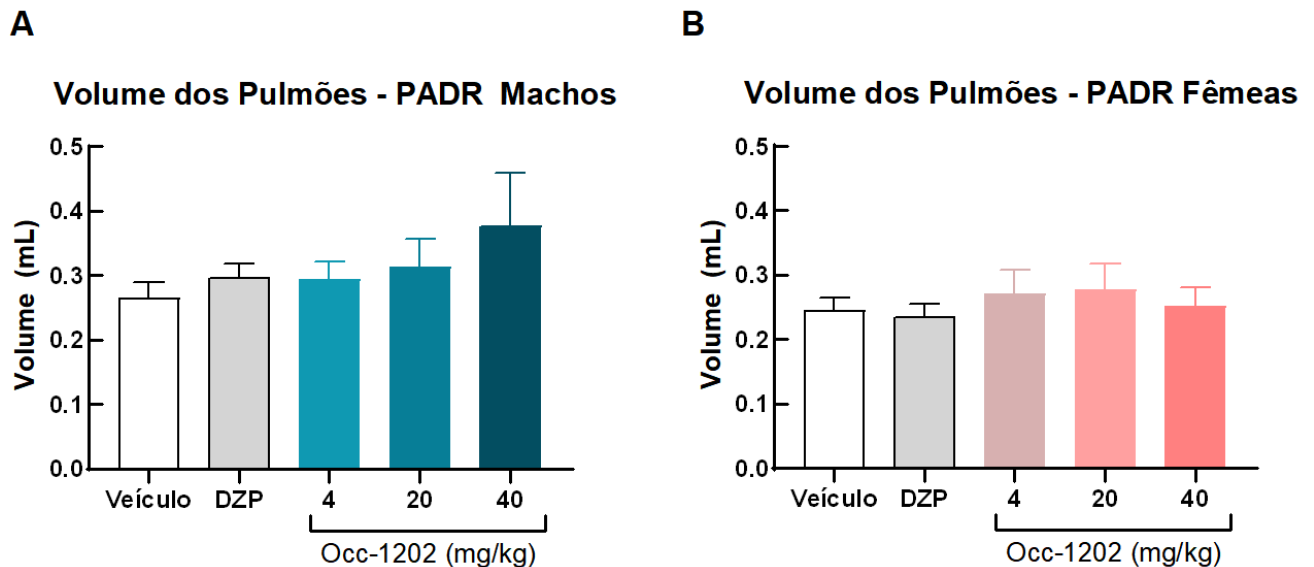
No que diz respeito ao volume dos pulmões, foi observada diferença apenas nas fêmeas do PADU (dose de 4mg/kg) em relação ao grupo veículo. Os dados sobre os volumes dos fígados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via no PADU, em machos ( $F_{4, 25} = 0,5627$ ;  $p > 0.05$ ) e fêmeas ( $F_{4, 24} = 3,035$ ;  $p < 0.05$ ), e no PADR, em machos ( $F_{4, 35} = 0,8161$ ;  $p > 0.05$ ) e



fêmeas ( $F_{4, 34} = 0,3564$ ;  $p > 0,05$ ). Foram observadas diferenças significativas apenas nas fêmeas do PADU ( $p < 0,05$ ) (Figuras 35 A e B; 36 A e B, macho e fêmea, respectivamente).



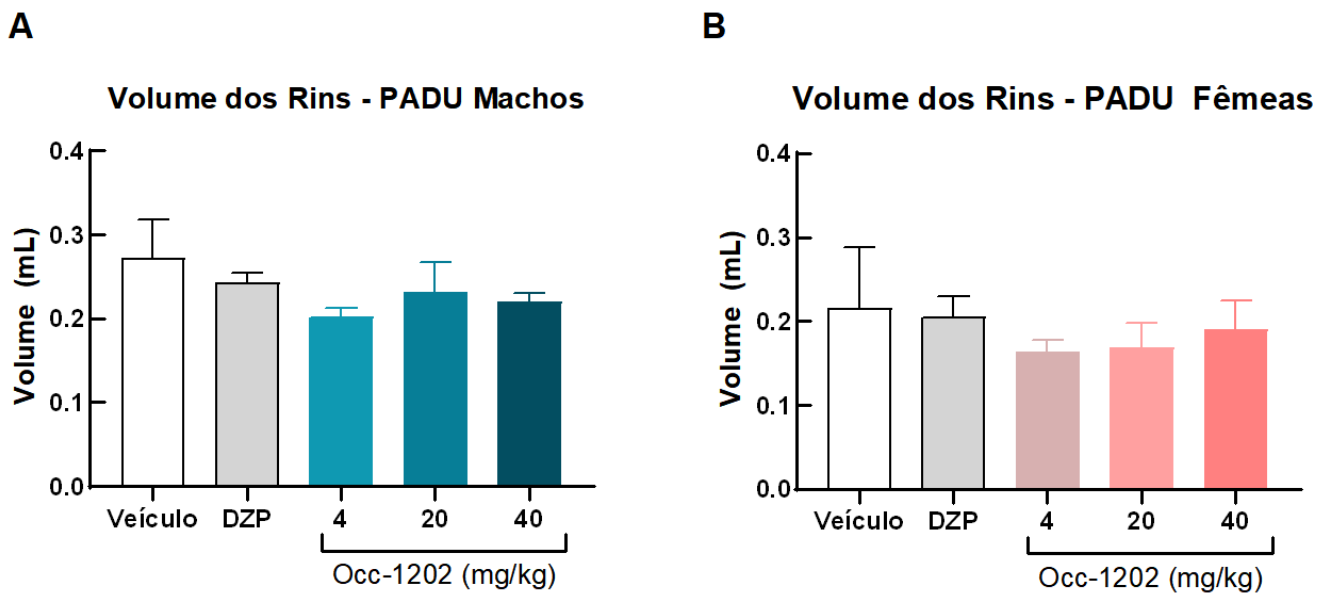
**Figura 35.** Análise do volume dos pulmões no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. (#) Diferenças significativas em relação ao grupo veículo: (B) # Occ-1202 4 mg/kg =  $p < 0,05$ .  $n=8$  para todos os grupos.



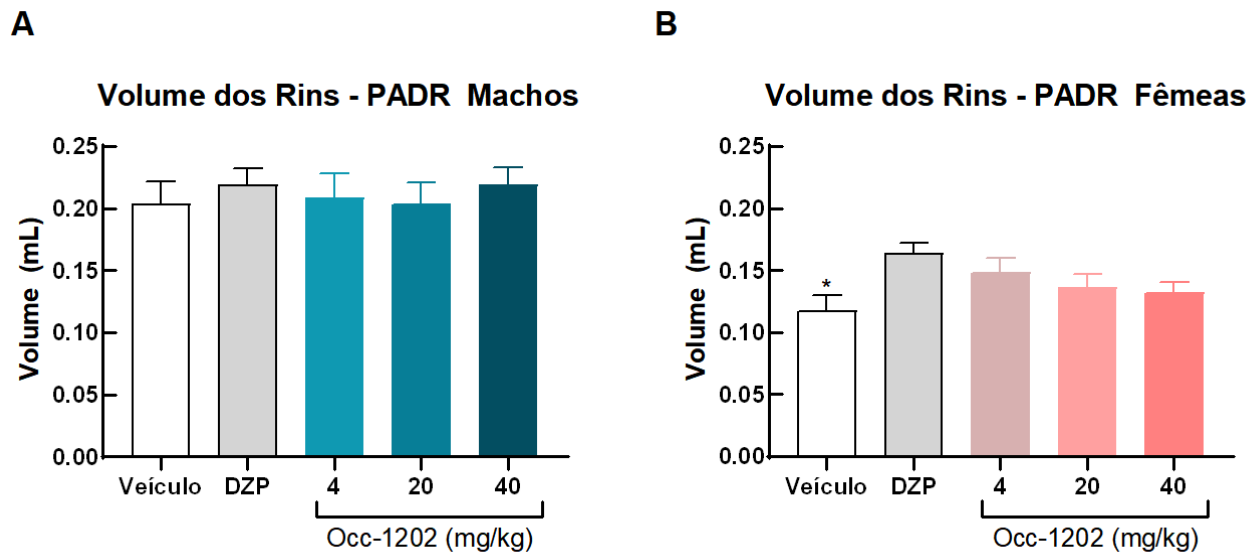
**Figura 36.** Análise do volume dos pulmões no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.

#### 4.3.2.4. Rins

Por fim, no que diz respeito aos dados sobre o volume dos rins, houve diferença significativa nas fêmeas no PADR, com um aumento do volume do Rim no grupo DZP em relação ao grupo veículo. Os dados dos volumes dos rins foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, tanto no PADU, em machos ( $F_{4,25} = 0,9087$ ;  $p > 0.05$ ) e em fêmeas ( $F_{4,24} = 0,3645$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 37 A e B, respectivamente), quanto no PADR, em machos ( $F_{4,35} = 0,2090$ ;  $p > 0.05$ ) e em fêmeas ( $F_{4,34} = 2,927$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 38 A e B, respectivamente).



**Figura 37.** Análise do volume dos rins no PADU em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0.05$ ).  $n=8$  para todos os grupos.



**Figura 38.** Análise do volume dos rins no PADR em (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao DZP. Diferenças significativas: (B) \* Veículo =  $p < 0.05$ .  $n = 8$  para todos os grupos.

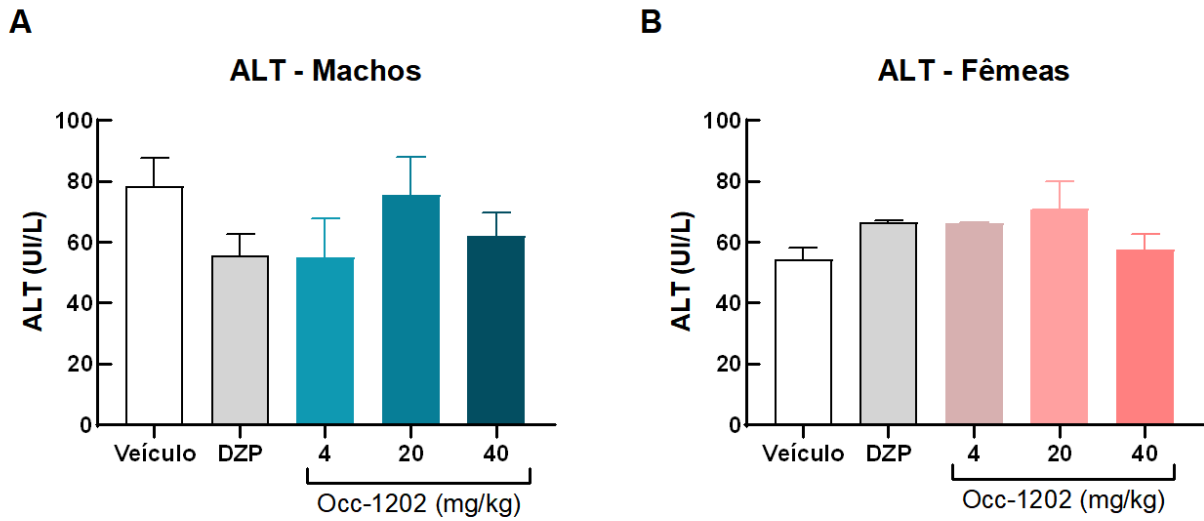
#### 4.4. Análise Bioquímica e Hematológica

##### 4.4.1. Análises Bioquímicas

Foram realizadas análises bioquímicas nas amostras de sangue coletadas dos animais no PADR. Os parâmetros analisados foram ALT, AST, Uréia e Creatinina.

##### 4.4.1.1. ALT

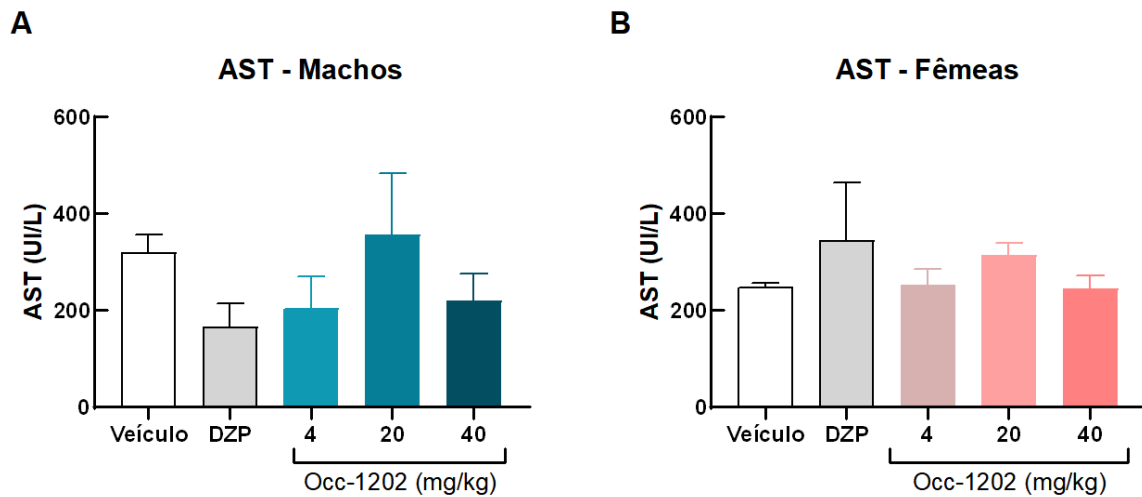
Não foram constatadas diferenças significativas nos níveis de ALT entre nos grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Os dados obtidos sobre os níveis de ALT foram submetidos à ANOVA de uma via para os machos ( $F_{4,13} = 1,313$ ;  $p > 0.05$ ) e para as fêmeas ( $F_{4,9} = 1,562$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 39 A e B, respectivamente).



**Figura 39.** Avaliação dos níveis de ALT no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

#### 4.4.1.2. AST

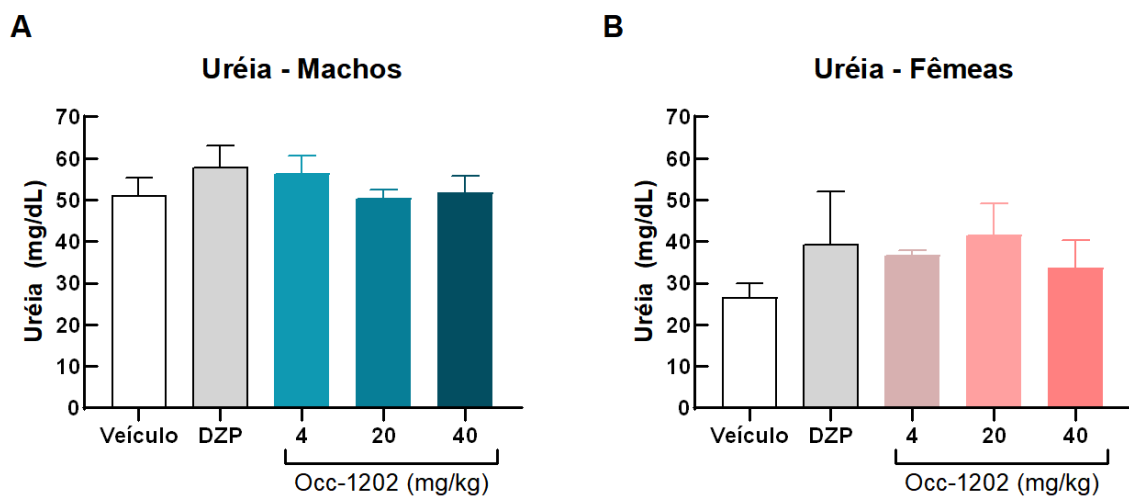
Quanto aos níveis de AST, não foram constatadas diferenças significativas entre nos grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Os dados obtidos sobre os níveis de ALT foram submetidos à ANOVA de uma via para os machos ( $F_{4, 13} = 1,458$ ;  $p > 0.05$ ) e para as fêmeas ( $F_{4, 9} = 0,5486$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura 40 A e B, respectivamente).



**Figura 40.** Avaliação dos níveis de AST no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $P > 0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

#### 4.4.1.3. Ureia

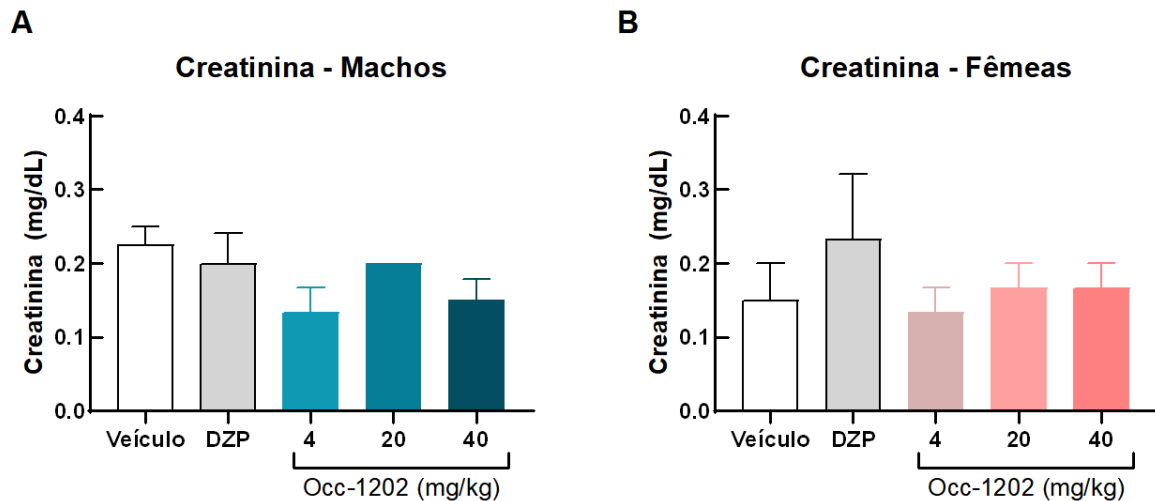
No que diz respeito aos níveis de Ureia, não foram constatadas diferenças entre os grupos. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via nos machos ( $F_{4, 13} = 0,6515$ ;  $p > 0.05$ ) e nas fêmeas ( $F_{4, 9} = 0,4586$ ;  $p > 0.05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em ambos os sexos ( $p > 0.05$ ) (Figura 41 A e B, respectivamente).



**Figura 41.** Avaliação dos níveis de Uréia no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p>0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

#### 4.4.1.4. Creatinina

Por fim, os dados sobre os níveis de creatinina não apresentaram diferença entre os grupos. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de uma via nos machos ( $F_{4,13} = 1,533$ ;  $p>0.05$ ) e nas fêmeas ( $F_{4,9} = 0,5307$ ;  $p>0.05$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em ambos os sexos ( $p>0.05$ ) (Figura 42 A e B, respectivamente).



**Figura 42.** Avaliação dos níveis de Creatinina no PADR (A) Machos e (B) Fêmeas. Análise estatística ANOVA de uma via. Não houve diferenças significativas ( $p>0.05$ ). (A)  $n=4$  para Veículo, DZP e Occ-1202 40 mg/kg;  $n=3$  para Occ-1202 4 mg/kg e Occ-1202 20 mg/kg. (B)  $n=3$  para todos os grupos, exceto veículo ( $n=2$ ).

Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os grupos nos diferentes parâmetros bioquímicos analisados, quando comparados aos valores de referência obtidos na literatura, é possível observar dados destoantes das médias e dos intervalos citados nas referências. Nos machos, ALT, AST e Ureia apresentaram dados que se enquadram nos valores de referência em todos os grupos. No entanto, todos os grupos apresentaram valores de creatinina menores do que os valores de referência (Tabela 2).

Nas fêmeas, todos os grupos, exceto veículo, apresentaram valores de ALT em conformidade com os dados de referência, sendo os valores do grupo veículo inferiores. Nas

observações dos níveis de AST, apenas o grupo Occ-1202 20 mg/kg apresentou valores diferentes (maiores) dos dados de referência, estando os demais grupos de acordo com os valores referentes. Quanto aos níveis de Ureia, o grupo controle apresentou valores inferiores aos de referência, não havendo diferenças nos demais grupos. Por fim, todos os grupos apresentaram valores de creatinina inferiores aos valores de referência (Tabela 3).

**Tabela 2** - Parâmetros bioquímicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para machos.

	<b>Veículo</b>	<b>DZP</b>	<b>Occ-1202 4 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 20 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 40 mg/kg</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>ALT (UI/L)</b>	78,25±18,4	55,5±14,2	54,7±22,6	75,3±21,9	61,75±15,6	62,0±4,0
<b>AST (UI/L)</b>	319,5±74,6	165±97,1	203±117	356,3±220	219,75±111	277,0±18,0
<b>Uréia (mg/dL)</b>	51±8,5	58±10,0	56,3±7,6	50,3±3,8	51,75±8,1	47,0±4,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,225±0,1	0,2±0,1	0,13±0,1	0,2±0,0	0,15±0,1	0,4±0,0

(Castello Branco, 2011; LIMA, 2018; Santos et al., 2016).

**Tabela 3** - Parâmetros bioquímicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para fêmeas.

	<b>Veículo</b>	<b>DZP</b>	<b>Occ-1202 4 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 20 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 40 mg/kg</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>ALT (UI/L)</b>	54±5,7	66,3±1,5	66±1	70,7±15,9	57,3±9,1	70,6±4,5
<b>AST (UI/L)</b>	249±11,3	345±205,3	251±58,6	314±42,5	244,3±48,4	234,0±7,6
<b>Uréia (mg/dL)</b>	26,5±4,9	39,3±21,9	36,7±2,1	41,7±13,1	33,7±11,6	35,0±1,3
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,15±0,1	0,23±0,15	0,13±0,1	0,17±0,1	0,17±0,1	0,4±0,0

(Castello Branco, 2011; LIMA, 2018; Santos et al., 2016).

#### 4.4.2. Hematotoxicidade

Para avaliação da hematotoxicidade, foi feita a análise do sangue coletado (hemograma) para avaliação de hematócritos (HCT), hemácias, hemoglobina (Hb), leucócitos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e volume plaquetário (Tabela 4 e 5, machos e fêmeas, respectivamente).

Os dados foram comparados com dados provenientes de biotérios de outras universidades para avaliação dos parâmetros. Desta forma, os machos do grupo Occ-1202 4 mg/kg apresentaram leves alterações no HCT e nos Leucócitos, quando comparado aos valores de referência. Todos os machos avaliados apresentaram alterações nos monócitos. Ainda, os animais do grupo Occ-1202 40 mg/kg apresentaram porcentagem de segmentados alterada quando comparado aos valores de referências (Tabela 4).

Nas fêmeas, o animal do grupo veículo apresentou leves alterações em relação à porcentagem de HCT, quando comparado aos valores de referência. Todos os animais apresentaram valores levemente mais altos de hemoglobina, leucócitos, linfócitos e plaquetas em relação aos valores de referência. Com relação aos monócitos, todos os animais, exceto o do grupo veículo, exibiram alterações quando comparados aos valores de referência, especialmente o animal que recebeu a dose intermediária do peptídeo (20 mg/kg). Por fim, os animais dos grupos tratados com o peptídeo apresentaram um aumento na porcentagem de eosinófilos em comparação aos valores de referência (Tabela 5).

**Tabela 4** - Parâmetros hematológicos obtidos após os tratamentos e valores de referência para camundongos Swiss machos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Veículo</b>	<b>Occ-1202 4 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 40 mg/kg</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>HCT (%)</b>	42,1	47,1	41,4	39 ± 1,40
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	9,53	10,79	8,76	9,19 ± 3,35
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	14,7	16,6	14,5	15 ± 3,6
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	7,13	10,42	5,68	7,74 ± 2,95
<b>Monócitos (%)</b>	6,6	12,4	7,1	2,84 ± 1,03



<b>Linfócitos (%)</b>	76,6	72,5	64	68,00 ± 8,36
<b>Segmentados (%)</b>	14,3	12,6	25,1	13.7 ± 4.5
<b>Eosinófilos (%)</b>	2,5	2,5	3,7	2,12 ± 1,09
<b>Basófilos (%)</b>	0	0	0,1	0
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	1498	1341	1537	1419,4±186,6

(Castello Branco, 2011; LIMA, 2018; Santos et al., 2016)

**Tabela 5** - Parâmetros hematológicos obtidos após o tratamento e valores de referência para camundongos Swiss para fêmeas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Veículo</b>	<b>DZP</b>	<b>Occ-1202 4 mg/kg</b>	<b>Occ-1202 20 mg/kg</b>	<b>Valores de Referência</b>
<b>HCT (%)</b>	43,8	39,2	38,1	38,3	38,44 ± 3,93
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	9,48	8,49	8,66	8,1	7,3 ± 2,01
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	15,4	14,5	14,1	13,7	11,85 ± 1,56
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	7,98	8,72	8,72	7,53	5,8 ± 0,5
<b>Monócitos (%)</b>	3,4	4,8	3,8	12,4	2,68 ± 1
<b>Linfócitos (%)</b>	84,7	79	79,1	61,1	71,76 ± 5,9
<b>Segmentados (%)</b>	9,9	13	12	19,2	VNI*
<b>Eosinófilos (%)</b>	2	3,2	5	7,3	2,16 ± 1,71
<b>Basófilos (%)</b>	0	0	0,1	0	0
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	1304	1585	1319	1212	1030± 55

\*VNI = valor não informado

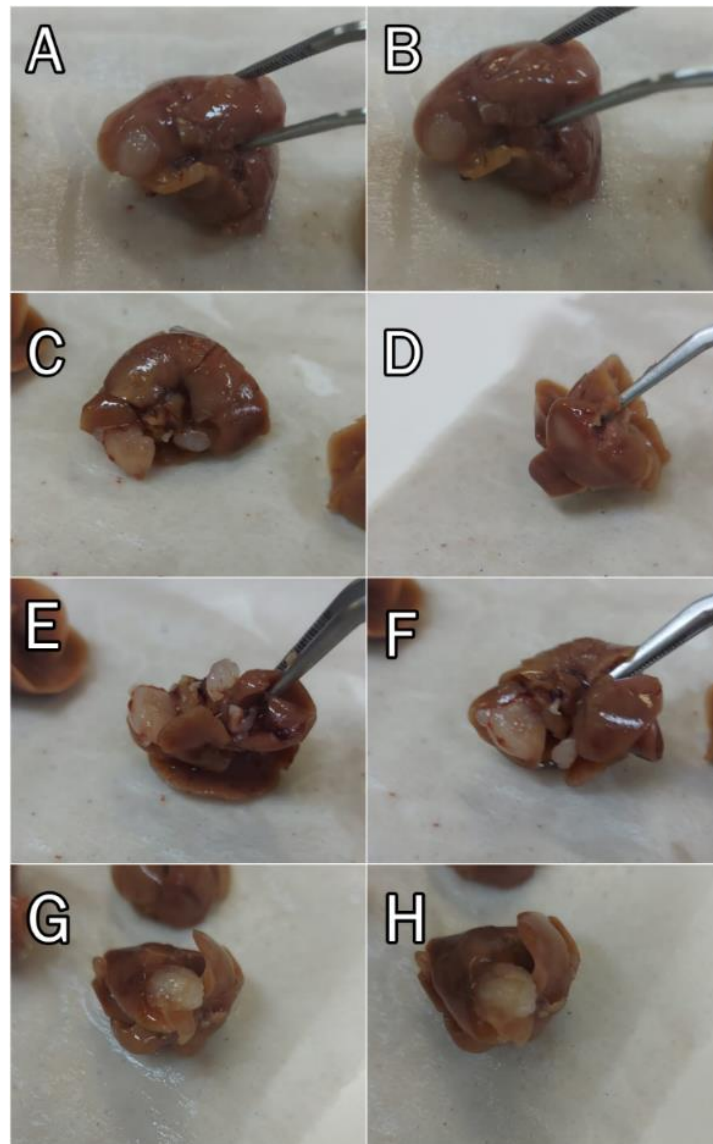
(Castello Branco, 2011; LIMA, 2018; Santos et al., 2016).

#### 4.5. Análises Histopatológicas

Após os ensaios comportamentais, os animais tiveram os cérebros, fígados, pulmões e rins coletados para análises histopatológicas. Fatias histológicas (50  $\mu$ M) foram obtidas em criostato, as lâminas histológicas foram montadas e submetidas à coloração de H.E. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico, não sendo observadas alterações nas lâminas quando comparadas aos grupos veículo, em cada órgão.

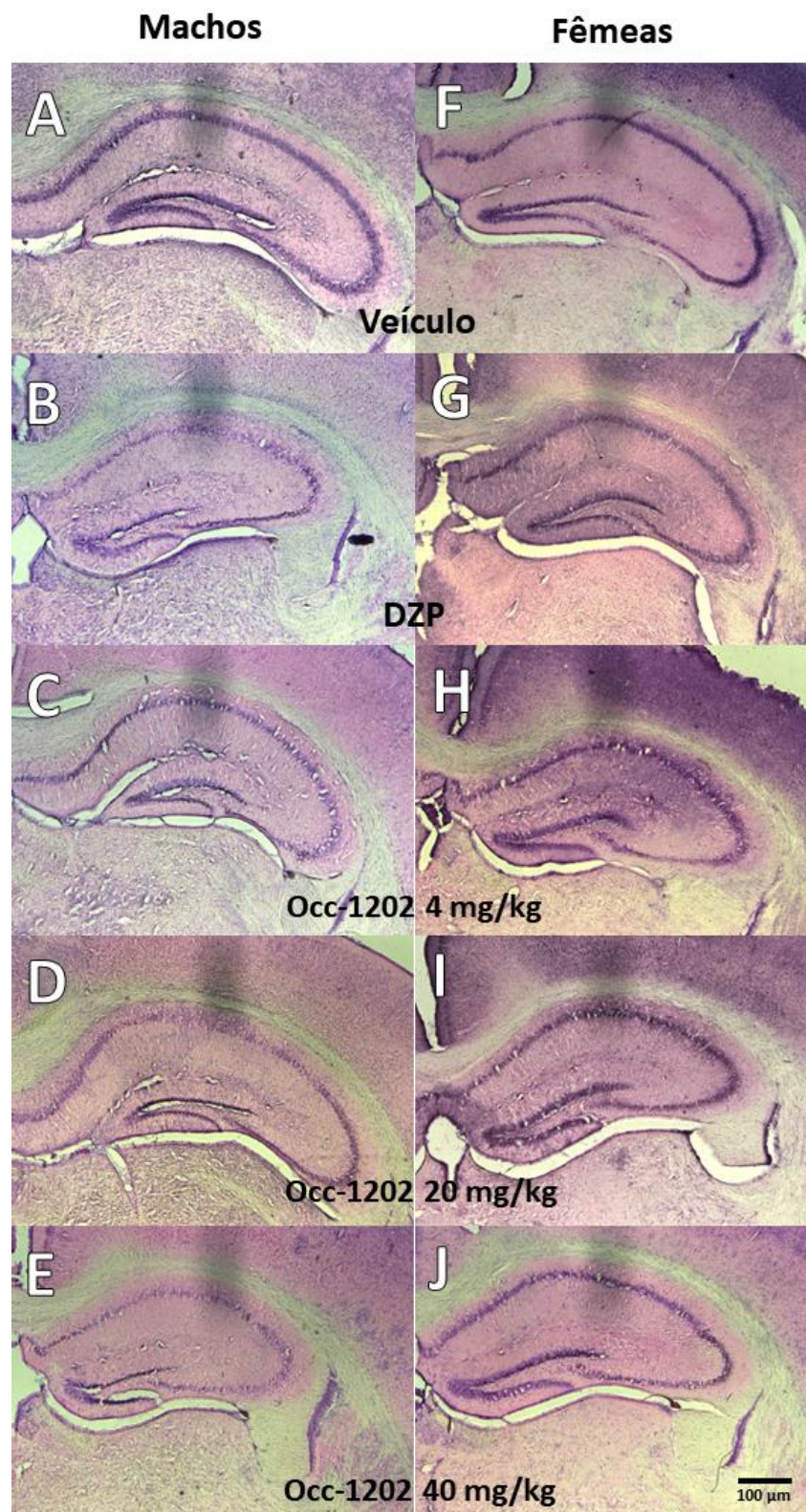
Vale ressaltar que foram montadas aproximadamente 700 lâminas, das quais foram obtidas cerca de 6.300 fotos. Todas as lâminas e fotografias foram analisadas qualitativa e descritivamente, para detectar ausência e presença de alterações morfológicas, bem como quais alterações estariam presentes. Não foram observadas nenhuma alteração morfológica e estrutural em decorrência dos tratamentos, quando comparados ao grupo controle (veículo). Ademais, é possível observar uma pequena mancha em todas as fotografias, decorrentes de uma sombra na lente do microscópio utilizado.

No entanto, apesar de não terem sido observadas diferenças na análise das lâminas histopatológicas, foram observadas alterações morfológicas nos fígados dos animais que receberam tratamento com a dose intermediária (20 mg/kg) e mais alta (40 mg/kg) do peptídeo no PADR. Estas alterações foram observadas em 37,5% das fêmeas e 25% dos machos tratados com a dose intermediária do peptídeo; e em 37,5% das fêmeas e 50% dos machos tratados com a dose mais alta de Occ-1202 (Figura 43 A - H). Mediante consulta com o patologista Prof. Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana (Hospital Veterinário da Universidade de Brasília), foi identificado que estas alterações aparentemente se tratavam de neoplasias de caráter lipídico (lipomas).

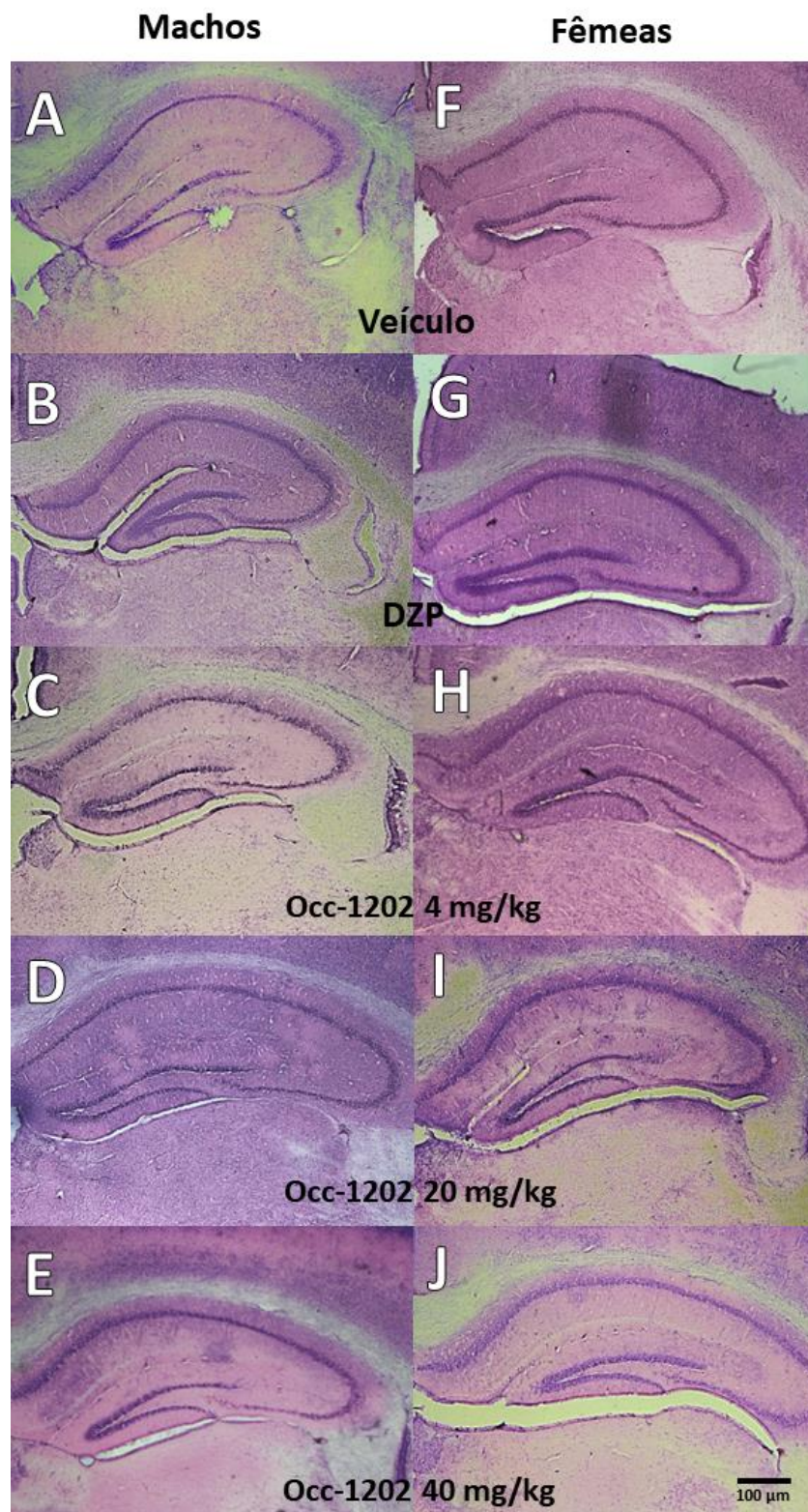


**Figura 43.** Imagens representativas das alterações observadas nos fígados extraídos dos animais que receberam dose intermediária (20 mg/kg) e dose mais alta (40 mg/kg) do peptídeo Occ-1202 no PADR. A e B: Fêmeas Occ-1202 20 mg/kg (n=3). C e D: Machos Occ-1202 20 mg/kg (n=2). E e F: Fêmeas Occ-1202 40 mg/kg (n=3). G e H: Machos Occ-1202 40 mg/kg (n=4).

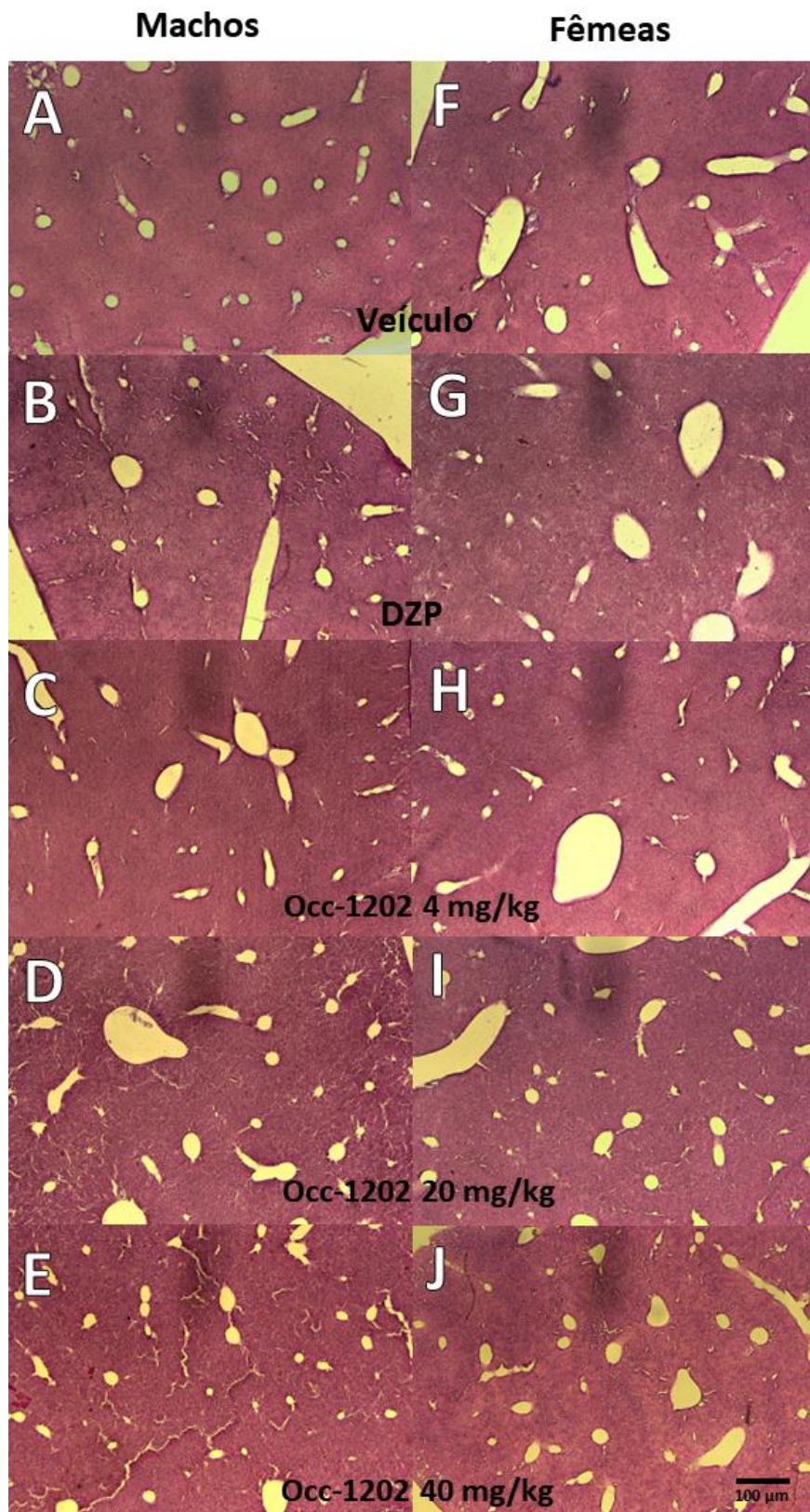
Abaixo, estão fotografias representativas de cada órgão em cada grupo dos modelos agudo e crônico, em ambos os sexos (Figuras 44 a 51; A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg).



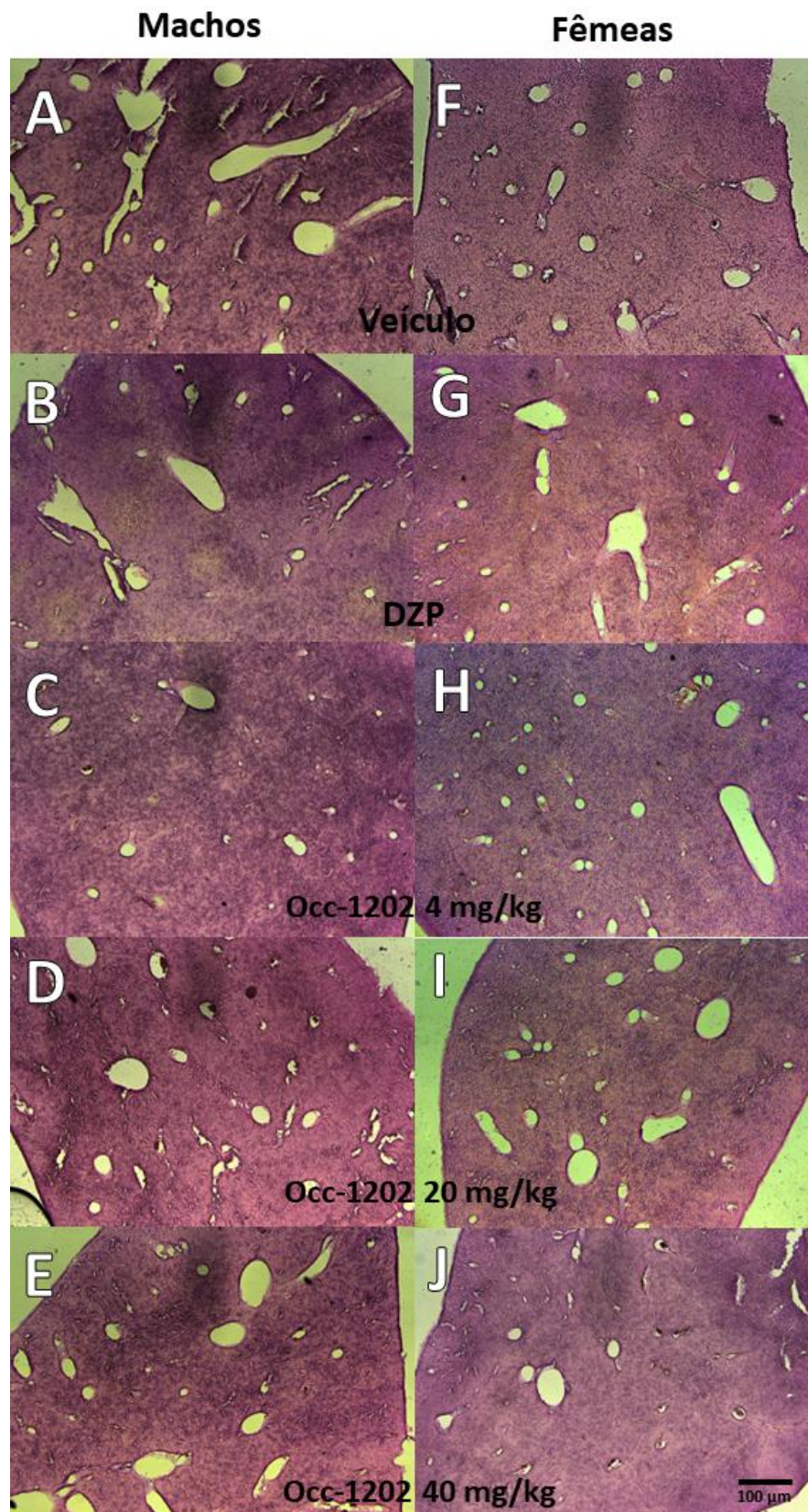
**Figura 44.** Imagens das secções coronais (50 $\mu$ m) da formação hipocampal (aumento de 10x) no PADU, mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações. n=6 para todos os grupos.



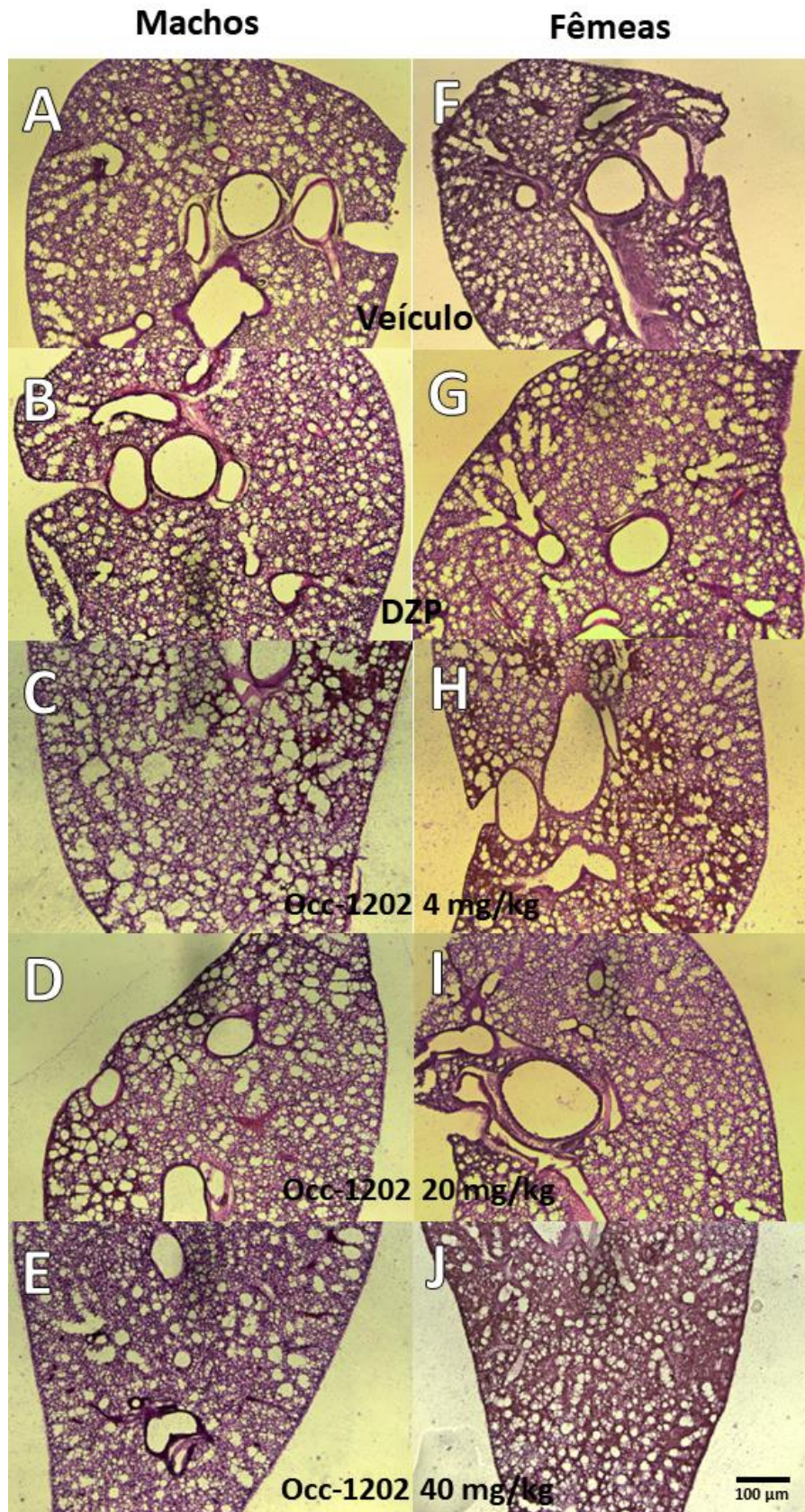
**Figura 45.** Imagens das secções coronais (50 $\mu$ m) da formação hipocampal de camundongos (aumento de 10x) no PADR, mostrando a organização das camadas celulares, submetidas à técnica de coloração de H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações. n=8 para todos os grupos.



**Figura 46.** Imagens das secções dos fígados (50  $\mu\text{m}$ ) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.



**Figura 47.** Imagens das secções dos fígados (50  $\mu\text{m}$ ) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos. n=8 para todos os grupos.

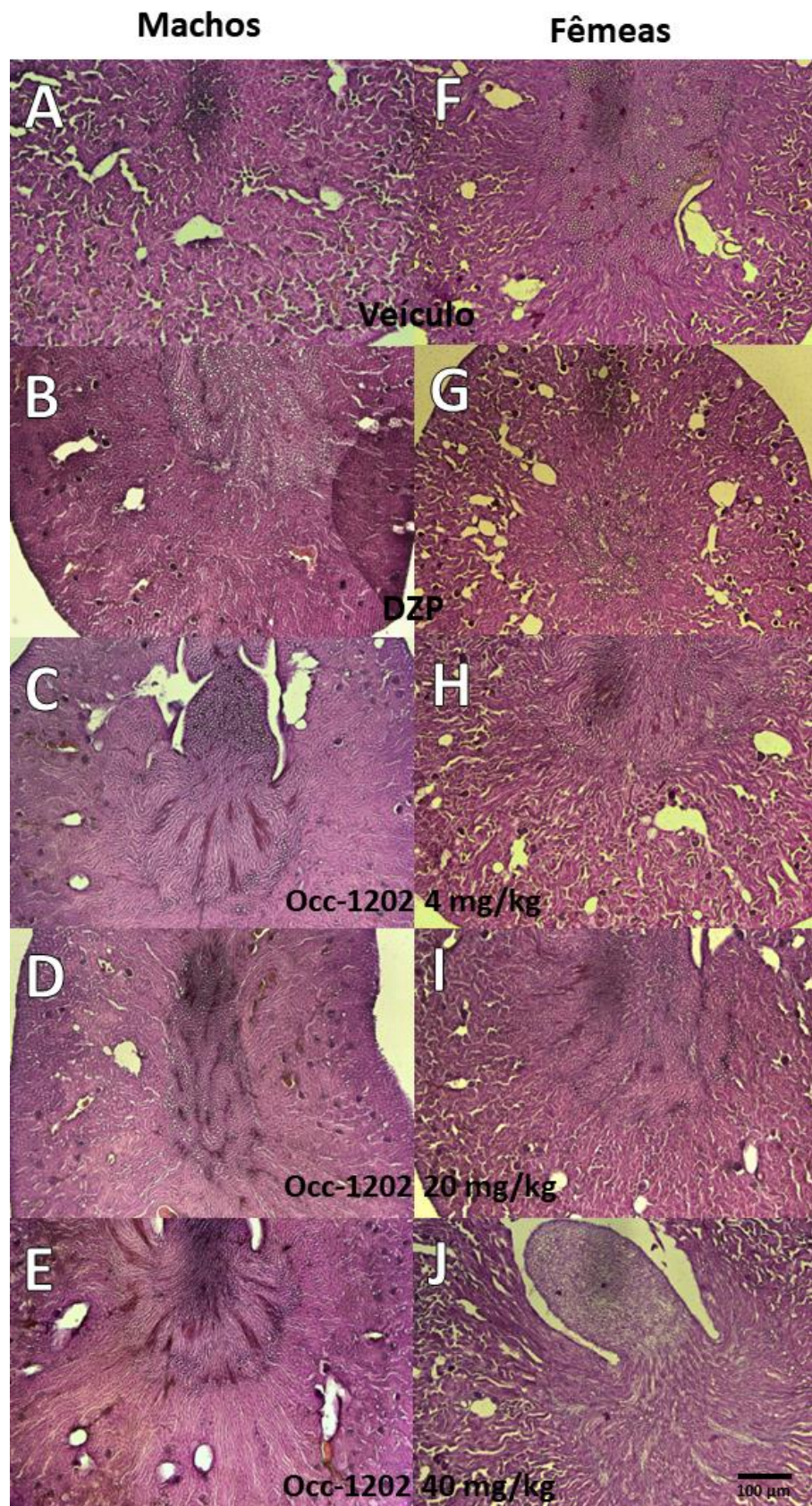


**Figura 48.** Imagens das secções dos pulmões (50  $\mu\text{m}$ ) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

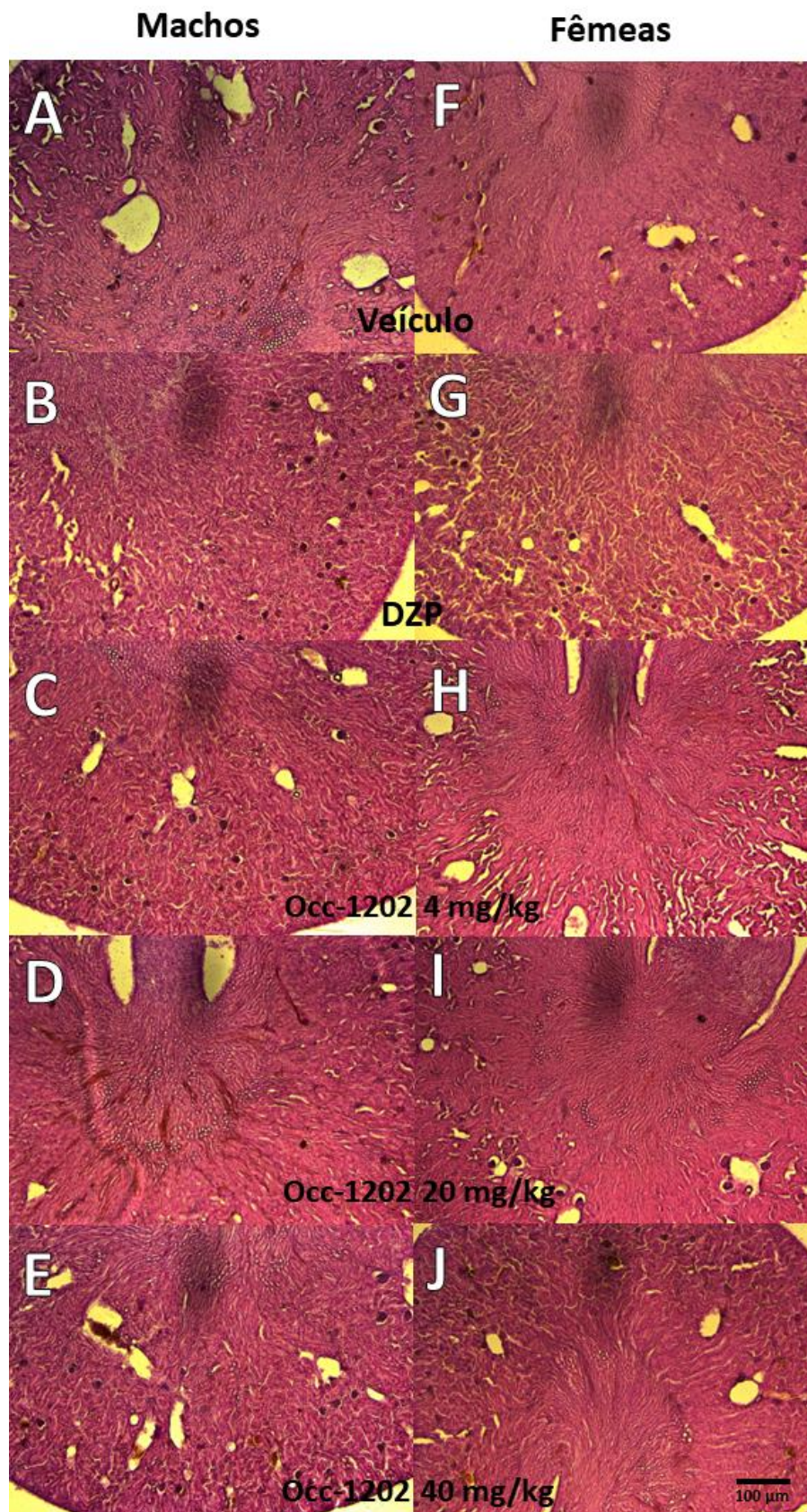




**Figura 49.** Imagens das secções dos pulmões (50  $\mu\text{m}$ ) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.



**Figura 50.** Imagens das secções dos rins (50  $\mu\text{m}$ ) no PADU (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.



**Figura 51.** Imagens das secções dos rins (50  $\mu\text{m}$ ) no PADR (aumento de 10x), submetidas à coloração H.E. A-E: machos. F-J: fêmeas. A e F: veículo. B e G: DZP. C e H: Occ-1202 4 mg/kg. D e I: Occ-1202 20 mg/kg. E e J: Occ-1202 40 mg/kg. Não foram observadas alterações nas lâminas. n=8 para todos os grupos.

#### **4.6. Quantificação de Proteínas**

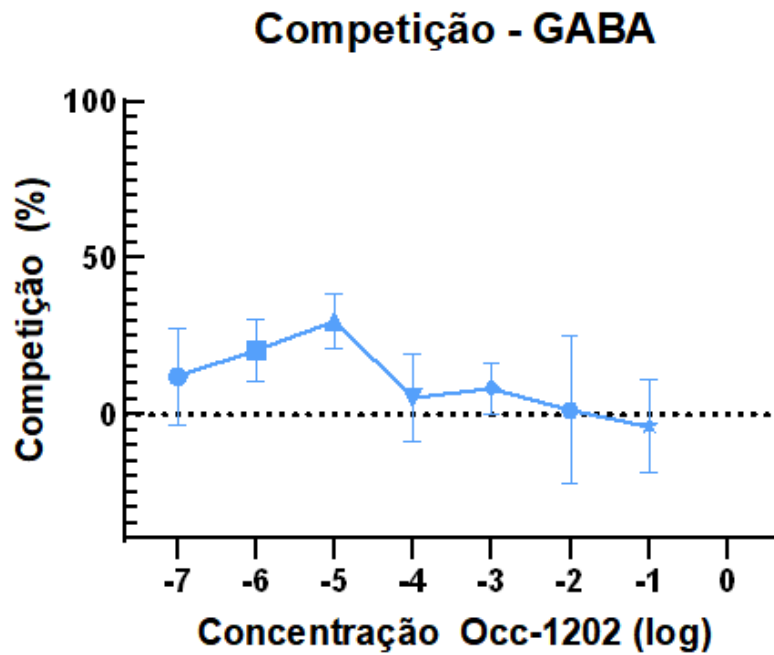
Foram obtidos, mediante leitura a 562nm em espectrômetro, cerca de 2360 µg/mL de proteína provenientes das amostras não diluídas de sinaptossoma, sendo suficientes para serem utilizadas nos ensaios de competição com radioligantes, que requerem cerca de 100 µg totais de proteína por poço (Campos, 2020).

#### **4.7. Identificação do alvo farmacológico por ensaio de competição com radioativos**

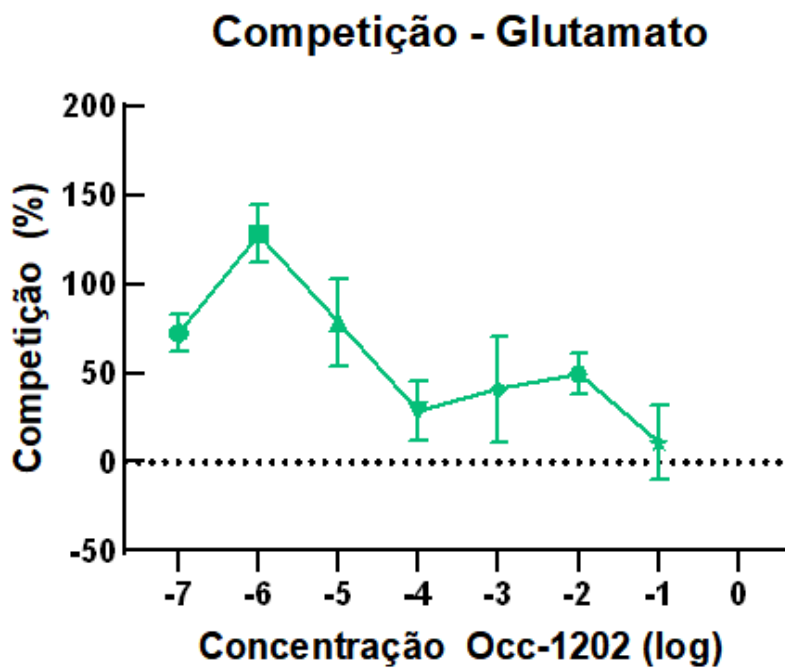
Para se avaliar possíveis alvos farmacológicos do peptídeo, foram realizados ensaios de competição com neurotransmissores (GABA e Glutamato) marcados com trício, um isótopo radioativo de hidrogênio.

Para avaliar a competição entre a Occidentalina-1202 e o neurotransmissor GABA foram realizados três ensaios independentes, em triplicata (Figura 52), em 7 concentrações diferentes do peptídeo. O resultado indicou não haver competição entre os dois, dado que as diferentes concentrações de Occ-1202 alteraram minimamente a ligação entre o GABA marcado radioativamente e os receptores sinaptossomais.

Diferentemente dos dados obtidos nos ensaios de competição com GABA, o resultado de dois ensaios independentes (um em triplicata e o outro em duplicata) revelaram alta afinidade entre a Occidentalina-1202 e o sítio de ligação de glutamato (Figura 2), apresentando uma competição de quase 100% ainda nas menores concentrações do peptídeo.



**Figura 52.** Ensaio de competição entre o peptídeo Occidentalina-1202 e o neurotransmissor GABA marcado com trício. Os resultados indicam ausência de ação do peptídeo no modelo. Dados representando média  $\pm$  erro padrão da média de três ensaios independentes.



**Figura 53.** Ensaio de competição entre o peptídeo Occidentalina-1202 e o neurotransmissor glutamato marcado

com trício. Os resultados indicam que há competição entre o peptídeo e o neurotransmissor glutamato no modelo. Dados representando média  $\pm$  erro padrão da média de dois ensaios independentes.

## 5. Discussão

Apesar dos inúmeros FAEs atualmente disponíveis e dos esforços no desenvolvimento de novas terapias farmacológicas, um terço dos pacientes com epilepsia permanecem resistentes ao tratamento (Golyala and Kwan, 2017). Além disso, a quantidade substancial de efeitos adversos associados a essas terapias muitas vezes impossibilita sua aplicação clínica (Löscher et al., 2013). Em vista do exposto, é de suma importância que novas terapias, mais eficazes e com menos efeitos adversos associados, sejam desenvolvidas para o combate da ER (Römermann et al., 2015).

Nesse contexto, as peçonhas de animais ganharam destaque nos últimos anos no desenvolvimento de novos fármacos para doenças neurológicas, incluindo a Epilepsia. Dentre estas peçonhas, a de artrópodes – particularmente – é bastante estudada devido às moléculas neuroativas presentes em sua composição, possuindo um grande potencial terapêutico no desenvolvimento de novos tratamentos para condições do SNC (Silva et al., 2015).

Desta forma, o peptídeo Occidentalina-1202 surgiu como uma das alternativas potenciais no tratamento de ER, sendo altamente eficaz e não exibindo efeitos tóxicos nos modelos agudo e crônico de ELT. Assim, tendo em vista o potencial da Occ-1202 como ferramenta de estudos e tratamento da ER, a investigação de sua segurança farmacológica, toxicidade e elucidação de seus possíveis alvos farmacológicos torna-se essencial e foi foco da presente pesquisa.

Nesse contexto, o presente estudo acessou a toxicidade do peptídeo Occidentalina-1202 em camundongos Swiss *Mus musculus* (machos e fêmeas) saudáveis, a fim de se elucidar sua segurança farmacológica e efeitos adversos. Ainda, os possíveis alvos farmacológicos do peptídeo também foram investigados por meio de ensaios de competição com os neurotransmissores GABA e glutamato. A escolha das doses de administração da Occ-1202 se deu com base em sua dose terapêutica (4 mg/kg), estabelecendo-se uma margem de até 10x a dose de tratamento, tanto com base em dados descritos em testes de toxicidade de FAEs, como de peptídeos utilizados no tratamento de epilepsia e de outras doenças.

O estabelecimento do uso dos protocolos utilizados para as investigações neste estudo foi feito com base no “guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” da ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária, 2013). Esse guia é aceito no Brasil para a condução de estudos pré-clínicos, estabelecendo os aspectos a serem avaliados na condução do estudo. Ainda, as exigências estabelecidas neste guia encontram-se em conformidade com as exigências para condução de estudos pré-clínicos estabelecidas por outros órgãos estrangeiros, como o *Federal Drug Administration (FDA)* dos Estados Unidos (FDA, 2023) e com *EMA (European Medicines Agency)* da Europa (EMA, 2023).

Desta forma, na avaliação da toxicidade, foram empregados dois protocolos: protocolo de administração de dose única e protocolo de administração de doses repetidas. No PADU (14 dias) os animais foram tratados apenas uma vez, no primeiro dia, e observado nos demais. No PADR a administração dos tratamentos se deu diariamente durante 28-30 dias do modelo. Ademais, além dos grupos controle (Veículo e DZP), foram estabelecidos grupos de três doses distintas do peptídeo (4, 20 e 40 mg/kg). Assim, o estudo atendeu às conformidades estabelecidas no guia da ANVISA no que diz respeito aos estudos de toxicidade de dose aguda e de doses repetidas (Agência de Vigilância Sanitária, 2013).

Durante o período de observação dos modelos, os animais tiveram sua massa corporal avaliada diariamente, bem como surgimento de possíveis alterações fisiológicas para investigar a possível toxicidade dos tratamentos. Em ambos os modelos, os animais apresentaram integridade fisiológica e aspecto saudável em todos os grupos de tratamento (veículo, DZP, Occ-1202 4 mg/kg, Occ-1202 20 mg/kg e Occ-1202 40 mg/kg) durante o período de observação, não havendo distinção entre os grupos controle e os grupos tratados com o peptídeo. Todos os grupos apresentaram ganho de massa corporal considerado normal, sem distinção entre os tratamentos, em ambos os modelos e sexos, como é esperado e observado em animais saudáveis (Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas, disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/cebio/camundongo-swiss/>).

Para se avaliar a toxicidade do peptídeo no organismo dos animais, ao final do período de observação dos modelos os animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros, fígados, pulmões e rins removidos para análises. Os órgãos tiveram sua massa e volume medidos e aspecto fisiológico geral inspecionado.

A Occidenalina-1202, na dose terapêuticas (4 mg/kg), foi bem tolerada, tendo em vista que não induziu efeitos de alteração no comportamento geral espontâneo e nem nos parâmetros fisiológicos dos animais, como o ganho de massa e massa dos órgãos. Ademais, foi constatado que a dose terapêutica apresentou um aumento do volume dos pulmões nas fêmeas do PADU. Esta alteração necessita de mais investigações, tendo em vista que pode ter ocorrido em decorrência da variabilidade na execução técnica para inflar os pulmões, dado que o mesmo não foi observado no PADR e nem nas doses mais altas do peptídeo.

Dentre as toxinas mais estudadas no controle de crises epilêpticas, a conotoxina, o CII9, o BmK AEP, e peptídeos extraídos das peçonhas de aranhas se destacam (Corona et al., 2003; Jackson and Scheideler, 1996; Pinheiro et al., 2006; Zhang et al., 2019). Estudos anteriores mostraram que o CII9, em sua dose de tratamento (7 ng via i.c.v) em ratos fez com que os animais exibissem sonolência e sedação 5-8 minutos após a administração. Da mesma maneira, peçonhas de vespas também têm sido amplamente investigadas por seu potencial antiepilêptico. Estudos anteriores demonstraram que a peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis* foi capaz de proteger os animais contra crises induzidas pelos epilêpticos padrões bicuculina, picrotoxina e ácido caínico, apresentando DL50 de 0,08 mg/animal (via i.c.v.) (Siqueira Cunha et al., 2005).

Nas doses de 20 e 40 mg/kg, também houve uma boa tolerância do peptídeo, considerando-se que não foram observadas alteração no comportamento geral espontâneo dos animais e nem nos parâmetros fisiológicos, como o ganho de massa corporal e massa e volume dos órgãos.

Com o intuito de se avaliar possíveis alterações histopatológicas causadas pelo peptídeo Occ-1202, a coloração de H.E. foi empregada em todos os órgãos coletados para análise morfológica. Essas análises demonstraram que não foram produzidas alterações morfológicas nos tecidos, nas diferentes doses de tratamento, quando comparados ao grupo veículo, apontando para a segurança do peptídeo, principalmente em sua dose terapêutica (4 mg/kg).

No entanto, apesar de não terem sido constatadas diferenças na análise das lâminas histopatológicas, foram observadas alterações morfológicas macroscópicas nos fígados dos animais que receberam tratamento com a dose intermediária (20 mg/kg) e mais alta (40 mg/kg) do peptídeo no PADR, sendo identificado que estas alterações aparentemente se tratavam de neoplasias de caráter lipídico (lipomas). Contudo, tendo em vista que o método empregado para



montagem das lâminas histológicas foi a coloração de H.E., e que as lâminas foram submetidas a imersões sucessivas em álcool (50-100%) e xilol, provavelmente houve uma dissolução deste conteúdo lipídico pelos reagentes empregados durante a montagem, portanto as alterações não foram possíveis de serem identificadas em análise histopatológica posterior.

Ainda, apesar das análises morfológicas dos fígados terem apresentado alterações nas doses mais altas de administração do peptídeo (20 e 40 mg/kg), a distância dessas doses para a dose terapêutica (4 mg/kg) sugere uma janela de segurança farmacológica considerável do peptídeo (IT>10).

Para se avaliar o desempenho motor e atividade espontânea dos animais, foi empregado – em ambos os modelos – o ensaio comportamental do Campo aberto (Open Field). Este teste foi utilizado para acessar a atividade geral espontânea dos animais ao longo dos dias de tratamento (1º dia no PADU, e 1º, 14º e 28º dias no PADR). O Open Field é um teste amplamente utilizado na avaliação de alterações motoras e do comportamento geral espontâneo nos animais em diversos modelos animais validados (Gould et al., 2009). Este teste é empregado para investigar se os animais apresentam alterações comportamentais. Nesse contexto, foram analisados cinco parâmetros comportamentais no teste de Open Field: o deslocamento total dos animais na arena, o tempo total que os animais estiveram imóveis, o tempo total que os animais realizaram autolimpeza, o tempo total que os animais realizaram elevação e o de exploração, a distância percorrida, a elevação e a autolimpeza (Gould et al., 2009). Desta forma, o peptídeo não apresentou diferença quando comparado ao veículo em nenhum dos parâmetros avaliados, em todas doses testadas.

Existem vários fatores de risco associados a falha no controle das crises epiléticas, acabando por impactar grandemente a vida dos pacientes. Dentre esses fatores, os danos corporais, hospitalizações constantes, expectativa de vida reduzida, comprometimentos neuropsicológicos, psiquiátricos e sociais podem ser mencionados. Ademais, é válido ressaltar que estes fatores não estão relacionados apenas à doença, mas também à vasta gama de efeitos adversos comumente associados aos FAEs utilizados, prejudicando consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes (French, 2007; Gao et al., 2015; Laxer et al., 2014).

Dentre os principais FAEs utilizados como intervenção na ER, destacam-se: diazepam, carbamazepina, etossuximida, fenobarbital, fenitoína, levetiracetam e ácido valproico (Dhaliwal et. al, 2023; Golyala and Kwan, 2017). Entretanto, apesar da disponibilidade e

desenvolvimento contínuo de novos FAEs, estas terapias fornecem apenas alívio sintomático, não sendo capazes de impedir a progressão da doença, ou de promover a neuro-regeneração. Além disso, o tratamento com FAEs está comumente associado a efeitos adversos variados, muitas vezes severos e recorrentes, impactando negativamente na qualidade de vida dos pacientes (Hauser et al., 2018; Macleod and Appleton, 2007). Estudos anteriores mostraram que, dentre os pacientes com epilepsia que fazem uso de FAEs, cerca de 88% apresentava pelo menos um efeito adverso (Perucca et al., 2009), podendo variar entre: letargia, tontura, comprometimento comportamental e cognitivo, confusão mental, alergias, hipersensibilidade, atrofia cerebelar, disfunção retiniana, linfoma, efeitos cardiovasculares, aceleração de doenças vasculares, prejuízos na memória, disfunções no SNC, tremores, fadiga, osteoporose, depressão, efeitos psicotrópicos, náuseas, sintomas gastrointestinais, alterações de peso, óbito por falência hepática e anemia aplástica (Carpay et al., 2005; Luoni et al., 2011; Perucca et al., 2009).

Ademais, estudos anteriores mostram que o impacto econômico nas famílias de pacientes com epilepsia, bem como no governo, relacionados ao tratamento médico para combate de efeitos adversos causados por FAEs é significativo e extremamente alto, demonstrando que o controle dos efeitos adversos se torna tão importante quanto o controle das crises no tratamento da epilepsia (De Kinderen et al., 2014).

O fármaco Diazepam, em sua dose terapêutica, foi escolhido como controle positivo devido à sua via de administração ser comparável (injetável, não oral), por ser bastante utilizado na prática clínica e por possuir perfil farmacológico conhecido (Mandelli et al., 1978), tendo em vista que outros FAEs disponíveis podem não apresentar eficiência no controle de crises e não possuir perfis farmacocinético e farmacodinâmico bem elucidados, o que tornaria a comparação inviável.

O tratamento com o Diazepam não produziu alterações no ganho de massa corporal dos animais ao longo do período dos modelos agudo e crônico, na massa dos órgãos dos animais e nos parâmetros histopatológicos avaliados. Contudo, nas fêmeas do PADR, o grupo DZP apresentou volume do rim maior quando comparado ao grupo veículo. Esta observação aponta para uma possível toxicidade renal causada pelo composto no PADR. Ainda, é válido ressaltar que o Diazepam não foi diluído em 20% de DMSO como os demais tratamentos, tendo em vista que o composto já possuía outros diluentes em sua ampola original.

Nas análises do teste de Campo Aberto, o grupo tratado com Diazepam apresentou período imóvel consideravelmente maior do que os demais tratamentos no PADU, nas fêmeas, e no PADR em ambos os sexos – em todos os *Open Fields* nos machos e no *Open Field I* nas fêmeas. Ademais, no PADU, o grupo DZP apresentou tempo de elevação consideravelmente menor com relação a todos os tratamentos (exceto a maior dose do peptídeo) nos machos e com relação ao veículo, nas fêmeas. O mesmo foi observado no tempo de exploração dos animais, que foi consideravelmente menor no grupo tratado com o DZP no PADU, em ambos os sexos, com relação aos demais tratamentos (exceto grupo veículo fêmeas); e no PADR com relação a todos os tratamentos (exceto para os machos: veículo no OF1, e para as fêmeas: veículo e Occ-1202 4 mg/kg no OF2; e Occ-1202 20 mg/kg e 40 mg/kg no OF3).

Estas diferenças observadas nos comportamentos espontâneos dos animais tratados com Diazepam é consistente com o descrito na literatura, tendo em vista que a administração de Diazepam em doses terapêuticas acarreta, dentre seus efeitos, em sedação (Dhaliwal et al., 2023; Costa et al., 1978). Estudos anteriores apontaram para um deslocamento total e autolimpeza reduzidos em animais tratados com diferentes doses de Diazepam, bem como sinais de sedação causados pelo composto nas maiores doses testadas (Birkett et al., 2011; Carola et al., 2002; Crawley, 1985; Pádua-Reis et al., 2021). Portanto, é esperado que os animais tratados com este composto apresentem um tempo maior de imobilidade, bem como tempos menores de elevação e exploração quando comparado aos demais grupos.

Adicionalmente, vale mencionar que o teste de campo aberto (*Open Field*) é um teste de alta variabilidade, tendo em vista que o mesmo acessa a atividade geral espontânea dos animais. Desta forma, é pertinente que mais testes sejam realizados com um número amostral maior a fim de se diminuir a variabilidade intrínseca deste ensaio comportamental.

Diversos efeitos adversos já foram relatados sobre o Diazepam, podendo-se citar: sedação, fadiga, confusão, amnésia anterógrada, depressão, ataxia, irritabilidade, desinibição, reações no local de administração, dores de cabeça, tremores, distonia, retenção urinária, incontinência, náuseas, constipação, diplopia, alterações na libido, erupções cutâneas, alterações no ciclo menstrual e elevação dos níveis de AST e ALT (Olson, 2007).

Ainda, o índice terapêutico (toxicidade/dose terapêutica - IT) dos benzodiazepínicos tende a ser alto. Estudos anteriores demonstraram que a administração de Diazepam, em via oral, de doses que variaram entre 15-20 vezes a dose terapêutica do composto não apresentaram morte

por overdose, no entanto, paradas cardiorrespiratórias já foram reportadas após administração intravenosa rápida de benzodiazepínicos (Olson, 2007).

Em estudos de toxicidade e segurança farmacológica, um parâmetro essencial é a avaliação da hematotoxicidade, realizada através da análise do sangue periférico, obtida por meio de hemograma completo, bem como em análises bioquímicas (Bloom and Brandt, 2008). Desta forma, foram realizados testes bioquímicos e de hemograma em animais do PADR.

Nos testes bioquímicos foram avaliados os níveis de ALT, AST, Ureia e Creatinina entre os grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas, não sendo observadas alterações entre os diferentes tratamentos. No entanto, quando comparados com valores de referência da literatura (Castello Branco, 2011; LIMA, 2018; Santos et al., 2016), alguns dados apresentaram valores destoantes.

Quanto aos parâmetros bioquímicos observados no estudo, a dose terapêutica do peptídeo (4 mg/kg) apresentou alterações apenas nos níveis de creatinina, sendo inferiores aos valores de referência. No entanto, estas alterações foram observadas uniformemente em todos os grupos, não sendo possível atribuí-la à administração do peptídeo. Ademais, a dose terapêutica apresentou níveis elevados de monócitos, quando comparada aos valores de referência, nos machos; e valores elevados de: leucócitos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas, quando comparados aos valores de referência, nas fêmeas. Contudo, o número amostral na realização do teste de hemograma foi de apenas um animal por grupo. Desta forma, estes valores não são estatisticamente significativos.

Ademais, nas doses mais altas do peptídeo, apenas o grupo Occ-1202 20 mg/kg fêmeas apresentou valores diferentes (maiores), nos níveis de ALT, quando comparados aos dados de referência, e ambos apresentaram níveis de creatinina inferiores, como descrito anteriormente.

No grupo tratado com Diazepam, foi observado que os níveis de AST estavam menores do que os valores de referência, nos machos. Os valores de creatinina também estavam mais baixos do que os dados de referência, como descrito anteriormente. No hemograma realizado nas fêmeas, o animal tratado com Diazepam apresentou níveis de hemoglobina, leucócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas elevados quando comparado aos valores de referência.

A Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima de extravasamento presente especificamente no citoplasma dos hepatócitos. Alterações nos níveis de ALT indicam mal

funcionamento hepático. A enzima Aspartato aminotransferase (AST) também é uma enzima de extravasamento, parte se encontra livre no citoplasma de hepatócitos, com uma maior concentração nas membranas das mitocôndrias, mas também está presente em diversos tecidos, como células do músculo cardíaco, esquelético e fígado. Desta forma, os testes realizados para identificar os níveis desta enzima são utilizados no diagnóstico de doenças musculares (Hall and Cash, 2012).

A Ureia, sintetizada pelo fígado, representa o principal produto final do catabolismo proteico, sendo excretada majoritariamente pelos rins. Os glomérulos são responsáveis pela filtração da ureia do plasma. Assim, sob condições normais, cerca de 25 a 40% da ureia filtrada é reabsorvida na sua passagem pelos túbulos renais. Velocidades de fluxo urinário maiores do que o normal acarreta na diminuição da reabsorção tubular de ureia; de forma semelhante, a diminuição da velocidade do fluxo urinário amplifica sua reabsorção nos túbulos renais. Ainda, os níveis de ureia podem ser afetados por fatores fisiológicos ou doenças de origem não-renal (Sodré et al., 2007).

A creatinina é uma substância encontrada no sangue e produzida pelos músculos como um produto do metabolismo da fosfocreatina, uma proteína obtida mediante ao consumo dos alimentos. A utilização da fosfocreatina pelos músculos para obtenção de energia resulta no transporte de creatinina na corrente sanguínea até os rins, sendo eliminada pela urina. Assim, a quantidade de creatinina no sangue permite avaliar a função renal. Níveis altos de creatinina apontam para um funcionamento renal comprometido; em contrapartida, níveis baixos podem sugerir quadros de desnutrição ou perda de massa magra, além de alterações hepáticas (Sodré et al., 2007).

No que diz respeito às análises dos parâmetros bioquímicos realizadas entre os grupos, é importante ressaltar que o número amostral de cada grupo foi pequeno em decorrência de problemas ocorridos com laboratório de análises de sangue utilizado no início do estudo. Pelo mesmo motivo não foi possível realizar as análises hematológicas nos animais do PADU.

Ainda, apesar dos valores de referência presentes na literatura, não é possível realizar uma comparação robusta e significativa com os mesmos, uma vez que cada laboratório ou biotério deve estabelecer seus próprios valores de referência dos animais saudáveis, tendo em vista as variações decorrentes de equipamento utilizado, metodologia empregada, linhagem, gênero e idade de cada espécie, que influenciam diretamente nos dados obtidos (Dantas et al., 2006).

Portanto, as comparações com os valores de referência realizadas neste estudo foram feitas apenas para fins informativos, levando-se em consideração que os dados de referência não foram obtidos do biotério da Universidade de Brasília.

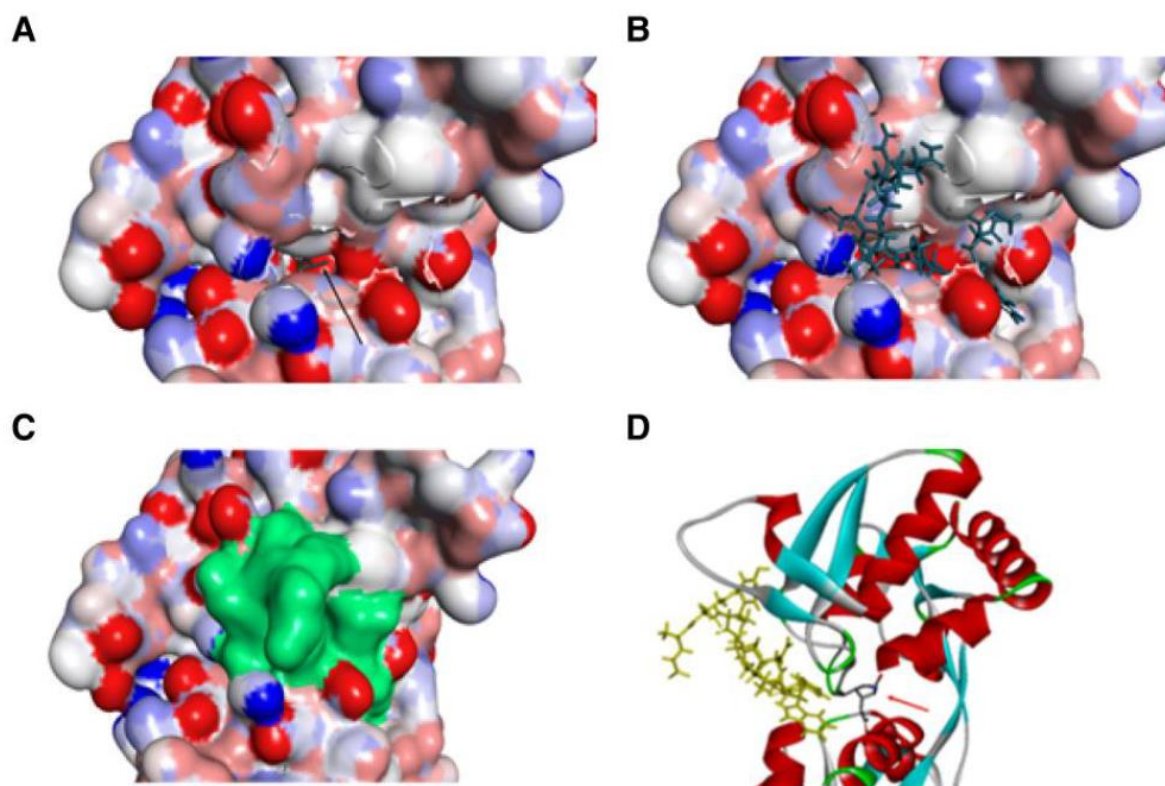
Desta forma, a avaliação dos parâmetros hematológicos neste estudo, em comparação com o grupo controle, não apresentou alterações significativas em nenhum dos componentes após administração do peptídeo, demonstrando que a Occidentalina-1202 não causa hemotoxicidade detectável nesse experimento.

Tendo em vista que a Occidentalina-120 apresentou potente efeito antiepilético em modelos agudo e crônico de crises epiléticas em estudos anteriores, é esperado que seus possíveis mecanismos de ação estejam relacionados com a modulação excitatória ou inibitória no SNC. Diversos FAEs atuam por meio da alteração da excitabilidade celular, modulando a neurotransmissão glutamatérgica ou GABAérgica (Rogawski and Löscher, 2004).

Nesse sentido, foram realizados ensaios de competição com os neurotransmissores GABA e Glutamato marcados com trício, um isótopo radioativo de hidrogênio, a fim de se avaliar a competição entre a Occidentalina-1202 e os respectivos neurotransmissores. As análises indicaram não haver competição entre o peptídeo e o neurotransmissor GABA. Ainda, os resultados apontaram para uma alta afinidade entre a Occidentalina-1202 e o sítio de ligação de glutamato, apresentando uma competição de quase 100% ainda nas menores concentrações do peptídeo.

Estes resultados sugerem que a Occidentalina-1202 exerce, dentre seus possíveis mecanismos de ação, um antagonismo em receptores glutamatérgicos. Estes dados são consistentes com os obtidos em estudos anteriores, em modelos computacionais, em que a Occidentalina-1202 promove bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo Cainato (Figura 54) (Mortari et al., 2023). É importante ressaltar, no entanto, 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 apresentem baixa densidade cortical (como receptores metabotrópicos), podem ter sua ligação camuflada nesse ensaio. Desta forma, não é possível afirmar em qual receptor este antagonismo é exercido. Da mesma maneira, como não há discriminação entre os tipos de receptores, também não é possível excluir a ação da Occidentalina-1202 em algum sítio

de ligação de receptores GABAérgicos – ou em outros subtipos de receptores -, diferentes de onde a ligação do neurotransmissor glutamato ocorre.



**Figura 54.** Sítio de ligação no receptor Cainato (GluR6). (A) Cainato no sítio de ligação (seta indica a posição). (B) Occidentalina-1202 bloqueando a entrada do receptor. (C) Occidentalina-1202 com a superfície destacada, indicando o bloqueio total do sítio de ligação. (D) Occidentalina-1202 (amarelo) não ocupa o mesmo sítio de ligação do que o Cainato (seta indica a posição) no receptor GluR6. Imagem retirada de Mortari et al., 2023.

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o peptídeo Occidentalina-1202 é seguro para ser utilizado como tratamento em sua dose terapêutica (4 mg/kg), não apresentando impactos fisiológicos, cognitivos, motores ou, ainda, histopatológicos negativos nos animais, tanto no PADU, quanto no PADR, em ambos os sexos. Além disso, apesar das análises morfológicas dos fígados terem apresentado alterações nas doses mais altas de administração do peptídeo (20 e 40 mg/kg), a distância dessas doses para a dose terapêutica (4 mg/kg) sugere uma janela de segurança farmacológica considerável do peptídeo.

Ademais, a Occidentalina-1202 apresentou interação em receptores glutamatérgicos, promovendo assim diminuição da neurotransmissão excitatória. Estes dados apontam para um mecanismo de ação consistente com seu efeito neuroprotetor e antiepilético.

Nesse contexto, estudos adicionais devem ser conduzidos para se avaliar a hematotoxicidade do peptídeo Occidentalina-1202 com maior robustez, em um número maior de animais – e também em PADU -, bem como para realizar a investigação de outros parâmetros necessários na determinação da toxicidade de um composto, como testes de genotoxicidade. Adicionalmente, novos testes, empregando técnicas histológicas adequadas, devem ser realizados para investigação das alterações observadas nos fígados dos animais que receberam as maiores doses do peptídeo.

Por fim, é necessário que haja mais investigações no que diz respeito ao mecanismo de ação da Occidentalina-1202, tanto para se identificar os receptores específicos nos quais o peptídeo exerce sua função farmacológica, quanto para se determinar uma curva de competição completa.

## **7. Referências Bibliográficas**

Abou-Khalil, B.W., 2016. Antiepileptic drugs. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 22, 132–156.

<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000289>

Agência de Vigilância Sanitária, 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Anvisa 1–48.

Asadi-Pooya, A.A., Rostami, C., 2017. History of surgery for temporal lobe epilepsy.

*Epilepsy Behav.* 70, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.02.020>

Beleza, P., 2009. Refractory epilepsy: A clinically oriented review. *Eur. Neurol.* 62, 65–71.

<https://doi.org/10.1159/000222775>

Beraud, E., Chandy, K.G., 2011. Therapeutic potential of peptide toxins that target ion channels. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* 10, 322–342.

<https://doi.org/10.2174/187152811797200696>

Birkett, M.A., Shinday, N.M., Kessler, E.J., Meyer, J.S., Ritchie, S., Rowlett, J.K., 2011.

Acute anxiogenic-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors are attenuated by the benzodiazepine diazepam in BALB/c mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98, 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.03.006>



- Boon, P., De Cock, E., Mertens, A., Trinka, E., 2018. Neurostimulation for drug-resistant epilepsy: a systematic review of clinical evidence for efficacy, safety, contraindications and predictors for response. *Curr. Opin. Neurol.* 31, 198–210.  
<https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000534>
- Brodie, M.J., Mintzer, S., Pack, A.M., Gidal, B.E., Vecht, C.J., Schmidt, D., 2013. Enzyme induction with antiepileptic drugs: Cause for concern? *Epilepsia* 54, 11–27.  
<https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2012.03671.X>
- Campos, G.A.A., 2020. Investigação do mecanismo de ação e do alvo farmacológico do peptídeo neuroprotetor Neurovespina.
- Cardenal-Muñoz, E., Auvin, S., Villanueva, V., Cross, J.H., Zuberi, S.M., Lagae, L., Aibar, J.Á., 2022. Guidance on Dravet syndrome from infant to adult care: Road map for treatment planning in Europe. *Epilepsia Open* 7, 11–26.  
<https://doi.org/10.1002/EPI4.12569>
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P., 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 134, 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Carpay, J.A., Aldenkamp, A.P., van Donselaar, C.A., 2005. Complaints associated with the use of antiepileptic drugs: Results from a community-based study. *Seizure* 14, 198–206.  
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2005.01.008>
- Castello Branco, A.C. da S., 2011. Parâmetros Bioquímicos E Hematológicos De Ratos Wistar E Camundongos Swiss Do Biotério Professor Thomas George. *Rev. Bras. Ciências da Saúde* 15, 209–214. <https://doi.org/10.4034/rbcs/2011.15.02.11>
- Corona, M., Coronas, F. V., Merino, E., Becerril, B., Gutiérrez, R., Rebolledo-Antunez, S., Garcia, D.E., Possani, L.D., 2003. A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1649, 58–67.  
[https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00155-9)
- Costa, E., Guidotti, A., Toffano, G., 1978. Molecular mechanisms mediating the action of

- diazepam on GABA receptors. *Br. J. Psychiatry* 133, 239–248.  
<https://doi.org/10.1192/bjp.133.3.239>
- Crawley, J.N., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 37–44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2)
- Cuadrado, A., De las Cuevas, I., Valdizán, E.M., Armijo, J.A., 2002. Synergistic interaction between valproate and lamotrigine against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylentetrazole in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 453, 43–52.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02341-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02341-5)
- Dalic, L., Cook, M.J., 2016. Managing drug-resistant epilepsy : challenges and solutions 2605–2616.
- Dalkilic, E.B., 2017. Neurostimulation Devices Used in Treatment of Epilepsy. *Curr. Treat. Options Neurol.* 2017 192 19, 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11940-017-0442-9>
- Dantas, J.A., Ambiel, C.R., Cuman, R.K.N., Baroni, S., Bersani-Amado, C.A., 2006. Reference values of some physiological parameters in the rats of the Central Biotery at the State University of Maringá State of Paraná. *Acta Sci. - Heal. Sci.* 28, 165–170.
- De Kinderen, R.J.A., Evers, S.M.A.A., Rinkens, R., Postulart, D., Vader, C.I., Majoie, M.H.J.M., Aldenkamp, A.P., 2014. Side-effects of antiepileptic drugs: The economic burden. *Seizure* 23, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.11.009>
- Deckers, C.L.P., Czuczwar, S.J., Hekster, Y.A., Kewser, A., Kubova, H., Meinardi, H., Patsalos, P.N., Renier, W.O., Van Rijn, C.M., 2000. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia* 41, 1364–1374. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.2000.TB00111.X>
- Do Couto, L., Dos Anjos, L., Araujo, M.D.A.F., Mourão, C., Schwartz, C., Ferreira, L., Mortari, M.R., 2012. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacogn. Mag.* 8, 292–299. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.103657>
- Dohtsu, K., Okumura, K., Hagiwara, K., Palma, M.S., Nakajima, T., 1993. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-

- vespidae). *Nat. Toxins* 1, 271–276. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010503>
- dos Anjos, L.C., 2017. 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 161.
- Dos Anjos, L.C., 2013. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 1–115.
- Emanuelli, T., Antunes, V.F., Souza, D.O.G., 1998. CHARACTERISATION OF L-[3H]GLUTAMATE BINDING TO FRESH AND FROZEN CRUDE PLASMA MEMBRANES ISOLATED FROM CEREBRAL CORTEX OF ADULT RATS. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 01, 89.
- Fattorusso, A., Matricardi, S., Mencaroni, E., Dell’Isola, G.B., Di Cara, G., Striano, P., Verrotti, A., 2021. The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existing and New Emerging Therapies. *Front. Neurol.* 12, 1030.  
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.674483/BIBTEX>
- Faught, E., Duh, M.S., Weiner, J.R., Guérin, A., Cunnington, M.C., 2008. Nonadherence to antiepileptic drugs and increased mortality: findings from the RANSOM Study. *Neurology* 71, 1572–1578. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000319693.10338.B9>
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014a. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014b. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482. <https://doi.org/10.1111/EPI.12550>
- Fisher, R.S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., 2005.

Response: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [4]. *Epilepsia* 46, 1701–1702.  
[https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00273\\_4.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00273_4.x)

Fonseca, M.S.M., Esposito, S.B., Silva, B.G., 2018. Percepções de pais sobre a epilepsia. *Rev. da Fac. Ciências Médicas Sorocaba* 20, 33. <https://doi.org/10.23925/1984-4840.2018v20i1a8>

French, J.A., 2007. Refractory epilepsy: Clinical overview. *Epilepsia* 48, 3–7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00992.x>

French, J.A., Gazzola, D.M., 2011. New generation antiepileptic drugs: What do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Ther. Adv. Drug Saf.* 2, 141–158.  
<https://doi.org/10.1177/2042098611411127>

Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J., Shi, Q., 2017. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins (Basel)*. 9, 1–17.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9120397>

Gao, L., Xia, L., Pan, S.Q., Xiong, T., Li, S.C., 2015. Burden of epilepsy: a prevalence-based cost of illness study of direct, indirect and intangible costs for epilepsy. *Epilepsy Res.* 110, 146–156. <https://doi.org/10.1016/J.EPILEPSYRES.2014.12.001>

Golyala, A., Kwan, P., 2017. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. *Seizure - Eur. J. Epilepsy* 44, 147–156.  
<https://doi.org/10.1016/J.SEIZURE.2016.11.022>

Gomes, F.M.M., 2016. AVALIAÇÃO ANTIEPILEPTICA DO PEPTÍDEO NEUROPOLYBINA NO MODELO CRÔNICO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS.

Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E., 2009. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* 42, 1–20. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>

Hall, P., Cash, J., 2012. What is the real function of the liver “function” tests?: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. *Ulster Med. J.* 81, 30–36.

Hauser, R.M., Henshall, D.C., Lubin, F.D., 2018. The Epigenetics of Epilepsy and Its

- Progression. *Neuroscientist* 24, 186–200. <https://doi.org/10.1177/1073858417705840>
- Hu, Q., Zhang, F., Teng, W., Hao, F., Zhang, J., Yin, M., Wang, N., 2018. Efficacy and safety of antiepileptic drugs for refractory partial-onset epilepsy: a network meta-analysis. *J. Neurol.* 265. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8621-x>
- Jackson, H., Scheideler, M., 1996. Behavioural and anticonvulsant effects of Ca<sup>2+</sup> channel toxins in DBA / 2 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 126, 85–90.
- Janowsky, A., Neve, K., Eshleman, A.J., 1998. Uptake and Release of Neurotransmitters. *Curr. Protoc. Neurosci.* 2, 1–22. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0709s02>
- Koristkova, B., Grundmann, M., Brozmanova, H., Kacirova, I., 2019. Lamotrigine drug interactions in combination therapy and the influence of therapeutic drug monitoring on clinical outcomes in paediatric patients. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 125, 26–33. <https://doi.org/10.1111/BCPT.13203>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Hauser, W.A., Mathern, G., Moshé, S.L., Perucca, E., Wiebe, S., French, J., 2010. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 51, 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
- Kwan, P., Brodie, M.J., 2010. Definition of refractory epilepsy: defining the indefinable? *Lancet. Neurol.* 9, 27–29. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70304-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70304-7)
- Kwan, P., Brodie, M.J., 2006. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. *Expert Rev. Neurother.* 6, 397–406. <https://doi.org/10.1586/14737175.6.3.397>
- Kwan, P., Brodie, M.J., 2005. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 46, 224–235. <https://doi.org/10.1111/J.0013-9580.2005.31904.X>
- Kwan, P., Sander, J.W., 2004. The natural history of epilepsy: An epidemiological view. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1376–1381. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.045690>
- Kwan, P.K.L., 2000. Refractory Epilepsy: Natural History and Pathogenesis.
- LaPenna, P., Tormoehlen, L.M., 2017. The Pharmacology and Toxicology of Third-

Generation Anticonvulsant Drugs. *J. Med. Toxicol.* 13, 329–342.

<https://doi.org/10.1007/s13181-017-0626-4>

Laxer, K.D., Trinka, E., Hirsch, L.J., Cendes, F., Langfitt, J., Delanty, N., Resnick, T., Benbadis, S.R., 2014. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav.* 37, 59–70. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2014.05.031>

LIMA, F.E.G. DE, 2018. PERFIL BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO DE RATOS E CAMUNDONGOS DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ 1–26.

Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D., 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 757–776. <https://doi.org/10.1038/nrd4126>

Löscher, W., Potschka, H., 2002. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 7–14. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.1.7>

Loup, F., Wieser, H.G., Yonekawa, Y., Aguzzi, A., Fritschy, J.M., 2000. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 20, 5401–5419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05401.2000>

Luoni, C., Bisulli, F., Canevini, M.P., De Sarro, G., Fattore, C., Galimberti, C.A., Gatti, G., La Neve, A., Muscas, G., Specchio, L.M., Striano, S., Perucca, E., 2011. Determinants of health-related quality of life in pharmacoresistant epilepsy: Results from a large multicenter study of consecutively enrolled patients using validated quantitative assessments. *Epilepsia* 52, 2181–2191. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03325.x>

Łuszczki, J.J., 2009. Third-generation antiepileptic drugs: Mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Reports* 61, 197–216. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70024-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70024-6)

Macleod, S., Appleton, R.E., 2007. The new antiepileptic drugs. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 92. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.106880>

- Mandelli, M., Tognoni, G., Garattini, S., 1978. Clinical Pharmacokinetics of Diazepam. *Clin. Pharmacokinet.* 3, 72–91. <https://doi.org/10.2165/00003088-197803010-00005>
- Mortari, M.R., Cunha, A.O.S., Dos Anjos, L.C., Amaral, H.O., Quintanilha, M.V.T., Gelfuso, E.A., Homem-De-Mello, M., De Almeida, H., Rego, S., Maigret, B., Lopes, N.P., Dos Santos, W.F., 2023. A new class of peptides from wasp venom: a pathway to antiepileptic/neuroprotective drugs. *Brain Commun.* 5, 1–20. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad016>
- Pádua-Reis, M., Nôga, D.A., Tort, A.B.L., Blunder, M., 2021. Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice. *Sci. Rep.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88599-5>
- Patrick Kwan, M.D., Ph.D., Steven C. Schachter, M.D., and Martin J. Brodie, M.D., 2011. Drug-Resistant Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 919–926.
- Perucca, E., 2002. Overtreatment in epilepsy: adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res.* 52, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00182-1)
- Perucca, P., Carter, J., Vahle, V., Gilliam, F.G., 2009. Adverse antiepileptic drug effects: Toward a clinically and neurobiologically relevant taxonomy. *Neurology* 72, 1223–1229. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000345667.45642.61>
- Picot, M.C., Baldy-Moulinier, M., Daurès, J.P., Dujols, P., Crespel, A., 2008. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia* 49, 1230–1238. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2008.01579.X>
- Pinheiro, A.C.N., Gomez, R.S., Massensini, A.R., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A.M., Marco, L. De, Gomez, M. V., 2006. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem. Int.* 49, 543–547. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.04.009>
- Pisani, F., Oteri, G., Russo, M.F., Di Perri, R., Perucca, E., Richens, A., 1999. The efficacy of valproate-lamotrigine comedication in refractory complex partial seizures: evidence for a pharmacodynamic interaction. *Epilepsia* 40, 1141–1146. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1999.TB00832.X>

- Poolos, N.P., Castagna, C.E., Williams, S., Miller, A.B., Story, T.J., 2017. Association between antiepileptic drug dose and long-term response in patients with refractory epilepsy. *Epilepsy Behav.* 69, 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2016.10.010>
- Poolos, N.P., Warner, L.N., Humphreys, S.Z., Williams, S., 2012. Comparative efficacy of combination drug therapy in refractory epilepsy. *Neurology* 78, 62–68. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31823ED0DD>
- Remy, S., Gabriel, S., Urban, B.W., Dietrich, D., Lehmann, T.N., Elger, C.E., Heinemann, U., Beck, H., 2003. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann. Neurol.* 53, 469–479. <https://doi.org/10.1002/ANA.10473>
- Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 553–564. <https://doi.org/10.1038/nrn1430>
- Römermann, K., Bankstahl, J.P., Löscher, W., Bankstahl, M., 2015. Pilocarpine-induced convulsive activity is limited by multidrug transporters at the rodent blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 351–359. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.221952>
- Rosenow, F., Lüders, H., 2001. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain* 124, 1683–1700. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/124.9.1683>
- Santos, E.W., de Oliveira, D.C., Hastreiter, A., da Silva, G.B., Beltran, J.S. de O., Tsujita, M., Crisma, A.R., Neves, S.M.P., Fock, R.A., Borelli, P., 2016. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 138–145. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>
- Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.H., Zuberi, S.M., 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58, 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Schinkel, A.H., 1997. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* 8, 161–170. <https://doi.org/10.1006/SCBI.1997.0068>



- Schmidt, D., Löscher, W., 2005. Drug resistance in epilepsy: Putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 46, 858–877. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.54904.x>
- Sheikh, S.R., Kattan, M.W., Steinmetz, M., Singer, M.E., Udeh, B.L., Jehi, L., 2020. Cost-effectiveness of surgery for drug-resistant temporal lobe epilepsy in the US. *Neurology* 95, E1404–E1416. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010185>
- Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., dos Anjos, L., Campos, G., Arenas, C., Biolchi, A., Gonçalves, J., Galante, P., Campos, L., Mortari, M., 2015. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins (Basel)*. 7, 3179–3209. <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>
- Simasathien, T., Vadera, S., Najm, I., Gupta, A., Bingaman, W., Jehi, L., 2013. Improved outcomes with earlier surgery for intractable frontal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 73, 646–654. <https://doi.org/10.1002/ANA.23862>
- Simonato, M., Löscher, W., Cole, A.J., Dudek, F.E., Engel, J., Kaminski, R.M., Loeb, J.A., Scharfman, H., Staley, K.J., Velíšek, L., Klitgaard, H., 2012. Finding a better drug for epilepsy: Preclinical screening strategies and experimental trial design. *Epilepsia* 53, 1860–1867. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03541.x>
- Siqueira Cunha, A.O., Mortari, M.R., Oliveira, L., Gomes Carolino, R.O., Coutinho-Netto, J., Ferreira Dos Santos, W., 2005. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 141, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.05.004>
- Sodré, F.L., Costa, J.C.B., Lima, J.C.C., 2007. Avaliação da função e da lesão renal: Um desafio laboratorial. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 43, 329–337. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442007000500005>
- Sutula, T.P., 2004. Mechanisms of epilepsy progression: Current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res.* 60, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2004.07.001>

- Vajda, F.J.E., Eadie, M.J., 2014. The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs. *Epileptic Disord.* 16, 395–408. <https://doi.org/10.1684/epd.2014.0704>
- van Vliet, E.A., Aronica, E., Gorter, J.A., 2014. Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience* 277, 455–473. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.030>
- Wong, R.K.S., Ph, D., Bianchi, R., Chuang, S., Merlin, L.R., 2005. C U R R E N T R E V I E W I N B A S I C S C I E N C E Epileptogenesis : Distinct and 5, 63–68.
- Zhang, F., Wu, Y., Zou, X., Tang, Q., Zhao, F., Cao, Z., 2019. BmK AEP, an anti-epileptic peptide distinctly affects the gating of brain subtypes of voltage-gated sodium channels. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030729>

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo 1 – Declaração do CEUA


**Universidade de Brasília**  
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 04 de março de 2022.

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de ensino intitulado “**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE UM PEPTÍDEO ANTIEPILEPTICO BIOINSPIRADO DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS**”, SEI n.º 23106.125197/2021-49, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 168ª reunião ordinária, realizada em 16/02/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* / Swiss (140 machos e 140 fêmeas), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 01/5/2022 a 01/5/2027.

  
 Dra. Carina da Costa Krewer  
 Coordenadora da CEUA – UnB




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